

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LAIS DE SOUZA BRAGA

Avaliação da resposta imune por células polimorfonucleares e mononucleares humanas infectadas com formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Maringá
2015

LAIS DE SOUZA BRAGA

Avaliação da resposta imune por células polimorfonucleares e mononucleares humanas infectadas com formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof^a Dr.^a Sandra Mara Alessi Aristides

Maringá
2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

LAIS DE SOUZA BRAGA

Avaliação da resposta imune por células polimorfonucleares e mononucleares humanas infectadas com formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Profa. Dra. Sandra Mara Alessi Aristides
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Profa. Dra. Thaís Gomes Verzignassi Silveira
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Raíssa Bocchi Pedroso
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 05 de março de 2015.

Local de defesa: Sala 01, Bloco 126, campus da Universidade Estadual de Maringá.

Avaliação da resposta imune por células polimorfonucleares e mononucleares humanas infectadas com formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

RESUMO

O estabelecimento da leishmaniose tegumentar americana (LTA) é determinado pela espécie do parasito, saliva do flebotômico e pela imunidade do hospedeiro, envolvendo neutrófilos, macrófagos, citocinas e moléculas coestimuladoras. Este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta imune por neutrófilos e monócitos isolados do sangue de indivíduos saudáveis, seguido de infecção com formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Foram coletados 8 mL de sangue de 42 indivíduos sem histórico de LTA para a separação de células mononucleares e de polimorfonucleares. As células foram infectadas com *L. (L.) amazonensis* e testadas para fagocitose, produção de óxido nítrico e a expressão de IL-8, CXCR1, CCL3, CCR1 e iNOS. Os neutrófilos apresentaram maior atividade fagocítica e produção de NO nos tempos iniciais de infecção e os macrófagos nos tempos finais da infecção, sendo que as duas células apresentaram expressão de IL-8, CXCR1, CCL3, CCR1 e iNOS, mas não houve diferença estatisticamente significativa. A maior atividade fagocítica e produção de NO pelos neutrófilos nas primeiras horas de infecção e pelos macrófagos mais tardiamente, mostram que estas células podem estar auxiliando na indução da dicotomia da resposta imune.

Palavras chave: Leishmaniose cutânea, macrófagos, neutrófilos.

Evaluation of the immune response by human polymorphonuclear and mononuclear cells infected with promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

ABSTRACT

The establishment of American cutaneous leishmaniasis (ACL) is determined by the species of the parasite, the saliva of the sandfly, and by the host immunity, involving neutrophils, macrophages, cytokines and costimulatory molecules. This work aimed to evaluate the immune response of neutrophils and monocytes isolated from the blood of healthy individuals, followed by infection with promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. It was collected 8 mL of blood of 42 individuals without ACL history for the separation of mononuclear cells and polymorphonuclear cells. Cells were infected with *L. (L.) amazonensis* and tested for phagocytosis, production of nitric oxide and expression of IL-8, CXCR1, CCL3, CCR1 and iNOS. Neutrophils showed increased phagocytic activity and NO production in the early hours of infection in macrophages and end times of the infection, and the two cells showed expression of IL-8, CXCR1, CCL3, CCR1 and iNOS, but not statistically significant. The highest phagocytic activity and NO production by neutrophils in the early hours of infection and macrophages later show that these cells may be assisting in the induction of the immune response dichotomy.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, macrophages, neutrophils.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1 Taxonomia da família Trypanosomatidae	10
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos e condições de reação para amplificação de β -actina, IL-8, CXCR1, CCL3, CCR1 e iNOS em neutrófilos e macrófagos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	33
Tabela 2. Dados epidemiológicos dos indivíduos sem histórico de leishmaniose tegumentar americana.	34
Figura 1. Cinética da produção de óxido nítrico em células humanas infectadas..	35
Figura 2. Cinética do índice fagocítico em células mononucleares e polimorfonucleares infectadas.	36
Figura 3. Densidade relativa da intensidade de banda da expressão de RNAm.....	37

Dissertação elaborada e formatada
conforme as normas da ABNT (Capítulo
I) e das publicações científicas
Transactions of the Royal Society of
Tropical Medicine and Hygiene (Capítulo
II) disponível em:
< <https://rstmh.org/journals> >

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	9
Doença	9
Epidemiologia	9
Agente etiológico	9
Vetores	10
Formas clínicas	10
Imunopatogenia.....	11
Diagnóstico	12
Tratamento	12
Justificativa	13
Objetivos	13
Referências.....	14
CAPÍTULO II	18
Artigo: “Avaliação da resposta imune por células polimorfonucleares e mononucleares humanas infectadas com formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ”	19
CAPÍTULO III	38
Conclusões	38
Perspectivas futuras.....	39

Capítulo I

Doença

A leishmaniose tegumentar americana é uma doença infecto-parasitária, que acomete o homem desde ao século I d.C. Esta doença está entre as endemias de maior importância na saúde pública no Brasil, devido a sua distribuição, formas clínicas e as dificuldades encontradas no diagnóstico e no tratamento (BASANO, 2004; DORVAL, 2006).

Epidemiologia

Mundialmente a LTA atinge cerca de 1 a 1,5 milhões de pessoas por ano, considerada assim um problema de saúde pública. No Brasil a LTA foi detectada em 635.399 indivíduos entre os anos de 1990 a 2013, merecendo atenção, pois é de ampla distribuição no território nacional, sendo que 13.188 casos foram registrados no Paraná (BRASIL, 2013).

Agente etiológico

Os protozoários do gênero *Leishmania* da família Trypanosomatidae (Figura 1) causam as leishmanioses, através da picada de insetos vetores, os flebotomíneos. No Brasil são descritas sete espécies: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) linderberg* e *Leishmania (Viannia) shawi*. Sendo a *L. (V.) braziliensis* e a *L. (L.) amazonensis*, mais amplamente distribuídas no território nacional (DORVAL, 2006; BRASIL, 2013).

As leishmânias possuem duas formas, uma flagelada ou promastigota e outra aflagelada ou amastigota. Nos hospedeiros mamíferos encontramos a forma intracelular, amastigota, obrigatória em células mononucleares. As amastigotas se multiplicam dentro dos macrófagos que se rompem e liberam os parasitos que são fagocitados por outros macrófagos. A forma infectante, promastigota, se encontra no trato digestório do inseto vetor, e através da picada são inoculadas no hospedeiro (GONTIJO, 2003; BRASIL, 2013).

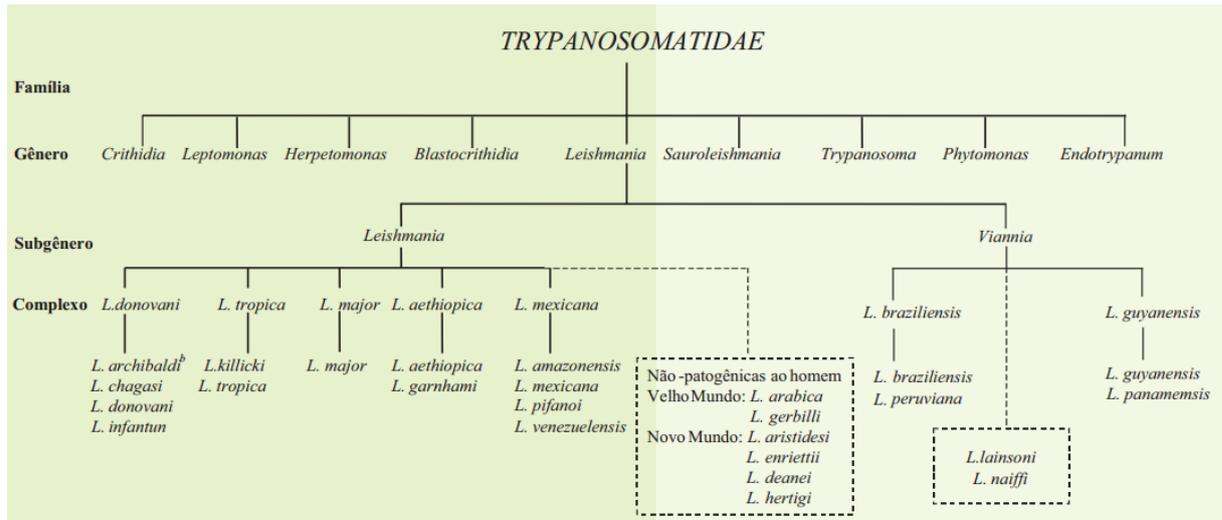


Figura 1. Taxonomia da família Trypanosomatidae. Fonte: Ministério da Saúde. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana Diagnóstico Clínico e Diferencial. Editora MS, Brasília-DF, 2006.

