

**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Actividade funcional dos neutrófilos  
durante a infecção por *Leishmania infantum*

Neutrophil functional activity  
during *Leishmania infantum* infection

CLÁUDIA SILVA MARQUES

LISBOA

2011



Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas, Especialidade em Parasitologia, pelo Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.



Este trabalho foi realizado sob a orientação da Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes, na Unidade de Ensino e Investigação de Leishmanioses, Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais - Laboratório Associado do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa e no Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) em Salvador da Bahia, Brasil. O trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, através da bolsa de doutoramento SFRH/BD/21368/2005, do projecto de investigação POCI/CVT/55113/2004 com a co-participação do Fundo da União Europeia (FEDER) e da rede Leishvacina - Mecanismos de controle e imunoprofilaxia na leishmaniose (207RT0308 CYTED).





*Dedico este trabalho em memória da minha tia Isabel*



# ÍNDICE GERAL

<b>Agradecimentos</b>	<b>xiii</b>
<b>Publicações e comunicações</b>	<b>xvii</b>
<b>Resumo</b>	<b>xix</b>
<b>Abstract</b>	<b>xxi</b>
<b>Objectivos</b>	<b>xxiii</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>xxv</b>
<b>Índice de tabelas</b>	<b>xxvii</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>xxix</b>
<b>Capítulo 1 “Enquadramento teórico”</b>	
1.1 Leishmaniose - Noções gerais	3
1.1.1 Morfologia e ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	7
1.1.2 Hospedeiro invertebrado (vector)	10
1.1.3 Hospedeiro vertebrado (reservatório)	11
1.1.4 Diagnóstico, tratamento, profilaxia e controlo da LV	12
1.1.5 Modelo roedor	14
1.2 Neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares (PMN)	15
1.3 Leishmaniose – Resposta imunológica	18
1.3.1 Interação PMN- <i>Leishmania</i>	21
1.4. Referências bibliográficas	23
<b>Capítulo 2 “Interação <i>in vitro</i> entre neutrófilos e parasitas de <i>L. infantum</i>”</b>	
2.1 Introdução	37
2.2 Objectivo	38
2.3 Material e métodos	39
2.3.1 Animais e parasitas	39

---

2.3.2 Isolamento e purificação de neutrófilos	40
2.3.3 Infecção <i>in vitro</i> com <i>L. infantum</i> e determinação da capacidade fagocitária de neutrófilos	42
2.3.4 Crescimento e viabilidade de <i>L. infantum</i> após o contacto com neutrófilos	43
2.3.5 Quimiotaxia	44
2.3.6 Respiração oxidativa	45
2.3.7 Desgranulação	46
2.3.8 Apoptose	47
2.3.9 Quantificação da expressão de citocinas, quimiocinas, TLR-2 e gp91phox	49
2.3.9.1 Extracção de RNA total e síntese de cDNA	49
2.3.9.2 Seleção dos genes-alvo e sequência de <i>primers</i>	50
2.3.9.3 PCR convencional, purificação e clonagem do produto amplificado em vectores plasmídicos	52
2.3.9.4 Construção de curvas - padrão e PCR em tempo real para a quantificação absoluta da expressão génica	55
2.3.10 Análise estatística	56
2.4 Resultados	57
2.4.1 Promastigotas de <i>L. infantum</i> são fagocitados pelos PMN e diferenciaram-se em amastigotas	57
2.4.2 Os parasitas mantêm a sua viabilidade mas a multiplicação é inibida pela presença de PMN	58
2.4.3 O contacto com parasitas de <i>L. infantum</i> inibe a migração de PMN	60
2.4.4 <i>L. infantum</i> induz a produção de ião superóxido mas a expressão da subunidade da enzima NADPH, gp91phox não sofre alterações	61
2.4.5 Aumento da desgranulação/exocitose das enzimas MPO, NE and Cat G na presença de <i>L. infantum</i>	62
2.4.6 Aumento do número de PMN viáveis e diminuição do tamanho e complexidade de PMN na presença do parasita	65
2.4.7 A presença do parasita regula negativamente a expressão de quimiocinas, citocinas e TLR2	68
2.5 Discussão	70
2.6 Referências bibliográficas	78

**Capítulo 3** “Interacção entre neutrófilos e macrófagos durante a infecção *in vitro* de *L. infantum*”

3.1 Introdução	87
3.2 Objectivo	88
3.3 Material e métodos	88
3.3.1 Animais e parasitas	88
3.3.2 Isolamento e purificação de neutrófilos e macrófagos	89
3.3.3 Infecção <i>in vitro</i> de neutrófilos com <i>L. infantum</i> e co-cultura de macrófagos com neutrófilos infectados. Caracterização da capacidade fagocitária dos macrófagos	90
3.3.4 Quantificação da expressão de receptores <i>toll-like</i> , quimiocina MCP-1 e citocinas	91
3.3.5 Quantificação da produção de metabolitos do óxido nítrico	92
3.3.6 Análise estatística	95
3.4 Resultados	96
3.4.1 A infecção de macrófagos parece ser influenciada pela presença inicial de neutrófilos previamente infectados com <i>L. infantum</i>	96
3.4.2 A presença de inicial de neutrófilos e <i>L. infantum</i> afecta a expressão de receptores <i>toll-like</i> em macrófagos	99
3.4.3 A presença inicial de neutrófilos e <i>L. infantum</i> afecta a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias por macrófagos	100
3.4.4 A presença de inicial de neutrófilos e <i>L. infantum</i> afecta a expressão da quimiocina MCP-1 em macrófagos	102
3.4.5 A presença de neutrófilos e <i>L. infantum</i> afecta os níveis de NO	104
3.5 Discussão	105
3.6 Referências bibliográficas	112

**Capítulo 4** “Papel dos neutrófilos durante a fase inicial da infecção *in vivo* por *L. chagasi*”

4.1 Introdução	119
4.2 Objectivo	120
4.3 Material e métodos	120
4.3.1 Animais e parasitas	120
4.3.2 Preparação de antigénio solúvel de <i>L. chagasi</i>	121

---

4.3.3 Constituição dos grupos de animais, depleção de PMN, infecção experimental e recolha de órgãos	122
4.3.4 Imunofenotipagem da população leucocitária no local da infecção	124
4.3.5 Isolamento ( <i>single-cell suspension</i> ) e cultura de células ganglionares	127
4.3.6 Quantificação da expressão de citocinas em células ganglionares	127
4.3.7 Quantificação da produção de granzima B por células ganglionares	129
4.3.8 Detecção e quantificação do parasita no local de infecção e nos gânglios cervicais	130
4.3.9 Análise estatística	131
4.4 Resultados	132
4.4.1 Confirmação da depleção de granulócitos/PMN	132
4.4.2 O parasita é detectado na orelha e nos gânglios cervicais de murganhos depletados de PMN	134
4.4.3 A dinâmica da população leucocitária parece não ser alterada devida à presença do parasita ou pela depleção de PMN	135
4.4.4 A ausência inicial de PMN e a presença de <i>L. chagasi</i> afectam a expressão da citocinas nos gânglios cervicais superficiais	137
4.4.5 A produção de granzima B por linfócitos ganglionares durante a infecção por <i>L. chagasi</i> é afectada pela depleção de PMN	140
4.5 Discussão	141
4.6 Referências bibliográficas	147
<b>Conclusões finais</b>	<b>151</b>

## AGRADECIMENTOS

À **Prof. Doutora Gabriela Santos-Gomes**, por uma exemplar orientação científica. A sua presença foi fundamental ao longo de todas as etapas deste percurso – tanto nos momentos mais sérios e de total dedicação científica, com indicações e críticas sempre pragmáticas, mas também nos mais descontraídos, que foram algumas vezes (especialmente do outro lado do Atlântico), acompanhados de uma saborosa (e merecida) caipirinha. Nuns e noutros, o seu papel omnipresente como cientista, conselheira e amiga deu-me a perseverança necessária para nunca desistir das minhas escolhas e, acima de tudo, o privilégio de poder partilhar uma paixão genuína pela Ciência.

À **Prof. Doutora Lenea Campino**, Directora da UEI de Leishmanioses do IHMT, por me proporcionar todas as condições necessárias à elaboração deste trabalho e por acompanhar atentamente o meu percurso científico desde 2001, altura que iniciei o projecto de estágio de licenciatura, desenvolvido em parte na UEI Leishmanioses. A sua presença marcou uma década fundamental na minha vida.

Ao **Prof. Doutor Virgílio do Rosário**, Presidente do Conselho Científico do IHMT, estou profundamente grata pela atenção que sempre dedicou aos bolseiros de investigação, estudantes de licenciatura, mestrado e doutoramento do IHMT, e por sempre nos incentivar a crescer como cientistas.

No Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ), em Salvador da Bahia, Brasil, agradeço à **Prof. Aldina Barral** por me receber no Laboratório de Imunoparasitologia (LIP), no âmbito do projecto da rede de colaboração CNPq/ CYTED - Mecanismos de Controle e Imunoprofilaxia na Leishmaniose, para a realização de um estágio, cujo trabalho desenvolvido permitiu obter parte dos resultados expostos nesta tese. À **Prof. Camila Indiani de Oliveira**, pela orientação

científica, e aos bolsеiros **Sarah Falcão, Fernanda Novais, Diego Moura e Kiyoshi Fukutan** pela partilha de técnicas laboratoriais e ajuda na bancada.

Ao **Prof. Eric Denkers**, por me ter acolhido no seu laboratório (Department of Microbiology and Immunology, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, NY, EUA) para a realização de um estágio, e à sua estudante de doutoramento **Woraporn Sukhumavasi (Kwan)**, a responsável pelo ensinamento de grande parte das técnicas relacionadas com neutrófilos descritas nesta tese. A acessibilidade e simpatia com que partilharam os seus conhecimentos fizeram com que fosse também um privilégio estagiar nesta instituição.

Ao **Prof. Doutor Jorge Pedrosa** do Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde da Universidade do Minho e à **Inv. Doutora Sónia Lima** do IHMT, membros da minha comissão tutorial, pelas críticas, conselhos e sábias sugestões científicas durante as reuniões desta comissão. Agradeço ao Prof. Doutor Jorge Pedrosa também por me ter acolhido no seu laboratório para um curto mas relevante estágio e por me ter cedido o anticorpo RB6-8C5 usado neste trabalho.

Este trabalho não poderia ter sido realizado sem a constante ajuda na bancada e sem as opiniões e conselhos no tratamento e discussão de resultados, do meu querido amigo **Felipe Passero**, estudante de doutoramento da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil. Agradeço-lhe por tudo isso, mas sobretudo pela amizade, porque sei que encontrei um amigo para a vida.

Ao meus colegas na UEI de Leishmanioses **Armanda Rodrigues, Olivia Roos Rodrigues, Inês Vale-Gato, Marta Clemente e David Mateus** que pelo apoio laboratorial e científico contribuíram para os resultados presentes neste trabalho.

Agradeço ao **Nuno Rolão, Sofia Cortes, Olivia Roos Rodrigues, Armanda Rodrigues, Marta Clemente, Mónica Nunes, Carina Esteves, Carla Maia, Mónica Marques, Sofia Henriques,**

**Geovania Braga e Marco Bragança**, meus colegas de investigação na UEI de Leishmanioses mas também amigos, por me proporcionarem um fantástico ambiente de trabalho e de saudável camaradagem, que provavelmente não irei encontrar em mais nenhum lugar.

Ao **João Ramada, José Manuel Cristóvão e Arminda Barbosa**, pela ajuda e apoio técnico na UEI de Leishmanioses.

À **Investigadora Ivone Correia**, do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, pela formação relativa ao citómetro de fluxo e apoio constante, quase sempre fora de horas, nas experiências relacionadas com a apoptose.

À **Prof. Doutora Ana Tomás**, do Instituto de Biologia Molecular e Celular, Porto, por gentilmente me ceder os promastigotas-GFP de *L. infantum*, utilizados na primeira parte deste trabalho.

Ao **Prof. Michel Kranendonk** do Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Biomédicas por me ter possibilitado o uso contínuo da ultracentrífuga do seu laboratório, ao longo de quase 3 anos.

Aos membros da UEI de Malária do CMDT (IHMT), por toda a ajuda e disponibilidade, mas em particular à **Susana Ramos, Rute Félix e Patrícia Machado** pela amizade e contínuo apoio.

Aos restantes Professores, Investigadores, Bolseiros e Técnicos do **IHMT**, foi um prazer e um privilégio ter feito parte desta ilustre instituição, a minha casa durante 8 anos.

À **Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT)**, por financiar a bolsa de doutoramento (SFRH/BD/21368/2005) e o trabalho desenvolvido através do projecto *Zoonotic visceral leishmaniasis: Role of neutrophils and regulatory T cells in parasite persistence and in host immunity* (POCI/CVT/55113/2004).

Não posso deixar de agradecer aos meus **AMIGOS** pela força, por me suportarem e por sempre me proporcionarem momentos especiais extra-doutoramento e contribuírem assim para a minha sanidade.

**Pedro**, obrigada por insistires em fazer-me ver o mundo ao meu redor com mais optimismo e esperança.

Aos meus **Pais e irmão**. A Família é o nosso bem mais precioso, por isso, palavras para quê?

## PUBLICAÇÕES E COMUNICAÇÕES

Do presente trabalho de doutoramento resultaram as seguintes publicações e comunicações:

### Artigos em revistas de circulação internacional com arbitragem científica

- **Marques C.**, Passero L.F., Vale-Gato I., Rodrigues A., Rodrigues O.R. Santos-Gomes G. 2011. New insights into neutrophil and *Leishmania infantum* immune interactions (submetido).

