Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

ANA CAROLINA PAGLIARONE

**Efeito da deficiência da molécula β_2 -integrina na
produção de mediadores lipídicos e na resposta imune
durante infecção experimental por
*Leishmania amazonensis***

Ribeirão Preto

2014

ANA CAROLINA PAGLIARONE

**Efeito da deficiência da molécula β_2 -integrina na
produção de mediadores lipídicos e na resposta imune
durante infecção experimental por
*Leishmania amazonensis***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para
obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica
e Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena
Faccioli.

Versão corrigida
(versão original disponível na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto)

Ribeirão Preto

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo de Publicação

Preparada pela Biblioteca do Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade
de Medicina da Universidade de São Paulo

Pagliarone, Ana Carolina

Efeito da deficiência da molécula β_2 -integrina na produção de mediadores lipídicos e na resposta imune durante infecção experimental por *Leishmania amazonensis*. Ribeirão Preto, 2014.

105p.

Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Faccioli, Lúcia Helena.

1. *Leishmania amazonensis*. 2. β_2 -integrinas 3. CD18. 4. Mediadores lipídicos
5. Leucotrienos 6. Prostaglandinas.

PAGLIARONE, AC. **Efeito da deficiência da molécula β_2 –integrina na produção de mediadores lipídicos e na resposta imune durante infecção experimental por *Leishmania amazonensis*.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Esta tese é especialmente dedicada aos meus pais
Célia e Oswaldo. Meus Verdadeiros Amigos por
toda vida, me ensinaram que a Fé e a Persistência
nos levam a lugares nunca antes imaginados... o
amor que tenho por vocês é o ingrediente principal
que me fortalece e me faz desenvolver tudo o que
tenho de melhor...

Á minha irmã Célia Elizandra: apesar da distância,
sempre a tenho no meu coração e nos meus
pensamentos...! Muito obrigada!

Agradecimentos

- ✓ A Deus, por sempre me abençoar ao longo de minha jornada, me tornando uma pessoa cada vez mais forte em meio às dificuldades....
- ✓ À Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, pela oportunidade para o ingresso em seu grupo de pesquisa. Muito obrigada por ampliar ainda mais o meu conhecimento científico!
- ✓ Ao Dr. Carlos Arterio Sorgi, pelo auxílio incondicional neste trabalho. Agradeço imensamente pelos ensinamentos, pela agradável convivência e por acreditar que tudo seria possível apesar de tantos desafios...
- ✓ Aos meus queridos companheiros (e ex-companheiros) do Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses (LIIP): Adriana S. Sarti, Bruno C. Trindade, Cláudia S. Bitencourt, Denise Sayuri, Elyara M. Soares, Francisco W.G.P. Silva, Gisele A. Locachevic, Gabriel Pietro, Karina F. Zoccal, Morgana K. B. Prado, Márcio Fronza, Patrícia A. de Assis, Priscilla A. T. Pereira, Rafael Sanchez, Rodrigo Scandiuizzi e Tânia Petta. Não tenho como agradecer o enorme auxílio que cada um de vocês me proporcionou e por todos (ou poucos) anos que convivemos ao longo de minha jornada... Agradeço pelos momentos de alegria e de dificuldade que tivemos juntos (afinal, vocês fizeram parte da minha “segunda casa”) e, apesar de serem muitas pessoas, cada um tem um cantinho no meu coração pela ótima convivência e por serem tão prestativos e pacientes comigo. Meu caminho seria muito mais difícil sem vocês... Muito obrigada! Foi realmente um prazer ter trabalhado com todos vocês!

✓ Aos meus queridos companheiros do LIME (Laboratório de Imunologia e Epigenética): Profa. Dra. Fabiani G. Frantz e seus alunos Cecília C. S. Rocha, Fabiana A. Zambuzi, Gabriel Toffoli, Leonardo J.G. de Lima, Luana S. Soares, Maira C. Cacemiro, Milena S. Espíndola e Taísa S. Araújo. Agradeço muito por serem sempre tão solícitos, atenciosos e ótimas companhias em todas as horas! Também guardo vocês em um cantinho especial do meu “coração elástico” (sempre cabe mais um). Obrigada por tudo!

✓ Às técnicas Alyne F. Galvão e Caroline Fontanari: sem palavras para agradecer por todo o trabalho que fizeram em meu auxílio para cumprir essa etapa tão importante para mim, sem me esquecer da agradável companhia!! Muito obrigada por tudo, de coração, vocês foram (e ainda são) demais!

✓ À profa. Dra. Simone Gusmão Ramos do Laboratório de Patologia Pulmonar da Faculdade de Medicina (FMRP-USP), por ter cedido gentilmente seu laboratório para o preparo dos tecidos para histologia. Também agradeço imensamente à Elaine Medeiros Floriano pelo preparo das lâminas para as análises histológicas, realizado sempre com muito carinho... muito obrigada!

✓ A todos os funcionários do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFRP-USP) pelo fornecimento e cuidado dos animais utilizados nos experimentos. Sem vocês este trabalho não teria como acontecer, muito obrigada!

✓ À Profa. Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana (Laboratório de Leishmanioses- Departamento de Parasitologia- Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP) e ao Prof. Dr. Dario S. Zamboni do Laboratório de Patogenicidade Microbiana e Imunidade Inata da Faculdade de Medicina (FMRP-USP) por terem cedido gentilmente a cepa de *Leishmania amazonensis* utilizada no desenvolvimento deste trabalho. Também gostaria de agradecer pelo auxílio dos alunos do Prof. Dario: Karoline, Alexandre e Djalma por esclarecerem muitas dúvidas sobre tudo o que foi novidade para mim neste trabalho. Muito obrigada por toda atenção que recebi de todos!

✓ À profa. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso e seus alunos: muito obrigada por todo o auxílio e atenção que recebi de vocês sempre que necessitei...

✓ À Ana Cristine, secretária do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina (FMRP-USP), por seu auxílio e dedicação aos alunos da pós-graduação por tantos anos.

✓ Ao apoio financeiro da CAPES e FAPESP para o desenvolvimento deste trabalho.

“Uma noite eu tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia com o Senhor,
e no céu , passavam cenas de minha vida.
Para cada cena que passava, percebi que
eram deixados dois pares de pegadas na areia:
um era meu e o outro do Senhor.

Quando a última cena da minha vida
passou diante de nós, olhei para trás,
para as pegadas na areia, e notei que muitas vezes,
no caminho da minha vida,
havia apenas um par de pegadas na areia.

Notei também que isso aconteceu
nos momentos mais difíceis e angustiantes da minha vida.
Isso aborreceu-me deveras e perguntei então ao meu Senhor:
- Senhor, tu não me disseste que, tendo eu resolvido te seguir,
tu andarias sempre comigo, em todo o caminho?

Contudo, notei que durante as maiores tribulações do meu viver,
havia apenas um par de pegadas na areia.

Não compreendo por que nas horas
em que eu mais necessitava de ti, tu me deixaste sozinho.

O Senhor me respondeu:
- Meu querido filho.

Jamais te deixaria nas horas de prova e de sofrimento.

Quando viste na areia, apenas um par de pegadas, eram as minhas.

Foi exatamente aí, que te carreguei nos braços.”

Mary Stevenson - Poema “Pegadas na Areia” (1936).

Lista de Abreviaturas

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

5-LO: enzima 5 lipoxigenase

5-HPETE: ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico

cPLA₂: fosfolipase A₂ citosólica (do inglês: *Cytosolic Phospholipase A₂*)

CR 1: receptor para complemento 1

CR 3 (= CD11b/CD18 ; MAC-1): receptor para complemento 3

CR4: receptor para complemento 4

COX-1: cicloxigenase-1

COX-2: cicloxigenase-2

CysLTS: cys-leucotrienos

Epac-1: do inglês: *Exchange Protein Activated by cAMP 1*

EPO: enzima eosinófilo peroxidase (do inglês: *Eosinophil Peroxidase*)

EPO: enzima eosinófilo peroxidase (do inglês: *Eosinophil Peroxidase*)

FLAP: proteína ativadora da enzima 5 lipoxigenase (do inglês: *5-Lipoxygenase- Activating Protein*)

FcγRII: receptor classe 2 para a porção Fc da Imunoglobulina G

GIPL: glicoinositolfosfolípídeo

GM-CSF: Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos e Macrófagos (do inglês : *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

gp63: glicoproteína 63

HBSS: solução balanceada de Hank (do inglês : *Hank's Balanced Salt Solution*)

HTAB: Hexadeciltrimetilamono bromido

IL-4: interleucina -4

IL-10: interleucina-10

IL-12: interleucina-12

IFN- γ : interferon gama

iNOS: óxido nítrico-sintase induzida

IP-10: proteína indutora de interferon-gama (do inglês: *Interferon-gamma Inducible Protein-10*)

JAK3: proteína janus quinase 3 (do inglês: *Janus Kinase 3*)

LCL: Leishmaniose Cutânea Localizada

LCD: Leishmaniose Cutânea Difusa

LMC: Leishmaniose Mucocutânea

LFA-1: integrina antígeno associado a função de linfócitos-1 (do inglês: *Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*)

LPS: lipopolissacarídeo

LPG: lipofosfoglicano

LTA₄: leucotrieno A₄

LTB₄: leucotrieno B₄

LTC₄: leucotrieno C₄

MCP-1 α : Proteína quimiotática de monócitos 1-alfa (do inglês: *Monocyte Chemotactic Protein-1 alpha*)

MHC: complexo principal de histocompatibilidade (do inglês: *Major Histocompatibility Complex*)

MPO: enzima mieloperoxidase

MMP-4: metaloproteinase de matriz 4 (do inglês: *Matriz Metalloproteinase-4*)

MIP-1 β : proteína inflamatória de macrófago-alfa (do inglês: *Macrophage Inflammatory Protein*).

NO: óxido nítrico (do inglês: *nitric oxide*)

NF- κ B: fator nuclear- kappa B (do inglês: *Nuclear Factor-Kappa B*)

Nlrp3: receptor do tipo *NOD-LIKE* 3

OVA: proteína ovalbumina

OPD: o-fenilenodiamina

PAF: fator de agregação de plaquetas (do inglês: *Platelet-Activating Factor*)

PGD₂: prostaglandina D₂

PGE₂: prostaglandina E₂

PKA: proteína quinase A (do inglês: *Protein Kinase A*)

PPG: proteofosfoglicano

Syk: tirosina quinase esplênica (do inglês: *Spleen Tyrosine Kinase*)

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês: *Tumor Necrosis Factor alpha*)

TGF- β : Fator de transformação do Crescimento-beta (do inglês: *Transforming Growth Factor Beta*)

VLA-4: do inglês: *Very Late Antigen -4*

WT: tipo selvagem (do inglês *Wild-Type*).

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	18
2. ABSTRACT	20
3. INTRODUÇÃO	23
3.1. LEISHMANIOSE.....	23
3.1.1. ASPECTOS GERAIS	23
3.1.2. RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	26
3.1.3. TRATAMENTOS	30
3.2. β_2 -INTEGRINAS NA INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIA</i>	31
3.3. EICOSANOIDES NA LEISHMANIOSE.....	34
3.4. RELAÇÃO ENTRE AS β_2 -INTEGRINAS E EICOSANOIDES	38
4. OBJETIVO	42
5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	44
6. MATERIAL E MÉTODOS	46
6.1. Animais.....	46
6.2. Cultivo do parasita.....	46
6.3. Infecção dos animais e avaliação do edema da pata.....	47
6.4. Quantificação da carga parasitária nas patas	48
6.5. Análise histopatológica das patas	49
6.6. Quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO).....	49
6.7. Quantificação da enzima eosinófilo peroxidase (EPO).....	50
6.8. Quantificação de citocinas, quimiocinas e de eicosanoides	52
6.9. Produção de NO	52
6.10. Análise Estatística	53
7. RESULTADOS	55

7.1. Deficiência de CD18 favorece o edema e a carga parasitária nas patas dos animais infectados por <i>L. amazonensis</i>	55
7.2. Análise histopatológica das patas dos animais infectados com <i>L. amazonensis</i>	57
7.3. Avaliação da presença de neutrófilos e eosinófilos no tecido das patas infectadas com <i>L. amazonensis</i>	59
7.4 Quantificação de Óxido Nítrico (NO)	62
7.5. Quantificação da produção de eicosanoides	64
7.6 Produção de citocinas nas patas	67
7.7 Produção de quimiocinas nas patas	72
8. DISCUSSÃO	75
9. CONCLUSÃO.....	88
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1. RESUMO

Pagliarone, AC. Efeito da deficiência da molécula β_2 -integrina na produção de mediadores lipídicos e na resposta imune durante infecção experimental por *Leishmania amazonensis* [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2014, 105 f.

As leishmanias são parasitas intracelulares obrigatórios que utilizam fagócitos (em especial os macrófagos), para sua sobrevivência e propagação. Estes parasitas são interiorizados via interação com diversos receptores da superfície celular, como o receptor CR3 (MAC-1; CD18/CD11b), componente da família das β_2 -integrinas. As β_2 -integrinas são importantes em diferentes mecanismos imunológicos, como a adesão e migração de células, fagocitose e modulação de vias de sinalização intracelulares. Estudos demonstram que a molécula CD18 (constituente de todas as β_2 -integrinas) está envolvida na resposta imune na leishmaniose experimental, mas há controvérsias quanto a sua importância na defesa contra esta infecção. Leucotrienos e prostaglandinas são mediadores lipídicos envolvidos em diversos mecanismos da resposta imune inata e adaptativa. Na leishmaniose, os leucotrienos são considerados cruciais para a defesa do organismo por induzir mecanismos efetores celulares, como fagocitose e atividade microbicida. Por outro lado, as prostaglandinas (em especial PGE₂) exercem efeito imunossupressor sobre estes mecanismos, podendo favorecer o desenvolvimento da doença. Entretanto, não há conhecimento sobre a relação entre a expressão das β_2 -integrinas e a produção destes mediadores lipídicos na leishmaniose e a importância destas moléculas na resposta imune contra esta infecção. Assim, o objetivo desta tese foi investigar o efeito da redução da expressão das β_2 -integrinas na produção de citocinas, quimiocinas e de mediadores lipídicos, em modelo de infecção experimental por *L. amazonensis*. Para isso, camundongos da linhagem C57BL/6 selvagens (WT) e com baixa expressão de CD18 (CD18^{Low}), foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* na pata posterior, e o desenvolvimento da infecção foi acompanhado por 5 e 8 semanas após a inoculação. Com base nos resultados obtidos, os animais CD18^{Low} apresentaram maior carga parasitária nas patas, em comparação com os camundongos selvagens. Além disso, a maior suscetibilidade dos camundongos CD18^{Low} foi independente da produção de NO e de IL-10 e da redução de IL-12 mediada por IL-4. Estes animais também apresentaram reduzida produção de IFN- γ . Além disso, os

camundongos CD18^{Low} tiveram alterações na produção de LTB₄ e de PGE₂, as quais podem ter reduzido as respostas efetoras das células no sítio da infecção. Também demonstramos que a migração de neutrófilos e de eosinófilos para o sítio de infecção ocorreu de modo independente da expressão de CD18. O maior edema e recrutamento de eosinófilos nas patas dos camundongos CD18^{Low} foi independente da produção de MCP-1 α e parcialmente dependente de RANTES. Entretanto, a produção de LTC₄ pareceu ter sido o principal responsável por estes efeitos, em conjunto com PGD₂. Deste modo, nossos resultados mostram que a baixa expressão de CD18 favorece o desenvolvimento da infecção por *L. amazonensis*.

2. ABSTRACT

Pagliarone, AC. Effect of β_2 -integrin molecule deficiency in lipid mediators production and immune response during experimental infection with *Leishmania amazonensis* [thesis]. Ribeirão Preto: University of Sao Paulo, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, 2014, 105 p.

Leishmania are obligate intracellular parasites that use phagocytes (especially macrophages) for their survival and propagation. These parasites are internalized through interaction with several receptors of cellular surface, such as the CR3 receptor (Mac-1; CD18/CD11b), component of the β_2 -integrins family. β_2 - integrins are involved in important immune mechanisms, such as cell adhesion, cell migration, phagocytosis and modulation of intracellular signaling pathways. Studies have shown that the CD18 molecule (component of all β_2 -integrins), is involved in the immune response in experimental leishmaniasis, but its importance in the host defense against this infection is still controversial. Leukotrienes and prostaglandins are lipid mediators involved in various mechanisms of innate and adaptive immune response. In leishmaniasis, leukotrienes are considered critical for the host defense, once it induces cellular effector mechanisms such as phagocytosis and microbicide activity. On the other hand, prostaglandins (in particular PGE₂), lead to immunosuppressive effects on these mechanisms and may favor development of disease. However, it is unknown whether there is an interaction between the β_2 – integrins expression and the production of these mediators in leishmaniasis and the role of these molecules in host defense against this disease. Thus, the aim of this thesis was to verify the effect of reduced expression of β_2 -integrins in cytokines, chemokines and lipid mediators production, in experimental model of *L. amazonensis* infection. For this purpose, wild type mice (WT) and mice with reduced CD18 expression (CD18^{Low}) from C57BL/6 strain were infected with *L. amazonensis* promastigotes in the hind footpad. The development of the infection was assessed for 5 and 8 weeks after inoculation. Our results showed that the CD18^{Low} mice had higher parasite load in footpad, compared to wild-type mice. Moreover, the higher susceptibility of CD18^{Low} mice was independent of NO and IL-10 production and independent of IL-12 reduction mediated by IL-4. These mice also showed reduced IFN- γ production. CD18^{Low} mice had alterations in LTB₄ and PGE₂ levels in site of infection, which may have altered the effector cell responses. We also demonstrated that

the migration of neutrophils and eosinophils to the site of infection was CD18-independent. Moreover, the higher edema and eosinophils recruitment in CD18^{Low} mice was MCP-1 α -independent and partially dependent of RANTES. However, LTC₄ production seemed to be the main factor for edema and migration of eosinophils, together with PGD₂. Thus, our results show that the reduction on CD18 expression favors the development of *L. amazonensis* infection.