Vetores

Os insetos vetores da LTA pertencem a Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, Gênero Lutzomyia. No Brasil as espécies de flebotomíneos que estão envolvidas na transmissão da leishmaniose envolvem a *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia wellcome* e *Lutzomyia migonei*, sendo que a distribuição destes insetos varia de acordo com as regiões do país (MARGONARI, 2010; BRASIL, 2013).

Formas clínicas

A leishmaniose cutânea pode se apresentar na forma clínica cutânea localizada que é caracterizada por úlceras de fundo granuloso e bordas salientes com possibilidade de autocicatrização (BRASIL, 2013).

A forma cutânea disseminada apresenta múltiplas lesões papulares com aparência acneiforme que acomete várias regiões corporais. A disseminação linfática dos parasitos pode levar a formação de lesões nodulares em outras partes do corpo. A forma cutânea difusa leva a formação de placas e nódulos múltiplos ulcerados que recobrem áreas cutâneas extensas, ocasionada pela *L. (L.) amazonensis*. A forma mucosa apresenta metástases graves e multilantes da mucosa nasobucofaríngea, que podem ocorrer pela disseminação sanguínea e

linfática instalando-se nas mucosas, e também pode estabelecer após tratamentos falhos (CURTI, 2009; MARTINS, 2010; REIS, 2011; BRASIL, 2013).

Imunopatogenia

O desenvolvimento da LTA depende da espécie do parasito envolvido e da relação parasito-hospedeiro (CURTI, 2009; MARTINS, 2010; BRASIL, 2013). As principais células envolvidas no estabelecimento da infecção são os neutrófilos e macrófagos, sendo essencial o recrutamento destas células para o local de infecção, pois são importantes no desenvolvimento da resposta imune inata e adaptativa (BADOLATO, 1996; van ZANDBERGEN, 2002; LASKAY, 2008; PETERS, 2008).

Os neutrófilos compõem a primeira linha de defesa contra infecções, com capacidade fagocítica e produção de óxido nítrico (NO) que lhes permite eliminar muitos parasitos, expressando e secretando quimiocinas e citocinas que podem influenciar o microambiente no sítio da infecção e consequentemente, a resposta imune contra *Leishmania* (LIEW, 1997).

Os macrófagos têm importante função na resposta imune sendo que a interação entre estas células e os parasitos representa a principal função no estabelecimento da infecção por *Leishmania* spp. Mesmo assim, apesar dos potentes mecanismos imunes, as leishmânias podem infectar e se multiplicar dentro dessas células (LIASKOU, 2012).

O transporte de parasitos de neutrófilos para macrófagos ocorre devido à fagocitose de neutrófilos infectados, ou seja, essas células funcionam como “cavalo de Tróia”, pois não ativam os mecanismos leishmanicida e os parasitos sobrevivem e se multiplicam no meio intracelular dos macrófagos. Porém, há relatos de que quando ocorre o processo de fagocitose de neutrófilos por macrófagos, os neutrófilos cedem parte de seu conteúdo antimicrobiano aos macrófagos, aumentando assim sua atividade microbicida (AGA, 2002; LAUFS, 2002; van ZANDBERGEN, 2002; FAURSCHOU, 2003; APPELBERG, 2006; BATISTA, 2013).

Neutrófilos e macrófagos expressam quimiocinas e seus receptores que podem induzir ao controle ou susceptibilidade da LTA. A Interleucina-8 (IL-8) e CCL3 (MIP-1 α) são quimiocinas funcionais, mas quando expressas juntamente com os seus receptores CXCR1 e CCR1, respectivamente, indicam que está ocorrendo à estimulação e quimiotaxia destas células. As quimiocinas IL-8 e CCL3 estão envolvidas na migração de neutrófilos e

macrófagos para o local da infecção, o que pode levar então ou ao controle ou a susceptibilidade à doença (RAMOS, 2005; GUERREIRO, 2011; LIASKOU, 2012).

A óxido nítrico sintase induzida (iNOS) que catalisa a produção de óxido nítrico, tem também papel importante no desenvolvimento da resposta imune. O óxido nítrico faz parte dos mecanismos oxidativos contra a *Leishmania*, que representa importante mecanismo na eliminação do parasito (CERQUEIRA, 2002; SILVEIRA, 2008).

Assim, a atividade fagocítica, a produção de óxido nítrico, a expressão de quimiocinas e seus receptores e de iNOS por macrófagos e neutrófilos podem auxiliar a indução da resposta imune contra a leishmânia e o predomínio da resposta do tipo Th1 pode levar ao controle da infecção e a resposta Th2 leva a susceptibilidade a doença (CERQUEIRA, 2002; GUERREIRO, 2011; REIS, 2011).

Diagnóstico

O diagnóstico da LTA depende da análise epidemiológica, clínica e laboratorial. Sendo que a associação destas análises é necessária para o diagnóstico final (REIS, 2006).

O diagnóstico clínico é feito a partir das lesões e da anamnese do paciente. No diagnóstico laboratorial são realizados exames microscópicos, cultura de biópsias, inoculação em animais, pela reação em cadeia da polimerase (PCR), e pelos métodos imunológicos que envolvem a intradermoreação de Montenegro, reação de imunofluorescência indireta e o ensaio imunoenzimático (GOMES, 2009).

Tratamento

A droga de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose tegumentar é o antimoniato de meglumina, sendo recomendado 10 a 20 mg/kg/dia do medicamento, injetado por via intravenosa ou intramuscular por 20 dias. As drogas de segunda escolha utilizadas podem ser a anfotericina B ou a anfotericina lipossomal e as pentamidinas (ALMEIDA 2011; BRASIL, 2013).

Os antimoniais pentavalentes ou antimoniato de meglumina interferem na bioenergética do parasito, mas levam a efeitos colaterais como náuseas, vômitos, febre,

fraqueza, insuficiência renal aguda, alterações cardíacas e pancreáticas (BEZERRA-SOARES, 2004; BRASIL, 2013).

Existem também tratamentos alternativos, que envolvem a crioterapia, termoterapia, terapia fotodinâmica e laser de CO₂ (ALMEIDA, 2011; BRASIL, 2013).

Justificativa

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença de importância clínica, e com ampla distribuição no Brasil e no Paraná. Muitos estudos realizados até agora utilizam modelos animais e linhagens de células com a utilização de espécies de *Leishmania* que não são encontradas no Brasil. Com relação à resposta imune contra a LTA, podemos verificar que os neutrófilos e macrófagos são descritos como um dos principais mediadores na resposta imune inata e que vão predispor o hospedeiro a uma resposta imune adaptativa voltada à resistência ou a susceptibilidade à doença. (BADOLATO, 2004; GOMES, 2012). Deste modo, qual seria a participação destas células no desenvolvimento da resposta imune na LTA?

Objetivo Geral

Avaliação da resposta imune induzida por neutrófilos e macrófagos infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Objetivos específicos

1. Avaliar a produção de óxido nítrico de neutrófilos e macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*;
2. Analisar a capacidade fagocítica de neutrófilos e macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*;
3. Avaliar a expressão de RNAm das quimiocinas IL-8 e CCL3, de seus respectivos receptores CXCR1 e CCR1 e da iNOS em neutrófilos e macrófagos infectados e não infectados com *L. (L.) amazonensis*.