### Comunicações orais por convite

- **Marques, C.** 2009. Effect of *Leishmania infantum* in neutrophil immune mechanisms. Sessões científicas de trabalho em andamento. 06 de Agosto. Laboratório de Imunoparasitologia e Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunoregulação. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-FIOCRUZ. Salvador, Bahia. Brasil.
- **Marques, C.** 2007. Zoonotic visceral leishmaniasis: Role of neutrophils in parasite persistence and in host immunity. I Biology Alumni Meeting. 21 de Dezembro. Universidade de Évora.

### Comunicações orais em congressos

- **Marques C.**, Passero L.F., Vale-Gato I., Correia I., Ferronha H., Santos-Gomes G.M. 2009. Effect of *Leishmania infantum* parasites on neutrophil immune mechanisms. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 8 a 12 de Março. Recife, Pernambuco. Brasil.

### Comunicações em painel (poster)

- **Marques C.**, Rodrigues A., Santos-Gomes G.M. 2009. Exocytosis of serine proteases and modulation of neutrophil inflammatory response in the presence of *Leishmania infantum*. Tri-Society Annual Conference of the Society of Leukocyte Biology,

International Cytokine Society and the International Society for Interferon and Cytokine Research: Cellular and Cytokine Interactions in Health and Disease. 18 a 21 de Outubro. Centro de Congressos de Lisboa.

- **Marques C.**, Rodrigues A., Vale-Gato I., Santos-Gomes G.M. 2009. Macrophage immune response in the presence of neutrophils exposed to *Leishmania infantum* parasites. XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia. 23 a 26 de Setembro. Salvador, Bahia. Brasil.
- **Marques C.**, Rodrigues O.R., Soares-Clemente M., Tomás A., Santos-Gomes G. 2008. Immune interactions between neutrophils and *Leishmania infantum*. 2<sup>nd</sup> EFIS/EJI Belgrade Symposium/Postgraduate Course-Inflammation at the Interface of Innate and Acquired Immunity. 7 a 10 Setembro, Belgrado, Sérvia.

**Actualmente estão em preparação os seguintes artigos**

- **Marques C.**, Rodrigues A., Passero L.F., Santos-Gomes G.M. 2011. Macrophage immune response in the presence of neutrophils exposed to *Leishmania infantum* parasites.
- **Marques C.**, Falcão S., Novais F. Moura D., Rodrigues A., Passero L.F., Santos-Gomes G.M., Barral A., Oliveira C.I. 2011. Role of neutrophils in parasite persistence and in host immunity during *L. chagasi* experimental infection.

## RESUMO

A presente dissertação tinha como objectivo geral aprofundar o papel desempenhado pelos neutrófilos durante as fases iniciais na infecção por *L. infantum*, contribuindo para o esclarecimento dos mecanismos de activação da imunidade inata e adaptativa. O estudo foi programado de acordo com três objectivos específicos, cujo desenho experimental, resultados e respectivas discussões se encontram descritos nos capítulos 2, 3 e 4.

No capítulo 1 foi efectuada uma introdução teórica sobre a patogénese da leishmaniose visceral, revendo os trabalhos relacionados com a interacção parasita-hospedeiro e focando o papel dos PMN, durante a infecção com *Leishmania*.

No capítulo 2 foi avaliado o efeito do parasita nos mecanismos imunológicos de neutrófilos, através da análise da fagocitose, respiração oxidativa, apoptose, quimiotaxia, desgranulação e expressão de citocinas, quimiocinas e receptores *toll-like*. Por outro lado, foi também analisada a influência dos neutrófilos na viabilidade e no crescimento do parasita. Verificou-se que o parasita induz a activação de algumas das vias da imunidade inata dos PMN, nomeadamente mecanismos oxidativos e não oxidativos como a produção de ião superóxido e a exocitose das enzimas proteolíticas, NE e CatG. Porém, os parasitas mais aptos parecem causar a inibição da migração dos PMN e de mecanismos que levam à activação de outras subpopulações celulares, incluindo a expressão de quimiocinas (MIP-1 $\alpha$ ), citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) ou do receptor *toll-like 2*, comprometendo o vínculo natural entre a imunidade inata e a adaptativa.

No capítulo 3 foi dissecada a interacção M $\Phi$ -PMN durante a infecção *in vitro* por *L. infantum*, através da análise da capacidade fagocitária, expressão de citocinas, quimiocinas e receptores *toll-like* em macrófagos, e produção de metabolitos do óxido nítrico. Verificou-se que *L. infantum* induz a activação da resposta imunológica através da via de estimulação do TLR-4 de M $\Phi$  modulando a expressão de quimiocinas e citocinas pró (TNF- $\alpha$  e IL-6) e anti-inflamatórias (TGF- $\beta$ ), potenciada pela presença inicial de PMN. O parasita parece também bloquear a produção de NO, e na fase inicial da infecção e na presença de PMN este bloqueio, associado a níveis reduzidos da citocina pro-inflamatória IL-1 $\beta$  e da quimiocina MCP-1, induz um fenótipo anti-inflamatório, possivelmente para evitar o excesso de resposta inflamatória que advém da colaboração entre PMN e M $\Phi$ . Todavia, o decréscimo drástico do parasitismo macrofágico deverá estar relacionado com outros factores imunológicos que podem ser potenciados pela cooperação dos M $\Phi$  com os PMN e/ou interacção prévia dos PMN com o parasita.

---

No capítulo 4 foi avaliado *in vivo* o papel dos PMN durante o início da infecção experimental por *L. chagasi*, através da imunofenotipagem das populações leucocitárias recrutadas para o local da inoculação dos parasitas, da determinação da presença do parasita e da quantificação da expressão de citocinas em órgãos internos após depleção de PMN. Observou-se que a ausência de PMN, apesar de não influenciar as populações leucocitárias no local de infecção, parece retardar a remoção dos parasitas e afectar a possível migração de leucócitos parasitados para os órgãos internos, nomeadamente para os gânglios cervicais. No entanto, em qualquer das situações há disseminação dos parasitas para os gânglios. A depleção de PMN parece também influenciar o perfil de citocinas induzidas pelo parasita no início da infecção, conduzindo à expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-17). A produção de granzima B juntamente com a inibição de IFN- $\gamma$  numa fase posterior da infecção, é ainda um reflexo possível da ausência inicial de PMN.

Resumindo, na infecção por *L. infantum* os PMN, estão envolvidos no controlo inicial de uma parte dos parasitas, enquanto outros, provavelmente os mais virulentos, conseguem subsistir, reinfectar novas células e passar para as células hospedeiras definitivas, os M $\Phi$  que são recrutados ao local de infecção através do estímulo provocado por quimiocinas. Os M $\Phi$ , por sua vez, expressam o receptor de reconhecimento *toll-like 4* e citocinas pró-inflamatórias associadas à inibição da expressão da IL-1 $\beta$ . Numa fase posterior da infecção, a expressão de TLR-4 mantém-se mas a carga parasitária diminui drasticamente.

Independentemente da presença de PMN no local de infecção, os parasitas são disseminados para os órgãos linfóides, porém, os PMN influenciam a regulação da complexa sinalização de citocinas nestes órgãos.

Este trabalho evidencia o papel crucial dos PMN no desencadear da resposta imunológica na infecção por *L. infantum*, sendo a primeira barreira de controlo contra o parasita através da indução dos mecanismos de imunidade inata, recrutamento e estimulação de outras células, nomeadamente M $\Phi$  e linfócitos.

## ABSTRACT

The present work aimed to deepen the role of neutrophils during the early stages of *L. infantum* infection and to contribute to the elucidation of activation mechanisms of innate and adaptive immunity. The study was planned in accordance with three specific objectives described in Chapters 2, 3 and 4.

Chapter 1 describes the pathogenesis of visceral leishmaniasis, reviewing the host-parasite interaction, focusing on the role of PMN during *Leishmania* infection.

In Chapter 2 the effect of the parasite on neutrophil immune mechanisms is delineated, through the analysis of phagocytosis, oxidative burst, apoptosis, chemotaxis, degranulation and expression of cytokines, chemokines and *toll-like* receptors. The influence of neutrophils on parasite viability and growth was also analyzed. It was found that *Leishmania* induced the activation of some pathways of PMN innate immunity, which includes oxidative and non oxidative mechanisms such as, production of superoxide ion and exocytosis of proteolytic enzymes, NE and CatG. However, the more fit parasites seemed to cause the inhibition of PMN migration and the mechanisms that lead to activation of other leukocyte populations, including the expression of chemokines (MIP-1 $\alpha$ ), cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ ) or toll-like 2 receptor, affecting the natural link between the innate and adaptive immunity.

Chapter 3 dissects the M $\Phi$ -PMN interaction during *in vitro* infection by *L. infantum* through the analysis of phagocytosis capacity, expression of cytokines, chemokines and *toll-like* receptors in M $\Phi$ , and the production of metabolites of nitric oxide. It was found that *L. infantum* induced the activation of immune response through the stimulation of M $\Phi$  TLR-4, modulating the expression of pro-inflammatory chemokines and cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) and anti-inflammatory (TGF- $\beta$ ), boosted by the initial presence of PMN. The parasite also blocks the production of NO in the early phase of infection and in the presence of PMN. This blockade associated to reduced levels of IL-1 $\beta$  and MCP-1, favor an anti-inflammatory macrophage phenotype that may prevent the excessive inflammatory response resulting from the cross talk between PMN and M $\Phi$ . However, the drastic decrease of macrophage parasitism should be related to other immunological factors that can be enhanced by M $\Phi$ -PMN cooperation and/or PMN interaction with the parasite.

Chapter 4 accesses *in vivo* the role of PMN during the early stage of *L. chagasi* experimental infection by immunophenotyping leukocyte populations recruited to the site of parasite

inoculation, determining the presence of the parasite and quantifying cytokine expression in internal organs after PMN depletion. It was observed that absence of PMN, while not influencing the leukocyte population at the site of infection, appeared to slow the removal of parasites, affecting the possible migration of leukocytes to internal organs (cervical lymph nodes). However, in either situation, there is dissemination of parasites to the lymph nodes. PMN depletion also appeared to influence the cytokine profile induced by the parasite during the early phase of infection, leading to the expression of pro and anti-inflammatory cytokines (IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  and IL-17). The production of granzyme B along with the inhibition of IFN- $\gamma$  at a later stage of infection still was a reflect of the initial PMN depletion.

In short, PMN are involved in the initial control of *L. infantum* infection by causing the destruction of some of the parasites. While others, probably the most virulent, can subsist, reinfect new cells and transfer into the definitive host cells, the M $\Phi$  that are recruited to the site of infection through the stimulation caused by chemokines. The M $\Phi$ , in turn, express the recognition receptor *toll-like 4* and pro-inflammatory cytokines associated to inhibition of expression of IL-1 $\beta$ . At a later stage of infection, the expression of TLR-4 remains but the parasite load decreases dramatically. Regardless of the presence of PMN at the site of infection, the parasites are spread to lymphoid organs, however, PMN influence the regulation of the complex cytokine signaling in these organs.

This study highlights the crucial role of PMN in triggering the immune response to *L. infantum* infection, being the first control barrier against the parasite by inducing innate immune mechanisms, recruitment and stimulation of other cells, including lymphocytes and M $\Phi$ .

## OBJECTIVOS

O conjunto de trabalhos que integram esta dissertação teve como objectivo central estudar o papel desempenhado pelos neutrófilos durante a infecção por *L. infantum*, esclarecendo a sua função no desenvolvimento da imunidade inata e adaptativa e aprofundando o conhecimento sobre as alterações imunopatogénicas causadas pelo parasita nos momentos iniciais da infecção.

Os objectivos específicos deste estudo foram os seguintes:

**1. Analisar *in vitro* as interacções que se estabelecem entre neutrófilos e parasitas de *L. infantum***

O efeito do parasita nos mecanismos imunológicos de neutrófilos foi estudado *in vitro* através da análise da actividade fagocítica, respiração oxidativa, apoptose, quimiotaxia, desgranulação e pela expressão de citocinas, quimiocinas e de receptores *toll-like*. A influência dos neutrófilos na viabilidade e no crescimento do parasita foi também avaliada.

**2. Caracterizar *in vitro* as relações funcionais entre neutrófilos e macrófagos durante a infecção com *L. infantum*.**

A capacidade fagocítica, a produção de metabolitos do óxido nítrico e a expressão de citocinas, quimiocinas e receptores *toll-like* em macrófagos foi avaliada na presença de neutrófilos previamente infectados *in vitro* por *L. infantum*.

**3. Avaliar *in vivo* o papel dos neutrófilos durante a fase inicial da infecção por *L. chagasi***

A caracterização da dinâmica e do estado de activação imunológica no local da infecção foi efectuada na presença e ausência de neutrófilos através da imunofenotipagem das populações leucocitárias recrutadas para o local da inoculação dos parasitas e da quantificação da expressão de citocinas e produção de granzima B nos gânglios linfáticos, associada à dispersão do parasita.