Introdução

3. INTRODUÇÃO

3.1. LEISHMANIOSE

3.1.1. ASPECTOS GERAIS

A leishmaniose é uma doença transmitida através da picada de fêmeas infectadas de mosquitos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, também denominados flebotomíneos (Desjeux, 1996). O agente etiológico é o protozoário da família dos tripanossomídeos (gênero *Leishmania*) que se encontra alojado no tubo digestivo destes insetos. No Brasil, a leishmaniose é transmitida pelo mosquito-palha, pertencente ao gênero *Lutzomyia* (Warburg et al., 1994). Esta doença é de considerável importância mundial, com estimativa de 1,3 milhões de novos casos e 20 a 30 mil mortes registradas anualmente. A leishmaniose possui áreas endêmicas em países da América do Sul e Central, Ásia e norte da África (WHO, 2013).

No seu ciclo de vida, as leishmanias adquirem duas morfologias distintas: a forma promastigota (flagelada e alongada), presente no interior do tubo digestivo e das glândulas salivares dos flebotomíneos, e a forma amastigota (não flagelada e arredondada), presente no interior das células do hospedeiro. Os promastigotas metacíclicos (infectantes) são inoculados na pele do indivíduo pelo mosquito e infectam as células fagocíticas, especialmente macrófagos. Uma vez no meio intracelular, os parasitas adquirem a morfologia amastigota e se multiplicam por fissão binária, ocasionando o rompimento celular e a subsequente infecção dos fagócitos adjacentes. Quando o flebotomíneo se alimenta do sangue de um indivíduo já infectado, os amastigotas adquiridos vão para o intestino do mosquito, assumindo a forma promastigota pró-cíclica, ou seja, não infectante

(Desconteaux; Turco, 1999). O ciclo de vida de *Leishmania* spp está ilustrado na figura 1.

Figura 1: Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Fonte: www.dpd.cdc.gov/dpdx (modificado).

Há mais de 20 espécies de leishmania descritas, as quais estão distribuídas entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* de acordo com diferenças em seu desenvolvimento no trato digestório do mosquito (Shaw, 1994; De Assis et al., 2012). Dependendo da espécie do parasita, a leishmaniose possui duas formas clínicas: visceral e cutânea. Na leishmaniose visceral, os amastigotas atingem os órgãos linfoides causando hepatomegalia, esplenomegalia e caquexia, ocasionando altos índices de mortalidade de indivíduos sem o tratamento adequado (Desjeux, 1996). Já a leishmaniose cutânea ou tegumentar é classificada em três subtipos: cutânea localizada (LCL), cutânea difusa (LCD) e mucocutânea (LMC). A LCL é a mais comum, ocasionando lesões locais ulceradas na pele (Hepburn, 2000). As espécies de leishmania indutoras da LCL no Brasil são a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Já na LCD, as lesões são de aspecto nodular e encontram-se disseminadas por diferentes áreas da superfície do corpo. Nas Américas Central e do Sul, a LCD é causada principalmente pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. A LMC, por sua vez, é o subtipo de leishmaniose tegumentar mais severa, a qual acomete a região das mucosas nasal e bucofaríngea, causando desfigurações nos locais lesionados. A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é o agente etiológico desta doença em nosso país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Além do Homem, outros mamíferos podem ser infectados com o parasita, sendo assim denominados reservatórios. Os reservatórios podem ser selvagens (animais selvagens como roedores, marsupiais e canídeos selvagens como as raposas) ou domésticos (cães e gatos), garantindo a circulação das leishmanias nas áreas endêmicas. Deste modo, a transmissão da leishmaniose é um processo complexo que envolve o mosquito como

vetor, os reservatórios e o ser humano, dentro de um determinado ambiente. Como o flebotomíneo é o único capaz de transmitir a doença, ele adquire o parasita ao picar um reservatório natural ou um indivíduo já doente. Consequentemente, o mosquito infectado transmite o parasita ao picar um animal ou indivíduo saudável. A transmissão da leishmaniose ao Homem pode ser prevenida através do tratamento dos animais domésticos infectados e pela proteção contra a picada de flebotomíneos em áreas endêmicas, com auxílio de mosquiteiros e repelentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

3.1.2. RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Uma vez que o indivíduo saudável é infectado com os promastigotas provindos da saliva do flebotomíneo, ocorre o recrutamento inicial de células polimorfonucleares e de macrófagos no sítio de infecção. Tal recrutamento é resultante da ação de fatores quimiotáticos da saliva do mosquito e dos que também são produzidos pelos próprios parasitas, como o denominado fator quimiotático de *Leishmania* (Saito et al., 1996 ;van Zandbergen et al., 2002).

No estágio inicial da infecção, os neutrófilos são os primeiros fagócitos recrutados, seguidos mais tarde por células inflamatórias como macrófagos, células dendríticas e eosinófilos (Belkaid et al., 2000; revisado por Liu; Uzonna 2012). Entretanto, apesar de serem importantes para a captura inicial dos parasitas, os neutrófilos tem uma meia-vida muito curta. Por outro lado, há estudos que já demonstraram que o parasita pode prolongar ou não a meia-vida dos neutrófilos, podendo retardar ou acelerar a apoptose destas células. No geral, os macrófagos são considerados os

hospedeiros finais para a proliferação dos parasitas, enquanto os neutrófilos são hospedeiros intermediários. Isso se deve ao fato de que os neutrófilos infectados são utilizados pela *Leishmania* como um modo alternativo de entrar nos macrófagos, os quais capturam os neutrófilos apoptóticos contendo parasitas ainda viáveis, ocorrendo o efeito “cavalo de Tróia” (revisado por Ribeiro-Gomes; Sacks, 2012). Por outro lado, estudos já demonstraram que neutrófilos potencializam a atividade leishmanicida de macrófagos infectados, via produção de TNF- α , PAF, elastase neutrofílica e de superóxido (Novais et al., 2009 ; Ribeiro-Gomes et al., 2007 ; Carmo et al., 2010). Os macrófagos são as células mais eficientes na morte do parasita intracelular, devido à produção de óxido nítrico (NO) e de outras espécies reativas de oxigênio, além de serem importantes fontes de citocinas pro-inflamatórias (como IL-1, IL-6 e TNF- α) e quimiocinas (como RANTES, MCP-1, IP-10 e MIP-1 β), favorecendo o recrutamento e ativação celulares no sítio de infecção (Sacks; Noben-Trauth, 2002; Teixeira et al., 2006; Von Stebut, 2007).

Além dos macrófagos, as células dendríticas são cruciais para o controle do desenvolvimento da infecção (revisado por Liu; Uzonna, 2012). Uma vez que os macrófagos são importantes na morte do parasita intracelular, as células dendríticas são mais especializadas na captura, processamento e apresentação de antígeno para os linfócitos T, estimulando a resposta padrão Th1 antígeno-específica. Além disso, são principais produtoras de IL-12 na infecção por *Leishmania* (Marovich et al., 2000). A IL-12 induz a produção de IFN- γ pelas células Th1 e células *natural killer*, potencializando a atividade microbicida dos macrófagos, principalmente pela indução da expressão da enzima iNOS, responsável pela síntese de NO (revisado por Liu ; Uzonna, 2012).

É bem determinado que o desenvolvimento da resposta imune de padrão Th1 é crucial para o controle da infecção, enquanto que a resposta

padrão Th2 favorece a suscetibilidade à doença. Um clássico exemplo na literatura é da comparação da resposta imune desenvolvida entre camundongos de linhagens suscetíveis (camundongos BALB/c) e os de linhagens resistentes à infecção por *L.major*. Nestes modelos experimentais, é demonstrado claramente que a suscetibilidade à infecção é devido à produção das citocinas IL-10 e principalmente de IL-4, enquanto que a resistência é devido à produção de IFN- γ (revisado por Kaye ; Scott, 2011). Por exemplo, já foi descrito por vários estudos que a IL-4 inibe a expressão do receptor de IL-12 (IL-12R β 2) e a produção de IFN- γ , impedindo a ativação das atividades efectoras dos macrófagos e a resposta Th1 protetora (revisado por McMahon-Pratt; Alexander, 2004). Além disso, Stamm et al. (1999) demonstraram que a sinalização de IL-12 via STAT-4 em camundongos resistentes (linhagem C57BL/6) auxilia no desenvolvimento da resposta Th1 sobre a resposta Th2, favorecendo a resistência à infecção. Já Cangussú et al.(2009) observaram que camundongos BALB/c IL-4^{-/-} infectados apresentaram redução significativa da lesão cutânea, em comparação aos camundongos selvagens e os da linhagem C57BL/6 resistente. Entretanto, a importância de IL-4 na suscetibilidade à infecção pode variar, dependendo da espécie de *Leishmania*. Por exemplo, diferentemente do que ocorre na infecção por *L. major*, o desenvolvimento da resposta imune padrão Th2 não depende da produção de IL-4 na infecção por *L. amazonensis* (Jones et al., 2000), indicando que diferentes espécies do parasita utilizam mecanismos imunes distintos para a sua sobrevivência. Além disso, outras citocinas, como a IL-13, também podem auxiliar na inibição da resposta Th1 protetora de modo independente de IL-4 (revisado por McMahon-Pratt; Alexander, 2004).

A relação entre a resposta imune de padrão Th1 insuficiente e o desenvolvimento da doença também é descrito em indivíduos com leishmaniose cutânea. Rada et al. (1987) demonstraram que pacientes com

LCD apresentam redução da proliferação de linfócitos T, associada com a redução da produção de IFN- γ . Além disso, também já foi demonstrado em outros estudos que pacientes com LCD possuem alta expressão de mRNA de IL-10 e baixa expressão da enzima iNOS em suas lesões (Salaiza-Suazo et al., 1999; Diaz et al., 2006). Além do desequilíbrio entre as respostas imunes padrão Th1 e Th2, a ativação das células T reguladoras (Tregs) também pode favorecer a imunossupressão, uma vez que são produtoras de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β , que reduzem as atividades efectoras dos macrófagos infectados (Belkaid et al., 2002; revisado por Liu; Uzonna, 2012).

Uma vez que a *Leishmania* é um parasita intracelular obrigatório, este microrganismo desenvolveu certos mecanismos que favorecem sua sobrevivência no nocivo meio intracelular (baixo pH, presença de enzimas proteolíticas e de produtos do estresse oxidativo). Dependendo da espécie, a *Leishmania* pode evadir-se da morte intracelular através da inibição de processos como: a ação proteolítica de enzimas do lisossomo, a atividade lítica do complemento através da clivagem de C3b para o fragmento inativo C3bi, a maturação do fagolisossomo por inibição da fusão de fagossomo e lisossomos, a produção de espécies reativas de oxigênio induzida pela fagocitose, a acidificação do pH do fagossomo, a apresentação do antígeno por reduzir a expressão da molécula MHC de classe II, e a produção de citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas, através da redução da ativação de vias de sinalização intracelulares (revisado por De Assis et al 2012; Gupta et al., 2013).

Com base nestas informações, é notável a complexidade da resposta imune na infecção por *Leishmania*, uma vez que ela difere de acordo com a suscetibilidade do organismo e a espécie do parasita. Assim, o estudo dos mecanismos de evasão do parasita e também dos processos imunológicos

da defesa do hospedeiro oferecem possíveis alvos de intervenção terapêutica.

3.1.3. TRATAMENTOS

O tratamento contra as leishmanioses consiste da administração de determinados compostos, os quais diferem em suas ações contra o parasita, doses recomendadas, reações adversas no organismo e forma clínica da doença. Os compostos utilizados na clínica não são padronizados mundialmente, podendo ser variáveis entre diferentes países (Pavli; Maltezou, 2010; Lindoso et al., 2012).

Os compostos geralmente utilizados como primeira escolha de tratamento são os antimoniais pentavalentes (Ministério da Saúde, 2007 ; Lindoso et al., 2012). Apesar de seus mecanismos de ação ainda não serem totalmente conhecidos, já foi descrito que induzem a inibição das vias glicolíticas e oxidativas de ácidos graxos na forma amastigota do parasita (Croft et al., 2006). Já a Pentamidina pode ser outra escolha além dos antimoniais, tendo ação leishmanicida por interferir na síntese de DNA do parasita. Este composto também pode ser utilizado clinicamente em conjunto com a Miltefosina, a qual inibe a síntese de fosfolipídeos e esteróis da *Leishmania* (Pavli; Maltezou, 2010; Seifert, 2011).

Também é utilizado o tratamento com o antibiótico Anfotericina B que exerce sua atividade leishmanicida em ambas as formas do parasita, agindo sobre o ergosterol da membrana do microrganismo, ocasionando o aumento da permeabilidade (Ellis et al., 2009). Dentre as formulações

existentes deste fármaco, há o emprego da Anfotericina B lipossomal, que oferece como vantagem a liberação da droga em níveis mais elevados no plasma, além de ser rapidamente adquirida pelos macrófagos do fígado (Croft et al., 2006 ; Goto; Lindoso, 2010). Podemos também citar duas classes de compostos utilizados no tratamento da leishmaniose que são primariamente utilizados como drogas antifúngicas, como os imidazóis (por exemplo, o Cetoconazol) e triazóis (como o Fluconazol e Itraconazol). Estes compostos tem a vantagem de serem menos tóxicos que os antimoniais pentavalentes, além de serem de administração oral, ao contrário dos outros compostos citados, os quais são aplicados por via intramuscular ou intravenosa (Mitropoulos et al., 2010).

O tratamento contra a leishmaniose é longo e os compostos utilizados ocasionam diversos efeitos colaterais como náuseas, dor de cabeça, febre, problemas cardíacos e renais (Ministério da Saúde, 2007; Saha et al., 2011; Lindoso et al., 2012). Apesar de haver estudos em andamento, ainda não há uma vacina que seja eficiente e segura para ser utilizada em seres humanos (Handman, 2001; Kobets et al., 2012). Deste modo, o estudo sobre novos mecanismos da resposta imune na infecção por *Leishmania* são cruciais para novas alternativas de tratamentos mais eficientes e menos agressivos ao organismo.

3.2. β_2 -INTEGRINAS NA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA*

Uma vez que são parasitas intracelulares obrigatórios, as leishmanias entram nos fagócitos por fagocitose mediada por receptores. Assim, a

captura da *Leishmania* por estas células ocorre através da interação com diversos receptores expressos na superfície dos fagócitos, como o receptor para manose, receptores para fibronectina, receptor para Fc, receptores *Toll-like*, os receptores para complemento CR1 e CR3 e o DC-SIGN específico de células dendríticas. Estes receptores reconhecem certas moléculas expressas na superfície do parasita, como o lipofosfoglicano (LPG), glicoproteína gp63, proteofosfoglicano (PPG) e glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs) (Naderer et al., 2004 ; Ueno;Wilson, 2012 ; Walker et al., 2014).

Um dos principais receptores utilizados na entrada da *Leishmania* nos macrófagos é o CR3 (ou MAC-1), um integrante da família das β_2 -integrinas. As β_2 -integrinas são glicoproteínas que formam heterodímeros constituídos de uma cadeia β comum (β_2 ou CD18) ligada de modo não covalente com uma das subunidades α : α_L (CD11a) ou α_M (CD11b) ou α_X (CD11c) ou α_D (CD11d), formando deste modo, quatro subtipos diferentes de β_2 -integrinas (Noti et al., 2000). Estas moléculas são expressas principalmente na superfície de neutrófilos e fagócitos mononucleares, e exercem funções como adesão e migração celular, fagocitose e ativação de proteínas quinases em vias de sinalização intracelular (Mócsai et al., 2002; Zhang ; Wang, 2012; Walker, et al., 2014). O CR3 (formado pelo heterodímero CD18/CD11b), tem como principal função reconhecer o fragmento C3bi do complemento. No entanto, na infecção por *Leishmania*, o CR3 reconhece o parasita tanto quando este é opsonizado com complemento, como também por interação com as moléculas LPG e gp63 expressas na superfície do parasita (Domínguez ; Torano, 1999; Handman ; Bullen, 2002).