Referências

- AGA, E.; KATSCHINSKI, D.M.; ZANDBERGEN, G.V.; LAUFS, H.; HANSEN, B.; MÜLLER, K.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, Lubeck, v. 169, n. 2, p.898-905, 15 jul. 2002.
- ALMEIDA, O.L.S.; SANTOS, J.B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Salvador, v. 86, n. 3, p.497-506, 2011.
- APPELBERG, Rui. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. **Trends in Microbiology**, Porto, v. 15, n. 2, p.87-92, 6 dez. 2006.
- BADOLATO, R.; SACKS, D.L.; SAVOIA, D.; MUSSO, T. *Leishmania major*: Infection of Human Monocytes Induces Expression of IL-8 and MCAF. **Experimental Parasitology**, Torino, v. 82, n. 3, p.21-26, 1996.
- BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Rondônia, v. 7, n. 3, p.328-337, 2004.
- BATISTA, Mauricio Azevedo. **Avaliação, in vitro, da resposta imune de neutrófilos de camundongos C57BL/6 estimulados com diferentes espécies de *Leishmania***. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.
- BEZERRA-SOARES, R.J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 2, p.139-149, jun. 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Atlas de leishmaniose tegumentar americana. Brasília, DF, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, DF, 2013.

CERQUEIRA, N.F.; YOSHIDA, W.B. Óxido Nítrico: Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, Botucatu, v. 17, n. 6, p.417-423, 2002.

CURTI, M.C.M.; SILVEIRA, T.G.V.; ARRAES, S.M.A.A.; BERTOLINI, D.A.; ZANZARINI, P.D.; VENZAZZI, E.A.S.; FERNANDES, A.C.S.; TEIXEIRA, J.J.V.; LONARDONI, M.V.C. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana na região Noroeste do Estado do Paraná. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Maringá, v. 30, n. 1, p.63-68, 2009.

DORVAL, M.E.M.C.; OSHIRO, E.T.; CUPOLLILO, E.; CASTRO, A.C.C.; ALVES, T.P. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 1, p.43-46, fev. 2006.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, Copenhagen, v. 14, n. 5, p.1317-1327, nov. 2003.

GOMES, C.F.L. Protozoologia: Gênero *Leishmania*. In: NEVES, David Pereira. **Parasitologia Dinâmica**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 99-125.

GOMES, C.M. **Produção de citocinas por células mononucleares humanas estimuladas por formas amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2012. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Tropical e Saúde Pública, Medicina Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. de. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Belo Horizonte, v. 36, n. 1, p.71-80, fev. 2003.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J.M. As Quimiocinas e seus Receptores: Características e Funções Fisiológicas. **Acta Medica Portuguesa**, Lisboa, v. 24, n. 4, p.967-976, 2011.

LAUFS, H.; MULLER, K.; FLEISCHER, J.; REILING, N.; JAHNKE, N.; JENSENIUS, J.C.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infection and Immunity**, Lubeck, v. 70, n. 2, p.826-835, fev. 2002.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, Lubeck, v. 213, n. 3, p.183-191, 14 maio 2008.

LIASKOU, E.; WILSON, D.V.; OO, Y.H. Innate Immune Cells in Liver Inflammation. **Mediators of Inflammation**, Birmingham, v. 2012, p.1-21, 2012.

LIEW, F.Y.; WEI, X.Q.; PROUDFOOT, L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. **Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences**, Glasgow, v. 352, p.1311-1315, 29 set. 1997.

MARGONARI, C.; SOARES, R.P.; ANDRADE-FILHO, J.D.; XAVIER, D.C.; SARAIVA, L.; FONSECA, A.L.; SILVA, R.A.; OLIVEIRA, M.E.; BORGES, E.C.; SANGUINETTE, C.C.; MELO, M.N. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. **Journal of Medical Entomology: Entomological Society of America**, Belo Horizonte, v. 47, n. 6, p.1212-1219, nov. 2010.

MARTINS, L.; ALEXANDRINO, A.; GUIMARÃES, G. Detecção de DNA de *Leishmania braziliensis* em pacientes de leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n. 3, p.1-4, jun. 2010.

PETERS, N.C.; EGEN, J.G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M.P.; GERMAIN, R.N.; SACKS, D. *In vivo* Imaging

Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. **Science**, New York, v. 321, p.971-974, 12 dez. 2008.

RAMOS, C.D.L.; CANETTI, C.; SOUTO, J.T.; SILVA, J.S.; HOGABOAM, C.M.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. MIP-1 α [CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF- α and LTB₄. **Journal of Leukocyte Biology**, Ribeirão Preto, v. 78, n. 1, p.167-177, jul. 2005.

REIS, L.C.; BRITO, M.E.F.; SOUZA, M.A.; PEREIRA, V.R.A. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, Recife, v. 35, n. 2, p.103-115, ago. 2006.

REIS, H.R.D.; LOPIS-MORI, F.M.R.; REIS, C.R.D.; FREIRE, R.L.; MARANA, E.R.M.; CHRYSSAFIDIS, A.L.; TEDIM, A.V.; RUFFOLO, B.B.; BUGNI, F.M.; CASTRO, E.A.de.; THOMAZ-SOCCOL, V.; NABUT, L.B.; NAVARRO, I.T. Soroprevalência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) canina e fauna de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Bela Vista do Paraíso, Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 3, p.1083-1094, set. 2011.

SILVEIRA, F.T.; MULLER, S.R.; SOUZA, A.A.A.de.; LAINSON, R.; GOMES, C.M.C.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P. Revisão sobre a Patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com Ênfase à Doença Causada por *Leishmania* (V.) *braziliensis* e *Leishmania* (L.) *amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, Belém, v. 22, n. 1, p.9-20, 2008.

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 protein 10 production by neutrophil granulocytes. **Infection and Immunity**, Lubeck, v. 70, n. 8, p.4177-4184, ago. 2002.

CAPÍTULO II

Artigo: “Avaliação da resposta imune por células polimorfonucleares e mononucleares humanas infectadas com formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*”

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE POR CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES E MONONUCLEARES HUMANAS INFECTADAS POR FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Lais de Souza Braga¹, Sandra Mara Alessi Aristides².

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. ²Departamento Análises Clínicas e Biomedicina Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

Endereço para correspondência: Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Av. Colombo 5790 CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

RESUMO

Introdução: A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença de importância clínica, e a resposta imune contra esta infecção envolve células mononucleares e polimorfonucleares, quimiocinas, moléculas coestimuladoras. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune desenvolvida por células mononucleares e polimorfonucleares de indivíduos sem histórico de LTA após a infecção por *L. (L.) amazonensis*.

Métodos: Após a obtenção das células provenientes de 42 pacientes, estas foram infectadas com *L. (L.) amazonensis* e testadas para produção de óxido nítrico, fagocitose e a expressão de IL-8, CXCR1, CCL3, CCR1 e iNOS.

Resultados: As células polimorfonucleares apresentaram maior produção de NO e fagocitose nos tempos iniciais de infecção e os macrófagos mais tardiamente. Ambas as células analisadas expressaram IL-8, CXCR1, CCL3, CCR1 e iNOS, mas não foram encontradas diferenças estatisticamente diferentes.

Conclusão: Neutrófilos e macrófagos podem auxiliar no controle ou susceptibilidade à infecção por *L. (L.) amazonensis*.