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> <i>Representação esquemática da estrutura de <u>Leishmania</u>.</i>	8
<b>Figura 1.2.</b> <i>Esquema representativo do ciclo de vida de <u>Leishmania</u>.</i>	10
<b>Figura 2.1.</b> <i>Isolamento e purificação de neutrófilos (I)</i>	41
<b>Figura 2.2.</b> <i>Isolamento e purificação de neutrófilos (II)</i>	42
<b>Figura 2.3.</b> <i>Sistema de separação de células e de quimiotaxia</i>	45
<b>Figura 2.4.</b> <i>Esquema representativo da apoptose celular</i>	48
<b>Figura 2.5.</b> <i>Géis de agarose com produtos de PCR e produtos da digestão de DNA plasmídico</i>	55
<b>Figure 2.6.</b> <i>Co-culturas de PMN e <u>L. infantum</u> e fagocitose</i>	58
<b>Figura 2.7.</b> <i>Níveis de multiplicação de promastigotas de <u>L. infantum</u> na presença de PMN ou de sobrenadantes de co-culturas de PMN-<u>L. infantum</u></i>	59
<b>Figura 2.8.</b> <i>Migração de PMN na presença e na ausência de <u>L. infantum</u></i>	60
<b>Figure 2.9.</b> <i>Respiração oxidativa e expressão da subunidade gp91phox da NADPH oxidase</i>	62
<b>Figura 2.10.</b> <i>Desgranulação/Actividade enzimática de proteínas dos grânulos primários</i>	64
<b>Figura 2.11.</b> <i>Detecção in situ da apoptose dos PMN na presença de parasitas de <u>L. infantum</u></i>	66
<b>Figura 2.12.</b> <i>Fenotipagem dos PMN apoptóticos na presença e na ausência de parasitas de <u>L. infantum</u></i>	67
<b>Figura 2.13.</b> <i>Expressão de quimiocinas, citocinas e TLR-2 gene</i>	69
<b>Figura 3.1.</b> <i>Isolamento e purificação de neutrófilos e macrófagos</i>	89
<b>Figura 3.2.</b> <i>Ensaio colorométrico para detecção de metabolitos de NO</i>	93
<b>Figura 3.3.</b> <i>Infecção de MΦ com parasitas de <u>L. infantum</u></i>	96
<b>Figure 3.4.</b> <i>Fagocitose de <u>L. infantum</u> por MΦ</i>	97
<b>Figura 3.5.</b> <i>Co-culturas de MΦ e PMN infectados</i>	98
<b>Figura 3.6.</b> <i>Expressão de receptores toll-like</i>	99

---

<b>Figura 3.7.</b> <i>Expressão de citocinas</i>	101
<b>Figura 3.8.</b> <i>Expressão da quimiocina CCL2/MCP-1</i>	103
<b>Figura 3.9.</b> <i>Produção de óxido nítrico</i>	104
<b>Figura 4.1.</b> <i>Infecção intradérmica de parasitas <u>L. chagasi</u></i>	123
<b>Figura 4.2.</b> <i>Sistema de desagregação de amostras biológicas</i>	124
<b>Figura 4.3.</b> <i>Gráfico representativo dot plot SSC (side scatter)/FCS (forward scatter)</i>	126
<b>Figura 4.4.</b> <i>Porcentagem de leucócitos no sangue</i>	133
<b>Figura 4.5.</b> <i>Caracterização imunofenotípica da população leucocitária no local de infecção</i>	136
<b>Figura 4.6.</b> <i>Gânglio cervical aumentado</i>	137
<b>Figura 4.7.</b> <i>Expressão de citocinas</i>	139
<b>Figura 4.8.</b> <i>Produção de granzima B</i>	140
<b>Figura A.</b> <i>Esquema representativo dos principais resultados obtidos nos estudos <i>in vitro</i>.</i>	154
<b>Figura B.</b> <i>Esquema representativo dos principais resultados obtidos nos estudos <i>in vivo</i>.</i>	155

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.1.</b> <i>Patologia, vectores, reservatórios e distribuição geográfica da leishmaniose</i>	5
<b>Tabela 2.1.</b> <i>Sequência de primers forward e reverse de cada gene</i>	51
<b>Tabela 4.1.</b> <i>Anticorpos monoclonais específicos utilizados na imunofenotipagem de leucócitos da pele</i>	125
<b>Tabela 4.2.</b> <i>Detecção de parasitas de <i>L. chagasi</i></i>	134



## LISTA DE ABREVIATURAS

Para a maior parte dos termos, optou-se por manter as abreviaturas em língua inglesa uma vez que são mais facilmente reconhecíveis devido à sua ampla utilização.

**%:** percentagem

**°C:** graus centígrados

**µm:** micrometro, **nm:** nanometro

**Ag:** antigénio solúvel de *L. chagasi*

**BSA:** albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*)

**CatG:** catepsina G

**cDNA:** DNA complementar

**CIE:** contraimunolectroforese

**Cl<sup>-</sup>:** iões cloreto

**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono

**DAPI:** *4',6-diamidino-2-phenylindole*

**DAT:** teste de aglutinação directa

**DEPC:** dietilpirocarbonato

**DI:** grupo depletado e infectado

**DNA:** ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

**DNase:** desoxirribonuclease

**ELISA:** *enzyme linked immunosorbent assay*

**FBS:** soro fetal bovino (*fetal bovine serum*)

**Fig.:** figura

**fMLP:** N-formyl-Met-Leu-Phe

**FW:** *forward*

**GFP:** proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*)

**gp63:** glicoproteína de 63 Kilodalton

**h:** hora, **min:** minutos, **s:** seg

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** ácido sulfúrico

**HCl:** ácido clorídrico

**HClO:** ácido hipocloroso

**HPRT:** *hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*

**i.d.:** intradérmica

**i.p.:** intraperitoneal

**I:** grupo infectado

**IFI:** imunofluorescência indirecta

**IFN:** interferão

**IgG:** imunoglobulinas G

**IL:** interleucina (*interleukin*)

**iNOS :** sintetase indutora de NO (*inducible NO synthetase*)

**IPTG:** isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo

**ISPs:** inibidores das peptidases serínicas (*inhibitors of serine peptidases*)

**KC:** quimiocina derivada de queratinócitos (*keratinocyte-derived chemokine*)

**kDNA:** DNA cinetoplastideal

**Kg:** kilograma, **g:** grama, **mg:** miligrama, **µg:** micrograma, **ng:** nanograma, **pg:** picograma

**l:** litro, **ml:** mililitro, **µl:** microlitro

**LC:** leishmaniose cutânea

**LCan:** leishmaniose canina

**LCD:** leishmaniose cutânea difusa

**LCL:** leishmaniose cutânea localizada

**Leish:** *Leishmania*

**LMC:** leishmaniose mucocutânea

**LPG:** lipofosfoglicano

**LV:** leishmaniose visceral

**LVZ:** leishmaniose visceral zoonótica

**MΦ:** macrófagos

**M:** molar, **mM:** milimolar, **µM:** micromolar

**MCP:** proteína quimiotática de monócitos (*monocyte chemoattractant protein*)

**MIP:** proteína inflamatória de macrófagos (*macrophage inflammatory protein*)

**Mo:** macrófagos

**MPO:** mieloperoxidase

**mRNA:** RNA mensageiro

**NaCl:** cloreto de sódio

**NBT:** *nitroblue tetrazolium*

**NE:** elastase neutrofílica (*neutrophil elastase*)

**NF-κB:** factor de transcrição nuclear

**NK:** células *Natural Killer*

**NLR:** *Nucleotide-binding domain, Leucine-Rich repeat containing*

**NNN:** Novy-Nicolle-McNeal

**NO:** óxido nítrico

**NO<sub>2</sub>:** ião nitrito

**NO<sub>3</sub>:** ião nitrato

**O<sub>2</sub>:** ião superóxido

**OMS/WHO:** Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

**p/v:** peso/volume

**PAMPs:** padrões moleculares de reconhecimento do agente patogénico (*pathogen-associated molecular patterns*)

**pb:** pares de base

**PBMC:** células mononucleares do sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cells*)

**PBS:** tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline*)

**PCR:** reacção da polimerase em cadeia (*polymerase chain reaction*)

**PI:** iodeto de propídio (*propidium iodide*)

**pi:** pós-infecção

**PKDL:** leishmaniose dérmica pós-Kala-azar

**PMA:** acetato de forbol miristato (*phorbol myristate acetate*)

**PMN:** neutrófilos ou células polimorfonucleares (*polymorphonuclear*)

**PRRs:** receptores de padrões de reconhecimento (*pattern-recognition receptors*)

**PS:** fosfadilserina (*phosphatidylserine*)

**REV:** *reverse*

**RNA:** ácido ribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

**RNase:** ribonuclease

**S:** grupo saudável

**SDS:** dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)

**Tc:** linfócitos T citotóxicos

**Th:** linfócitos T *helper*

**TLR:** receptor *toll-like* (*toll-like receptor*)

**TMB:** 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (*tetramethylbenzidine*)

**TNF:** fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*)

**Treg:** linfócitos T reguladores

**U:** unidades

**v/v:** volume/volume

**V:** volt

**VIH/SIDA:** vírus de imunodeficiência humana/síndrome de imunodeficiência adquirida

**vs:** *versus*

**xg:** força centrífuga relativa

**X-Gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactopiranosídeo



# **CAPÍTULO 1**

## **Enquadramento teórico**



## 1.1 Leishmaniose - Noções gerais

As leishmanioses são um grupo de doenças infecto-parasitárias causadas por parasitas protozoários do Género *Leishmania* Ross, 1903. Este protozário inclui-se no sub-filo *Mastigophora* por apresentar flagelo; na ordem *Kinetoplastida* pelo flagelo emergir de uma bolsa flagelar, na base da qual se encontra uma mitocôndria única que possui cromatina muito condensada que depois de corada com corante com afinidade para ácidos nucleicos, é visualizada ao microscópio óptico uma estrutura muito corada denominada cinetoplasto, e na família *Trypanosomatidae*, por apresentar mais de uma forma morfológica durante o ciclo de vida. O parasita é transmitido pela picada de insectos dípteros dos géneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Tomás A & Romão 2008).

Apesar da diversidade epidemiológica e clínica e de possuírem uma distribuição geográfica complexa, as leishmanioses são das doenças transmitidas por vectores mais negligenciadas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO), das 350 milhões de pessoas em risco, 12 milhões de pessoas estão infectadas por *Leishmania*, das quais 41000 acabam por morrer. Por ano, calcula-se a ocorrência de 1.5-2 milhões de novos casos. Este complexo de doenças está geograficamente e ecologicamente distribuída por todos os continentes, com excepção do continente Antártida e Austrália, sendo endémico em 88 países (WHO 2010). O aumento da dispersão da doença é devido a factores relacionados com o desenvolvimento económico-social. Projectos agro-industriais que conduzem indivíduos não imunes de zonas urbanas para áreas rurais endémicas, migrações em geral, planos de urbanização rápidos e indevidamente estruturados ou transformações com impacto ambiental, como a exploração mineira, a desflorestação, a construção de sistemas de irrigação, barragens, poços, ou ainda a limitação de pulverizações com insecticidas destinados a eliminar os mosquitos que transmitem o parasita da malária em áreas onde ambas as doenças coexistem, podem contribuir para a disseminação da leishmaniose (WHO 2010).

Dentro do grupo de hospedeiros naturais incluem-se mamíferos domésticos e uma grande variedade de mamíferos silváticos. A infecção humana é causada por cerca de 21 das 30 espécies de *Leishmania* que infectam os mamíferos através da picada de 80 espécies de vectores de *Leishmania*. No caso do ciclo de transmissão do parasita incluir reservatórios animais, considera-se que a infecção é zoonótica. Mas se a infecção for transmitida de homem a homem designa-se antroponótica.

De acordo com a classificação actual, o género *Leishmania* inclui os dois subgéneros, *Leishmania* e *Viannia*. Actualmente, a electroforese enzimática multilocus é a técnica mais utilizada e universalmente aceite para a caracterização genérica e subgenérica de *Leishmania*. Este tipo de classificação baseia-se na mobilidade electroforética de isoenzimas, requerendo a análise de 8-15 enzimas diferentes, que são separadas em gel de acetato de celulose e formam um padrão específico de acordo com a sua carga iónica (perfil isoenzimático). O conjunto de estirpes com o mesmo perfil isoenzimático é designado de zimodeme (Rioux *et al.* 1990). A tipagem isoenzimática é realizada em centros de referência da OMS.

As manifestações clínicas da doença dependem de inúmeras e complexas interacções entre o parasita e o hospedeiro, nomeadamente a espécie e a virulência do parasita e a resposta imunológica do hospedeiro. Existem três formas clínicas principais: a leishmaniose visceral (LV) ou Kala-azar, a leishmaniose cutânea (LC), localizada (LCL) ou difusa (LCD) e a leishmaniose mucocutânea (LMC). Cada forma clínica é causada por espécies de *Leishmania* próprias. A forma de leishmaniose cutânea (LC), caracterizada pela presença de lesões cutâneas localizadas frequentemente de cura espontânea que podem provocar cicatrizes indeléveis é causada no velho mundo por *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* e no novo mundo por *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi* e *L. peruviana*. A LMC, que ocorre em alguns casos de infecção por *L. braziliensis* e, mais raramente, por *L. panamensis*, é caracterizada pelo aparecimento de lesões secundárias que levam à destruição de cartilagens e mucosas (fossas nasais, palato, faringe, laringe e pavilhões

auditivos) provocando lesões graves, mutilantes e de difícil tratamento (Ashford 2000; WHO 2010).