O CR3 ativado pode reduzir a resposta imune padrão Th1 protetora ao inibir a produção de IL-12, mesmo na ausência do parasita. Isso foi demonstrado por Marth e Kellsal (1997), os quais observaram que a

interação de CR3 com seus ligantes ou com anticorpos anti-CD18 e anti-CD11b, reduz significativamente a produção de IL-12 e de IFN- γ em monócitos humanos. Em um trabalho mais recente, Ricardo-Carter et al. (2013) demonstraram que o parasita reduz a produção de IL-12 via interação com CR3, uma vez que macrófagos murinos infectados com *L. major* apresentaram redução da produção desta citocina e de óxido nítrico, em comparação aos macrófagos infectados e deficientes da expressão de CD11b. Outros estudos também relataram que a interação do parasita com o CR3 reduz a atividade microbicida de macrófagos, ocasionando a fagocitose “silenciosa”, ou seja, sem a indução da produção de espécies reativas de oxigênio pela célula hospedeira (Wright; Silverstein, 1983 ; Mosser ; Edelson, 1987). Assim, a interiorização da *Leishmania* através de CR3 é um modo do parasita de evadir-se da resposta imune do hospedeiro.

Por outro lado, Schönlau et al. (2000) demonstraram que camundongos CD18^{-/-} infectados com *L. major* apresentaram maior disseminação do parasita, em comparação com os animais selvagens. Em ensaios *in vitro*, estes mesmos autores observaram que os macrófagos CD18^{-/-} infectados tiveram redução de 50% da sua capacidade fagocítica, com significativa diminuição da produção de NO e da atividade microbicida, em comparação aos macrófagos de camundongos selvagens. Em conjunto, estas informações sugerem que, mesmo com a existência de outros receptores celulares que também interagem com o parasita, a ausência da expressão das β_2 -integrinas pode resultar em alterações significativas na resposta imune na leishmaniose.

3.3. EICOSANOIDES NA LEISHMANIOSE

Os eicosanoides são compostos lipídicos derivados do ácido araquidônico os quais se incluem os leucotrienos (LTs) e as prostaglandinas (PGs). A biossíntese destes mediadores lipídicos é iniciada por distúrbios na membrana celular provocados por patógenos ou mediadores solúveis. Consequentemente, o ácido araquidônico provindo dos fosfolipídeos da membrana celular é liberado pela fosfolipase A₂ citosólica (cPLA2) para então ser metabolizado pela via da enzima 5-lipoxigenase (5-LO) ou das ciclooxigenases (COX) (Funk, 2001).

A biossíntese dos leucotrienos ocorre através da via da 5-LO. Nesta via, o ácido araquidônico liberado da membrana pela cPLA2 é transformado em ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE). A 5-LO é então ativada pela Proteína Ativadora da 5-LO (FLAP) e converte o 5-HPETE em leucotrieno A₄ (LTA₄). O LTA₄ pode ser metabolizado por duas vias: ou é hidrolisado pela enzima LTA₄ hidrolase formando o LTB₄ ou é conjugado com glutathione pela LTC₄ sintase, originando o LTC₄ intracelular. A partir deste último, ocorre a formação dos denominados cys-leucotrienos (CysLTs), os quais incluem o próprio LTC₄ além de LTD₄ e LTE₄ (Funk, 2001). Os mastócitos e eosinófilos são as principais células de cysLTs (revisado por Peters-Golden et al., 2004).

Os leucotrienos são considerados importantes indutores da inflamação, tendo macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos como células produtoras (Peters-Golden ; Henderson, 2007). Estes mediadores lipídicos (em especial o LTB₄) são cruciais na ativação de mecanismos efetores de fagócitos, auxiliando no controle de infecções causadas por diversos microrganismos, como fungos, parasitas e bactérias (Medeiros et al., 2004 ; Machado et al., 2005; Peres-Buzalaf et al., 2011). Além disso, já

foi descrito que o LTB₄ favorece a migração de leucócitos (Medeiros et al., 1999; Tager et al., 2003) e a sobrevivência destas células contra a apoptose (Hébert et al., 1996; Lee et al., 2000), além de induzir a fagocitose por macrófagos e neutrófilos (Mancuso et al., 1998, 2001; Canetti et al., 2003) e favorecer a morte de microrganismos por indução da produção de espécies reativas de oxigênio, enzimas lisossomais e de citocinas pro-inflamatórias (revisado por Peters-Golden et al., 2004).

As prostaglandinas, por sua vez, são derivadas do ácido araquidônico metabolizado pela via das ciclooxygenases COX-1 e COX-2. Assim, após o ácido araquidônico ser liberado da membrana celular pela cPLA2 e metabolizado pelas ciclooxygenases COX-1 e COX-2, ocorre a formação de PGH₂ - precursor intermediário instável responsável pela formação dos subtipos de prostaglandinas PGD₂, PGE₂, PGF₂ e PGI₂ (Funk, 2001). Em infecções, as prostaglandinas (em especial a PGE₂) também podem modular a resposta imune, favorecendo a resposta de padrão Th2 em relação à de padrão Th1 (revisado por Agard et al., 2013). Entretanto, a PGE₂ pode exercer papel imunossupressor por diversos mecanismos. Por exemplo, este mediador lipídico pode reduzir a proliferação de células T via inibição da produção de IL-2. Além disso, também é capaz de inibir a expressão do receptor desta citocina e a expressão de JAK3, ambos responsáveis pela ativação destas células por IL-2 (revisado por Kalinski, 2012).

Os leucotrienos e as prostaglandinas exercem suas atividades sobre as células do sistema imune através da interação com receptores específicos, acoplados à proteína G. No caso do LTB₄, já foi demonstrado que ele exerce sua função imunoestimuladora sobre os macrófagos pela sua interação com o receptor BLT1, o qual é acoplado às proteínas G_{ai} e G_{aq} (Aronoff et al., 2004 ; Peres et al., 2007). Por outro lado, a ação da PGE₂ nas células imunes é dependente da sua ligação aos seus respectivos

receptores EP1-EP4 (Breyer et al., 2001; Fujino et al., 2005). Já foi relatado que a PGE₂ exerce seu efeito inibitório na fagocitose de macrófagos ao interagir-se com o receptor EP2 e EP4 acoplados a proteína G α_s , resultando no aumento da produção de AMP cíclico (AMPc), via ativação de adenilato ciclase (Breyer et al., 2001 ; Aronoff et al., 2004; Fujino et al., 2005). O AMPc é um segundo mensageiro da sinalização celular, que ativa as proteínas PKA e EPAC-1 envolvidas na inibição da geração de mediadores inflamatórios e na redução da atividade microbicida e fagocitose (Misra ; Pizzo, 2005; Serezani et al., 2008). Neste contexto, já foi relatado que a PGE₂ inibe a fagocitose mediada por Fc γ R em macrófagos, de modo exclusivamente dependente da ativação de EPAC-1. Além disso, a redução da atividade microbicida por este eicosanoide é mediada pela sinalização via EPAC-1 e PKA (Aronoff et al., 2004; 2005). Por outro lado, a interação do LTB₄ ao receptor BLT1 pode controlar esse efeito inibitório da PGE₂ ao inibir a produção de AMPc (Aronoff et al., 2004 ; Peres et al., 2007).

Diversos estudos tem investigado a atividade dos mediadores lipídicos na leishmaniose. Lonardoni et al. (2000) demonstraram que em macrófagos infectados com *L. donovani*, a redução da infecção foi mais correlacionada com a presença de PAF e com a ausência de PGE₂ do que com a produção de NO. Já Pinheiro et al. (2009) relataram que, em modelo de indução de autofagia, macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis* tiveram maior replicação parasitária em presença de PGE₂ exógena. No entanto, houve aumento da morte do parasita intracelular na presença de Indometacina (composto inibidor de COX). Mais recentemente, Penke et al. (2013) demonstraram que a suscetibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. major* está correlacionada com o aumento da expressão dos receptores de PGE₂, EP1 e EP3. Além disso, estes autores observaram que a carga parasitária nos macrófagos destes

animais foi significativamente reduzida na presença de antagonistas destes receptores.

Contrariamente, os leucotrienos (em especial LTB₄) são considerados cruciais para a ativação de fagócitos contra a infecção por *Leishmania*. Serezani et al. (2006) demonstraram que, tanto camundongos tratados com Zileuton (composto inibidor da 5-LO) quanto camundongos 5-LO^{-/-} infectados com *L. amazonensis* apresentaram aumento significativo das lesões cutâneas. Em ensaios *in vitro*, estes autores observaram que macrófagos peritoneais murinos infectados e pré-tratados com o inibidor da enzima FLAP tiveram redução da atividade leishmanicida, em comparação com as células infectadas na ausência do inibidor. Neste mesmo estudo, também foi demonstrado que a adição de LTB₄ exógeno aumentou significativamente a produção de NO e a atividade microbicida dos macrófagos murinos infectados. Mais recentemente, o trabalho de Tavares et al. (2014) demonstrou que neutrófilos humanos infectados com *L. amazonensis* tiveram aumento na produção de LTB₄, acompanhado de degranulação e liberação da enzima MMP-4 e do aumento da atividade de MPO. Além disso, a atividade leishmanicida destas células foi dependente da ativação do receptor específico para LTB₄, BLT1. Neste mesmo trabalho, os autores também observaram que, na presença dos inibidores da biossíntese de leucotrienos Zileuton (inibidor da enzima 5-LO) ou MK-886 (composto inibidor de FLAP), houve aumento significativo da sobrevivência do parasita nos neutrófilos. Já Campos (2012) observou que houve alta produção de PGE₂ em relação a LTB₄ no soro de pacientes com LCD, concomitante com a baixa produção de TNF- α , IFN- γ e IL-12, reforçando o conceito de que LTB₄ e PGE₂ exercem papéis antagônicos na defesa imune do indivíduo na leishmaniose.

3.4. RELAÇÃO ENTRE AS β_2 -INTEGRINAS E EICOSANOIDES

Através de sua função primária de proporcionar a adesão e migração leucocitária no processo inflamatório, as β_2 -integrinas podem também modular a produção de mediadores lipídicos. Em um ensaio de adesão celular *in vitro* utilizando uma co-cultura de células polimorfonucleares e células do endotélio glomerular, Brady e Serhan (1992) observaram que a adição do anticorpo anti-CD18 ocasionou a redução de 57% da interação entre as células e inibição de 39% da produção de LTC₄ pelas células polimorfonucleares. Em outro ensaio de adesão celular, Dent et al. (2000) também demonstraram que a adição do anticorpo anti-CD18 ocasionou a redução da produção de LTC₄ em eosinófilos co-cultivados com células epiteliais brônquicas.

As β_2 -integrinas também podem induzir a produção de leucotrienos via interação com imunocomplexos. Por exemplo, já foi relatado que células polimorfonucleares deficientes da expressão de β_2 -integrinas e estimuladas com imunocomplexos apresentam redução significativa na produção de LTB₄, em comparação às células não deficientes (Graham et al., 1993). Neste mesmo trabalho, também foi observado que quando as células não deficientes foram estimuladas com imunocomplexos, a adição do anticorpo anti- β_2 -integrinas ocasionou redução de até 50% na produção de LTB₄.

O papel modulador das β_2 -integrinas na produção de mediadores lipídicos é bem conhecido em doenças inflamatórias. Por exemplo, Meenan et al. (1996) verificaram o efeito da inibição de CR3 no desenvolvimento de colite experimental em coelhos. Neste trabalho, foi observado que após o tratamento dos animais com um antagonista de CR3, houve redução do recrutamento de células polimorfonucleares concomitantemente com a

diminuição da produção de LTB₄ e de MPO (enzima mieloperoxidase), nos tecidos da mucosa intestinal. Já Alten et al. (2004) demonstraram que pacientes com artrite reumatóide tratados com antagonista de receptor de LTB₄, tiveram inibição da expressão de MAC-1 em neutrófilos, ocasionando a redução da inflamação.

Por outro lado, os mediadores lipídicos podem regular a expressão das β_2 -integrinas nas células inflamatórias. Por exemplo, já foi descrito que os leucotrienos induzem a expressão de β_2 integrinas na superfície de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (Showel et al., 1995 ; Oliveira et al., 1997; Luna-Gomes et al., 2013). No entanto, a PGE₂ é conhecida por reduzir a expressão destas moléculas nas células imunes, impedindo o recrutamento leucocitário. Por exemplo, Berends et al. (1997) demonstraram que a PGE₂ reduz a expressão de CD11b induzida por PAF em neutrófilos e eosinófilos. Já Ding et al. (1998) observaram que a PGE₂ controla danos teciduais na mucosa gástrica ao inibir o recrutamento de neutrófilos via diminuição da expressão de MAC-1 nestas células. Além disso, Zeidler et al. (2000) verificaram que PGE₂ provinda de células tumorais reduz a expressão de MAC-1 em monócitos.

A relação entre mediadores lipídicos e β_2 -integrinas também tem sido investigada em doenças infecciosas. Mittal et al. (2010) observaram que em infecção experimental por *Escherichia coli*, a inibição de PGE₂ resultou no aumento da expressão de CR3 em neutrófilos e macrófagos, favorecendo a migração destas células para o sítio de infecção. Em um trabalho prévio desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que camundongos infectados com *Toxocara canis* e tratados com composto MK-886 (composto inibidor da enzima FLAP), tiveram redução da eosinofilia no sangue e nos tecidos pulmonares. Tal efeito foi correlacionado com a redução da integrina VLA-4 (pertencente à família das β_1 -integrinas), mas sem alteração da expressão de MAC-1 (Aníbal et

al., 2007). Outro estudo realizado por nosso grupo demonstrou que a expressão da molécula CD18 pode modular a produção de mediadores lipídicos na infecção pelo fungo *Histoplasma capsulatum* (Sorgi et al., 2009). Neste trabalho, foi observado que em leucócitos alveolares de camundongos infectados que possuem baixa expressão de CD18 (camundongos CD18^{Low}), a produção de LTB₄ foi significativamente reduzida, em comparação às células dos animais selvagens, mas não houve alteração na produção de PGE₂. Deste modo, podemos supor que como a produção de LTB₄ favorece a resposta imune contra este patógeno, os animais CD18^{Low} teriam maior suscetibilidade à esta infecção em comparação com os camundongos selvagens.

Com base nestas informações, podemos observar que apesar da *Leishmania* utilizar o CR3 para entrar nos fagócitos e regular suas atividades microbidas, não há estudos os quais correlacionem a expressão de β_2 -integrinas com a síntese de eicosanoides neste modelo de infecção. Além disso, ainda se desconhece como tal correlação poderia alterar a resposta imune do organismo (via produção de citocinas e quimiocinas) na leishmaniose.

Objetivo

4. OBJETIVO

Esta tese teve como objetivo, investigar o efeito da redução da expressão das β_2 -integrinas na produção de medidores lipídicos, citocinas e quimiocinas em modelo de infecção experimental por *L. amazonensis*.

Para tal finalidade, camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e com reduzida expressão da molécula CD18 (CD18^{Low}) foram infectados com promastigotas do parasita no coxim plantar de uma das patas posteriores, por via subcutânea. Nestes animais, entre 5 e 8 semanas, avaliamos no sítio da infecção:

- A cinética do desenvolvimento do edema;
- A carga parasitária nas patas;
- Alterações histopatológicas;
- Presença de neutrófilos e de eosinófilos no infiltrado celular;
- Produção de NO;
- Produção de leucotrienos e prostaglandinas;
- Produção de citocinas pro e anti-inflamatórias;
- Produção de quimiocinas;

Delineamento
Experimental

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Material e Métodos

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Animais

Foram utilizadas fêmeas de camundongos pertencentes à linhagem C57BL/6 selvagens ou deficientes para a expressão da molécula CD18 (CD18^{Low}), com idade de 6 semanas. Os animais foram provenientes do Biotério Unidade II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP). Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética do Campus de Ribeirão Preto (processo número 2013.1.255.53.4). Análises prévias realizadas em nosso laboratório demonstraram que 12% dos macrófagos alveolares e 0,2% dos macrófagos peritoneais de camundongos CD18^{Low} expressam CD18, em comparação a respectivos 35% e 8,5% em camundongos selvagens. Além disso, também observamos que 2,1% dos macrófagos alveolares e 1,4% dos macrófagos peritoneais expressam CR3 (CD18/CD11b) em camundongos CD18^{Low}, em comparação a respectivos 22,1% e 61,3% em camundongos selvagens (Soares, 2009).

6.2. Cultivo do parasita

Leishmania (Leishmania) amazonensis (cepa MHOM/BR/73M2269) que expressa constitutivamente GFP, foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Dario Simões Zamboni (Laboratório de Patogenicidade Microbiana e Imunidade Inata - Departamento de Biologia Celular, Molecular e

Bioagentes Patogênicos) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), com permissão da Profa. Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana (Laboratório de Leishmanioses - Departamento de Parasitologia) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP). Os parasitas foram cultivados em estufa a 23°C em meio Schneider (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (GIBCO® Life Technologies, Carlsbad, California, EUA), 15 µg/mL de gentamicina (GIBCO® Life Technologies, Carlsbad, California, EUA) e 10% de urina humana filtrada (Soares et al., 2010). Em todos os experimentos, os parasitas foram utilizados na fase estacionária de crescimento (forma promastigota), até a terceira passagem *in vitro*.