Palavras chave: Leishmaniose cutânea, macrófagos, neutrófilos.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) um problema de saúde pública, sendo registrados mundialmente cerca de 1 a 1,5 milhões de casos por ano.¹ No Brasil, segundo o banco de dados do Sistema Único de Saúde, foram registrados 635.399 casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) entre os anos de 1990 e 2013, sendo que 13.188 casos ocorreram no estado do Paraná.^{1,2}

Os protozoários do gênero *Leishmania* são causadores das leishmanioses. No Brasil as espécies amplamente distribuídas são a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.¹

A doença pode apresentar diferentes formas clínicas dependendo da espécie do parasito envolvido e da relação parasito-hospedeiro. A LTA causada por *L. (L.) amazonensis* ocasiona lesões cutâneas localizadas e caracterizadas por úlceras de fundo granuloso e bordas salientes com possibilidade de autocicatrização. A outra forma cutânea difusa, a qual leva a formação de placas e nódulos múltiplos ulcerados podem recobrir áreas cutâneas extensas.^{1,3,4}

Na LTA observa-se que o estabelecimento da infecção envolve a fagocitose e o parasitismo de neutrófilos e macrófagos.⁵

O desenvolvimento da resposta imune contra a LTA está relacionado com o recrutamento de células mononucleares e polimorfonucleares para o local da infecção, e a expressão de quimiocinas e seus receptores por essas células, levam a resistência ou a susceptibilidade a doença.^{5,6,7}

Os neutrófilos compõem a primeira linha de defesa contra infecções, com capacidade fagocítica e produção de óxido nítrico (NO) que lhes permite eliminar muitos parasitos, expressando e secretando quimiocinas e citocinas que podem influenciar o microambiente no sítio da infecção e, conseqüentemente, a resposta imune contra *Leishmania*.⁷

Os macrófagos têm importante função na resposta imune sendo que a interação entre estas células e os parasitos representa a principal função no estabelecimento da infecção por *Leishmania* spp. Mesmo assim, apesar dos potentes mecanismos imunes, as leishmânias se multiplicam dentro destas células.⁸

Pela importância clínica e epidemiológica da LTA no Brasil e pela capacidade de neutrófilos e macrófagos em desenvolver ou controlar a doença, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de neutrófilos e macrófagos provenientes de indivíduos saudáveis, sem histórico de LTA e que não frequentavam áreas endêmicas. Estas células foram verificadas quanto à produção de óxido nítrico (NO), capacidade fagocítica e expressão de RNAm de quimiocinas, seus receptores e da iNOS, após a infecção com *L. (L.) amazonensis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de células humanas

Para a obtenção de células polimorfonucleares e mononucleares foram coletados 8 mL de sangue com heparina ou EDTA de indivíduos sem história clínica de leishmaniose tegumentar e que não residiam em áreas endêmicas.

Os indivíduos forneceram informações quanto ao nome, idade, sexo, endereço e atividade de lazer. Todos os indivíduos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido concordando em participar do projeto.

O projeto foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - COPEP da Universidade Estadual de Maringá, conforme o parecer nº 406/2010, em conformidade com a Resolução nº 196/1996-CNS.

Leishmania (L.) amazonensis

L. (L.) amazonensis (MHOM/BR/73/M2269) foi cultivada em meio 199 (Gibco, USA) contendo 0,69 mM de L-glutamina (Sigma Aldrich Chemie, Alemanha) e suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco, USA), 1% de urina humana, e antibióticos (100 UI/mL penicilina G (Sigma Aldrich Chemie, Alemanha) e 100 µg/mL estreptomicina (Sigma Aldrich, USA) em estufa B.O.D. (Logen Scientific, Brasil) a 25°C, até fase estacionária de crescimento para obtenção das formas promastigotas.

Obtenção de monócitos e neutrófilos humanos

Para o isolamento das células foi utilizado Mono-Poly Resolving Medium (M-PRM; MP Biomedicals; França), de acordo com a prescrição do fabricante, com algumas modificações.

A viabilidade celular foi avaliada pela adição de 10 µL da suspensão celular e 10 µL de azul de tripan 0,1% em lâmina e analisada em microscópio óptico. Para a contagem celular foi utilizado 190 µL de líquido de Turk e 10 µL de suspensão celular em câmara de Neubauer e analisada em microscópio óptico (Olympus CX21, Japão).

Cultura de células mononucleares e polimorfonucleares e infecção com *L. (L.) amazonensis* para determinação de óxido nítrico

As células foram adicionadas a placas de culturas de 24 poços (1×10^6 células/mL) com RPMI (pH 7,2 e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco, USA) e mantidas por 2 horas para aderência em estufa (Nuair, USA) com 5% de CO₂ a 37°C.

As células não aderentes foram lavadas com solução de Hanks, ficando cerca de 1×10^5 células aderentes.⁸ Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (1×10^6 /mL) foram adicionadas a placa e mantidas com RPMI pH 7,2 e 10% de SFB em estufa a 37°C/5% CO₂. Após 6, 16, 30 e 42 horas o sobrenadante foi retirado, centrifugado a 300 g por 10 minutos e armazenado a -20°C. Como controle de estimulação foi utilizado lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* 026:B6 (10 ng/mL) (Sigma Aldrich, Israel).

A dosagem de nitrito foi realizada pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess.⁹ Em placa de 96 poços foram adicionados 50 µL de reagente de Griess e 50 µL de amostra de sobrenadantes de cultura, incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz. Todas as placas continham uma curva padrão com nitrito de sódio (Sigma, EUA) em concentrações de 5, 10, 30 e 60 µM. A leitura foi realizada em leitora de microplacas (Asys Hitech GmbH, Austria) a 540 nm.

Cultura de células mononucleares e polimorfonucleares e infecção com *L. (L.) amazonensis* para determinação do índice fagocítico

As células mononucleares e polimorfonucleares foram adicionadas a placas de 24 poços (2×10^6 células/mL) com lamínulas de 13 mm e incubadas com meio RPMI (pH 7,6) (Gibco, USA) por 3 horas a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Após o tempo de aderência, as células foram lavadas com solução de Hanks, ficando aproximadamente 2×10^5 células⁸ e receberam promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (2×10^6) opsonizadas ou não com 10% soro humano normal que para opsonização foram previamente incubadas em banho-maria 37°C por 30 minutos (Novatecnica, Brasil).

O controle de estimulação utilizado foi o Zymozan A de *Saccharomyces cerevisiae* (5 mg/mL) (Sigma Aldrich, Suíça), diluído em 900 μL de PBS e 100 μL de soro humano normal e incubados por 30 minutos a 37°C para sensibilização. Após o material foi centrifugado (Mikro 200R, Alemanha) 300 g durante 10 minutos para formação de “pellet” que foi ressuspensionado em meio RPMI.

Após 1, 2, 3, 5, 8 e 16 horas de incubação as lamínulas foram retiradas e coradas com hematoxilina-eosina. Foram contadas 200 células com fagocitose por lamínula como também as partículas fagocitadas em cada célula. A leitura foi feita em microscópio óptico.

O índice fagocítico foi obtido pela porcentagem de células com fagocitose multiplicada pelo número médio de partículas fagocitadas.

Cultura de células mononucleares e polimorfonucleares e infecção com *L. (L.) amazonensis* para extração de RNA

As células mononucleares e polimorfonucleares foram adicionadas a placas de 24 poços (1×10^6 células/mL) e incubadas por 2 horas a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ para aderência. Logo após as células não aderentes foram lavadas com solução de Hanks, ficando aproximadamente 1×10^5 células.⁸ Ambas as células foram infectadas com *L. (L.) amazonensis* (1×10^6 células/mL) e um grupo de células foi mantido como controle, sem infecção.

As culturas de células mononucleares foram incubadas por 16 e 42 horas e as de células polimorfonucleares foram incubadas por 6 e 30 horas com RPMI (pH 7,2 e SFB a 10%) a 37°C com 5% de CO_2 . Após, o sobrenadante foi desprezado e às células aderentes foi adicionado 1 mL de Trizol (Life Technologies, USA), homogeneizado e armazenado em freezer -80°C até a extração de RNA.

A extração de RNA seguiu a metodologia com Trizol de acordo com o fabricante. O RNA foi quantificado em Nano Drop 2000 UV-VIS spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

Obtenção e Amplificação de cDNA

A produção da primeira fita de cDNA foi realizada por Superscript III segundo o fabricante (Invitrogen, USA).