Espécie	Patologia habitual Patologia rara	Vectores	Reservatórios	Distribuição geográfica
<b>Sub-Gênero Leishmania</b>				
<i>L. infantum</i>	LV LCL, LCD*	<i>Ph. ariasi</i> <i>Ph. perniciosus</i> <i>Ph. chinensis</i>	Canídeos	Região mediterrânea, Balcãs, Médio Oriente, Ásia Central, China
<i>L. donovani</i>	LV LCL, PDKL	<i>Ph. argentipes</i> <i>Ph. martini</i> <i>Ph. orientalis</i> <i>Ph. alexandri</i>	Homem	Índia, Paquistão, China, Quênia, Sudão, Etiópia
<i>L. major</i>	LCL LCD*	<i>Ph. papatasi</i> <i>Ph. duboscqi</i>	Roedores	Norte, Este e Oeste África, próximo e Médio Oriente, Ásia Central
<i>L. tropica</i>	LCL LV	<i>Ph. sergenti</i>	Homem; Canídeos	Médio Oriente, Paquistão, Índia, Região mediterrânea
<i>L. aethiopica</i>	LCL LCD	<i>Ph. longipes</i> <i>Ph. pedifer</i>	Hiraxes	Etiópia e Quênia
<i>L. chagasi/infantum</i>	VL LCL, LCD*	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. evansi</i>	Canídeos	América Central e do Sul
<i>L. mexicana</i>	LCL LCD, LV*	<i>Lu. olmeca olmeca</i>	Roedores; Canídeos	América Central e do Sul
<i>L. amazonensis</i>	LCL LCD, LV*	<i>Lu. flaviscutellata</i>	Roedores Marsupiais	América Central e do Sul
<i>L. venezuelensis</i>	LCL	<i>Lu. rangeliana</i>	Equinos e Felinos	Venezuela
<b>Sub-Gênero Viannia</b>				
<i>L. peruviana</i>	LCL	<i>Lu. peruensis</i> <i>Lu. verrucarum</i>	Canídeos Roedores	Perú
<i>L. lainsoni</i>	LCL	<i>Lu. ubiquitatis</i>	Roedor	Brasil, Perú
<i>L. naiffi</i>	LCL	<i>Lu. ayrozai</i> <i>Lu. paraensis</i>	Desdentados	Brasil
<i>L. shawi</i>	LCL	<i>Lu. whitmani</i>	Primatas e Pergiças	Brasil
<i>L. guyanensis</i>	LCL LMC	<i>Lu. umbratilis</i>	Pergiças; Roedores e Marsupiais	América do Sul
<i>L. panamensis</i>	LCL LMC, LCD*	<i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. prapidoi</i> <i>Lu. gomezi</i>	Pergiças; Primatas, Marsupiais, Roedores, Canídeos	América Central e do Sul
<i>L. braziliensis</i>	LCL, LMC LCD*, LV*	<i>Lu. wellcomei</i>	Canídeos, Equinos e Roedores	América Central e do Sul

**Tabela 1.1.** Patologia, vectores, reservatórios e distribuição geográfica da leishmaniose (WHO, 2010). LV, leishmaniose visceral; LCL, leishmaniose cutânea localizada; LCD, leishmaniose cutânea difusa; LMC, leishmaniose mucocutânea; \* forma clínica associada a imunossupressão.

O complexo *Leishmania donovani* é responsável pela forma visceral da doença (LV). As espécies deste complexo são *L. donovani* e *L. infantum* (Velho Mundo) e *L. chagasi* (Novo Mundo). *L. infantum* e *L. chagasi* são actualmente consideradas uma única espécie de *Leishmania*, não tendo sido encontradas, até ao momento, diferenças imunológicas, moleculares e bioquímicas (Maurício *et al.* 2000; Coelho-Finamore *et al.* 2011).

Para além das formas referidas há ainda a leishmaniose dérmica pós-Kala-azar (PKDL), uma variação da LV que se caracteriza pelo aparecimento de lesões cutâneas após o tratamento do kala-azar (Ashford 2000; WHO 2010). A patologia, principais vectores, reservatórios e distribuição geográfica das leishmanioses encontram-se resumidos na tabela 1.1.

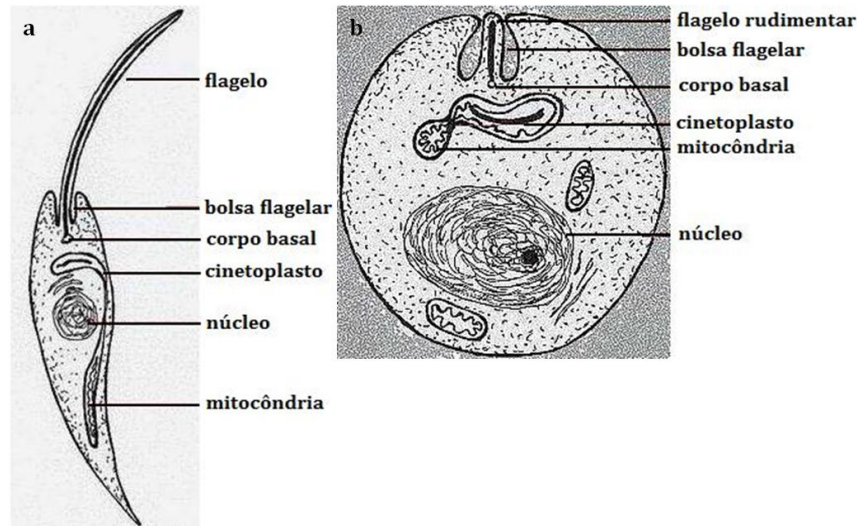
A LV é a forma clínica mais grave e que pode ser fatal quando não tratada. É caracterizada pela febre persistente, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia e anemia. São registados 500 mil novos casos anuais de LV distribuídos pela África Oriental, Índia e China (*L. donovani*) e pelos países do Mediterrâneo, África Central e Ocidental, Médio Oriente, China e América Latina (*L. infantum/L. chagasi*) (WHO 2010). No entanto, é muito provável que a prevalência seja bastante superior, já que em muitos países não é obrigatória a notificação da doença. A LV apresenta distribuição descontínua e está fortemente associada ao subdesenvolvimento e às fracas condições de alojamento e saneamento. Consequentemente, a ausência de diagnóstico ou a existência de casos não assinalados é bastante frequente, sobretudo quando os doentes não têm acesso facilitado a instituições de saúde, quando os meios de diagnóstico são raros ou inadequados, ou quando os medicamentos não são acessíveis. Nas últimas décadas do século XX, o panorama da LV sofreu modificações epidemiológicas devido sobretudo à pandemia do vírus de imunodeficiência humana/síndrome de imunodeficiência adquirida (VIH/SIDA). Casos de co-infecção LV/VIH foram frequentes em 35 países (Cruz *et al.* 2006; WHO, 2010). Em algumas regiões do sudoeste europeu, nomeadamente em países da bacia mediterrânica tais como a Espanha, França, Itália, Grécia e Portugal, a prevalência da leishmaniose sofreu aumentos notórios com a expansão de VIH/SIDA e frequentemente

associado à utilização de drogas endovenosas, promovendo a transmissão antropológica da doença (Cruz *et al.* 2006). Todavia, a LV causada por *L. infantum/chagasi* é considerada uma zoonose (leishmaniose visceral zoonótica, LVZ) em que o cão é o principal reservatório do parasita e o Homem é infectado acidentalmente (Abranches *et al.* 1998). A leishmaniose canina (LCan) é potencialmente fatal para os cães e à semelhança dos restantes países da bacia mediterrânica, é considerado um problema veterinário grave mas também de saúde pública (Campino & Maia 2010). A LCan é uma infecção crónica, com elevada prevalência (segundo Moreno & Alvar 2002, de 16.7% na região mediterrânica), e em que o contacto estreito entre o cão e o Homem facilita a transmissão, já que o parasita pode ser encontrado na pele dos animais infectados, o que ajuda na propagação ao vector (Abranches *et al.* 1998)

### **1.1.1 Morfologia e ciclo de vida de *Leishmania***

Todos os parasitas do género *Leishmania* possuem um ciclo de vida polimórfico e heteroxénico. A forma extracelular, flagelada e móvel do parasita, o promastigota, coloniza o insecto vector e o amastigota, forma intracelular e sem flagelo livre, é encontrada no hospedeiro vertebrado. Quando um flebótomo fêmea infectado realiza uma refeição sanguínea no hospedeiro vertebrado, inocula as formas infectantes do parasita, os promastigotas metacíclicos. São formas fusiformes, livres e móveis, com cerca de 10-20 µm de comprimento e 1.5-3.0 µm de largura. Possuem um flagelo maior que o corpo celular que pode atingir 20µm e que emerge de uma invaginação na parte anterior e que lhes confere uma grande mobilidade. Os promastigotas têm um núcleo central e um cinetoplasto, estrutura que contém uma quantidade importante de DNA (kDNA) (Fig. 1.1a). No hospedeiro, os promastigotas ligam-se a receptores na superfície de células fagocíticas, sendo incorporados pelas células hospedeiras. Uma vez alojados no interior da célula, diferenciam-se rapidamente em amastigotas. Os amastigotas são formas esféricas ou

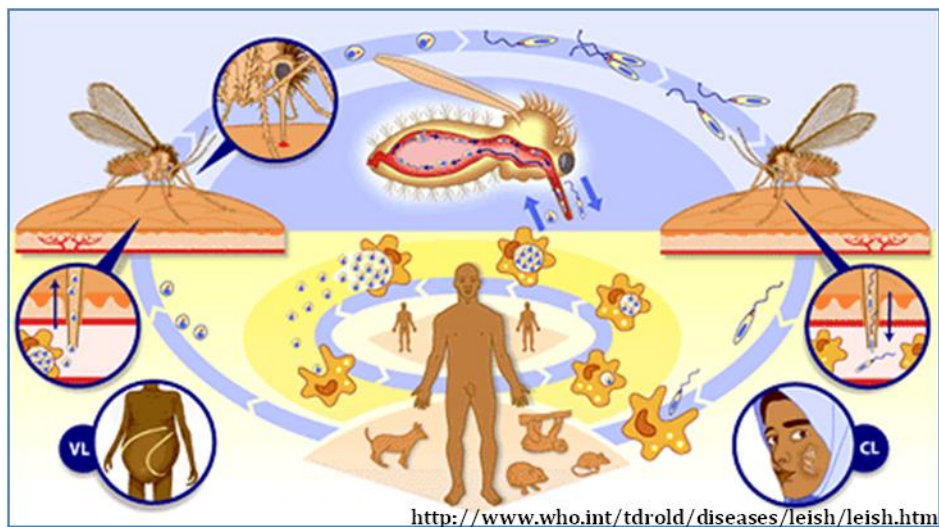
sub-esféricas com 2.5-6.8  $\mu\text{m}$  de diâmetro. O flagelo é rudimentar, mas tal como as formas promastigotas possuem núcleo e cinetoplasto (Tomás A & Romão 2008) (Fig. 1.1b).



**Figura 1.1.** Representação esquemática da estrutura de *Leishmania*. (a) Formas promastigota e (b) amastigota do parasita. Adaptado de <http://ilmioamicocane.blogspot.com/2009/04/leishmaniosi-canina.html>.

Dentro dos fagolisossomas de macrófagos (M $\Phi$ ), que resultam da maturação do fagossoma por acidificação e aquisição de hidrolases lisossomais, os amastigotas multiplicam-se por fissão binária longitudinal e eventualmente provocarão a lise da membrana da célula hospedeira. Ao serem libertados, são novamente fagocitados por outras células fagocíticas, promovendo a sua disseminação. O ciclo completa-se quando os M $\Phi$  infectados são ingeridos pelo vector durante a realização da refeição sanguínea no reservatório infectado. Os amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas e fixam-se no intestino médio do insecto, multiplicando-se logaritmicamente. Os promastigotas procíclicos não infecciosos transformam-se em formas infecciosas metacíclicas de promastigotas que migram para a zona proximal do tubo digestivo (esófago e faringe), prontos a serem introduzidos na pele do hospedeiro através do probóscis. Nas espécies causadoras de lesões cutâneas, a infecção fica limitada à região do local da inoculação ou é disseminada através do sistema linfático para outros locais da derme, mucosas

ou cartilagens, enquanto nas espécies que causam leishmaniose visceral, os macrófagos infectados transportam os parasitas até aos órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocítico, como o baço, fígado, medula óssea e gânglios linfáticos (Tomás A & Romão 2008). O ciclo de vida do parasita está representado na Fig. 1.2.



**Figura 1.2.** Esquema representativo do ciclo de vida de *Leishmania*. Durante a alimentação sanguínea, o insecto vector injecta a forma promastigota metacíclica do parasita no hospedeiro vertebrado. Os promastigotas são fagocitados por células fagocíticas transformam-se em amastigotas. Os amastigotas multiplicam-se no interior das células hospedeiras definitivas (macrófagos). Estas células ao rebentarem permitem que os amastigotas invadam outras células que dependendo em parte das espécies de *Leishmania*, podem ficar localizadas no local de infecção ou transportar o parasita para outros tecidos ou órgãos originando as manifestações clínicas da leishmaniose. O insecto fica parasitado ao ingerir macrófagos infectados com amastigotas durante a alimentação sanguínea no hospedeiro vertebrado. No tubo digestivo do hospedeiro invertebrado, o parasita diferencia-se em promastigota, que se multiplica e migra para o probóscis. O ciclo inicia-se novamente com a introdução dos promastigotas infecciosos no hospedeiro vertebrado pelo vector (<http://www.who.int/tdroid/diseases/leish/leish.htm>).

### **1.1.2 Hospedeiro invertebrado (vector)**

O insecto díptero envolvido no ciclo natural de infecção de *Leishmania* é um hematófago da Família Psychodidae, Sub-Família Phlebotominae. Os flébotomos são insectos relativamente pequenos (2-3 mm), caracterizados por possuírem asas estreitas e erectas, corpo delgado, patas compridas, olhos negros e mandíbulas longas (Killick-Kendrick 1990; Afonso & Alves-Pires 2008) (Fig. 1.3).