6.3. Infecção dos animais e avaliação do edema da pata

Os camundongos selvagens e CD18^{Low} foram infectados por via subcutânea, com 30 µL de uma suspensão contendo 1x10⁶ promastigotas do parasita em PBS, no coxim plantar de uma das patas posteriores, em uma única vez (Serezani et al., 2006). O desenvolvimento do edema foi acompanhado uma vez por semana, por meio de mensuração do diâmetro da pata com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo 2046F, Yokohama, Japan). Os animais infectados foram divididos em um total de 4 grupos, sendo 2 grupos para cada linhagem (n = 6-8 animais / grupo). Assim, 2 grupos (1 para cada linhagem) foram acompanhados por até 5 semanas após a infecção, enquanto os 2 grupos restantes (1 para cada linhagem) foram acompanhados em até 8 semanas e tendo o edema da pata mensurado. Os resultados foram expressos como o aumento (em porcentagem) da espessura da pata infectada. Os experimentos foram realizados em duas repetições, para cada período investigado. Grupos de

animais não infectados de ambas as linhagens (n = 6-8 animais /grupo) foram utilizados como controles.

6.4. Quantificação da carga parasitária nas patas

A carga parasitária foi quantificada nas patas dos animais infectados, nos períodos de 5 e 8 semanas após a infecção, através do ensaio de diluição limitante segundo Afonso e Scott (1993), com algumas modificações. Após a morte dos camundongos em câmara de CO₂, a pata posterior infectada de cada animal foi extraída e homogeneizada separadamente, em 2 mL de solução de PBS estéril, com auxílio de homogenizador de tecidos (IKA® T10 Basic, Germany). Para retirar os restos de tecido, o homogenato foi centrifugado a 50 x g por 1 min. O sobrenadante resultante foi transferido para outro tubo e novamente centrifugado a 2000 x g por 15 min. O sobrenadante retirado e estocado a -20°C para a utilização em outros ensaios de quantificação. O *pellet* obtido foi ressuspendido em 1 mL de meio Schneider (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, EUA) completo. Em uma placa de cultura de 96 poços, a suspensão foi diluída seriadamente e incubada a 26°C por 7 dias. A presença ou não dos parasitas nos poços foi observada por microscópio invertido (ZEISS®, Oberkochen, Alemanha) em lente objetiva de aumento de 40X. O título de parasitas foi expresso em logaritmo negativo da maior diluição na qual os parasitas estavam presentes.

6.5. Análise histopatológica das patas

Após a morte dos animais (infectados ou controles) em câmara de CO₂, foi realizada a assepsia da superfície dos animais com álcool 70% e as patas foram preparadas para análise histopatológica, segundo Svelander *et al.* (2004), com modificações. A pata posterior de cada animal foi retirada e fixada separadamente em formalina tamponada 10% por 24h, e imersa em solução de EDTA + NaOH (pH = 7,4) por até 10 dias, para a descalcificação. Após este período, as patas foram desidratadas em etanol, embebidas em parafina e seccionadas longitudinalmente em espessura de 5µm. As amostras foram coradas em Hematoxilina-Eosina (H&E) para posterior observação em microscópio óptico Leica DM5000B equipado com câmera digital DFC500 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). O processamento do tecido das patas para análise histopatológica foi realizado em colaboração com o laboratório da Profa. Dra. Simone Gusmão Ramos – Laboratório de Patologia Pulmonar- Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

6.6. Quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO)

Para estimar indiretamente a presença de neutrófilos no infiltrado celular do sítio de infecção, a enzima mieloperoxidase (MPO) foi quantificada no sobrenadante do homogenato das patas dos animais controles e infectados (item 6.4). Para tal, 500 µL do sobrenadante obtido da pata de cada animal foi transferido para tubos eppendorf de 2 mL e centrifugado a 1690 x g por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 400 µL de tampão fosfato de

sódio (0,02 M), NaCl (0,01 M) + EDTA (0,015 M) em pH = 4,7, sob agitação em vórtex. A seguir, foi acrescentada uma solução gelada de NaCl 0,2% para a lise de hemácias. Após 30 segundos, foi adicionado às amostras uma solução de NaCl (1,6%) com glicose (5%) e realizada nova centrifugação. O *pellet* foi então ressuspensionado em nova solução tampão, contendo fosfato de sódio (0,05M) e o detergente H-TAB (brometo de hexadecil-trimetil amônio, Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, EUA) a 0,5%, e foi realizada nova agitação. Para a extração de proteínas, as amostras foram submetidas a 3 ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (banho-maria a 36°C), e novamente centrifugadas a 75130 x g, 20 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado para o ensaio enzimático, pipetando 50 µL de cada amostra em placas de cultura de 96 poços, seguido de adição de mesmo volume do substrato contendo peróxido de hidrogênio (TMB Substrate Reagent Set - OptEIA™, BD Biosciences, San Jose, California, EUA). Os poços “branco” continham apenas o tampão de fosfato de sódio + H-TAB 0,5% e TMB. Após 15 minutos a 37°C e em ausência de luz, a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de H₂SO₄, a 4 M. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro (µQuant® Biotek Instruments, Inc., Winooski, EUA), em comprimento de onda de 450 nm (Barcelos et al., 2005, com modificações).

6.7. Quantificação da enzima eosinófilo peroxidase (EPO)

Para estimar indiretamente a presença de eosinófilos no infiltrado celular no sítio da infecção, a enzima eosinófilo peroxidase (EPO) foi quantificada no sobrenadante do homogenato das patas dos animais controles e infectados (item 6.4). Para tal finalidade, parte do homogenato

das patas (500 µL) de cada animal foi transferida para tubos eppendorf de 2 mL e centrifugado a 1950 x g, 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido foi ressuspendido em 1 mL de solução de PBS. Cada amostra foi transferida para tubos Falcon de 15 mL para a realização do choque hipotônico, via acréscimo de água (3 mL), salina 3,5% (1 mL) e PBS (5 mL), esperando 30 segundos e homogeneizando em vórtex após o acréscimo de solvente. As amostras foram novamente centrifugadas (1950 x g, 10 min, a 4°C) e o *pellet* foi ressuspendido em tampão HBSS (Solução Balanceada de Hanks - GIBCO® Life Technologies, Carlsbad, California, EUA) + HTAB (Hexadeciltrimetilamono bromido- Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, EUA). Em seguida, as amostras foram submetidas a choque térmico constituído de 3 ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (banho-maria 36°C), e centrifugadas a 300 x g por 10 minutos a 4°C. Para o ensaio enzimático, foi realizada a solução de OPD por dissolução de um comprimido contendo OPD (o-Phenylenediamine) + um comprimido de tampão peróxido de hidrogênio associado à uréia, em 20 mL de água destilada (pH = 5) conforme instruções do fabricante (SIGMAFAST™ OPD tablet set - Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, EUA). Em seguida, foi pipetado 50 µL do sobrenadante de cada amostra em placas de cultura de 96 poços, seguido de adição de mesmo volume da solução de OPD acima. Os poços “branco” somente continham 50 µL de tampão HBSS-HTAB e de OPD. Após 15 minutos de reação, esta foi interrompida pela adição de 50 µL H₂SO₄ 4M e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (µQuant® Biotek Instruments, Inc., Winooski, EUA), em comprimento de onda de 490 nm (Silveira et al., 2002, com modificações).

6.8. Quantificação de citocinas, quimiocinas e de eicosanoides

A quantificação de citocinas, quimiocinas e de eicosanoides foram realizadas no sobrenadante do homogenato das patas dos animais infectados e não infectados (item 6.4). As citocinas e quimiocinas foram detectadas empregando anticorpos de captura, citocinas-padrão e anticorpos biotinilados e amplificados com estreptoavidina-peroxidase de acordo com instruções do fabricante (OptEIA™, BD Biosciences, San Jose, California, EUA). Como substrato, foi utilizado o-Phenylenediamine (OPD) ou tetrametilbenzidina (TMB) (BD Biosciences, San Jose, California, EUA) e a reação foi bloqueada com a adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄, a 1 M). A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro (μQuant® Biotek Instruments, Inc., Winooski, EUA), em comprimento de onda de 490 nm. Já a quantificação da produção dos eicosanoides (LTB₄, LTC₄, PGD₂ e PGE₂), foi realizada por ensaio imunoenzimático competitivo, segundo instruções dos fabricantes (Cayman Biochemical, Ann Arbor, Michigan, EUA ; Enzo Life Sciences Inc, Farmingdale, NY, USA).

6.9. Produção de NO

A detecção de NO foi realizada indiretamente pela quantificação de nitrito (NO₂⁻) no sobrenadante do homogenato das patas dos animais infectados e controles (item 6.4), através do método colorimétrico de Greiss (Green et al., 1982). A dosagem foi realizada pipetando-se 50 μL de amostra em placas de cultura celular de 96 poços. Para determinação quantitativa de NO₂⁻, foi preparada na mesma placa uma curva-padrão de

nitrito de sódio (NaNO_2) com concentrações de 3 a 200 μM . Em seguida, foi adicionado à placa 50 μL de reagente de Greiss composto pela solução feita com proporção 1:1 (volume : volume) de NEED (N-naftiletilenodiamino dihidroclorídrico) a 0,1% (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, EUA) e de sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico (H_3PO_4). A placa foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (μQuant ® Biotek Instruments, Inc., Winooski, EUA), em comprimento de onda de 554 nm.

6.10. Análise Estatística

Os resultados foram analisados utilizando o teste de Mann-Whitney (comparação entre dois grupos) e ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0.05$.

Resultados

7. RESULTADOS

7.1. Deficiência de CD18 favorece o edema e a carga parasitária nas patas dos animais infectados por *L. amazonensis*

Primeiramente foi verificado o efeito da redução da expressão da molécula CD18 no desenvolvimento do edema das patas durante infecção por *L. amazonensis*. Para tal, camundongos selvagens (WT) e CD18^{Low} foram infectados com inóculo de 1×10^6 promastigotas de *L. amazonensis*, e o edema da pata foi avaliado semanalmente ao longo de 8 semanas após a infecção. A figura 2 A mostra que os animais CD18^{Low} apresentaram edema significativamente maior em suas patas a partir da segunda semana após a infecção, em comparação com os animais WT. No entanto, na oitava semana após a infecção, os animais CD18^{Low} tiveram redução do edema, mas sem diferença significativa em comparação aos animais selvagens.

Também avaliamos se a reduzida expressão de CD18 alteraria a carga parasitária nas patas em 5 e 8 semanas após a infecção. Como mostrado nas figuras 2 B e 2C, as patas dos animais CD18^{Low} tiveram carga parasitária significativamente maior em comparação aos camundongos selvagens, especialmente em 5 semanas após a infecção.

Figura 2: Edema e carga parasitária da pata de camundongos selvagens (WT) e deficientes da expressão de CD18 (CD18^{Low}) infectados com *L. amazonensis*. Fêmeas de camundongos de ambas as linhagens foram infectadas na pata posterior com 1×10^6 promastigotas de *L. amazonensis*, e a cinética do desenvolvimento do edema foi realizada ao longo de 8 semanas após a infecção (A). Após a morte dos animais infectados no final de 5 (B) e 8 semanas (C), a carga parasitária do homogenato das patas foi determinada por diluição limitante. Dados expressos como média $\pm$ SEM (n = 5 - 8 animais por grupo) utilizando teste de Mann-Whitney; * p<0.05 (em comparação ao camundongo selvagem). Resultados representativos de 2 experimentos independentes.

7.2. Análise histopatológica das patas dos animais infectados com *L. amazonensis*

Uma vez que observamos que o edema e a carga parasitária nas patas dos animais CD18^{Low} foi maior do que nos animais selvagens, realizamos análise histopatológica das patas em 5 e 8 semanas após a infecção. Tal análise teve como finalidade verificar as alterações no infiltrado celular no sítio da infecção na condição de redução da expressão de CD18.

A análise dos tecidos mostrou que os animais CD18^{Low} apresentaram maior número de macrófagos contendo amastigotas no sítio da infecção, em comparação com os animais selvagens em 5 (figuras 3C e 3E) e em 8 semanas (figuras 3G e 3I) após a infecção. Outra alteração notável no infiltrado celular nas patas dos animais CD18^{Low} foi que estes animais tiveram maior presença de eosinófilos em comparação aos animais selvagens, tanto em 5 (figuras 3D e 3F) quanto em 8 semanas (figuras 3H e 3J) após a infecção. Estas células se encontravam associadas ou não aos macrófagos infectados.

Figura 3: Cortes histológicos das patas de camundongos selvagens (WT) e deficientes da expressão de CD18 (CD18^{Low}) infectados ou não com *L. amazonensis*. Fêmeas de camundongos de ambas as linhagens foram infectadas na pata posterior com 1×10^6 promastigotas de *L. amazonensis* e, em 5 e 8 semanas após a infecção, os tecidos das patas foram seccionados e corados com H&E. As imagens foram adquiridas como descrito em Material e Métodos, em magnitude de 40X (A, B, C, E, G, I), com detalhe em magnitude de 100 X (D,F,H,J). Asteriscos indicam macrófagos contendo amastigotas intracelulares; setas indicam eosinófilos. Imagens representativas de 2 experimentos independentes (n= 2 animais por grupo).

7.3. Avaliação da presença de neutrófilos e eosinófilos no tecido das patas infectadas com *L. amazonensis*

Neutrófilos e eosinófilos são comumente encontrados no infiltrado celular em infecção por *Leishmania*, sendo importantes fontes de LTB₄ e LTC₄, respectivamente (Ohnishi et al., 2008 ; Luna-Gomes et al., 2013). Assim, a fim de confirmarmos as alterações do infiltrado celular ocorrido nas patas infectadas dos animais CD18^{Low}, realizamos a quantificação da atividade das enzimas MPO e de EPO, a partir do homogenato das patas dos animais infectados de ambas as linhagens. A quantificação de MPO e EPO são medidas indiretas que indicam a presença de neutrófilos e eosinófilos, respectivamente, no tecido das patas. Animais não infectados foram utilizados como controles.

Observamos que as patas dos camundongos selvagens e CD18^{Low} infectadas tiveram aumento significativo da atividade de MPO, em comparação com as patas dos animais não infectados, nos períodos de 5 e 8 semanas após a infecção (figuras 4A e 4B, respectivamente). No entanto, a atividade da enzima MPO foi similar em ambos os animais infectados, indicando que a presença de neutrófilos no sítio de infecção não foi diferente entre os animais das duas linhagens. Já a atividade de EPO foi significativamente maior nos animais infectados de ambas as linhagens em 5 semanas após a infecção (figura 4C), mas não houve diferença significativa entre os animais selvagens infectados e não infectados no período de 8 semanas, enquanto que os animais CD18^{Low} infectados continuaram a apresentar maior atividade da enzima em comparação aos não infectados (figura 4D). Além disso, a atividade de EPO foi significativamente maior nos animais CD18^{Low} infectados em comparação com os animais selvagens em ambos os períodos investigados (figuras 4C e

4D, respectivamente). Este resultado confirma o maior número de eosinófilos presentes no infiltrado celular das patas dos animais CD18^{Low} mostrado na análise histopatológica (figura 3).

Figura 4: Quantificação da atividade das enzimas MPO e EPO nas patas de camundongos selvagens (WT) e deficientes da expressão de CD18 (CD18^{Low}) infectados ou não com *L. amazonensis*. Fêmeas de camundongos de ambas as linhagens foram infectadas na pata posterior com 1×10^6 promastigotas de *L. amazonensis*. A atividade das enzimas mieloperoxidase (A e B) e eosinófilo peroxidase (C e D) foi quantificada a partir do homogenato das patas em 5 (A e C) e 8 semanas (B e D) após a infecção. Patas dos animais não infectados foram utilizadas como controle. Dados expressos como média $\pm$ SEM (n= 4 - 6 animais por grupo), utilizando análise de Newman-Keuls. * $p < 0.05$ (em comparação ao camundongo não infectado); # $p < 0.05$ (em comparação ao camundongo selvagem).

7.4 Quantificação de Óxido Nítrico (NO)

Para avaliar se a baixa expressão de CD18 altera a produção de óxido nítrico no sítio de infecção, a produção de nitrito também foi quantificada no homogenato das patas infectadas de camundongos selvagens e CD18^{Low}. O homogenato das patas dos animais não infectados foi utilizado como controle. De acordo com nossos dados, observamos que houve aumento significativo da produção de NO nas patas dos animais de ambas as linhagens em 5 semanas após a infecção, em comparação aos animais não infectados (figura 5A). Após 8 semanas da infecção, a quantidade de NO foi ainda maior em ambos os animais infectados, quando comparada com o período de 5 semanas (figura 5B). Em ambos os períodos investigados, os animais WT e CD18^{Low} infectados apresentaram similar produção de NO entre si (figuras 5A e 5B, respectivamente).

Figura 5: Quantificação da produção de NO nas patas de camundongos selvagens (WT) e deficientes da expressão de CD18 (CD18^{Low}) infectados ou não com *L. amazonensis*. Fêmeas de camundongos de ambas as linhagens, foram infectadas ou não com 1×10^6 promastigotas de *L. amazonensis* na pata posterior, e o homogenato das patas foi obtido em 5 (A) ou 8 (B) semanas após a infecção. **N.I.:** não infectado; Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM (n = 6- 8 animais por grupo), utilizando análise de Newman- Keuls. * $p < 0.05$ (em comparação ao camundongo não infectado). Resultados representativos de 2 experimentos independentes.

7.5. Quantificação da produção de eicosanoides

A fim de verificar se a reduzida expressão da molécula CD18 interfere na produção de leucotrienos e de prostaglandinas no sítio da infecção, estes mediadores lipídicos foram quantificados no homogenato das patas dos animais selvagens e CD18^{Low}, nos períodos de 5 e 8 semanas após a infecção. Animais não infectados foram utilizados como grupos controle.