Para amplificação de cDNA primeiramente foi preparado o máster mix do PCR (Buffer 1X, 0,2 mM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 1 µM Primers, 1U Taq platinum, H₂O) (Invitrogen, USA) com volume total de 20 µL por amostra. Após a preparação do mix foi adicionado 5 µL de cDNA e colocado em termocicladora.

Foram analisadas a expressão da β-actina para controle endógeno, e das quimiocinas IL-8 e CCL3 e seus respectivos receptores, CXCR1 e CCR1, e da iNOS em neutrófilos e macrófagos. O número de pares de base e as condições de amplificação são apresentados na tabela 1.

O material amplificado foi analisado em eletroforese de gel de agarose a 2%, revelado com brometo de etídio e visualizado em transluminador L-Pix (Loccus Biotecnologia, Brasil). A intensidade de banda expressa em cada quimiocina, seu receptor e na iNOS foi analisada pelo Image J.

Análise estatística

Para a análise da determinação de nitrito foi utilizada análise de variância e para a avaliação da fagocitose e análise da intensidade de banda produzida pelas quimiocinas, seus receptores e pela iNOS foi utilizado o teste de Mann Whitney pelo programa Bioestat 5.3, com nível de significância de 95% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Características dos indivíduos estudados

Na tabela 2 estão descritas as características dos 48 indivíduos utilizadas nesta pesquisa. Estes 48 indivíduos foram divididos em 16 para cada um dos experimentos

realizados (produção de óxido nítrico, índice fagocítico e expressão de RNAm de quimiocinas seus receptores e da iNOS).

Determinação de óxido nítrico pela dosagem de nitrito

Ao avaliar a cinética de produção de nitrito, que representa a produção de óxido nítrico, os macrófagos apresentaram maior produção em 42 horas, mas não houve diferença estatística ($P>0,05$) (Figura 1). Os neutrófilos apresentaram maior produção de NO até 16 horas de infecção e em 30 e 42 horas observou-se uma queda nesta produção. Quando comparamos os tempos de 6 e 42 horas observamos diferença estatística ($P=0,006$) (Figura1).

Quando foram comparados os níveis de nitrito entre os macrófagos e neutrófilos não houve diferença estatística nos tempos analisados ($P>0,05$).

Índice fagocítico

Os macrófagos apresentaram maior índice fagocítico em 5, 8 e 16 horas, e menor índice fagocítico em 1, 2 e 3 horas, porém não houve significância estatística ($P>0,05$). Ao analisarmos os neutrófilos podemos observar que em 1, 2 e 3 horas o índice fagocítico foi maior, e em 5, 8 e 16 horas o índice fagocítico foi menor ($P<0,001$) (Figura 2).

Na avaliação da fagocitose para os macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* opsonizadas e para os macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* não opsonizadas, nos tempos iniciais e finais de infecção, foi observado diferença estatística apenas entre 1 e 16 horas ($P<0,01$) ($P<0,04$), respectivamente. E ao avaliar os neutrófilos infectados com promastigotas opsonizadas e os neutrófilos infectados com promastigotas não opsonizadas também mostraram diferença estatística entre 1 e 16 horas ($P<0,001$) (Figura 2).

Ao comparar os macrófagos infectados com promastigotas opsonizadas com os macrófagos infectados com promastigotas não opsonizadas e os neutrófilos infectados com promastigotas opsonizadas com os neutrófilos infectados com promastigotas não opsonizadas, não foram encontradas significância estatística ($P>0,05$) (Figura 2).

Quanto à comparação do índice fagocítico entre macrófagos e neutrófilos infectados com *L. (L.) amazonensis* opsonizadas ou não, observamos que os neutrófilos nos tempos iniciais de infecção (3 e 5 horas) fagocitaram mais, apresentando diferença estatística significativa ($P<0,001$), e os macrófagos apresentaram maior índice fagocítico em 8 e 16 horas, apresentando diferença estatisticamente significativa ($P<0,001$).

Expressão de RNAm de quimiocinas e seus receptores e iNOS em neutrófilos e macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*

Não foram encontradas diferenças estatísticas ($P > 0,05$) na avaliação de expressão de RNAm para quimiocinas, seus receptores e iNOS pelas células mononucleares e polimorfonucleares, infectadas ou não com *L. (L.) amazonensis* dos 16 indivíduos estudados.

Houve expressão de RNAm de IL-8, CCL3 e CCR1 em todos os tempos de incubação por neutrófilos e macrófagos. Quanto a expressão de RNAm de CXCR1 foi vista a expressão em todos os horários analisados, exceto em macrófagos incubados em 42 horas, tanto em células infectadas como em células não infectadas. E na expressão de RNAm de iNOS houve expressão apenas em macrófagos infectados em 16 e 42 horas.

Na figura 3, está demonstrada a densidade média relativa entre a expressão de quimiocinas, seus receptores e iNOS com a β -actina, os quais não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$).

Discussão

Neste trabalho foram utilizadas células humanas, pois representam mais a realidade já que na comparação de alguns trabalhos são observadas diferença na resposta imune entre células humanas e células animais.¹⁰ Apesar da região noroeste do Paraná ser considerada endêmica para a leishmaniose tegumentar, as células utilizadas neste trabalho foram provenientes de indivíduos sem histórico de leishmaniose tegumentar, e para excluir a possibilidade de infecção sem sintomas, no questionário aplicado aos participantes da pesquisa, podemos verificar que estes relataram não frequentar as áreas endêmicas, como rios e matas.

O estabelecimento da infecção por *Leishmania* é determinado pela espécie do parasito e pela imunidade do hospedeiro. A resposta imunológica não está muito bem esclarecida, pois se trata de um mecanismo muito complexo, onde estão envolvidas além da saliva do flebotomíneo, as citocinas, moléculas coestimuladoras e células como neutrófilos e macrófagos têm sido estudadas e mostram que desempenham papel importante na infecção.^{11,12,13}

A fagocitose é um processo ativo dependente de energia para incorporação de partículas em vesículas, que se fundem com lisossomos, onde as partículas que foram

ingeridas são destruídas. Para o início da fagocitose em neutrófilos e macrófagos há necessidade de receptores específicos para os micro-organismos.^{14,15}

Neutrófilos infectados com *L. (L.) amazonensis* opsonizadas ou não apresentaram maior atividade fagocítica nas primeiras horas de infecção e os macrófagos mais tardiamente.

Segundo Castellano et al¹⁶ a opsonização do parasito leva a facilitação do processo da fagocitose, pois pela ligação de moléculas de C3b e C3bi, o mecanismo oxidativo não é ativado e a entrada do parasito na célula é facilitada. Porém, nossos resultados mostraram que a fagocitose por neutrófilos e macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* opsonizadas ou não, não apresentaram diferença estatística, ou seja, a opsonização das promastigotas não facilitou o processo de fagocitose.

Após o processo da fagocitose, as promastigotas se transformam em amastigotas e as células liberam sinais de ativação que estimulam as atividades microbicidas das células, como a liberação de óxido nítrico que tem importante papel na sinalização celular e como molécula efetora e pode agir também no controle da leishmaniose murina.¹⁷ Os neutrófilos apresentaram maior produção de óxido nítrico em 16 horas, e em 30 e 42 horas observou-se uma queda. Alguns trabalhos demonstram que os neutrófilos são importantes no combate inicial ao parasito e na emissão de sinais capazes de dar início a imunidade adaptativa, pois possuem papel ativo no controle de infecções.^{18,19}

Não foi observada diferença estatística, na produção de óxido nítrico, pelos macrófagos entre os diferentes tempos de infecção. Nossos resultados corroboram com os de Diniz²⁰ que demonstrou produção de NO nos macrófagos infectados com *L. (L.) braziliensis*, mas não encontrou diferença entre os grupos analisados, que englobavam pacientes com leishmaniose mucosa, leishmaniose cutânea, subclínicos e indivíduos saudáveis. Isto sugere que os derivados oxidantes do NO podem não ser críticos no controle da infecção, embora Morato¹⁰ tenha demonstrado que a produção de NO por macrófagos humanos pode ser baixa, mas relevante no controle da infecção. Outros fatores podem estar agindo no início da infecção ou estão atuando juntamente com o NO para promover a resposta imune contra o parasito.