**Figura 1.3.** Flébotomo vector da leishmaniose ([http://www.who.int/leishmaniasis/Leishmaniasis\\_vector\\_hr.jpg](http://www.who.int/leishmaniasis/Leishmaniasis_vector_hr.jpg))

Existem três géneros cujas fêmeas se alimentam de sangue de vertebrados, o género *Phlebotomus* que ocorre no Velho Mundo, especialmente em áreas semi-áridas e regiões de savana, enquanto as espécies do Novo Mundo pertencem ao género *Lutzomyia* e encontram-se preferencialmente em zonas de florestas. O género *Sergentomyia* representa espécies no Velho Mundo que se alimentam de répteis. Os principais vectores de *L. infantum* nos três continentes do Velho Mundo, pertencem ao sub-género *Larroussius*, sendo *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* e *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* as principais espécies da Bacia do Mediterrâneo (Killick-Kendrick 1990; Afonso & Alves-Pires 2008) que transmitem este parasita. *P. perniciosus* encontra-se sobretudo em biótipos domésticos, onde se alimenta em humanos, cães e gado. *P.*

*arisi* domina os biótipos silváticos, onde se alimenta de animais silváticos como por exemplo a raposa, mas também de cães e humanos (Pires *et al.* 1991).

As fêmeas depositam os ovos no solo, entre restos de folhas mortas, em tocas de pequenos animais, na casca de árvores velhas, em fendas, em construções abandonadas e lixos. Neste tipo de habitats as larvas encontram as condições ideais de alimentação (matéria orgânica), calor e humidade necessárias ao seu desenvolvimento. Os adultos de ambos os sexos alimentam-se de néctares de plantas, enquanto as fêmeas precisam de uma refeição sanguínea para a maturação dos ovos, sendo por isso as responsáveis pela transmissão do parasita ao hospedeiro vertebrado. Alimentam-se de uma enorme variedade de vertebrados, preferencialmente mamíferos e a picada é normalmente restrita a períodos nocturnos e crepusculares (Killick-Kendrick 1990 Afonso & Alves-Pires 2008). Os flébotomos não podem ser considerados exímios voadores. A sua distância de voo é limitada a uns escassos metros, daí que o hospedeiro vertebrado tenha de invadir ou viver próximo do habitat do vector para ficar infectado com *Leishmania* (Killick-Kendrick 1990).

### **1.1.3 Hospedeiro vertebrado (reservatório)**

Fracção importante das leishmanioses são zoonoses de animais silváticos ou domésticos. O Homem apenas é infectado acidentalmente quando exposto ao ciclo natural de transmissão. Os reservatórios de leishmaniose visceral são, em geral, canídeos (cães, chacais e raposas). Originariamente, a LV era uma zoonose silvática mas em consequência da urbanização e desflorestação e consequentemente da invasão das zonas endémicas pelo Homem acompanhado do cão, tornou-se uma zoonose doméstica e peri-doméstica, tendo o cão como o reservatório doméstico da espécie de *Leishmania* que provoca a LVZ (Garnham, 1965). A doença no cão tem uma evolução crónica que favorece a transmissão ao Homem (Abranches *et al.* 1998).

Nas leishmanioses cutâneas verifica-se uma enorme diversidade de animais reservatórios, que incluem entre outros mamíferos roedores, primatas não humanos e desdentados. Como já foi referido anteriormente existem também casos de leishmanioses antroponóticas em que não se conhece outro reservatório para além do Homem (WHO 2010).

#### **1.1.4 Diagnóstico, tratamento, profilaxia e controlo da LV**

O diagnóstico laboratorial da LV humana e canina faz-se recorrendo à mesma metodologia. Existem três tipos de testes de diagnóstico: parasitológico, molecular e imunológico. Os testes parasitológicos permitem a observação directa (através da observação microscópica de amastigotas em esfregaços/decalques de amostras biológicas) ou cultural, em meio NNN (Novy-MacNeal-Nicolle), Schneider ou outro, dos parasitas dos órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocítico (baço, fígado, medula óssea e gânglios linfáticos). No entanto, estes exames são invasivos e por isso menos recomendados (Srivastava *et al.* 2011), a eficiência depende da experiência do técnico e da carga parasitária no caso da observação directa e, o exame cultural pode ser demorado na obtenção de um resultado conclusivo e ser sujeitos a possíveis contaminações por outros microrganismos que competem com o desenvolvimento do parasita. Métodos baseados em técnicas moleculares, como a reacção da polimerase em cadeia (PCR) e mais recentemente PCR em tempo real (Solano-Gallego *et al.* 2009; Srivastava *et al.* 2011), para detecção de sequências específicas de DNA dos parasitas, por exemplo de genes do kDNA, são cada vez mais utilizados não só no diagnóstico dos casos activos da doença, como também na monitorização da cura parasitológica após o tratamento. No entanto, um resultado negativo da PCR, com a existência de uma suspeita clínica, não é suficiente para descartar uma possível infecção. Diversos testes serológicos para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* são usados para identificar de forma indirecta o contacto do hospedeiro com o parasita, nomeadamente o teste de imunofluorescência indirecta (IFI), a contraimuno-electroforese (CIE),

o teste de aglutinação directa (DAT), ELISA (do inglês *enzyme linked immunosorbent assay*) e o teste imunocromatográfico rK39. Estes testes possuem elevada sensibilidade e especificidade mas apresentam duas limitações, os anticorpos específicos permanecem detectáveis após vários anos de cura parasitológica e uma parte de indivíduos e cães de áreas endémicas sem historial de LV possuem anticorpos anti-*Leishmania*, havendo para além disso a possibilidade de reactividade cruzada com outros parasitas. Assim, a OMS recomenda que os testes serológicos sejam sempre realizados em combinação com outros exames clínicos e parasitológicos (WHO 2010).

Nos últimos 70 anos, os compostos de primeira linha no tratamento da LV foram os antimoniais pentavalentes que bloqueiam a formação de TGP e ATP e inibem a fosfofrutoquinase e a piruvato desidrogenase. No entanto, a duração do tratamento, a toxicidade associada a efeitos secundários graves e o aparecimento de resistência (Meireles 2008; Miró *et al.* 2008; Moore & Lockwood 2010) levaram ao uso de fármacos de segunda linha, como a anfotericina B, que é um anti-fúngico que actua no ergosterol, causando a permeabilidade da membrana celular da *Leishmania*, e a pentamidina que inibe a replicação e transcrição ao nível mitocondrial. Nas últimas décadas foram aprovados para o tratamento da LV formulações lipídicas de anfotericina B, miltefosina, um composto anti-tumoral que é tóxico para ambas as formas morfológicas de *Leishmania* e a paramomicina, um antibiótico que inibe a síntese proteica e altera as propriedades da membrana celular. O tratamento da LCan pode também incluir o fármaco alopurinol, que interfere com a síntese proteica do parasita (Meireles 2008; Miró *et al.* 2008).

As medidas profiláticas e de controlo da LV visam principalmente a interrupção do ciclo biológico do parasita. Porém, o carácter zoonótico da LVZ e a manutenção do ciclo biológico em hospedeiros silvestres dificultam a adopção de medidas de controlo eficazes (Meireles 2008). O controlo do vector pode ser realizado pela aplicação de inseticidas piretrinóides, electrocutores, redes mosquiteiras e plantação de plantas que actuem como insecticidas naturais (buganvílias, limonete e rícino) no ambiente doméstico e peridoméstico. No que se refere à LCan, o uso de

coleiras repelentes impregnadas com deltametrina no cão, pode reduzir esta fonte de infecção para o vector e conseqüentemente a transmissão entre o mesmo e o homem. Todavia, a pesquisa para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a LCan pode ser a melhor alternativa para o controlo da LV. Contudo, o desenvolvimento de vacinas eficientes tem-se revelado uma tarefa árdua e complexa embora considerada uma solução real e importante (Reis *et al.* 2010). Apenas no Brasil há duas vacinas para a LCan: Leishmune® baseada no antigénio gp63 de *L. donovani*, que mostrou uma eficácia de 80% e Leishtec® constituída pela proteína recombinante A2, específica da forma amastigota. Porém, os resultados dos estudos não contemplam a observação da infecciosidade dos vectores e da população humana após interacção com cães vacinados. Uma terceira vacina, desenvolvida em França, baseada em fracções proteicas purificadas (antigénio de moléculas excretadas purificado de sobrenadantes de culturas de promastigotas de *L. infantum*) mostrou uma boa protecção na prevenção da infecção natural (Lemesre *et al.* 2007; Bourdoiseau *et al.* 2009). Outra alternativa no desenvolvimento de vacinas contra a LCan, é o uso de vacinas de DNA e os estudos têm sido promissores conferindo alguma protecção (Rafati *et al.* 2005; Ramos *et al.* 2008, 2009).

### **1.1.5 Modelo roedor**

No modelo animal experimental pretende-se desencadear uma infecção semelhante à infecção natural, permitindo efectuar estudos de imunopatogenia e de eficácia de novos fármacos ou potenciais vacinas. Em teoria pretende-se executar experiências controladas em modelos animais para que os resultados obtidos possam ser extrapolados para humanos/cães. De facto, os modelos animais experimentais têm-se revelado indispensáveis, porém não representam exactamente a infecção natural, pelo os resultados têm que se interpretados e aplicados à infecção natural com muita cautela. Os modelos roedores oferecem inúmeras vantagens em relação aos modelos caninos uma vez que o custo de manutenção destes animais é relativamente

inferior, são mais fáceis de manter e manusear e levantam menos problemas éticos. O cão tem sido o modelo experimental mais utilizado, sobretudo para infecções por *L. infantum* pois trata-se do principal reservatório do parasita. Devido às dificuldades, nomeadamente económicas, de acomodação e manipulação destes animais, tem-se optado pelo uso alternativo do modelo roedor. Os hamsters (*Mesocricetus auratus*) têm sido utilizados igualmente para o estudo da LV, pois possuem características parasitológicas, imunológicas e histopatológicas mais parecidas às observadas na infecção natural humana (Perez *et al.* 2006; Nieto *et al.* 2011). O modelo murino *Mus musculus* é bastante utilizado em estudos de espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose cutânea e visceral, contribuindo para um maior conhecimento dos mecanismos de evasão desencadeados pelo parasita e do tipo de resposta imunitária exibida por hospedeiros resistentes e susceptíveis, informações que são importantes para o desenvolvimento de vacinas e novos agentes terapêuticas (Garg & Dube 2006; Nieto *et al.* 2011).

## **1.2 Neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares (PMN)**

Desde a sua primeira observação e descrição na passagem do século XIX para o século XX pelos prémios Nobel, Paul Ehrlich e Elie Metchnikoff, os PMN são considerados células importantes do sistema imunitário. No entanto, o seu papel na plasticidade e regulação da resposta imunitária têm sido subestimado, sendo consideradas apenas como células efectoras capazes de fagocitar agentes patogénicos. Estas células multilobadas com cerca de 12-15µm de diâmetro são as mais abundantes do sistema imunitário e são a primeira linha de defesa contra a invasão de microrganismos. A maturação dos PMN (granulopoiese) envolve seis fases morfológicas distintas: mieloblasto, promieloblasto, mielócito, metamielócito, PMN não segmentado e PMN segmentado (Kobayashi *et al.* 2005; Dockrell *et al.* 2007). Estas células apresentam um tempo de vida relativamente curto (6-8h para PMN humanos) quando atingem a circulação sanguínea. O

recrutamento e mobilização dos PMN da medula para a circulação sanguínea e da circulação sanguínea para os locais de infecção depende de factores quimiotáticos (quimiocinas) libertados por outras células (macrófagos, mastócitos, células epiteliais, queratinócitos, fibroblastos ou ainda outros PMN) ou moléculas libertadas ou que fazem parte da estrutura do microrganismo infectante (Nathan 2006). A adesão e transmigração dos PMN através dos vasos sanguíneos é também dependente da interacção dos PMN com células endoteliais através de uma família de glicoproteínas transmembranares do tipo C (selectinas) e respectivos receptores (Zarbock & Ley 2008; Woodfin *et al.* 2010). Nos tecidos, os PMN ingerem rapidamente os microrganismos extracelulares através de mecanismos dependentes da opsonização. Estes mecanismos envolvem o reconhecimento de microrganismos através de receptores celulares opsonizados com proteínas do complemento e/ou anticorpos ou pelo reconhecimento directo de padrões moleculares de reconhecimento do agente patogénico (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*). Os PAMPs são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs, do inglês *pattern-recognition receptors*), tais como os receptores *toll-like* (TLR), os receptores *NOD-like* (NLR, do inglês *Nucleotide-binding domain, Leucine-Rich repeat containing*) (Kobayashi *et al.* 2005; Nathan 2006; Cascão *et al.* 2009; Ekman & Cardell 2010) ou ainda os receptores CLR (do inglês *C-type lectin receptors*). A ligação através destes receptores permite a activação de cascatas de sinalização que contribuem para a fagocitose de agentes invasores e produção de moléculas imunomodulatórias, tais como citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40, etc.) e anti-inflamatórias (TGF- $\beta$  e IL-10 etc.), quimiocinas (CXCL1, CXCL2, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4 etc.) e outros mediadores moleculares que regulam a migração e activação dos PMN e de outras células (macrófagos, células dendríticas e linfócitos), fazendo a ligação entre o sistema imunológico inato e adaptativo, mas também podendo ter um efeito citotóxico directo sobre os microrganismos (Scapini *et al.* 2000; Lapinet *et al.* 2000; Denkers *et al.* 2003; Sukhumavasi *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2009). No interior dos PMN, os microrganismos podem ser destruídos através da actividade de espécies reactivas de oxigénio,