De acordo com os resultados obtidos, ambos os animais selvagens e CD18^{Low} tiveram a produção de LTB₄ significativamente aumentada nas patas, em comparação aos animais não infectados, nos períodos de 5 e 8 semanas após a infecção (figuras 6A e 6B, respectivamente). No entanto, a produção de LTB₄ nas patas dos animais CD18^{Low} foi significativamente maior após 5 semanas da infecção e significativamente menor após 8 semanas, em comparação aos animais selvagens (figuras 6A e 6B, respectivamente).

Em relação à produção de PGE₂, observamos que houve aumento de sua produção apenas nos animais CD18^{Low} em 5 semanas após a infecção, em comparação aos animais não infectados e aos animais WT infectados (figura 6C). Por outro lado, em 8 semanas após a infecção, tanto os animais selvagens quanto CD18^{Low} tiveram significativo aumento da produção de PGE₂, em comparação aos animais não infectados (figura 6D). Entretanto, neste mesmo período, os animais CD18^{Low} infectados tiveram menor produção de PGE₂, em comparação com a dos animais selvagens infectados (figura 6D).

Quanto a LTC₄, esta teve sua produção significativamente aumentada nas patas dos animais CD18^{Low} infectados, em comparação aos não infectados em 5 semanas após a infecção. Neste mesmo período, o aumento da LTC₄ nas patas dos animais selvagens infectados não foi significativo em comparação aos animais não infectados (figura 6E). No entanto, em 8 semanas após a infecção, os animais infectados de ambas as linhagens tiveram aumento significativo de LTC₄ produzido, em comparação aos animais não infectados (figura 6F). Entretanto, a produção de LTC₄ foi significativamente maior nas patas dos camundongos CD18^{Low} em comparação aos selvagens, em ambos os períodos após a infecção (figuras 6E e 6F).

Também observamos que os camundongos de ambas as linhagens tiveram aumento significativo de PGD₂ produzida nas patas em 5 e 8 semanas após a infecção, em comparação aos animais não infectados (figuras 6G e 6H, respectivamente). No entanto, PGD₂ foi produzida de modo similar nos animais selvagens e CD18^{Low} em ambos os períodos após a infecção (figuras 6G e 6H).

Figura 6: Quantificação da produção de eicosanoides nas patas de camundongos selvagens (WT) e CD18^{Low} infectados ou não com *L. amazonensis*. Fêmeas de camundongos de ambas as linhagens foram infectadas ou não com 1×10^6 promastigotas de *L. amazonensis*. O homogenato das patas foi obtido em 5 e em 8 semanas após a infecção. **N.I.:** não infectado; Dados expressos como média $\pm$ SEM (n = 4 - 6 animais por grupo), utilizando análise de Newman-Keuls. *p<0.05 (em comparação ao camundongo não infectado); # p<0.05 (em comparação ao camundongo selvagem).

7.6 Produção de citocinas nas patas

Para avaliar se a deficiência da expressão da molécula CD18 resulta em alterações na produção de citocinas no sítio da infecção, estas foram quantificadas no homogenato das patas dos camundongos selvagens e CD18^{Low}, em 5 e 8 semanas após a infecção. Animais não infectados foram utilizados como controle.

Em relação à TNF- α , sua produção foi significativamente aumentada nos animais de ambas as linhagens, em 5 e 8 semanas após a infecção, em comparação aos animais não infectados (figuras 7A e 7B, respectivamente). Entretanto, os animais CD18^{Low} produziram quantidade significativamente maior de TNF- α nas patas em 5 semanas após a infecção, em comparação aos animais selvagens (figura 7A), enquanto que em 8 semanas após a infecção, os animais de ambas as linhagens tiveram similar produção da citocina (figura 7B).

Como ocorrido com TNF- α , a produção de IFN- γ não foi detectável nas patas dos animais não infectados pela técnica de ELISA, enquanto que foi induzida pela infecção nos animais selvagens e CD18^{Low} em ambos os períodos investigados (figuras 7C e 7D). No entanto, a produção de IFN- γ foi significativamente maior nos camundongos CD18^{Low}, do que nos animais selvagens em 5 semanas após a infecção (figura 7C), mas foi similar em ambos os animais no período de 8 semanas (figura 7D).

Quanto a produção de IL-12, não observamos alterações significativas em sua quantidade nas patas dos camundongos selvagens em 5 semanas após a infecção. Contrariamente, neste mesmo período, os camundongos CD18^{Low} tiveram aumento significativo de IL-12 produzida suas patas infectadas, tanto em comparação aos animais não infectados, quanto aos animais selvagens infectados (figura 8A). Já em 8 semanas após

a infecção, a produção de IL-12 foi reduzida similarmente nas patas de ambos os animais infectados, em comparação aos não infectados (figura 8B).

A produção de GM-CSF foi significativamente aumentada nas patas dos animais de ambas as linhagens, nos períodos de 5 e 8 semanas após a infecção, em comparação aos animais não infectados (figuras 8C e 8D, respectivamente). Por outro lado, esta citocina foi significativamente menos produzida nos animais CD18^{Low} em 5 semanas após a infecção, em comparação aos animais selvagens (figura 8C). Já no período de 8 semanas, a produção de GM-CSF foi semelhante entre os animais de ambas as linhagens (figura 8D).

Em relação a IL-10, foi observado que o aumento de sua produção nas patas dos animais selvagens e CD18^{Low} não foi significativo em comparação aos animais não infectados, tanto em 5 quanto em 8 semanas após a infecção (figuras 9A e 9B, respectivamente).

A produção de IL-4 nas patas dos animais selvagens após 5 semanas da infecção foi similar aos não infectados, mas foi significativamente maior em comparação aos animais CD18^{Low} infectados (figura 9C). Por outro lado, neste mesmo período, a infecção reduziu a produção de IL-4 nos animais CD18^{Low}, em comparação aos não infectados (figura 9C). No entanto, em 8 semanas após a infecção, os animais de ambas as linhagens tiveram aumento significativo de IL-4, em comparação aos não infectados, mas apresentaram produção similar da citocina entre si (figura 9D).

Figura 7: Quantificação da produção de TNF- α e IFN- γ nas patas de camundongos selvagens (WT) e deficientes da expressão de CD18 (CD18^{Low}) infectados ou não com *L. amazonensis*. Fêmeas de camundongos de ambas as linhagens, foram infectadas ou não com 1×10^6 promastigotas de *L. amazonensis* na pata posterior, e o homogenato das patas foi obtido em 5 semanas (A e C) e 8 semanas (B e D) semanas após a infecção. **N.I.:** não infectado; **N.D.:** não detectável. Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM (n = 5 - 8 animais por grupo), utilizando análise de Newman-Keuls. *p<0.05 (em comparação ao camundongo não infectado); # p<0.05 (em comparação ao camundongo selvagem). Resultados representativos de 2 experimentos independentes.

Figura 8: Quantificação da produção de IL-12 e GM-CSF nas patas de camundongos selvagens (WT) e deficientes da expressão de CD18 (CD18^{Low}) infectados ou não com *L. amazonensis*. Fêmeas de camundongos de ambas as linhagens, foram infectadas ou não com 1×10^6 promastigotas de *L. amazonensis* na pata posterior, e o homogenato das patas foi obtido em 5 semanas (A e C) e 8 semanas (B e D) semanas após a infecção. **N.I.:** não infectado; **N.D.:** não detectável. Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM (n = 5 - 8 animais por grupo), utilizando análise de Newman-Keuls. *p<0.05 (em comparação ao camundongo não infectado); # p<0.05 (em comparação ao camundongo selvagem). Resultados representativos de 2 experimentos independentes.

Figura 9: Quantificação da produção de IL-10 e IL-4 nas patas de camundongos selvagens (WT) e deficientes da expressão de CD18 (CD18^{Low}) infectados ou não com *L. amazonensis*.

Fêmeas de camundongos de ambas as linhagens, foram infectadas ou não com 1×10^6 promastigotas de *L. amazonensis* na pata posterior, e o homogenato das patas foi obtido em 5 semanas (A e C) e 8 semanas (B e D) semanas após a infecção. **N.I.:** não infectado; **N.D.:** não detectável. Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM (n = 5 - 8 animais por grupo), utilizando análise de Newman-Keuls. *p<0.05 (em comparação ao camundongo não infectado); # p<0.05 (em comparação ao camundongo selvagem). Resultados representativos de 2 experimentos independentes.

7.7 Produção de quimiocinas nas patas

Também investigamos se a deficiência da expressão de CD18 também alteraria a produção de quimiocinas sítio de infecção por *L. amazonensis*.

De acordo com os resultados obtidos, observamos que houve aumento significativo da produção de RANTES nas patas de ambos os animais selvagens e CD18^{Low}, em 5 e em 8 semanas após a infecção (figuras 10A e 10B, respectivamente). Por outro lado, os animais CD18^{Low} tiveram maior produção da quimiocina em 5 semanas após a infecção (figura 10A), mas foi significativamente reduzida no período de 8 semanas (figura 10B), em comparação aos animais selvagens. Em relação a produção de MCP-1 α , esta não foi detectável nas patas dos animais não infectados de ambas as linhagens, pela técnica de ELISA (figuras 10C e 10D). No entanto, observamos que sua produção foi significativamente aumentada nas patas dos animais selvagens e CD18^{Low} em ambos os períodos após a infecção, em comparação aos animais não infectados. No entanto, a quantidade de MCP-1 α produzida foi similar entre os animais selvagens e CD18^{Low} em 5 e em 8 semanas após a infecção (figuras 10C e 10D, respectivamente).

Figura 10: Quantificação da produção de quimiocinas produzidas nas patas de camundongos selvagens (WT) e deficientes da expressão de CD18 (CD18^{Low}) infectados ou não com *L. amazonensis*. Fêmeas de camundongos de ambas as linhagens, foram infectadas ou não com 1×10^6 promastigotas de *L.a* –GFP na pata posterior, e o homogenato das patas foi obtido em 5 (A e C) ou 8 semanas (B e D) após a infecção. **N.I.:** não infectado; **N.D.:** não detectável. Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM ($n = 5 - 8$ animais por grupo), utilizando análise de Newman-Keuls. * $p < 0.05$ (em comparação ao camundongos não infectado); # $p < 0.05$ (em comparação ao camundongo selvagem). Resultados representativos de 2 experimentos independentes.

Discussão

8. DISCUSSÃO

As β_2 -integrinas e os mediadores lipídicos (leucotrienos e prostaglandinas) são de grande importância na modulação da resposta imune na leishmaniose (Schönlau et al., 2000; Serezani et al., 2006). Nosso grupo de pesquisa já demonstrou anteriormente que a molécula CD18 (constituente de todas as β_2 -integrinas) modula a produção de mediadores lipídicos, em infecção *in vitro* com o fungo *H. capsulatum* (Sorgi et al., 2009). No entanto, devido ao fato de que não há dados na literatura que mostram a relação entre a expressão de β_2 -integrinas e a produção de eicosanoides na resposta imune em infecção por *Leishmania*, esta tese teve como objetivo investigar o efeito da deficiência das β_2 -integrinas na produção de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos, em modelo de infecção experimental por *L. amazonensis*.

Inicialmente, acompanhamos o desenvolvimento da infecção nas patas dos camundongos selvagens e CD18^{Low}, através da mensuração do edema local e da quantificação da carga parasitária. De acordo com os nossos resultados, os animais CD18^{Low} apresentaram maior edema e carga parasitária em comparação aos camundongos selvagens, após 8 semanas da infecção. Estes dados estão parcialmente de acordo com Schönlau et al. (2000), os quais observaram que camundongos CD18^{-/-} infectados com *L. major* apresentaram maior carga parasitária nas patas, mas o desenvolvimento do edema no local foi similar ao dos animais selvagens. Contrariamente, Lee et al. (2003) observaram que camundongos CD18^{-/-} infectados com *L. major* apresentaram menor edema e parasitemia nas patas, em comparação com os camundongos selvagens. Tais discrepâncias indicam que o efeito da deficiência da expressão de CD18 na leishmaniose ainda necessita ser melhor investigado. No entanto, as contradições podem

ser explicadas pela diferença das espécies e cepas de *Leishmania* utilizadas, ocasionando em variações na resposta imune do organismo ao parasita (Milon et al., 1995 ; Alexander ; Bryson, 2005).

A fim de verificarmos as alterações no infiltrado celular no local da infecção, realizamos a análise histopatológica das patas dos animais de ambas as linhagens. Nos cortes histológicos das patas dos camundongos CD18^{Low}, observamos maior presença de macrófagos infectados em comparação aos animais selvagens, o que confirmou o aumento da parasitemia nas patas dos animais CD18^{Low}. Nossos resultados estão de acordo com os observados por Schönlaue et al. (2000), os quais demonstraram que macrófagos CD18^{-/-} infectados com *L. major* tiveram atividade leishmanicida reduzida, ocasionando maior carga parasitária. Por outro lado, Carter et al. (2009) demonstraram que macrófagos murinos deficientes de CD11b (CD11b^{-/-}) apresentaram capacidade de fagocitar e matar *L. major in vitro* similar à dos macrófagos não deficientes. No entanto, este trabalho não considerou o possível papel de outra β_2 -integrina, LFA-1 (CD11c/CD18) também expressa nestas células, o que poderia compensar a deficiência de CR3 (CD11b/CD18).

A análise histopatológica das patas também mostrou que os animais CD18^{Low} infectados apresentaram maior número de eosinófilos no infiltrado celular, em comparação aos animais selvagens. Tal resultado foi confirmado pelo aumento da atividade da enzima EPO no homogenato das patas dos animais CD18^{Low} infectados, em ambos os períodos de 5 e 8 semanas após a infecção. Trabalhos da literatura já relataram a presença de eosinófilos no sítio de infecção por *L. amazonensis* (Pompeu et al., 1992 ; Guerra et al., 2010). No entanto, não há estudos que mostram se as β_2 -integrinas são cruciais na adesão e transmigração de eosinófilos na leishmaniose. Além disso, em outros modelos experimentais, sugere-se que estas moléculas atuam de formas distintas na migração de eosinófilos. Por

exemplo, Larangeira et al. (2001) observaram que camundongos injetados com LPS ou OVA e pré-tratados com anti-CD11b/CD18, tiveram inibição do acúmulo de eosinófilos na cavidade pleural. Por outro lado, Kanwar et al. (2001) observaram que camundongos *knockout* para MAC-1 apresentaram intensa eosinofilia tecidual pulmonar após 1 semana de exposição à OVA, sendo similar à apresentada pelos animais selvagens após 5 semanas de exposição ao alérgeno. Além disso, outras integrinas, como a β_1 -integrina VLA-4, também estão envolvidas na migração de eosinófilos (Jia et al., 1999), podendo até mesmo atuar em conjunto com CD18 (Schneider et al., 1999).

Há outros fatores que podem explicar o aumento de eosinófilos nos animais CD18^{Low}. É sabido que a *Leishmania* (incluindo a *L. amazonensis*) pode induzir a quimiotaxia celular (Saito et al., 1996 ;van Zandbergen et al., 2002). Outro ponto a considerar é que as β_2 -integrinas estão envolvidas em outros mecanismos celulares, como a indução da apoptose de eosinófilos. Por exemplo, Kim et al. (1999) observaram que a apoptose de eosinófilos induzida por Fc γ RII, é inibida na presença do anticorpo anti-CD18. Além disso, quimiocinas e mediadores lipídicos como os leucotrienos, são potentes agentes quimiotáticos para eosinófilos (Faccioli et al., 1991; Oliveira et al., 1997; Shahabuddin et al., 2000 ; Fregonense et al., 2002 ; Kim ; Luster, 2007). Deste modo, podemos sugerir que os camundongos CD18^{Low} tem maior acúmulo de eosinófilos devido a uma serie conjunta de fatores. Além disso, nós observamos que estes animais tiveram aumento inicial da produção de RANTES, LTB₄ e LTC₄ nas patas infectadas, em comparação com os camundongos selvagens.

O papel dos eosinófilos na leishmaniose tem sido investigado por diversos estudos. Sabe-se que estas células auxiliam na morte de microrganismos, através da fagocitose, *burst* respiratório e pela liberação de proteínas citotóxicas dos grânulos citoplasmáticos (Akuthota et al.,

2008; Blanchard ; Rotenby, 2009). Camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com IL-5 (citocina estimuladora de eosinófilos) apresentaram menor carga parasitária, em comparação aos animais não tratados (Watanabe et al., 2004). Neste mesmo estudo, foi observado que em co-cultura de eosinófilos e promastigotas de *L. amazonensis*, houve morte do parasita por intermédio da produção de peróxido de hidrogênio. Além disso, já tinha sido anteriormente descrito que os eosinófilos podem atuar diretamente sobre os amastigotas no sítio de infecção, através da liberação de peroxidase (Grimaldi et al., 1984; Pimenta et al., 1987). Com base nestas observações, seria esperado que os animais CD18^{Low} apresentassem maior controle da infecção, e portanto, menor número de parasitas devido à maior presença de eosinófilos observada no sítio de infecção. Além disso, estes camundongos tiveram maior produção da enzima EPO nos períodos de 5 e 8 semanas após a infecção, em comparação aos camundongos selvagens. No entanto, nossos resultados mostraram que apesar do maior número de eosinófilos no sítio de infecção, estas células podem estar com suas funções efetoras reduzidas pela diminuição da expressão de CD18, favorecendo a parasitemia nas patas.