A comparação da análise da expressão de IL-8, CCR1, CCL3, CXCR1 e iNOS entre as células polimorfonucleares e mononucleares infectadas com *L. (L.) amazonensis* ou não, não mostrou diferença estatística significativa. A análise da expressão por PCR em tempo real poderia esclarecer melhor estes dados.

Nos neutrófilos a expressão das quimiocinas IL-8, CCL3 e de seus receptores respectivamente, CXCR1, CCR1 nos indicam um provável recrutamento de mais neutrófilos para o local da infecção, o que pode levar a um controle ou exacerbação da doença.^{21,22}

A expressão de quimiocinas e seus receptores nos macrófagos infectados ou não por *L. (L.) amazonensis*, exceto nas 42 horas para o CXCR1, demonstra a quimiotaxia de monócitos e neutrófilos para o local da infecção. Estes fatos favorecem a morte das espécies de *Leishmania* ou a progressão da doença.^{20, 23}

A expressão de iNOS e a produção de NO pelos macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* em 16 e 42 horas, reforça o relatado por Machado²⁴, quanto a expressão de iNOS vista em lesões de pacientes com LTA acompanhada da produção de NO.

Nossos resultados mostram que os neutrófilos apresentaram maior fagocitose no início da infecção e deste modo poderiam estar atuando como cavalo de Tróia para os macrófagos, e as duas células agindo conjuntamente para o desenvolvimento da resposta imune. A maior atividade dos macrófagos mais tardiamente pode indicar sua ação mais direta na promoção da resposta imune específica contra a LTA. As atividades mostradas por neutrófilos e macrófagos podem então estar induzindo a dicotomia da resposta imune a partir da infecção.

A expressão de quimiocinas e seus receptores, e iNOS tanto nos neutrófilos como nos macrófagos, demonstram que estas células estão sendo estimuladas e sofrendo quimiotaxia e consequentemente participando e induzindo a dicotomia (Th1 e/ou Th2) da resposta imune contra a LTA.²⁵

Referências

1. BRASIL 2013, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2013; 3: 1-182.
2. Ministério da Saúde. Departamento de informática do Sistema Único de Saúde: Leishmaniose tegumentar americana: casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação SINAN NET. <http://dtr2004.saúde.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def> [acesso em Novembro 2014).
3. GONTIJO B, CARVALHO MLR. Leishmaniose tegumentar americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2003; 36: 71-80.
4. DORVAL MEMC, OSHIRO ET, CUPOLLILO E, CASTRO ACC et al. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2006; 39: 43-6.
5. LASKAY T, VAN ZANDBERGEN G, SOLBACH W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. Immunobiology, 2008; 213: 183-91.
6. van ZANDBERGEN G, HERMANN N, LAUFS H, SOLBACH W et al. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. Infection and Immunity, 2002; 70: 4177-84.
7. SCAPINI P, LAPINET-VERA JA, GASPERINI S, CALZETTI F et al. The neutrophil as a cellular source of chemokines. Immunological Reviews, 2000; 177: 195-203.

8. RIBEIRO-GOMES FL, OTERO AC, GOMES NA et al. Macrophage Interactions with Neutrophils Regulate *Leishmania major* Infection. *The Journal of Immunology*, 2010; 172: 4454-62.
9. GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 1982; 126: 131-8.
10. MORATO, CI. Avaliação da modulação da infecção de macrófagos humanos com *Leishmania (Viannia) braziliensis* por leucotrienos. Dissertação (Mestrado). *Medicina Tropical e Saúde Pública*. Universidade Federal de Goiás, 2013: 1-153.
11. ROGERS KA, DEKREY GK, MBOW ML, GILLESPIE RD et al. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *Elsevier*, 2002; 209: 1-7.
12. REIS LC, BRITO MEF, SOUZA MA, PEREIRA VRA. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. *Revista de Patologia Tropical*, 2006; 35: 103-15.
13. BATISTA MA. Avaliação *in vitro*, da resposta imune de neutrófilos de camundongos C57BL/6 estimulados com diferentes espécies de *Leishmania*. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, 2013: 1-94.
14. GENESTRA M, ECHEVARRIA A, CYSNE-FINKELSTEIN L, VIGNÓLIO-ALVES L et al. Effect of amidine derivatives on nitric oxide production by *Leishmania amazonensis* promastigotas and axenic amastigotes. *Elsevier*, 2003; 8: 1-6.
15. TRINDADE, EL. Análise comparativa da enzima óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) em diferentes espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose tegumentar americana. TCC (Graduação) - Curso de Biomedicina, Universidade Federal do Pará, Belém, 2009: 1-47.

16. CASTELLANO, LRC. Resposta imune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão. VITAE Academia Biomédica digital, 2005; 25: 1-10.
17. LIEW FY, COX FEG. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. Elsevier, 1991; 12: 17-21.
18. NOVAIS FO, SANTIAGO RC, BAFICA A, KHOURI R, AFONSO L et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. The Journal of Immunology, 2009; 183: 1-12.
19. FALCÃO, SAC. Avaliação da interação entre neutrófilos e *Leishmania braziliensis*. Tese (Doutorado) – Patologia Experimental, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Universidade Federal da Bahia, 2013: 1-77.
20. DINIZ AG. Monócitos e macrófagos participam da proteção e da patologia associada à infecção por *Leishmania braziliensis*. Tese (Doutorado) – Imunologia, Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia, 2012: 1-77.
21. TAVARES NM. Avaliação dos mecanismos de controle da infecção por *Leishmania amazonensis* em neutrófilos humanos: o papel do LTB₄. Tese (Doutorado). Patologia Humana, Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz. Universidade Federal da Bahia, 2013: 1-85.
22. SAFAIYAN S, BOLHASSANI S, NYLEN S, AKUFFO H et al. Contribution of human neutrophils in the development of protective immune response during *in vitro* *Leishmania major* infection. Parasite Immunology, 2011; 33: 609-20.
23. COÊLHO, ZCB. Avaliação *in vitro* dos mecanismos imunossupressores induzidos por *Leishmania amazonensis* na resposta imune de indivíduos sadios. Dissertação (Mestrado). Patologia, Departamento de Patologia e Medicina Legal. Universidade Federal do Ceará, 2004: 1-75.

24. MACHADO PRL, CARVALHO L, ARAÚJO MIAS, CARVALHO EM. Mecanismos de resposta imune ás infecções. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2004; 79: 647-64.
25. GUERREIRO R, SANTOS-COSTA Q, AZEVEDO-PEREIRA JM. As quimiocinas e os seus receptores, características e funções fisiológicas. *Acta Médica Portuguesa*, 2011; 24: 967-76.
26. FUJISAWA T, KATO Y, ATSUTA J, TERADA A et al. Chemokine production by the BEAS-2B human bronchial epithelial cells: Differential regulation of eotaxin, IL-8, and RANTES by Th2-and Th1- derived cytokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2000; 105: 126-33.
27. NAGASE H, MIYAMASU M, YAMAGUCHI M, FUJISAWA T et al. Expression of CXCR4 in Eosinophils: Functional Analyses and Cytokine-Mediated Regulations. *The Journal of Immunology*, 2000; 164: 5935-43.
28. CHUI R, ZIS-DOROVINI K. Regulation of CCL2 and CCL3 expression in human brain endotelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *Journal of Neuroinflammation*, 2010; 7: 1-12.
29. TAKAHASHI M, KITAHASHI T, ISHIGAMORI R, MUTOH M et al. Increased expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced hamster pancreatic carcinogenesis and prevention of cancer development by ONO-1714, an iNOS inhibitor. *Carcinogenesis*, 2008; 29: 1608-13.
30. GOIDIN D, MAMESSIER A, STAQUET MJ, SCHMITT D et al. Ribossomal 18S RNA Prevails over Glyceraldehyde-3- Phosphate Dehydrogenase and b-actin Genes as Internal Standard for Quantitative Comparison of mRNA Levels in Invasive and Noninvasive Human Melanoma Cell Subpopulations. *Analytical Biochemistry*, 2001; 295: 17-21.