num processo denominado de respiração oxidativa. A activação da enzima NADPH conduz à produção de ião superóxido, que por dismutação dá origem a peróxido de hidrogénio, e outras espécies reactivas de oxigénio (ácido hipocloroso, radicais hidroxilo e singleto de oxigénio) e espécies reactivas secundárias (cloraminas) que são potentes moléculas microbidas (Nauseef, 2007). Mecanismos microbidas não oxidativos despoletados pela fagocitose incluem a endocitose e exocitose (desgranulação) do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos (primários, secundários e terciários) que contêm inúmeros péptidos anti-microbianos e enzimas proteolíticas, tais como  $\alpha$ -defensinas, catepsina G, proteinase-3, elastase, lisozima, fosfatase alcalina, lactoferrina e gelatinase entre outras (Nathan 2006; Borregaard *et al.* 2007; Cascão *et al.* 2009). Algumas das moléculas granulares exocitadas pelos PMN, nomeadamente a elastase, juntamente com cromatina e histonas são parte estruturante de formações extracelulares dos PMN, as NETs (NET's, do inglês *neutrophil extracellular traps*). Estas estruturas, que dependem da libertação de espécies reactivas de oxigénio resultam da actividade das enzimas NADPH oxidase e mieloperoxidase (Fuchs *et al.* 2007; Ermert *et al.* 2009; Patel *et al.* 2010), são um mecanismo alternativo de morte celular com comprovada actividade microbida (Papayannopoulos & Zychlinsky 2009; Urban *et al.* 2009). É também aceite que a resolução da inflamação é processada mediante o reconhecimento por parte dos M $\Phi$  de PMN apoptóticos, sendo este processo altamente regulado por factores intrínsecos (citocinas), mas também por factores derivados dos agentes patogénicos que podem prolongar o tempo de vida dos PMN (Cabrini *et al.* 2010; Fox *et al.* 2010; Witko-Sarsat *et al.* 2011).

### 1.3 Leishmaniose – Resposta imunológica

A infecção por *Leishmania* desencadeia no hospedeiro vertebrado uma resposta humoral que não é protectora e uma resposta celular que pode controlar a infecção evitando o estabelecimento da doença. A resolução da infecção por *Leishmania* está associada à actividade leishmanicida de espécies reactivas de oxigénio e óxido nítrico (NO). O NO é produzido nos macrófagos a partir do metabolismo da L-arginina, numa reacção catalisada pela enzima indutora da sintetase de NO (iNOS, do inglês *inducible NO synthetase*). Citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  estimulam a expressão de iNOS enquanto IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  inibem a sua expressão, tornando a célula refractária à actividade microbicida (Wilson *et al.* 2005; Tripathi *et al.* 2007; Liese *et al.* 2008; Goto & Prianti 2009).

O reconhecimento inicial do parasita pode ser feito via PPRs, nomeadamente via TLRs (Becker *et al.* 2003; de Veer *et al.* 2003; Flandin *et al.* 2006; Kropf *et al.* 2004a, 2004b; Whitaker *et al.* 2008; Kavosi *et al.* 2009 Silvestre *et al.* 2009) e o controlo inicial da infecção pode também ser modulado por outras células do sistema imunológico inato tais como células hospedeiras intermediárias (neutrófilos e células dendríticas) ou as células *Natural Killer* (NK) (Liese *et al.* 2008; Soong 2008; Charmoy *et al.* 2010a, 2010b; Manna *et al.* 2010 Remer *et al.* 2010).

A apresentação antigénica da parasita efectuada pelos M $\Phi$  e células dendríticas conduz à activação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> importantes no desenvolvimento de resposta imunológica protectora, no estabelecimento da imunidade duradoura que envolve a activação de linfócitos T efectores e de memória (Liese *et al.* 2008). A maior parte dos estudos efectuados para dissecar a resposta imunológica à infecção por *Leishmania* foi realizada no modelo murino de infecção por *L. major*. Este modelo de infecção permitiu definir o paradigma Th1/Th2 de resistência/susceptibilidade. A resistência e cura estão associadas à activação e diferenciação selectiva das células T CD4<sup>+</sup> *helper* 1 (Th1) que produzem citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12. Enquanto nos animais susceptíveis ocorre a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup>

*helper 2* (Th2) que produzem citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5 e IL-13 (Locksley e Scott, 1991; Sacks *et al.* 2002).

Na infecção visceral, a imunidade protectora está também relacionada com a resposta Th1 associada à activação dos mecanismos leishmanicidas dos MΦ por a IL-12 e IFN- $\gamma$  e à formação de granulomas em tecidos infectados. No entanto, a dicotomia do perfil de resposta imunológica Th1 e Th2 verificado para a infecção com *L. major*, não é tão evidente em modelos murinos de LV (Rosa *et al.* 2006; Rolão *et al.* 2007; Ettinger & Wilson 2008). Na LV murina, a resposta Th1, é reprimida pela produção de citocinas imunossupressoras como a IL-10 e TGF- $\beta$  (Wilson *et al.* 2005; Tripathi *et al.* 2007). *L. chagasi* afecta directamente o ambiente no local de infecção através da activação de TGF- $\beta$  latente e ambas as espécies, *L. chagasi* e *L. donovani*, suprimem a resposta dos MΦ ao IFN- $\gamma$  (McMahon-Pratt & Alexander 2004). Níveis elevados de IL-10 e TGF- $\beta$ , associados à imunossupressão foram já descritos para as formas humanas, mas também murinas da LVZ (Caldas *et al.* 2005; Gomes-Pereira *et al.* 2004). Assim, o fenótipo de susceptibilidade à LV murina parece estar mais relacionado com a incapacidade de desenvolvimento de uma resposta Th1 efectiva do que do predomínio de uma resposta Th2 uma vez que a citocina IL-4 do tipo 2 não parece ser suficiente para influenciar a resposta Th1, nem o curso da infecção por *L. donovani* em murganhos BALB/c, ao contrário do observado pela acção da IL-10 (Miralles *et al.* 1994). Linfócitos T reguladores (Treg) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, envolvidos na supressão da imunidade e controlo da resposta efectora excessiva causada pelo parasita, parecem ser a fonte da produção de IL-10 e TGF- $\beta$ . Recentemente, a importância desta subpopulação durante a infecção experimental de murganhos BALB/c com *L. infantum* foi descrita pelo nosso grupo (Rodrigues *et al.* 2009).

A activação via IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  ou a desactivação (IL-10 e TGF- $\beta$ ) da resposta efectora na infecção por *L. donovani* e *L. infantum/chagasi* é específica e localizada, ocorrendo sobretudo nos órgãos linfóides, (Wilson *et al.* 2005; Tripathi *et al.* 2007). Dependendo do órgão afectado e da resposta imunitária predominante o nível de multiplicação parasitária é diferencial. Aparentemente, o

fígado parece ser o local inicial de expansão do parasita e o baço funciona como local de abrigo onde o parasita pode persistir. (Wilson *et al.* 2005; Tripathi *et al.* 2007).

Nos últimos tempos, com a descoberta de mais uma subpopulação de linfócitos pró T *helper* (Th17), têm surgido os primeiros estudos, ainda que preliminares, da função destas células na infecção por *Leishmania*. Estas células pró-inflamatórias produtoras de IL-17, são importantes no recrutamento, migração e activação de neutrófilos, porém o conhecimento do seu papel na protecção ou exacerbação da leishmaniose ainda é embrionário. Ainda assim, o papel protector das citocinas pró-inflamatórias IL-17 e IL-22, produzidas por células Th17 e NK foi observado durante a infecção causada por *L. donovani* em humanos (Pitta *et al.* 2009).

No cão, a resposta imunológica à infecção por *L. infantum* tem sido avaliada através de RT-PCR semi-quantitativo e mais recentemente, por quantificação absoluta da expressão de citocinas por PCR em tempo real. No entanto, a grande variabilidade de tecidos utilizados (células mononucleares do sangue periférico (PBMC), medula óssea, gânglios linfáticos, baço e fígado), a variedade de raças caninas utilizadas em infecções naturais ou experimentais e finalmente, a estirpe de *Leishmania* envolvida na infecção, impõem algumas cautelas na interpretação dos resultados. Todavia a resistência de cães assintomáticos à infecção por *L. infantum* parece estar relacionada com as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-12 e activação dos M $\Phi$  para a destruição de amastigotas intracelulares via NO (Pinelli *et al.* 1994, 1999, 2000; Panaro *et al.* 2001; Santos-Gomes *et al.* 2002). Enquanto que em cães sintomáticos observa-se um padrão de citocinas misto, com expressão de IFN- $\gamma$  e IL-2 mas também das citocinas IL-10, IL-4 e IL-13 (Pinelli *et al.* 1999; Santos-Gomes *et al.* 2002; Sanchez-Robert *et al.* 2008), sendo estas últimas citocinas provavelmente as responsáveis pela patologia sintomática. No entanto, fenótipos mistos já foram verificados em outros estudos para animais assintomáticos (Chamizo *et al.* 2005; Panaro *et al.* 2009; Barbosa *et al.* 2011).

Uma das subpopulações envolvidas na resistência à LCan é a de linfócitos CD8+, uma vez que foram detectadas em cães assintomáticos, mas não em cães sintomáticos infectados

naturalmente com *L. infantum*, sugerindo a lise de MΦ infectados por linfócitos T citotóxicos. Recentemente, um estudo desenvolvido por elementos da UEI de Leishmanioses mostrou a importância da subpopulação de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> no controlo de infecções latentes e a sua possível função na resposta imunitária durante a LCan (Alexandre-Pires *et al.* 2010).

Estudos sobre a resposta humoral canina mostraram um aumento dos níveis das imunoglobulinas do tipo G2a (IgG2a) específicos do parasita em cães assintomáticos e resistentes à infecção. Já um aumento dos níveis de produção de imunoglobulinas do tipo G1 (IgG1) foi relacionado com o aparecimento de sintomas clínicos em animais infectados (Deplazes *et al.* 1995; Nieto *et al.* 1999; Leandro *et al.* 2001).

As características genéticas de cada animal/raça, bem como a virulência de cada estirpe de *L. infantum* são também factores-chave para um conhecimento mais profundo da regulação imunitária do cão perante esta parasitose (Baptista-Fernandes *et al.* 2007; Santos-Gomes *et al.* 2008)

### **1.3.1 Interacção PMN-Leishmania**

Durante muito tempo foi assumido que a infecção por *Leishmania* era iniciada pela fagocitose de MΦ e células dendríticas residentes na pele (Locksley *et al.* 1988; Leon *et al.* 2007). Apesar de já no passado se ter verificado a fagocitose de parasitas de *Leishmania* por PMN (Grimaldi *et al.* 1984; Pimenta *et al.* 1987; Wilson *et al.* 1987; Laurenti *et al.* 1996; Santos-Gomes *et al.* 2000), só recentemente essa visão foi alterada e os PMN são agora apresentandos como células preponderantes na infecção com *Leishmania*, com um papel relevante na imunidade do hospedeiro quer na protecção, quer na exacerbação da patologia. Imagens reais *in vivo* da infecção por *L. major* através da picada de flebótomos em murganhos C57BL/6, permitiu observar o rápido recrutamento dos PMN e uma eficiente captura dos parasitas. No entanto, estes PMN não destroem os parasitas mas ao morrerem libertam-nos para que sejam fagocitados

pelas células hospedeiras definitivas, os MΦ/monócitos que entretanto chegam ao local da infecção (Peters *et al.* 2008, 2009). Paralelamente Laskay e os seus colegas proporam um modelo um pouco diferente. De acordo com os seus resultados, PMN apoptóticos humanos contendo parasitas intactos de *L. major* são fagocitados pelos MΦ de um modo silencioso (modelo do “cavalo de tróia”) prevenindo a activação imunológica dos MΦ e facilitando a entrada do parasita na célula hospedeira definitiva (Laskay *et al.* 2003; van Zandbergen *et al.* 2004; Laskay *et al.* 2008). O parasita pode também induzir ao aumento do tempo de vida dos PMN, inibindo a sua apoptose espontânea, e assim providenciar um nicho de sobrevivência até que os MΦ cheguem aos locais de infecção (Aga *et al.* 2002; van Zandbergen *et al.* 2004). Ainda assim, alguns estudos sugerem um papel protector por parte dos PMN na infecção por *Leishmania* já que na infecção experimental visceral, murganhos BALB/c depletados de PMN desenvolveram uma resposta imunológica do tipo Th2 durante a infecção por *L. donovani* (MacFarlane *et al.* 2008), tiveram ao aumento da carga parasitária no baço durante a fase aguda da infecção por *L. infantum* (Rousseau *et al.* 2001) e a remoção de promastigotas extracelulares no local da infecção foi abrandada (Thalhofer *et al.* 2011), sugerindo que os PMN favorecem o controlo inicial da leishmaniose visceral. No entanto, foi também verificada uma incapacidade dos PMN de destruir parasitas em cães infectados com *L. infantum* (Brandonisio *et al.* 1996) e em 2008, Gueirad e os seus colegas, mostraram que uma proporção de parasitas de *L. donovani* era capaz de sobreviver no interior dos PMN em compartimentos não líticos dos fagossomas dependentes do retículo endoplasmático, enquanto os parasitas aparentemente degradados eram direccionados para compartimentos dependentes do lisossoma, com elevada actividade lítica. Os parasitas presentes nos compartimentos não líticos apresentavam um fenótipo de maior virulência pela presença de lipofosfoglicano (LPG), uma das moléculas mais expressas durante a diferenciação de parasitas metacíclicos (Gueirard *et al.* 2008).