Neutrófilos são rapidamente recrutados para o sítio de infecção na leishmaniose experimental (Beil et al., 1992 ; Wilson et al., 1987) e são importantes para a defesa do organismo por produzir citocinas pro-inflamatórias, quimiocinas e por liberar proteases provindas dos seus grânulos (revisado por Ribeiro-Gomes ; Sacks, 2012). Assim, verificamos a presença indireta de neutrófilos nas patas dos camundongos selvagens e CD18^{Low} pela atividade da enzima MPO. Nossos resultados mostram que a infecção induziu o aumento destas células nas patas modo similar nos nestes camundongos, em ambos os períodos após a infecção. Isso pode ter ocorrido devido à migração de neutrófilos também ter sido independente de CD18, uma vez que outras moléculas de adesão podem compensar a

deficiência de β_2 integrinas, como a β_1 -integrina VLA-4 (Kubes et al., 1995; Tasaka et al., 2002), como ocorre com eosinófilos. Além disso, Bhaumik et al. (2013) demonstraram que os neutrófilos podem migrar para o sítio de infecção por *L. major* por intermédio de galectina-3. Já Carter et al. (2009) relataram que camundongos CD11b^{-/-} e infectados com *L. major* tiveram recrutamento mais rápido de neutrófilos nas lesões, do que os animais selvagens nos estágios mais iniciais da infecção. Deste modo, podemos considerar que, a similaridade da presença de neutrófilos nos camundongos selvagens e CD18^{Low} pode ter sido por migração independente de β_2 -integrinas. Além disso, fatores quimiotáticos, como LTB₄, podem estar envolvidos no recrutamento de neutrófilos (Kim ; Luster, 2007 ; Afonso et al., 2012). No entanto, de acordo com nossos resultados, apesar dos animais CD18^{low} terem apresentado maior produção deste eicosanoide em 5 semanas após a infecção, parece que isso não influenciou no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção após 8 semanas. Outro fato a considerar seria o envolvimento das β_2 -integrinas na ativação de neutrófilos, uma vez que Lau et al. (2005) demonstraram que a interação entre a enzima MPO e CD11b induz a ativação de diferentes vias de sinalização intracelulares em neutrófilos, como da MAP quinase e translocação do fator de transcrição NF- κ B. Além disso, Schymeinsky et al. (2007) demonstraram que a ativação da proteína quinase Syk pelas β_2 -integrinas são importantes para a fagocitose e *burst* oxidativo em neutrófilos. Com base nestas informações, podemos supor que a redução da expressão de CD18 pode ter alterado os mecanismos efetores de neutrófilos contra a infecção por *L. amazonensis*, o que explicaria a maior parasitemia nos animais CD18^{Low}.

O NO é geralmente considerado importante para a defesa contra a infecção por *Leishmania* (Liew et al., 1990 ; Stenger et al., 1996; Souza et al., 2010). Por outro lado, sabe-se também que a interação do parasita com

o receptor CR3 favorece a fagocitose “silenciosa”, ou seja, com redução da produção de espécies reativas de oxigênio (Wright ; Silverstein, 1983 ; Mosser ; Edelson, 1987). Como observamos que os animais CD18^{Low} apresentaram maior carga parasitária, investigamos se a redução da expressão de CD18 poderia alterar a produção de NO no sítio da infecção. Assim, ao contrário do esperado, a produção de NO foi induzida pela infecção de modo similar nos animais CD18^{Low} e selvagens. No entanto, este resultado corrobora com descrições de que a morte de *L. amazonensis* não depende da produção de NO (Carmo et al., 2010). Também era esperado que a redução da expressão das β_2 -integrinas aumentasse a produção de NO, mas esta pode ter sido induzida por outras vias, como foi demonstrado pelo trabalho de Lima-Junior *et al.*, (2013). Neste trabalho, foi observado que a infecção por *L. amazonensis* pode ativar o inflamassoma Nlrp3, com subsequente produção de NO induzida por IL-1 β . Além disso, estes autores também relataram que camundongos deficientes para Nlrp3 apresentaram maior replicação do parasita. Com base nestas observações, o aumento da carga parasitária nos animais CD18^{Low} pode ser explicado de três maneiras: 1) a produção de NO pode ter ocorrido por outro mecanismo independente da expressão de β_2 -integrinas; 2) a produção de NO não seria o único mecanismo que tornariam os animais selvagens mais resistentes à infecção; 3) provável redução de outros mecanismos efetores leishmanicidas das células do infiltrado celular nas patas destes animais.

Mediadores lipídicos, como leucotrienos (LTs) e prostaglandinas (PGs) são importantes moduladores da resposta imune. Dentre eles, tem sido bem descrito na literatura o papel imunoestimulador do LTB₄ sobre as atividades efetoras dos fagócitos nas infecções (Mancuso et al., 1998 ; Peters-Golden et al., 2005), incluindo a leishmaniose (Serezani et al., 2006; Tavares et al., 2014) .Quanto às prostaglandinas, sabe-se que PGE₂

está relacionada com o favorecimento da infecção por *Leishmania*, devido ao seu papel imunossupressor nas atividades efectoras celulares (Lonardoni *et al.*, 2000; Penke *et al.*, 2013).

Ao investigarmos se a maior suscetibilidade dos camundongos CD18^{Low} seria devido às alterações na produção destes mediadores lipídicos, nossos resultados mostraram que a infecção ocasionou aumento significativo de LTB₄ e de PGE₂ nos camundongos de ambas as linhagens. No entanto, a produção destes mediadores lipídicos foi significativamente maior nos animais CD18^{Low} em 5 semanas do que em 8 semanas após a infecção, em comparação com os camundongos selvagens. Desta forma, podemos supor que houve um cenário nos animais CD18^{Low} onde os efeitos inibitórios PGE₂ estariam se contrapondo aos efeitos ativadores do LTB₄, ocasionando maior suscetibilidade destes animais à infecção.

A maior resistência dos camundongos selvagens à infecção pode ter sido pela relação cruzada (*crosstalk*) entre os efeitos de LTB₄ e de PGE₂, que ao interagirem com seus receptores, podem exercer efeitos antagônicos atividade efectoras dos fagócitos por modulação da produção de AMPc intracelular (Lee *et al.*, 2009 ; Peres-Buzalaf *et al.*, 2011). Assim, o LTB₄ pode ter se sobreposto aos efeitos imunossupressores exercidos pela PGE₂ sobre os fagócitos. Lee *et al.* (2009) demonstraram que mesmo em menor quantidade produzida do que a PGE₂, o LTB₄ pode exercer seu efeito imunoestimulador na resposta imune. Assim, iremos futuramente investigar se a redução da expressão de CD18 ocasionou diferenças na expressão dos receptores específicos para LTB₄ e de PGE₂, na infecção por *L. amazonensis*. Além disso, é sabido que o AMPc pode contribuir para a sobrevivência da *Leishmania* no interior dos fagócitos, favorecendo maior resistência às alterações de pH no fagossomo e induzindo a expressão de genes de proteínas antioxidantes no parasita, protegendo-o contra as ações microbidas do estresse oxidativo (Bhattacharyya *et al.*, 2008 ; Biswas *et*

al., 2011). Além disso, também já foi relatado que a ativação de PKA via AMPc auxilia na diferenciação intracelular de promastigotas de *L. amazonensis* (Genestra et al., 2004).

Uma vez que observamos que os animais CD18^{Low} apresentaram maior edema no sítio de infecção, também investigamos se houve alterações na produção de LTC₄. Nossos dados mostraram que, de alguma forma, a redução da expressão de CD18 induziu significativamente a produção deste mediador lipídico na infecção por *L. amazonensis*. Contrariamente, Brady e Serhan (1992) demonstraram que o bloqueio de CD18 e de L-selectinas em células polimorfonucleares pode reduzir a produção de LTC₄, mas tal efeito não foi observado em modelo de infecção. Em modelos de leishmaniose experimental, há estudos que relataram que a infecção de macrófagos e células do baço com *L. donovani* pode aumentar a produção de LTC₄ (Reiner ; Malemud, 1984; 1985). Já Serezani et al. (2006) demonstraram que em macrófagos infectados e pré-tratados ou não com antagonista do receptor CysLT1, não houve diferença significativa no índice fagocítico. Apesar de não termos verificado a produção de LTD₄, nossos dados sugerem que para os animais CD18^{Low}, a produção de LTC₄ deve ter sido mais relevante para o recrutamento celular (especialmente de eosinófilos), do que para a atividade microbicida.

Já foi descrito por outros trabalhos que a PGD₂ também auxilia no recrutamento de eosinófilos, além de induzir a expressão de CD11b nestas células (Hirai et al., 2001; Monneret et al., 2001) e ser produzida por mastócitos e eosinófilos (Hyo et al., 2007 ; Luna-Gomes et al., 2011). Além disso, já foi descrito que PGD₂ é capaz de estimular a produção de LTC₄ pelos eosinófilos (Mesquita-Santos et al., 2006). De acordo com nossos dados, a produção de PGD₂ foi similar nos animais selvagens e CD18^{Low} em 5 e 8 semanas após a infecção. Interessantemente, tal aumento foi ainda maior após 8 semanas nos animais infectados de ambas as linhagens, mas

foi concomitante com o aumento de LTC₄ dos animais CD18^{Low}. Isso indica que a PGD₂ pode ter induzido a produção de LTC₄ na infecção, mas de modo mais eficiente nos camundongos CD18^{Low} do que nos camundongos selvagens, devido a maior presença de eosinófilos nas patas dos animais CD18^{Low}, o que corrobora com o demonstrado pelo trabalho por Mesquita-Santos et al. (2006). Apesar de estudos terem relatado que a PGD₂ é induzida na leishmaniose (Reiner ; Malemud, 1985), o papel deste eicosanoide nesta infecção ainda necessita ser esclarecido. Nossos resultados em relação aos animais CD18^{Low} sugerem que a PGD₂ (como já sugerimos no caso de LTC₄), está mais associada ao desenvolvimento do edema e no recrutamento de eosinófilos do que na eliminação do parasita.

Por fim investigamos se a redução da expressão de CD18 favoreceu o desenvolvimento da infecção por *L. amazonensis* devido a alterações na produção de citocinas e quimiocinas. Em relação às citocinas, nossos resultados mostraram que em 5 semanas após a infecção, os camundongos CD18^{Low} (em comparação com os camundongos selvagens) apresentaram um padrão mais inflamatório e direcionado para resposta Th1, devido a maior produção de TNF- α , IL-12 e de IFN- γ , concomitantemente com a diminuição de IL-4. Por outro lado, após a 8ª semana, os animais CD18^{Low} apresentaram produção de TNF- α e de GM-CSF semelhantes aos animais selvagens, mas com redução significativa de IFN- γ . A diminuição da produção de IFN- γ também foi observada em camundongos CD18^{-/-} em infecção por *L. major*, o que favoreceu a suscetibilidade à doença (Schönlau et al., 2000). Ainda na 8ª semana após a infecção, os animais de ambas as linhagens tiveram semelhante redução de IL-12, sendo este um dos mecanismos de evasão da *L. amazonensis* à resposta padrão Th1 (Carrera et al., 1996; Jones et al. 2000). Entretanto, já foi demonstrado que na infecção por *L. major*, o parasita pode reduzir a produção de IL-12 de macrófagos murinos via interação com CR3 (Ricardo-Carter et al., 2013)e

também com CD18 e CD11b (Schönlau et al., 2000; Ricardo-Carter et al., 2013). Tais discrepâncias podem ter sido pela utilização de camundongos totalmente deficientes da expressão de β_2 -integrinas ou de seus componentes, enquanto utilizamos animais apenas com reduzida expressão de β_2 -integrinas.

Ao verificarmos se as citocinas imunossupressoras IL-10 e IL-4 estariam envolvidas na redução de IL-12, nossos dados mostraram que a IL-10 não exerceu nenhum efeito negativo sobre a produção de IL-12 nos camundongos selvagens e CD18^{Low} infectados. Por outro lado, a IL-4 pode ter inibido a produção de IL-12 nestes animais, uma vez que o aumento de IL-12 nos camundongos CD18^{Low} foi concomitante com a redução de IL-4 em 5 semanas após a infecção. Além disso, na 8ª semana, a inibição similar de IL-12 nos camundongos selvagens e CD18^{Low} ocorreu paralelamente ao aumento de IL-4, o qual também foi similar em ambos os animais infectados. Nossos resultados corroboram parcialmente com o trabalho de Carter et al. (2009), o qual mostra que em períodos tardios de infecção por *L. major*, a falta da expressão de CR3 não altera a produção de IL-10 e de IL-4 em células do linfonodo murinos, em comparação às células não deficientes. No entanto, ao contrário do que observamos, Jones et al. (2000) demonstraram que a redução de IL-12 na infecção por *L. amazonensis* é independente do aumento de IL-4. Nossos dados também sugerem que o aumento do edema e do parasitismo observados nos animais CD18^{Low} não foram resultantes de diferenças na produção de IL-10 e de GM-CSF, uma vez que estas citocinas foram semelhantes nas duas linhagens de animais infectados, especialmente na 8ª semana após a infecção.

Quanto a produção de quimiocinas, nossos resultados mostraram que a produção de MCP-1 α foi semelhantemente produzida nos animais selvagens e CD18^{Low}, em ambos os períodos após a infecção. Apesar de esta quimiocina auxiliar na redução da infecção em macrófagos e

monócitos (Bhattacharyya et al., 2002 ; Brandonísio et al., 2002), nossos resultados mostram que MCP-1 α não foi importante na proteção contra a infecção por *L. amazonensis* , uma vez que sua produção foi independente da redução da expressão de CD18. Este resultado está de acordo ao observado por Carmo et al. (2010), os quais observaram que a morte de *L. amazonensis* em co-cultura de neutrófilos e macrófagos foi independente da produção desta quimiocina. Além de MCP-1 α , RANTES também é induzida na infecção por *Leishmania* (Matte ; Olivier, 2002). A produção desta quimiocina foi maior nos animais CD18^{Low} em 5 semanas após a infecção, mas foi reduzida em 8 semanas, em comparação aos animais selvagens. RANTES pode ter tido participação no recrutamento inicial de eosinófilos e no desenvolvimento do edema nos animais CD18^{Low}, mas não pareceu ter exercido um papel importante na resposta contra a doença. Assim, nossos resultados indicaram que a redução da expressão de CD18 na produção destas quimiocinas foi variável quanto ao tempo de infecção e não tiveram relação com a suscetibilidade ao parasita.

Em resumo, com base nos resultados obtidos, supomos que a redução da expressão de CD18 pode desfavorecer as atividades efectoras de células como macrófagos, neutrófilos e eosinófilos no sítio de infecção por *L. amazonensis*. Além disso, a maior suscetibilidade dos camundongos CD18^{Low} à infecção foi independente da produção de NO e de IL-10 e da redução de IL-12 mediada por IL-4. No entanto, estes animais apresentaram alterações na produção de LTB₄ e de PGE₂ , as quais podem ter favorecido a suscetibilidade a infecção. Também demonstramos que a redução da expressão de CD18 não alterou a migração de neutrófilos e de eosinófilos no sítio de infecção. Além disso, o maior desenvolvimento do edema e o recrutamento de eosinófilos no local da infecção nos camundongos CD18^{Low} foi independente da produção de MCP-1 α e

parcialmente dependente de RANTES, mas LTC_4 , em conjunto com PGD_2 , podem ter sido os principais responsáveis por esta migração.

Conclusão

9. CONCLUSÃO

A redução da expressão de β_2 -integrinas favorece a suscetibilidade à infecção por *L.amazonensis* por ocasionar alterações na produção de LTB_4 e de PGE_2 e por inibir as atividades efectoras das células inflamatórias (macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) presentes no sítio de infecção.

Referências Bibliográficas

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AFONSO, LC, SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.**1993 Jul;61(7): 2952-59.
- AFONSO, PV, JANKA-JUNTILA, M, LEE, YJ, MCCANN, CP, OLIVER, CM, AAMER, KA, LOSERT, W, CICERONE, MT, PARENT, CA. LTB₄ is a signal-relay molecule during neutrophil chemotaxis. **Dev. Cell.** 2012 May;22(5):1079-91.
- AGARD, M, ASAKRAN, S, MORICI, LA. PGE₂ suppression of innate immunity during mucosal bacterial infection.**Front. Cell. Infect. Microbiol.**2013 Aug 21;3:45. doi: 10.3389 /fcimb.2013.00045.
- AKUTHOTA P, WANG, HB, SPENCER, LA, WELLER, PF. Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. **Clin. Exp. Allergy** 2008 Aug; 38(8): 1254–63.
- ALEXANDER, J, BRYSON, K. Th1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunol. Lett.** 2005 Jun15;99(1):17-23.
- ALTEN, R, GROMNICA-IHLE, E, POHL, C, EMMERICH, J, STEFFGEN, J, ROSCHER, R, SIGMUND, R, SCHMOLKE, B. Inhibition of leukotriene B₄-induced CD11B/CD18 (Mac-1) expression by BIIL 284, a new long acting LTB₄ receptor antagonist, in patients with rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.** 2004 Feb; 63(2): 170–76.
- ANÍBAL, FF, ROGERIO, AP, MALHEIRO, A, MACHADO, ER, MARTINS-FILHO, OA, ANDRADE, MC, SOARES, EG, MEDEIROS, AI, FACCIONI, LH. Impact of MK886 on eosinophil counts and phenotypic features in toxocariasis. **Scand. J. Immunol.** 2007 Apr;65(4):344-52.
- ARONOFF, DM., CANETTI, C, PETERS-GOLDEN, M. Prostaglandin E₂ inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. **J. Immunol.** 2004 Jul 1;173(1):559-65.