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos e condições de reação para amplificação de β -actina, IL-8, CXCR1, CCL3, CCR1 e iNOS em neutrófilos e macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*.

	Sequência dos iniciadores	Produto do PCR	Desnaturação	CICLOS		Referência
				Anelamento	Extensão	
IL-8	5'ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT3' 5'TCTCAGCCCTCTTCAAAAATTCTC3'	289 pb	95°C - 9 min	40 ciclos: 94°C – 30 s 54°C – 30 s 72°C – 5 min	72°C – 5 min	FUJISAWA, 2000
CXCR1	5'CAGATCCACAGATGTGGGAT3' 5'AGCAGCCAAGACAAACAAACT3'	468 pb	95°C – 5 min	30 ciclos: 94°C – 30 s 56°C – 30 s 72°C – 30 s	72°C – 10 min	NAGASE, 2000
CCL3	5'ATGCAGGTCTCCACTGCTGCCCTT3' 5'GCACTCAGCTCCAGGTCGCTGACAT3'	274 pb	1 ciclo: 94°C – 8 min 55°C – 30 s 72°C – 3 min	35 ciclos:94°C- 1 min 55°C – 30 s 72°C – 45 s		CHUI, 2010
CCR1	5'TGGAAACTCCAAACACCACAG-3' 5'CCCAGTCATCCTTCAACTTG3'	346 pb	95°C – 5 min	30 ciclos: 94°C – 30 s 56°C – 30 s 72°C – 30 s	72°C – 10 min	NAGASE, 2000
iNOS	5'TTCCCCCAGCGGAGTGATGG3' 5'GTACCAGCCATTGAAGGGGC3'	382 pb	95°C – 3 min	35 ciclos: 94°C – 15 s 60°C – 25 s 72°C – 30 s	72°C – 10 min	TAKAHASHI, 2008
β-actina	5'GGCGACGAGGCCAGA3' 5'CGATTTCCTCGGC3'	463 pb	94°C – 5 min	30 ciclos: 94°C – 30 s 62°C – 30 s 72°C – 30 s	72°C – 10 min	GOIDIN, 2001

Tabela 2. Dados epidemiológicos dos indivíduos sem histórico de leishmaniose tegumentar americana.

Variável	Total (%)
Gênero	
Feminino	85%
Masculino	15%
Faixa Etária	
18 – 30 anos	72,5%
31 – 81 anos	27,5%
Moradia	
Maringá	87,5%
Marialva	5%
Iguatemi	2,5%
Atividade de Lazer	
Academia	30%
Caminhada	17,5%
Cinema e Leitura	17,5%
Handebol, Futebol ou Bateria	2,5%
Sem atividade	20%

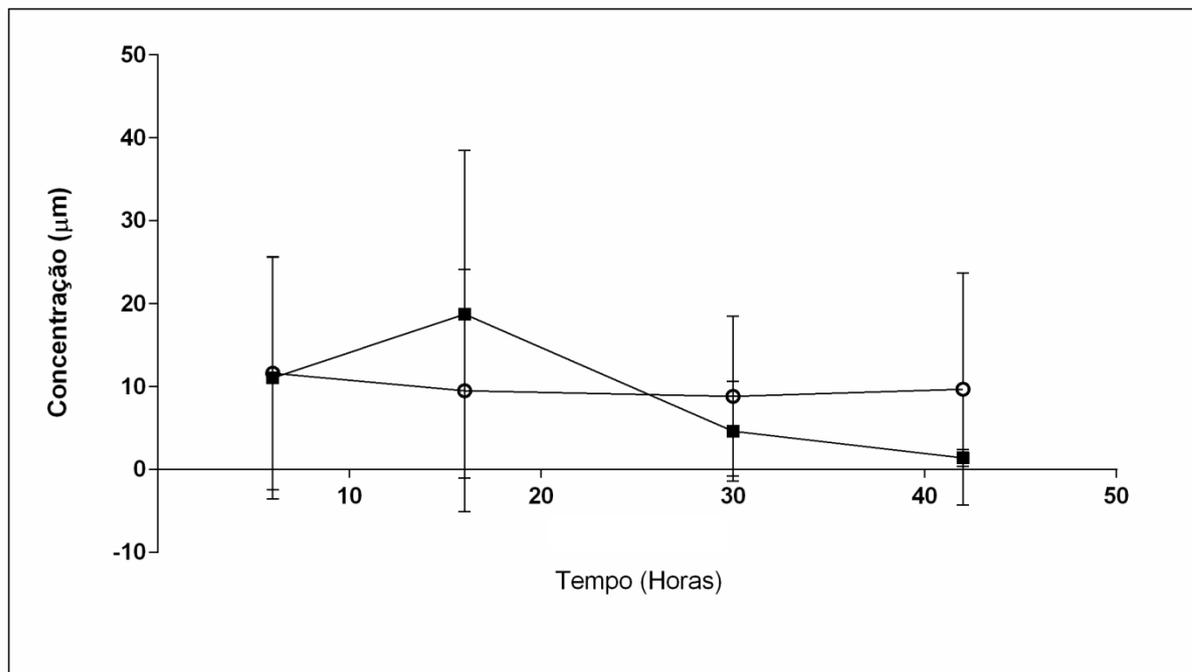


Figura 1. Cinética da produção de óxido nítrico em células humanas infectadas. Células mononucleares e polimorfonucleares foram isoladas de 16 indivíduos saudáveis e infectadas com *L. (L.) amazonensis*, incubadas por 6, 16, 30 e 42 horas em CO₂ a 5%. Os sobrenadantes foram analisados quanto a produção de nitrito. O gráfico apresenta média \pm SD da análise em quadruplicata da produção de nitrito, estes dados foram analisados estatisticamente pela análise variância, considerando um nível de significância de 95% ($P < 0,05$). ■ macrófagos ○ neutrófilos.