A descoberta recente das NETs permitiu relacionar estas estruturas contendo elastase, com a morte extracelular de promastigotas de *L. amazonensis* (Guimarães-Costa *et al.* 2009),

apontando para mais um mecanismo de defesa dos PMN que, juntamente com a capacidade destas células expressarem TLRs e produzirem ou influenciarem a produção de mediadores anti e pró-inflamatórios, citocinas, quimiocinas por outras células durante a infecção por *Leishmania* (Chen *et al.* 2005; Charmoy *et al.* 2007; Novais *et al.* 2009; de Souza Carmo *et al.* 2010), com certeza terão um impacto no desenvolvimento da resposta imune. Contudo, a grande diversidade de hospedeiros, de espécies e estirpes de *Leishmania*, assim como de diferentes vias e quantidade de inóculo utilizados na infecção experimental, ainda não possibilitaram esclarecer totalmente o papel dos PMN no controlo ou progressão da doença.

#### 1.4 Referências bibliográficas

**Abranches P**, Campino L, Santos-Gomes GM. 1998. Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis. *Acta Med Port.* 11: 871-875.

**Afonso & Alves-Pires.** 2008. Bioecologia dos vectores. In *Leishmaniose canina*. Ed. Chaves Ferreira Publicações. 1ª. Edição. Lisboa. Portugal. 27-40.

**Aga E**, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Müller K, Solbach W, Laskay T. 2002. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol.* 169: 898-905.

**Alexandre-Pires G**, de Brito MT, Algueró C, Martins C, Rodrigues OR, da Fonseca IP, Santos-Gomes G. 2010. Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 137: 275-283.

**Ashford RW.** The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. 2000. *Int J Parasitol.* 30: 1269-1281.

**Baptista-Fernandes T**, Marques C, Roos Rodrigues O, Santos-Gomes GM. 2007. Intra-specific variability of virulence in *Leishmania infantum* zymodeme MON-1 strains. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 30: 41-53.

- Barbosa MAG**, Alexandre-Pires G, Soares-Clemente M, Marques C, Roos Rodrigues O, Villa De Brito T, Pereira Da Fonseca I, Alves LC, Santos-Gomes GM. 2011. Cytokine gene expression in the tissues of dogs infected by *Leishmania infantum*. *Journal of Comparative Pathology* (*in press*).
- Becker I**, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N, González A, Maldonado C, Isibasi A. 2003. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol*. 130: 65-74.
- Borregaard N**, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K. 2007. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol*. 28: 340-345.
- Bourdoiseau G**, Hugnet C, Gonçalves RB, Vézilier F, Petit-Didier E, Papierok G, Lemesre JL. 2009. Effective humoral and cellular immunoprotective responses in Li ESAP-MDP vaccinated protected dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 128: 71-78.
- Brandonisio O**, Panunzio M, Faliero SM, Ceci L, Fasanella A, Puccini V. 1996. Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 53: 95-103.
- Cabrini M**, Nahmod K, Geffner J. 2010. New insights into the mechanisms controlling neutrophil survival. *Curr Opin Hematol*. 17: 31-35.
- Caldas A**, Favali C, Aquino D, Vinhas V, van Weyenbergh J, Brodskyn C, Costa J, Barral-Netto M, Barral A. 2005. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis*. 5: 113.
- Campino L**, Maia C. 2010. Epidemiologia das Leishmanioses em Portugal. *Acta Med Port*. 23: 859-864.
- Cascão R**, Rosário HS, Fonseca JE. 2009. Neutrophils: warriors and commanders in immune mediated inflammatory diseases. *Acta Reumatol Port*. 34: 313-326.
- Chamizo C**, Moreno J, Alvar J. 2005. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 103: 67-75.
- Charmoy M**, Auderset F, Allenbach C, Tacchini-Cottier F. 2010a. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *J Biomed Biotechnol*. 2010: Article ID 719361. 8pp. pages.
- Charmoy M**, Brunner-Agten S, Aebischer D, Auderset F, Launois P, Milon G, Proudfoot AE, Tacchini-Cottier F. 2010b. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog* 6: e1000755.

**Charmoy M**, Megnekou R, Allenbach C, Zweifel C, Perez C, Monnat K, Breton M, Ronet C, Launois P, Tacchini-Cottier F. 2007. *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *J Leukoc Biol.* 82: 288-299.

**Chen L**, Zhang ZH, Watanabe T, Yamashita T, Kobayakawa T, Kaneko A, Fujiwara H, Sendo F. 2005. The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. *Parasitol Int.* 54: 109-118.

**Coelho-Finamore JM**, Freitas VC, Assis RR, Melo MN, Novozhilova N, Secundino NF, Pimenta PF, Turco SJ, Soares RP. 2011. *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. *Int J Parasitol.* 41: 333-342.

**Cruz I**, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J. 2006. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res.* 123: 357-388.

**de Souza Carmo EV**, Katz S, Barbiéri CL. 2010. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. *PLoS One.* 5: e13815.

**de Veer MJ**, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, Handman E, Schofield L. 2003. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol.* 33: 2822-2831.

**Denkers EY**, Del Rio L, Bennouna S. 2003. Neutrophil production of IL-12 and other cytokines during microbial infection. *Chem Immunol Allergy.* 83: 95-114.

**Deplazes P**, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J. 1995. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 17: 451-458.

**Dockrell D**, McGrath E, Whyte M, Sabroe I. 2007. The Neutrophil. In *Immunology of Fungal Infections*. Publisher Springer . 1<sup>st</sup> Edition. Dordrecht. Netherlands. 51-73.

**Ekman AK**, Cardell LO. 2010. The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology.* 130: 55-63.

**Ermert D**, Urban CF, Laube B, Goosmann C, Zychlinsky A, Brinkmann V. 2009. Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *J Innate Immun.* 1: 181-193.

**Ettinger NA**, Wilson ME. 2008. Macrophage and T-cell gene expression in a model of early infection with the protozoan *Leishmania chagasi*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2: e252.

**Flandin JF**, Chano F, Descoteaux A. 2006. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *Eur J Immunol.* 36: 411-420.

**Fox S**, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. 2010. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun.* 2: 216-227.

**Fuchs TA**, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 176: 231-241.

**Garg R**, Dube A. 2006. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 123: 439-54.

**Garnham PC**. 1965. The Leishmanias, with special reference to the role of animal reservoirs. *Am Zool.* 5: 141-151.

**Gomes-Pereira S**, Rodrigues OR, Rolão N, Almeida PD, Santos-Gomes GM. 2004. Hepatic cellular immune responses in mice with "cure" and "non-cure" phenotype to *Leishmania infantum* infection: importance of CD8+ T cells and TGF-beta production. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 41: 59-68.

**Goto H**, Prianti MG. 2009. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis.

**Grimaldi G Jr**, Soares MJ, Moriearty PL. 1984. Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 6: 397-408.

**Gueirard P**, Laplante A, Rondeau C, Milon G, Desjardins M. 2008. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cell Microbiol.* 10: 100-111.

**Guimarães-Costa AB**, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceição-Silva F, Saraiva EM. 2009. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 6748-6753.

**Kavoosi G**, Ardestani SK, Kariminia A. 2009. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). *Parasitology.* 136: 1193-1199.

**Killick-Kendrick R**. 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol.* 4: 1-24. Review.

**Kobayashi SD**, Voyich JM, Burlak C, DeLeo FR. 2005. Neutrophils in the innate immune response. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 53: 505-517.

**Kropf P**, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazzi S, Galanos C, Smith DF, Müller I. 2004a. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun*. 72: 1920-1928.

**Kropf P**, Freudenberg N, Kalis C, Modolell M, Herath S, Galanos C, Freudenberg M, Müller I. 2004b. Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNcr mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication. *J Leukoc Biol*. 76: 48-57.

**Lapinet JA**, Scapini P, Calzetti F, Pérez O, Cassatella MA. 2000. Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. *Infect Immun*. 68: 6917-6923.

**Laskay T**, van Zandbergen G, Solbach W. 2003. Neutrophil granulocytes-Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol*. 11: 210-214.

**Laskay T**, van Zandbergen G, Solbach W. 2008. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology*. 213: 183-191.

**Laurenti MD**, Corbett CE, Sotto MN, Sinhorini IL, Goto H. 1996. The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host-parasite interaction in hamsters inoculated with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Int J Exp Pathol*. 77: 15-24.

**Leandro C**, Santos-Gomes GM, Campino L, Romão P, Cortes S, Rolão N, Gomes-Pereira S, Riça Capela MJ, Abranches P. 2001. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 79: 273-284.

**Lemesre JL**, Holzmuller P, Gonçalves RB, Bourdoiseau G, Hugnet C, Cavaleyra M, Papierok G. 2007. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine*. 25: 4223-4234.

**Leon B**, Lopez-Bravo M, Ardavin C. 2007. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity*. 26: 519-531.

**Liese J**, Schleicher U, Bogdan C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. 2008. *Immunobiology*. 213: 377-387.

**Locksley RM**, Heinzl FP, Fankhauser JE, Nelson CS, Sadick MD. 1988. Cutaneous host defense in leishmaniasis: interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote. *Infect Immun.* 56: 336-342.

**Locksley RM**, Scott P. 1991. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. *Immunol Today.* 12(3):A58-61.

**Manna PP**, Chakrabarti G, Bandyopadhyay S. 2010. Innate immune defense in visceral leishmaniasis: cytokine mediated protective role by allogeneic effector cell. *Vaccine.* 28: 803-810.

**Maurício IL**, Stothard JR, Miles MA. 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today.* 16: 188-189.

**McFarlane E**, Perez C, Charmoy M, Allenbach C, Carter KC, Alexander J, Tacchini-Cottier F. 2008. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun.* 76: 532-541.

**McMahon-Pratt D**, Alexander J. 2004. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol Rev.* 201: 206-224.

**Meireles J**. 2008. Terapêutica e Profilaxia da Leishmaniose canina. In *Leishmaniose canina*. Ed. Chaves Ferreira Publicações. 1ª. Edição Lisboa Portugal. 93-103.

**Miralles GD**, Stoeckle MY, McDermott DF, Finkelman FD, Murray HW. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun.* 1994 62:1058-1063.

**Miró G**, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. 2008. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.* 24: 371-377.

**Moore EM**, Lockwood DN. 2010. Treatment of visceral leishmaniasis. *J Glob Infect Dis.* 2: 151-158.

**Moreno J**, Alvar J. 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 18: 399-405.

**Nathan C**. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. 2006. *Nat Rev Immunol.* 6: 173-182.

**Nauseef W**. 2007. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological Reviews.* 219: 88-102.

**Nieto A**, Dominguez-Bernal G, Orden JA, De La Fuente R, Madrid-Elena N, Carrion J. 2011. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniosis: BALB/c mouse versus Syrian hamster model. *Vet Res.* 42: 39.

**Nieto CG**, García-Alonso M, Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso C, Navarrete I. 1999. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 67: 117-130.

**Novais FO**, Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A, de Oliveira CI. 2009. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J Immunol.* 183: 8088-8098.

**Panaro MA**, Acquafredda A, Lisi S, Lofrumento DD, Mitolo V, Sisto M, Fasanella A, Trotta T, Bertani F, Consenti B, Brandonisio O. 2001. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 24: 187-195.

**Panaro MA**, Brandonisio O, Cianciulli A, Cavallo P, Lacasella V, Paradies P, Testini G, De Caprariis D, Mitolo V, Otranto D. 2009. Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Parasitology.* 136: 823-831.

**Papayannopoulos V**, Zychlinsky A. 2009. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* 30: 513-521.

**Patel S**, Kumar S, Jyoti A, Srinag BS, Keshari RS, Saluja R, Verma A, Mitra K, Barthwal MK, Krishnamurthy H, Bajpai VK, Dikshit M. 2010. Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation. *Nitric Oxide.* 22: 226-234.

**Perez LE**, Chandrasekar B, Saldarriaga OA, Zhao W, Arteaga LT, Travi BL, Melby PC. 2006. Reduced nitric oxide synthase 2 (NOS2) promoter activity in the Syrian hamster renders the animal functionally deficient in NOS2 activity and unable to control an intracellular pathogen. *J Immunol.* 176: 5519-5528.

**Peters NC**, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. 2008. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. 321: 970-974.

**Peters NC**, Kimblin N, Secundino N, Kamhawi S, Lawyer P, Sacks DL. 2009. Vector transmission of *Leishmania* abrogates vaccine-induced protective immunity. *PLoS Pathog.* 5: e1000484.

**Pimenta PF**, Dos Santos MA, De Souza W. 1987. Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Leishmania mexicana amazonensis* and rat neutrophils and eosinophils. *J Submicrosc Cytol.* 19: 387-395.

**Pinelli E**, Gebhard D, Mommaas AM, van Hoeij M, Langermans JA, Ruitenbergh EJ, Rutten VP. 2000. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Vet Parasitol.* 92: 181-189.

**Pinelli E**, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenbergh J. 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun.* 62: 229-235.

**Pinelli E**, van der Kaaij SY, Slappendel R, Fragio C, Ruitenbergh EJ, Bernadina W, Rutten VP. 1999. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol.* 69: 121-126.