* De acordo com o Estilo Vancouver segundo as “Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP”. 2ª edição revisada e ampliada- São Paulo- 2009

- ARONOFF, DM, CANETTI, C, SEREZANI, CH, LUO, M, PETERS-GOLDEN, M.
Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1. **J. Immunol.** 2005 Jan 15;174(2):595-99.
- BARCELOS, LS, TALVANI, A, TEIXEIRA, AS, VIEIRA, LQ, CASSALI, GD, ANDRADE, SP, TEIXEIRA, MM. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. **J. Leukoc. Biol.** 2005 Aug;78(2):352-58.
- BELKAID Y, MENDEZ S, LIRA R, KADAMBI N, MILON G, SACKS D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **J. Immunol.** 2000 Jul 15;165(2): 969-77.
- BELKAID, Y, PICCIRILLO, CA, MENDEZ, S, SHEVACH, EM, SACKS, DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature** 2002 Dec5; 420 (6915): 502-7.
- BERENDS C, DIJKHUIZEN, B, DE MONCHY, JGR, DUBOIS, AEJ, GERRITSEN, J, KAUFFMAN, HF. Inhibition of PAF-induced expression of CD11b and shedding of L-selectin on human neutrophils and eosinophils by the type IV selective PDE inhibitor, rolipram. **Eur. Respir. J.** 1997 May;10(5):1000-7.
- BHAUMIK, P, ST-PIERRE, G, MILOT, V, ST-PIERRE, C, SATO, S. Galectin-3 facilitates neutrophil recruitment as an innate immune response to a parasitic protozoa cutaneous infection. **J. Immunol.** 2013 Jan 15;190(2):630-40
- BHATTACHARYYA, S, GHOSH, S, DASGUPTA, B, MAZUMBER, D, ROY, S, MAJUMDAR, S. Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via generation of nitric oxide. **J. Infect. Dis.** 2002 Jun ;185(12):1704-8
- BLANCHARD, C, ROTHENBERG, ME. Biology of the eosinophil. **Adv. Immunol.** 2009;101:81-121.
- BRADY, HR., SERHAN, CN. Adhesion promotes transcellular leukotriene biosynthesis during neutrophil-glomerular endothelial cell interactions: inhibition by antibodies against CD18 and L-selectin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1992 Aug 14;186(3):1307-14.

- BRANDONISIO, O, PANARO, MA, FUMAROLA, I, SISTO, M, LEOGRANDE, D, ACQUAFREDDA, A, SPINELLI, R, MITOLO, V. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 α induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. **Clin. Exp. Med.** 2002 Nov;2(3):125-29.
- BREYER, RM, BAGDASSARIAN, CK, MYERS, SA, BREYER, MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 2001;41:661-90
- BEIL, WJ, MEINARDUS-HAGER, G, NEUGEBAUER, DC, ANDSORG, C. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **J. Leukoc.Biol.** 1992 Aug;52(2):135-42.
- BISWAS, A, BHATTACHARYYA, A, DAS, PK. Role of CAMP signaling in the survival and infectivity of the protozoan parasite, *Leishmania donovani*. **Mol. Biol. Int.** 2011;782971.doi:10.4061/2011/782971.
- CAMPOS, DCS. Papel dos eicosanoides na resposta inflamatória da leishmaniose difusa. Monografia. Faculdade de Medicina da Bahia (FMB). Universidade Federal da Bahia (UFBA), 2012.
- CANETTI, C, HU, B, CURTIS, JL, PETERS-GOLDEN, M. Syk activation is a leukotriene B4-regulated event involved in macrophage phagocytosis of IgG-coated targets but not apoptotic cells. **Blood** 2003 Sep;102(5):1877-83.
- CANGUSSÚ, SD, SOUZA, CC, CAMPOS, CF, VIEIRA, LQ, AFONSO, LCC, ARANTES, RME. Histopathology of *Leishmania major* infection: revisiting *L. major* histopathology in the ear dermis infection model. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 2009 Sept; 104(6):918-22.
- CARMO, EVS, KATZ, S, BARBIÉRI, CL. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. **Plos One** 2010 Nov 5(11):e13815. doi: 10.1371/journal.pone.0013815.
- CARTER, CR, WHITCOMB, JP, CAMPBELL, JA, MUKBEL, RM, MCDOWELL, MA. Complement Receptor 3 deficiency influences lesion progression during *Leishmania major* infection in Balb/c mice. **Infect. Immun.** 2009 Dec;77(12):5668-75.

- CARRERA, L, GAZZINELLI, RT, BADOLATO, R, HIENY, S, MULLER, W, KUHN, R, SACKS, DL. Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. **J. Exp. Med.** 1996 Feb 1;183(2):515-26.
- CROFT, SL, SEIFERT, K, YARDLEY V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian J Med Res.** 2006 Mar;123(3):399–410.
- DE ASSIS, RR, IBRAIM, IC, NOGUEIRA, PM, SOARES, RP, TURCO, SJ. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochim. Biophys. Acta** 2012 Sep; 1820 (9): 1354-65.
- DENT, G, RÜHLMANN, E, BODTKE, K, MAGNUSSEN, H, RABE, KF. Up-regulation of human eosinophil leukotriene C4 generation through contact with bronchial epithelial cells. **Inflamm. Res.** 2000 May;49(5):236-9
- DESCOTEAUX, A, TURCO, SJ. Glycoconjugates in leishmania infectivity. **Biochim. Biophys. Acta** 1999 Oct ;1455(2-3):341-52
- DESJEUX, P. Leishmaniasis, public health aspects and control. **Clin. Dermatol.** 1996 Sep-Oct;14(5):417-23.
- DIAZ, NL, ARVELAEZ, FA, ZERPA, O, TAPIA, FJ. Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. **Clin Exp Dermatol** 2006 Jan; 31(1): 114-17.
- DING, SZ, LAM, SK, YUEN, ST, WONG, BCY, HUI, WM, HO, J, GUO, X, CHO, CH. Prostaglandin, tumor necrosis factor α and neutrophils: causative relationship in indomethacin-induced stomach injuries. **Eur. J. Pharmacol.** 1998 May 8;348(2-3):257-63
- DOMÍNGUEZ, M, TORANO, A. Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of *Leishmania* infection. **J. Exp. Med.** 1999 Jan 4;189(1):25-35
- ELLIS, M, BERNSEN, R, ALI-ZADEH, H, KRISTENSEN, J, HEDSTRÖM, U, POUGHIAS, L, BRESNIK, M, AL-ESSA, A, STEVENS, DA. A safety and feasibility study comparing an intermittent high dose with a daily standard dose of liposomal amphotericin B for persistent neutropenic fever. **J Med Microbiol.** 2009 Nov58;(Pt 11):1474–85.

- FACCIOLI, LH, NOURSHARGH, S, MOGBEL, R, WILLIAMS, FM, SEHMI, R, KAY, AB, WILLIAMS, TJ. The accumulation of ¹¹¹In-eosinophils induced by inflammatory mediators, in vivo. **Immunology** 1991 Jun;73(2):222-7.
- FREGONESE, L, SILVESTRI, M, SABATINI, F, ROSSI, GA. Cysteinyl leukotrienes induce human eosinophil locomotion and adhesion molecule expression via a CysLT1 receptor-mediated mechanism. **Clin. Exp. Allergy** 2002 May;32(5):745-50.
- FUJINO, H, SALVI, S, REGAN, JW. Differential regulation of phosphorylation of the cAMP response element-binding protein after activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2. **Mol. Pharmacol.** 2005 Jul;68(1):251-59.
- FUNK, C. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science** 2001 Nov 30;294(5548):1871-75
- GENESTRA, M, CYSNE-FILKELSTEIN, K, LEON, L. Protein kinase A activity is associated with metacyclogenesis in *Leishmania amazonensis*. **Cell. Biochem. Funct.** 2004 Sep-Oct;22(5):315-20.
- GOTO, H, LINDOSO, JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.** 2010 Apr;8(4): 419–33.
- GRAHAM, IL, LEFKOWITH, JB, ANDERSON, DC, BROWN, EJ. Immune-complex-stimulated neutrophil LTB4 production is dependent on β 2-integrins. **J. Cell Biol.** 1993 Mar;120(6):1509-17.
- GREEN, LC, WAGNER, DA, GLOGOWSKI, J, SKIPPER, PL, WISHNOK, JS, TANNENBAUM, SR. Analyses of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.** 1982 Oct;126(1):131-38.
- GRIMALDI, G, SOARES, MJ, MORIEARTY, PL. Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.** 1984 Sep;6(5):397-408
- GUERRA, CS, SILVA, RMM, CARVALHO, LOP., CABRESE, KS, BOZZA, PT, CÔRTE-REAL, S. Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by *Leishmania (L.) amazonensis*. **Int. J. Exp. Path.** 2010 Oct;91(5):451-59.
- GUPTA, G, OGHUMU, S, SATOSKAR, AR. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. **Adv. Appl. Microbiol.** 2013; 82: 155–84.

- HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin. Microbiol. Rev.** 2001 Apr;14(2): 229–43.
- HANDMAN, E, BULLEN, DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitol.** 2002 Aug;18(8):332-34.
- HÉBERT, MJ, TAKANO, T, HOLTHOFER, H, BRADY, H. Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils: modulation by lipoxygenase derived eicosanoids. **J. Immunol.** 1996 Oct;157(7):3105-115.
- HEPBURN, NC. Cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.** 2000 Jul;25(5):363-70.
- HIRAI, H, TANAKA, K, YOSHIE, O, OGAWA, K, KENMOTSU, K, TAKAMORI, Y, ICHIMASA, M, SUGAMURA, K, NAKAMURA, M, TAKANO, S, NAGATA, K. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. **J. Exp. Med.** 2001 Jan 15;193(2):255-61.
- HYO, S, KAWATA, R, KADOYAMA, K, EGUCHI, N, KUBOTA, T, TAKENAKA, H, URADE, Y. Expression of prostaglandin D2 synthase in activated eosinophils in nasal polyps. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.** 2007 Jul;133(7):693-700.
- JIA, GQ, GONZALO, JA, HILDAGO, A, WAGNER, D, CYBULSKY, M, GUTIERREZ-RAMOS, JC. Selective eosinophil transendothelial migration triggered by eotaxin via modulation of MAC-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 interactions. **Int. Immunol.** 1999 Jan;11(1):1-10
- JONES, DE, BUXBAUM, LU, SCOTT, P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. **J. Immunol.** 2000 Jul 1;165(1):364-72.
- KALINSKI, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E₂. **J. Immunol.** 2012 Jan 1;188(1):21-8
- KANEKO, M, HORIE, S, KATO, M, GLEICH, GJ, KITA, H. A crucial role for beta 2 integrin in the activation of eosinophils stimulated by IgG. **J. Immunol.** 1995 Sep 1;155(5):2631-41
- KANWAR, S, WAYNE SMITH, C, SHARDONOSKY, FR, BURNS, AR. The role of MAC-1 (CD11b/CD18) in antigen-induced airway eosinophilia in mice. **Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.** 2001 Aug;25(2):170-77.

- KAYE, P, SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat. Rev. Microbiol.** 2011 Jul;9(8): 604-15.
- KIM, JT, SCHIMMING, AW, KITA, H. Ligation of Fc γ RII (CD32) pivotally regulates survival of human eosinophils. **J. Immunol.** 1999 Apr 1;162(7):4253-59.
- KIM, ND, LUSTER, AD. Regulation of immune cells by eicosanoid receptors. **Scientific World J.** 2007 Sep 1;7:1307-28.
- KOBETS, T, GREKOV, I, LIPODOLVÁ, M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. **Curr. Med. Chem.** 2012;19(10): 1413-74.
- KUBES, P, NIU, XF, SMITH, W, KEHRLI JR, ME, REINHARDT, PH, WOODMAN, RC. A novel β_1 -dependent adhesion pathway on neutrophils: an mechanism invoked by dihydrocytochalasin B or endothelial transmigration. **FASEB J.** 1995. Aug. 9; (11): 1103-11.
- LARANGEIRA, AP, SILVA, AR, GOMES, RN, PENIDO, C, HENRIQUES, MGMO, CASTRO-FARIA-NETO, HC, BOZZA, PT. Mechanisms of allergen-and-LPS-induced bone marrow eosinophil mobilization and eosinophil accumulation into the pleural cavity: a role for CD11b/CD18 complex. **Inflamm. Res.** 2001 Jun;50(6):309-16.
- LAU, D, MOLLNAU, H, EISERICH, JP, FREEMAN, BA, DAIBER, A, GEHLING, UM, BRÜMMER, J, RUDOLPH, V, MÜNDEL, T, HEITZER, T, MEINERTZ, T, BALDUS, S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **PNAS** 2005 Jan;102(2):431-6.
- LEE, E, ROBERTSON, T, SMITH, J, KILFEATHER, S. Leukotriene receptor antagonists and synthesis inhibitors reverse survival in eosinophils of asthmatic individuals. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 2000 Jun;161 (6):1881-886.
- LEE, S, PRINCE, JE, RAIS, M, KHERADMAND, F, SHADORNOSKY, F, LU, H, BEAUDET, AL, SMITH, CW, SOONG, L, CORRY, DB. Differential requirement of CD18 in T-helper effector homing. **Nat. Med.** 2003 Oct;9(10):1281-86
- LEE, SP, SEREZANI, CH, MEDEIROS, AI, BALLINGER, MN, PETERS-GOLDEN, M. Crosstalk between Prostaglandin E₂ and Leukotriene B₄ regulates phagocytosis in alveolar macrophages via combinatorial effects on cyclic AMP. **J. Immunol.** 2009 Jan;182(1):530-7.

- LIEW, FY, MILLOTT, S, PARKINSON, C, PALMER, RM, MONCADA, S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. **J. Immunol.** 1990 Jun 15;144(12):4794-97.
- LIMA-JUNIOR, DS, COSTA, DL, CARREGARO, V, CUNHA, LD, SILVA, ALN, MINEO, TWP, GUTIERREZ, FRS, BELLIO, M, BORTOLUCI, KR, FLAVELL, RA, BOZZA, MT, SILVA, JS, ZAMBONI, DS. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nat. Med.** 2013 Jul;19(7):909-15.
- LINDOSO, JAL, COSTA, JML, QUEIROZ, IT, GOTO, H. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Res. Rep. Trop. Med.** 2012 July13; 69-77.
- LIU, D, UZONNA, JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** 2012 Jun12; 2:83 1-8.
- LONARDONI, MVC, RUSSO, M, JANCAR, S. Essential role of Platelet- Activating-Factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infect. Immun.** 2000 Nov;68(11):6355-361.
- LUNA-GOMES, T, MAGALHÃES, KG, MESQUITA-SANTOS, FP, BAKKER-ABREU, I, SAMICO, RF, MOLINARO, R, CALHEIROS, AS, DIAZ, BL, BOZZA, PT, WELLER, PF, BANDEIRA-MELO, C. Eosinophils as a novel cell source of prostaglandina D2: autocrine role in allergic inflammation. **J. Immunol.** 2011 Dec 15;187(12):6518-526
- LUNA-GOMES, T, BOZZA, PT, BANDEIRA-MELO, C. Eosinophil recruitment and activation: the role of lipid mediators. **Front. Pharmacol.** 2013 Mar 22;4:27. doi: 10.3389/fphar.2013.00027
- MACHADO, ER, UETA, MT, LOURENÇO, EV, ANIBAL, FF, SORGI, CA, SOARES, EG, ROQUE-BARREIRA, MC, MEDEIROS, AI, FACCIOLO, LH. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. **The J. Immunol.** 2005 Sep 15;175(6):3892-899.
- MCMAHON-PRATT, D, ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? **Immunol. Rev.** 2004 Oct; 201: 206-24.