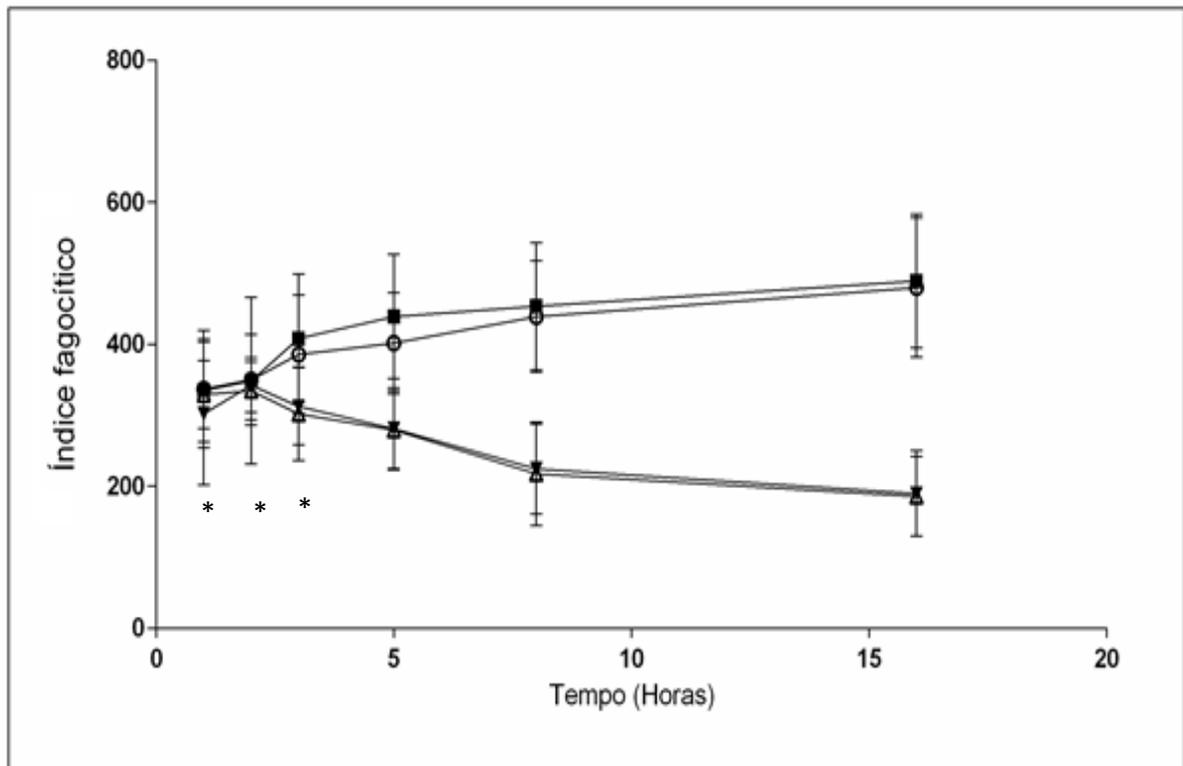


Figura 2. Cinética do índice fagocítico em células mononucleares e polimorfonucleares infectadas. Macrófagos e neutrófilos isolados de 16 indivíduos saudáveis e infectados com *L. (L.) amazonensis*, incubados por 1, 2, 3, 5, 8 e 16 horas em CO₂ 5% avaliadas quanto a fagocitose. Este gráfico representa a média ± SD das células quanto à fagocitose nos cinco tempos avaliados, estes dados foram analisados estatisticamente pelo teste de Mann Whitney, considerando um nível de significância de 95% ($P < 0,05$). ○ Macrófagos + *L. (L.) amazonensis*. ■ Macrófagos + *L. (L.) amazonensis* opsonizadas. △ Neutrófilos + *L. (L.) amazonensis*. ▼ Neutrófilos + *L. (L.) amazonensis* opsonizadas. * $P < 0,001$ em neutrófilos infectados com *L. (L.) amazonensis* opsonizadas ou não, em 1, 2 e 3 horas.

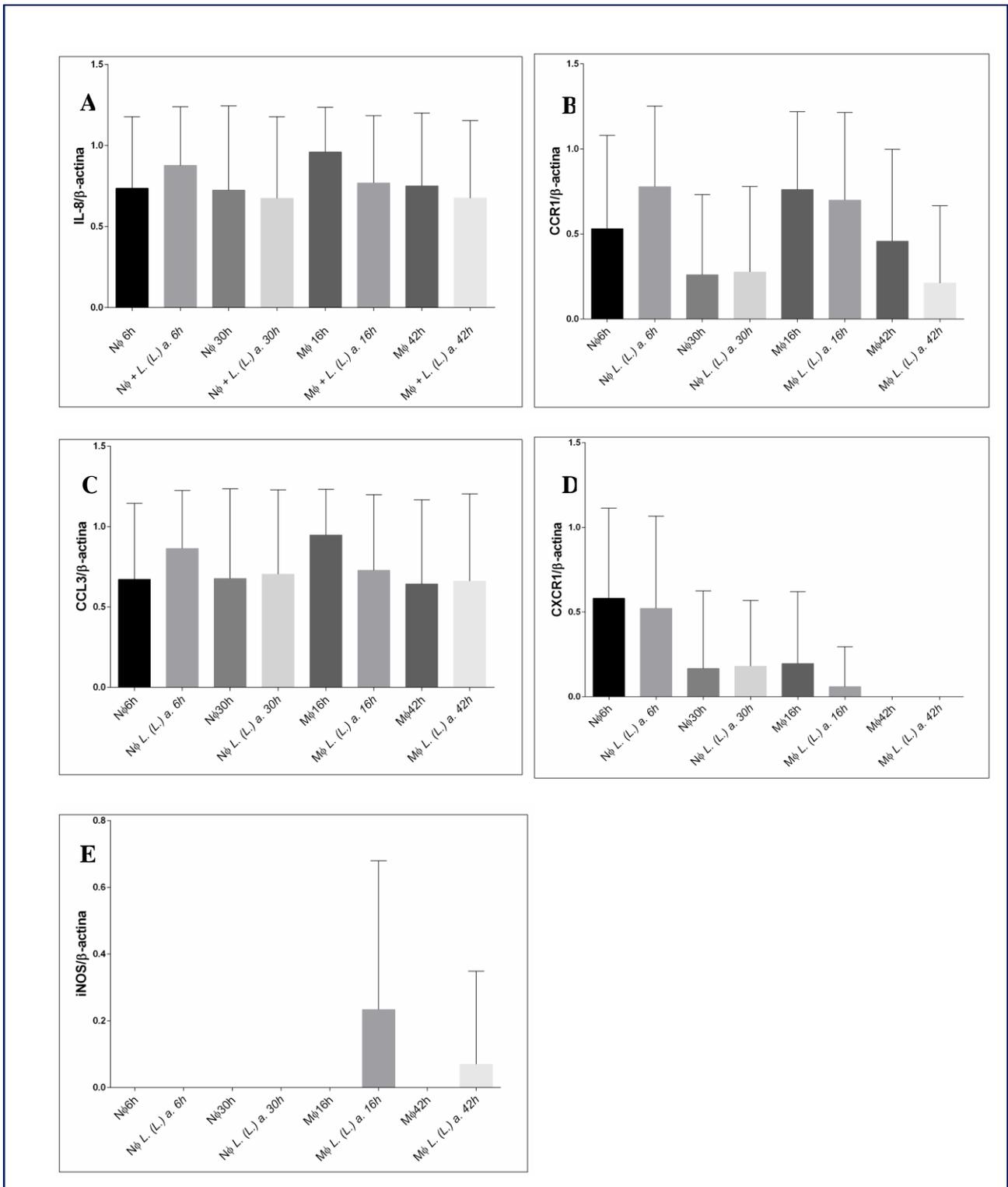


Figura 3. Densidade relativa da intensidade de banda da expressão de RNAm. Os gráficos representam a densidade média relativa obtida das intensidades de banda da expressão de RNAm de IL-8, CXCR1, CCL3, CCR1 e iNOS comparadas com a β -actina. Este gráfico representa a média \pm SD das células isoladas dos 16 indivíduos, estes dados foram analisados estatisticamente pelo teste de Mann Whitney, considerando um nível de significância de 95% ($P < 0,05$). A. - IL-8. B. - CXCR1. C. - CCL3. D. - CCR1. E. - iNOS.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

O presente estudo sobre avaliação da resposta imune por células polimorfonucleares e mononucleares humanas infectadas com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* demonstrou que:

1. A maior produção de óxido nítrico e a fagocitose pelos neutrófilos nos tempos iniciais de infecção pela *L. (L.) amazonensis*, sugere que estas células podem estar agindo como cavalo de Tróia para os macrófagos. Diferentemente, os macrófagos apresentaram maior produção de NO e fagocitose mais tardiamente. Juntamente estes dados indicam que a estimulação destas células e sua quimiotaxia podem estar auxiliando no desenvolvimento da dicotomia da resposta imune;
2. A expressão de quimiocinas, de seus receptores, e da iNOS, mostrou que estas moléculas podem estar envolvidas na indução da resposta Th1 e/ou Th2 devido a quimiotaxia e estimulação de neutrófilos e macrófagos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

O uso de células humanas na avaliação da resposta imune, e o uso de diferentes espécies de *Leishmania* pode permitir um melhor entendimento da imunopatogenia da LTA. Deste modo, poderá promover o desenvolvimento de modelos experimentais para novos diagnósticos e novos tratamentos.