- MANCUSO, P, STANDIFORD, TJ, MARSHALL, T, PETERS-GOLDEN, M. 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumonia*. **Infect. Immun.** 1998 Nov;66(11):5140-146.
- MANCUSO, P, NANA-SINKAM, P, PETERS-GOLDEN, M. Leukotriene B₄ augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun.** 2001 Apr;69(4):2011-16.
- MAROVICH, MA, MCDOWELL, MA, THOMAS, EK, NUTMAN, T B. IL-12p70 production by *Leishmania major*-harboring human dendritic cells is a CD40/CD40 ligand-dependent process. **J. Immunol.** 2000 Jun;164(11): 5858–865.
- MARTH, T, KELSALL, BL. Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. **J. Exp. Med.** 1997 Jun 2;185(11):1987-995.
- MATTE, C, OLIVIER, M. *Leishmania*-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. **J. Infect. Dis.** 2002 Mar 1;185(5):673-81.
- MEDEIROS, AI, SILVA. CL, MALHEIRO, A, MAFFEI, CM, FACCIOLI, LH. Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the beta-glucan present in their wall. **Br. J. Pharmacol.** 1999 Dec;128(7):1529-537.
- MEDEIROS, AI, SÁ-NUNES, A, SOARES, EG, PERES, CM, SILVA, CL, FACCIOLI, LH. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. **Infect. Immun.** 2004 Mar;72(3):1637-644.
- MEENAN, J, HOMMES, DW, MEVISSSEN, MM, DIJKHUISEN, H, SOULE, H, MOYLE, M, BÜLLER, HR, TEN KATE, FW, TYGAT, GNJ, VAN DEVENTER, JH. Attenuation of the inflammatory response in an animal colitis model by neutrophil inhibitory factor, a novel β_2 -integrin antagonist. **Scand. J. Gastroenterol.** 1996 Aug;31(8):786-91.
- MESQUITA-SANTOS, FP, VIEIRA-DE-ABREU, A, CALHEIROS, AS, FIGUEIREDO, IH, CASTRO-FARIA-NETO, HC, WELLER, PF, BOZZA, PT, DIAZ, BL, BANDEIRA-MELO, C. Cutting edge: prostaglandin D₂ enhances leukotriene C₄ synthesis by eosinophils during allergic inflammation: synergistic in vivo role of endogenous eotaxin. **J. Immunol.** 2006 Feb 1;176(3):1326-330
- MILON, G, DEL GIUDICE, G, LOUIS, JA. Immunobiology of experimental cutaneous Leishmaniasis. **Parasitol. Today** 1995 Jul 11(7): 244–47

- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2ª edição atualizada. Editora MS, Brasília-DF, 2007.
- MISRA, UK, PIZZO, SV. Coordinate regulation of forskolin-induced cellular proliferation in macrophages by protein kinase A/cAMP-response element-binding protein (CREB) and Epac1-Rap1 signaling: effects of silencing CREB gene expression on Akt activation. **J. Biol. Chem.** 2005 Nov 18;280(46):38276-8289.
- MITTAL, R, GONSALEZ-GOMEZ, I, PANIGRAHY, A, GOTH, K, BONNET, R, PRASADARAO, NV. IL-10 administration reduces PGE2 levels and promotes CR3-mediated clearance of *Escherichia coli* K1 by phagocytes in meningitis. **J.Exp.Med.** 2010 Jun 7;207(6):1307-319.
- MITROPOULOS P, KONIDAS P, DURKIN-KONIDAS M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. **J. Am. Acad. Dermatol.** 2010 Aug;63(2):309–22.
- MÓCSAI, A, ZHOU, M, MENG, F, TYBULEWICS, VL, LOWELL, CA. Syk is required for integrin signaling in neutrophils. **Immunity** 2002 Apr;16(4):547-58
- MONNERET, G, GRAVEL, S, DIAMOND, M, ROKACH, J, POWELL, WS. Prostaglandin D2 is a potent chemoattractant for human eosinophils that acts via a novel DP receptor. **Blood** 2001 Sep 15;98(6):1942-48.
- MOSSER, DM, EDELSON, PJ. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. **Nature** 1987 May 28-Jun 3;327(6120):329-31.
- NADERER, T, VINCE, JE, MCCONVILLE, MJ. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. **Curr. Mol. Med.** 2004 Sep;4(6): 649–65.
- NOTI, JD, JOHNSON, AK, DILLON, JD. Structural and functional characterization of the leukocyte integrin gene CD11d essential role of Sp1 and Sp3. **J. Biol. Chem.** 2000 Mar 24;275:8959-69.
- NOVAIS, FO, SANTIAGO, RC, BÁFICA, A, KHOURI, R, AFONSO, L, BORGES, VM, BRODSKYN, C, BARRAL-NETO, M, BARRAL, A, OLIVEIRA, CI. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **J. Immunol.** 2009 Dec 15;183(12):8088-898.

- OLIVEIRA, SHP, FACCIOLI, LH, FERREIRA, SH, CUNHA, FQ. Participation of interleukin-5, interleukin-8 and leukotriene B₄ in eosinophil accumulation in two experimental models. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1997;92 Suppl 2:205-10.
- OHNISHI, H, MIYAHARA, M, GELFAND, EW. The role of leukotriene B₄ in allergic diseases. **Allergol. Int.** 2008 Dec;57(4):291-98.
- PAVLI, A, MALTEZOU, HC. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **Int. J. Infect. Dis.** 2010 Dec; 14(12):e1032-39.
- PENKE, LR, SUDAN, R, SATHISHKUMAR, S, SAHA, B. Prostaglandin E2 receptors have differential effects on *Leishmania major* infection. **Parasite Immunol.** 2013 Jan 35(1); 51–54.
- PERES, CM, ARONOFF, DM, SEREZANI, CH, FLAMAND, N, FACCIOLI, LH, PETERS-GOLDEN, M. Specific leukotriene receptors couple to distinct G proteins to effect stimulation of alveolar macrophage host defense functions. **J. Immunol.** 2007 Oct 15;179(8):5454-461
- PERES-BUZALAF, C, DE PAULA, L, FRANTZ, FG, SOARES, EM, MEDEIROS, AI, PETERS-GOLDEN, M, SILVA, CL, FACCIOLI, LH. Control of experimental pulmonar tuberculosis depends more on the immunostimulatory leukotrienes than on the absence of immunosuppressive prostaglandins. **Prostagland. Leukot. Ess.** 2011 Aug;85(2):75-81.
- PETERS-GOLDEN, M, CANETTI, C, MANCUSO, P, COFFEY, MG. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune response. **J. Immunol.** 2004 Jan 15;174(2):589-94.
- PETERS-GOLDEN, M, HENDERSON JR, WR. Mechanisms of disease: Leukotrienes. **N. Engl. J. Med.** 2007 Nov 1; (357):1841-854
- PIMENTA, PFP, DOS SANTOS, MAV, DE SOUZA, W. Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Leishmania mexicana amazonensis* and rat neutrophils and eosinophils. **J. Submicrosc. Cytol.** 1987 Jul;19(3):387-95
- PINHEIRO, RO, NUNES, MP, PINHEIRO, CS, D'AVILA, H, BOZZA, PT, TAKIYA, CM, CÔRTE-REAL, S, FREIRE-DE-LIMA, CG, DOS REIS, GA. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. **Microbes Infect.** 2009 Feb;11(2):181-90

- POMPEU, ML, FREITAS, LA, SANTOS, MLV, BARRAL, A, BARRAL-NETO, M. *Leishmania amazonensis* infection: A comparison of *in vivo* leishmanicidal mechanisms between immunized and naive infected BALB/c mice. **Exp. Pathol.** 1992 Mar;74(2):169-76.
- RADA, E, TRUJILLO, D, CASTELLANOS, PL, CONVIT J. Gamma interferon production induced by antigens in patients with leprosy and American cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1987 Nov;37(3): 520-24.
- REINER, NE, MALEMUD, CJ. Arachidonic acid metabolism in murine leishmaniasis (Donovani): *ex-vivo* evidence for increased cyclooxygenase and 5-lipoxygenase activity in spleen cells. **Cell. Immunol.** 1984 Oct 15;88(2):501-10
- REINER, NE, MALEMUD, CJ. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: *in vitro* evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. **J. Immunol.** 1985 Jan;134(1):556-63.
- RIBEIRO-GOMES, FL, MONIZ-DE-SOUZA, MC, ALEXANDRE-MOREIRA, MS, DIAS, WB, LOPES, MF, NUNES, MP, LUNGARELLA, G, DOS REIS, GA. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. **J.Immunol.** 2007 Sep 15;179(6):3988-94.
- RIBEIRO-GOMES, FL, SACKS, D. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection.**Front. Cell. Infect. Microbiol.** 2012 May 4;2:59. doi: 10.3389/fcimb.2012.00059
- RICARDO-CARTER, C, FAVILA, M, POLANDO, R E, COTTON, R N, BOGARD HORNER, K, CONDON, D, BALLHORN, W, WHITCOMB, JP, YADAV, M., GEISTER, RL, SCHOREY, JS., MCDOWELL, MA. *Leishmania major* inhibits IL-12 in macrophages by signalling through CR3 (CD11b/CD18) and down-regulation of ETS-mediated transcription. **Parasite Immunol.** 2013 Dec; 35(12):409-20
- ROGÉRIO, AP, ANIBAL, FF. Role of leukotrienes on protozoan and helminth infections. **Mediators Inflamm.** 2012 Nov (2012) article ID 595694.
- SACKS D, NOBEN-TRAUTH N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat. Rev. Immunol.** 2002 Nov 2; (11): 845-58.

- SAHA, P, MUKHOPADHYAY, D, CHATTERJEE, M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. **Int. Immunopharmacol.** 2011 Nov;11(11):1668-79.
- SAITO, S, HAMADA, A, WATANABE, N, OBATA, T, KATAKURA, K, OHMOTO, H. Eosinophil chemotactic activity in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Parasitol. Res.** 1996;82(6):485-89
- SALAIZA-SUAZO, N, VOLKOW, P, TAMAYO, R, MOLL, H, GILLITZER, R, PEREZ- TORRES, A, PEREZ-MONTFORT, R, DOMINGUEZ, JD, VELASCO-CASTREJON, O, CRIPPA, M, BECKER, I. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. **Trop Med Int Health** 1999 Dec;4(12): 801-11.
- SCHNEIDER, T, ISSEKUTZ, TB, ISSEKUTZ, AC. The role of alpha4 (CD49d) and beta2 (CD18) integrins in eosinophil and neutrophil migration to allergic lung inflammation in the Brown Norway rat. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 1999 Mar;20(3):448-57
- SCHÖNLAU, F, SCHARFFETTER-KOCHANKE, K, GRABBE, S, PIETZ, B, SORG, C, SUNDERKÖTTER, C. In experimental leishmaniasis deficiency of CD18 results in parasite dissemination associated with altered macrophage functions and incomplete Th1 cell response. **Eur. J. Immunol** 2000 Sep;30(9):2729-40.
- SEIFERT K. Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. **Open Med Chem J.** 2011 Mar; 5:31–39.
- SEREZANI, CH, PERRELA, JH, RUSSO, M, PETERS-GOLDEN, M, JANCAR, S. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. **J. Immunol.** 2006 Sep 1;177(5):3201-208
- SEREZANI, CH, BALLINGER, MN, ARONOFF, DM, PETERS-GOLDEN, M. Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.** 2008 Aug;39(2):127-32
- SHAHABUDDIN, S, PONATH, P, SCHLEIMER, RP. Migration of eosinophils across the endothelial cell monolayers: interactions among IL-5, endothelial-activating cytokines and C-C chemokines. **J. Immunol.** 2000 Apr 1;164(7):3847-54

- SHOWEL, HJ, PETTIPHER, ER, CHENG, JB, BRESLOW, R, CONKLYN, MJ, FARRELL, CA, HINGORANI, GP, SALDER, ED, HACKMAN, BC, WIMBERLY, DJ, DOHERTY, NS, MELVIN, LS, REITER, LA, BIGGERS, MS, KOCH, K. The *in vitro* and the *in vivo* pharmacologic activity of the potent and selective leukotriene B4 receptor antagonist CP-105696. **J. Pharm. Exp. Ther.** 1995 Apr;273(1):176-84
- SILVEIRA, MR, NUNES, KP, CARA, DC, SOUZA, DG, CORREA, AJr, TEIXEIRA, MM, NEGRAO-CORREA, D. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. **Infect. Immun.** 2002 Nov;70(11):6263-272
- SCHYMEINSKY, J, MÓCSAI, A, WALZOG, B. Neutrophil activation via β_2 -integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications. **Thromb. Haemost.** 2007 Aug;98(2):262-73
- SHAW, JJ. Taxonomy of the Genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 1994 Jul/Set; 89(3): 471-78.
- SOARES, DC, ANDRADE, ALS, DELORENZI, JC, SILVA, JRA, FREIRE-DE-LIMA, L, FALCÃO, CAB, PINTO, AC, ROSSI-BERGMANN, B, SARAIVA, EM. Leishmanicidal activity of *Himatanthus sucuuba* látex against *Leishmania amazonensis*. **Parasitol. Int.** 2010 Jun;59(2):173-77
- SOARES, EM. Estudo da participação da β_2 -integrina nas atividades fagocítica e microbicida de macrófagos alveolares e peritoneais na histoplasmose. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo (FMRP-USP), 2009.
- SORGI, CA, SECATTO, A, FONTANARI, C, TURATO, WM, BELANGÉR, C, MEDIEROS, AI, KASHIMA, S, MARLEAU, S, COVAS, DT, BOZZA, PT, FACCIOLI, LH. *Histoplasma capsulatum* cell wall β -Glucan induces lipid bodies formation through CD18, TLR2 and dectin-1 receptors: correlation with leukotriene B4 generation and role in HIV infection. **J. Immunol.** 2009 Apr 1;182(7):4025-35.
- SOUZA, AS, GIUDICE, A, PEREIRA, JMB, GUIMARÃES, LH, DE JESUS, AR, DE MOURA, TR, WILSON, ME, CARVALHO, EM, ALMEIDA, RP. Resistance of *Leishmania (Viannia) brasiliensis* to nitric oxide: correlation to antimony therapy and TNF- α production. **BMC Infect. Dis.** 2010 Jul 15;10:209. doi: 10.1186/1471-2334-10-209.

- STAMM, LM, SATOSKAR, AA, GHOSH, SK, DAVID, JR, SATOSKAR, AR. STAT-4 mediated-IL-12 signaling pathway is critical for the development of protective immunity in cutaneous leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.** 1999 Aug;29(8): 2524-529.
- STENGER, S, DONHAUSER, N, THÜRING, H, RÖLLINGHOFF, M, BOGDAN, C. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **J. Exp. Med.** 1996 Apr 1;183(4):1501-14
- SVELANDER, L, HARRIS, HE, LORENTZEN, JC, TROLLMO, C, KLARESKOG, L, BUCHT, A. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce T cell-dependent arthritis in rats. **Arthritis Rheum.** 2004 Jan;50(1):297-304.
- TAGER, AM, BROMLEY, SK, MEDOFF, BD, ISLAM, SA, BERCURY, SD, FRIEDRICH, EB, CARAFONE, AD, GERSZTEN, RE, LUSTER, AD. Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. **Nat. Immunol.** 2003 Oct;4(10):982-90.
- TAVARES, NM, ARAÚJO-SANTOS, T, AFONSO, L, NOGUERIA, PM, LOPES, UG, SOARES, RP, BOZZA, PT, BANDEIRA-MELO, C, BORGES, VM, BRODSKYN, C. Understanding the mechanisms controlling *Leishmania amazonensis* infection in vitro: the role of LTB₄ derived from human neutrophils. **J. Infect. Dis.** 2014 Mar 14 *in press*.
- TEIXEIRA, MJ, TEIXEIRA, CR, ANDRADE, BB, BARRAL-NETO, M, BARRAL, A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Trends Parasitol.** 2006 Jan; 22(1): 32-41.
- UENO, N, WILSON, ME. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends Parasitol.** 2012 Aug;28(8):335-44.
- VAN ZANDBERGEN, G, HERMANN, N, LAUFS, H, SOLBACH, W, LASKAY, T. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein10 production by neutrophil granulocytes. **Infect. Immun.** 2002 Aug; 70(8) 4177–418.
- VON STEBUT, E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. **Eur. J. Dermatol.** 2007 Mar-Apr;17 (2): 115-22.

- WALKER, DM, OGHUMU, S, GUPTA, G, McGUIRE, BS, DREW, ME, SATOSKAR, AR. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cell. Mol. Life Sci.** 2014 April; 71(7): 1245-63.
- WARBURG, A, SARAIVA, E, LANZARO, GC, TITUS, RG, NEVA, F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 1994 Jul 29;345(1312):223-30
- WATANABE, Y, HAMAGUCHI-TSURU, E, MORIMOTO, N, NISHIO, Y, YAGYU, K, KONISHI, Y, TOMINAGA, M, MIYAZAKI, J, FURUYA, M, TOMINAGA, A. IL-5-induced eosinophils suppress the growth of *Leishmania amazonensis* *in vivo* and kill promastigotes *in vitro* in response to either IL-4 or IFN- γ . **DNA Cell Biol.** 2004 Jul;23(7):412-18
- WILSON, ME, INNES, DJ, SOUSA, AD, PEARSON, RD. Early histopathology of experimental infection with *Leishmania donovani* in hamsters. **J. Parasitol.** 1987 Feb;73(1):55-63
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO, 2013). Media Center : Leishmaniasis. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> (acesso em janeiro de 2014).
- WRIGHT, SD, SILVERSTEIN, SC. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. **J. Exp. Med.** 1983 Dec 1;158(6):2016-23.
- ZHANG, Y, WANG, H. Integrin signalling and function in immune cells. **Immunology** 2012 Apr;135(4): 268-75.
- ZEIDLER, R, CSANADY, M, GIRES, O, LANG, S, SCHIMITT, B, WOLLENBERG, B. Tumor-derived prostaglandin E2 inhibits monocyte function by interfering with CCR-5 and MAC-1. **FASEB J.** 2000 Apr;14(5):661-8.