**Pires CA**, Santos-Gomes GM, Pratlong F, Ribeiro H, Campino L, Abranches P. 1991. Phlébotomes du Portugal. IV Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* par *Leishmania infantum* MON-24 dans le foyer de l'Alto Douro. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 66: 47-48.

**Pitta MG**, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, Argiro L, el Kheir M, Bucheton B, Mary C, El-Safi SH, Dessein A. 2009. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest.* 119: 2379-2387.

**Rafati S**, Zahedifard F, Nazgouee F. 2005. Prime-boost vaccination using cysteine proteinases type I and II of *Leishmania infantum* confers protective immunity in murine visceral leishmaniasis. *Vaccine.* 24: 2169-2175.

**Ramos I**, Alonso A, Marcen JM, Peris A, Castillo JA, Colmenares M, Larraga V. 2008. Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine.* 26: 333-344.

**Ramos I**, Alonso A, Peris A, Marcen JM, Abengozar MA, Alcolea PJ, Castillo JA, Larraga V. 2009. Antibiotic resistance free plasmid DNA expressing LACK protein leads towards a protective Th1 response against *Leishmania infantum* infection. *Vaccine.* 27: 6695-6703.

**Reis AB**, Giunchetti RC, Carrillo E, Martins-Filho OA, Moreno J. 2010. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 26: 341-349.

**Remer KA**, Roeger B, Hambrecht C, Moll H. 2010. Natural killer cells support the induction of protective immunity during dendritic cell-mediated vaccination against *Leishmania major*. *Immunology*. 131: 570-582.

*Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 51: 241-246.

**Rioux JA**, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp*. 65: 111-125.

**Rodrigues OR**, Marques C, Soares-Clemente M, Ferronha MH, Santos-Gomes GM. 2009. Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. *Immunobiology*. 214:101-111.

**Rolão N**, Cortes S, Gomes-Pereira S, Campino L. 2007. *Leishmania infantum*: mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. *Exp Parasitol*. 115: 270-276.

**Rosa R**, Marques C, Rodrigues OR, Santos-Gomes GM. 2006. *Leishmania infantum* released proteins specifically regulate cytokine expression and production patterns by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *Acta Trop*. 97: 309-317.

**Rousseau D**, Demartino S, Ferrua B, Michiels JF, Anjuère F, Fragaki K, Le Fichoux Y, Kubar J. 2001. *In vivo* involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. *BMC Microbiol*. 1:17.

**Sacks D**, Noben-Trauth N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*. 2: 845-58.

**Sanchez-Robert E**, Altet L, Alberola J, Rodriguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes L, Timon M, Sanchez A, Francino O. 2008. Longitudinal analysis of cytokine gene expression and parasite load in PBMC in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 125: 168-175

**Santos-Gomes GM**, Campino L, Abranches P. 2000. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 952: 193-198.

**Santos-Gomes GM**, Roos Rodrigues O, Marques C. 2008. Resposta imunológica. In *Leishmaniose canina*. Ed. Chaves Ferreira Publicações, 1<sup>a</sup>. Edição. Lisboa. Portugal. 69-83.

**Santos-Gomes GM**, Rosa R, Leandro C, Cortes S, Romão P, Silveira H. 2002. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*. 88: 21-30.

**Scapini P**, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. 2000. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev*. 177: 195-203.

- Silvestre R**, Silva AM, Cordeiro-da-Silva A, Ouaiissi A. 2009. The contribution of Toll-like receptor 2 to the innate recognition of a *Leishmania infantum* silent information regulator 2 protein. *Immunology*. 128: 484-499.
- Solano-Gallego L**, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 165: 1-18.
- Soong L**. 2008. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *J Immunol*. 180: 4355-4360.
- Srivastava P**, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. 2011. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 105: 1-6.
- Sukhumavasi W**, Egan CE, Denkers EY. 2007. Mouse neutrophils require JNK2 MAPK for *Toxoplasma gondii*-induced IL-12p40 and CCL2/MCP-1 release. *J Immunol*. 179: 3570-3577.
- Thalhofer CJ**, Chen Y, Sudan B, Love-Homan L, Wilson ME. 2011. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum chagasi*. *Infect Immun*. 79: 108-17.
- Tomás A & Romão S**. 2008. Biologia do parasita. In *Leishmaniose canina*. Ed. Chaves Ferreira Publicações, 1ª. Edição. Lisboa. Portugal. 7-26.
- Tripathi P**, Singh V, Naik S. 2007. Immune response to *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 51: 229-242.
- Urban CF**, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A. 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 5:e1000639.
- van Zandbergen G**, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol*. 173: 6521-6525.
- Whitaker SM**, Colmenares M, Pestana KG, McMahon-Pratt D. 2008. *Leishmania pifanoi* proteoglycolipid complex P8 induces macrophage cytokine production through Toll-like receptor 4. *Infect Immun*. 76: 2149-2156.
- WHO**. 2010. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva. 22-26 March. 201pp.

**Wilson ME**, Innes DJ, Sousa AD, Pearson RD. 1987. Early histopathology of experimental infection with *Leishmania donovani* in hamsters. *J Parasitol.* 73: 55-63.

**Wilson ME**, Jeronimo SM, Pearson RD. 2005. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog.* 38: 147-160.

**Witko-Sarsat V**, Pederzoli-Ribeil M, Hirsh E, Sozzani S, Cassatella MA. 2011. Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game. *Trends Immunol.* 32: 117-124.

**Woodfin A**, Voisin MB, Nourshargh S. 2010. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr Opin Hematol.* 17: 9-17.

**Zarbock A**, Ley K. 2009. Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation.* 16: 31-42.

**Zhang X**, Majlessi L, Deriaud E, Leclerc C, Lo-Man R. 2009. Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity.* 31: 761-771.



## **CAPÍTULO 2**

**Interacção *in vitro* entre neutrófilos e parasitas de *L. infantum***



## 2.1 Introdução

Após a libertação de componentes quimiotácticos do hospedeiro ou do agente patogénico, os PMN ligam-se e rapidamente ingerem os microrganismos extracelulares, através de mecanismos dependentes da opsonização ou pelo reconhecimento directo de padrões moleculares de reconhecimento do agente patogénico (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) efectuada por receptores de padrões de reconhecimento (PRRs, do inglês *pattern-recognition receptors*), tais como os receptores *toll-like* (TLR) ou ainda os recém descobertos PPRs, os receptores *NOD-like* (NLR) (Nathan 2006; Cascão *et al.* 2009; Ekman & Cardell 2010). No interior dos PMN, os microrganismos podem ser destruídos através da actividade de espécies reactivas de oxigénio ou pela acção de enzimas proteolíticas e péptidos anti-microbianos que fazem parte do conteúdo dos grânulos (Nathan 2006; Cascão *et al.* 2009). Os PMN formam estruturas extracelulares, as NETs (NET's, do inglês *neutrophil extracellular traps*), constituídas por fibras de DNA, proteínas dos grânulos e histonas, que estão envolvidas na resposta inata contra bactérias, fungos e protozoários (Papayannopoulos & Zychlinsky 2009; Urban *et al.* 2009). Estas células são também capazes de expressar e produzir moléculas imunomodulatórias, tais como citocinas, quimiocinas e outros mediadores moleculares, que regulam a migração e activação dos PMN, podendo ter efeito citotóxico directo sobre os microrganismos (Scapini *et al.* 2000; Lapinet *et al.* 2000; Denkers *et al.* 2003; Sukhumavasi *et al.* 2007). O tempo de vida dos PMN é relativamente curto, acabando por morrer espontaneamente. A morte celular destas células pode ocorrer através de diferentes vias, nas quais se inclui a apoptose (Cabrini *et al.* 2010). Os PMN apoptóticos expressam determinados receptores que facilitam o reconhecimento e fagocitose pelos MΦ, sendo este processo essencial para a resolução da inflamação, já que a remoção de PMN apoptóticos intactos previne a libertação do seu conteúdo citotóxico para meio extracelular (Cabrini *et al.* 2010). No entanto, a extensão do tempo de vida pode ser vital para o

controlo ou a exacerbação de doenças causadas por diversos microrganismos (Kennedy & DeLeo 2009), incluindo *Leishmania* (Aga *et al.* 2002; van Zandbergen *et al.* 2004).

A associação entre PMN e a leishmaniose visceral é um tema bastante actual mas ainda com pouca informação disponível. Existem evidências de que os PMN têm um papel no controlo da doença, já que murganhos BALB/c depletados de PMN desenvolveram uma resposta imunológica do tipo Th2 durante a infecção por *L. donovani* (MacFarlane *et al.* 2008) e levaram ao aumento da carga parasitária no baço durante a fase aguda da infecção por *L. infantum* (Rousseau *et al.* 2001). Contrariamente, em cães infectados com *L. infantum* foi observada a redução da capacidade dos PMN de destruírem o parasita (Brandonisio *et al.* 1996). Assim, apesar de estar longe de estar totalmente esclarecido, os PMN aparecem como células cruciais no desenvolvimento da resposta imunitária durante a leishmaniose visceral, tendo provavelmente um papel decisivo no controlo ou na progressão para a doença e na transição da imunidade inata para adaptativa.

## 2.2 Objectivo

Este trabalho teve como objectivo estudar o efeito do parasita nos mecanismos imunológicos de neutrófilos, através da análise da fagocitose, respiração oxidativa, apoptose, quimiotaxia, desgranulação e expressão de citocinas, quimiocinas e receptores *toll-like*, após infecção *in vitro* com *L. infantum*. Complementarmente, foi também avaliada a influência dos neutrófilos na viabilidade e no crescimento do parasita.

## 2.3 Material e Métodos

### 2.3.1 Animais e parasitas

Os animais utilizados neste estudo foram murganhos (*Mus musculus*) machos com idades compreendidas entre as 5 e as 9 semanas, pertencentes à estirpe C57BL/6. Os animais foram adquiridos ao Instituto Gulbenkian de Ciência e mantidos no Biotério do IHMT sob condições climáticas e de nutrição adequadas e de acordo com os requerimentos da União Europeia relativos ao bem-estar dos animais de experiência (86/609/CEE) reconhecidos pela lei nacional (DR DL129/92 e Portaria 1005/92). A estirpe de murganhos é menos utilizada e apresenta menor susceptibilidade à infecção com espécies viscerais de *Leishmania* comparativamente à estirpe BALB/c e por isso está associada a maior eficiência no controlo da carga parasitária (Lehmann *et al.* 2000; Rosa *et al.* 2005).

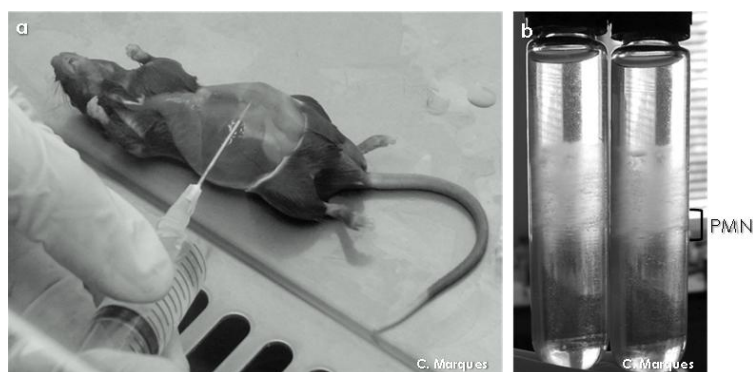
Para o estudo foram usados promastigotas virulentos de *L. infantum* MON-1 (MHOM/PT/89/IMT151) recolhidos na fase de crescimento estacionária de sub-culturas com menos de quatro passagens (Santos-Gomes & Abranches 1996) após a transformação *in vitro* a partir de amastigotas isolados do baço ou fígado de murganhos BALB/c infectados. Para a transformação *in vitro* dos parasitas foi utilizado o meio de cultura NNN (Novy-Nicolle-McNeal). Posteriormente os promastigotas foram mantidos em meio líquido Schneider's *Drosophila* (Sigma-Aldrich, USA) contendo L-glutamina e suplementado com 10% de soro fetal bovino inactivado (FBS, do inglês *fetal bovine serum*, Biochrom AG, Germany) (Biochrom AG, Germany), CaCl<sub>2</sub> a 0.6% (w/v) e 5mM HEPES (Sigma-Aldrich), a pH 7.2 (meio Schneider completo). Foram também utilizados promastigotas transgênicos de *L. infantum* que expressam "Green Fluorescent Protein" (GFP), cedidos gentilmente pela Prof.<sup>a</sup> Ana Tomás do Instituto de Biologia Molecular e Celular do Porto. Resumidamente, a cadeia ou grelha individual de leitura de *GFP* aberta foi inserida num plasmídeo pTEX (*pTEX plasmid shuttle vector*12) (Kelly *et al.* 1992) e posteriormente electroporado em promastigotas de *L. infantum*. Os parasitas mutantes foram

seleccionados em placas de agar com 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de Geneticina (G418; Sigma-Aldrich) e as colónias individuais positivas foram cultivadas em meio de cultura com a mesma condição de selecção e analisadas por *southern blotting*, para confirmar que a construção estava estruturalmente intacta e por microscopia de fluorescência para garantir a expressão de GFP.

Estes parasitas foram mantidos em meio RPMI 1640 (Gibco Laboratories, USA) suplementado com 10% FBS (Biochrom AG) e contendo 2mM L-glutamina, 2mM piruvato de sódio, 25mM Heps, 0.05mM  $\beta$ -mercaptoetanol (VWR International, USA), 100U. $\text{ml}^{-1}$  penicilina, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  estreptomicina (Biochrom AG) a pH 7.2 (meio RPMI completo) e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de Geneticina (Sigma-Aldrich).

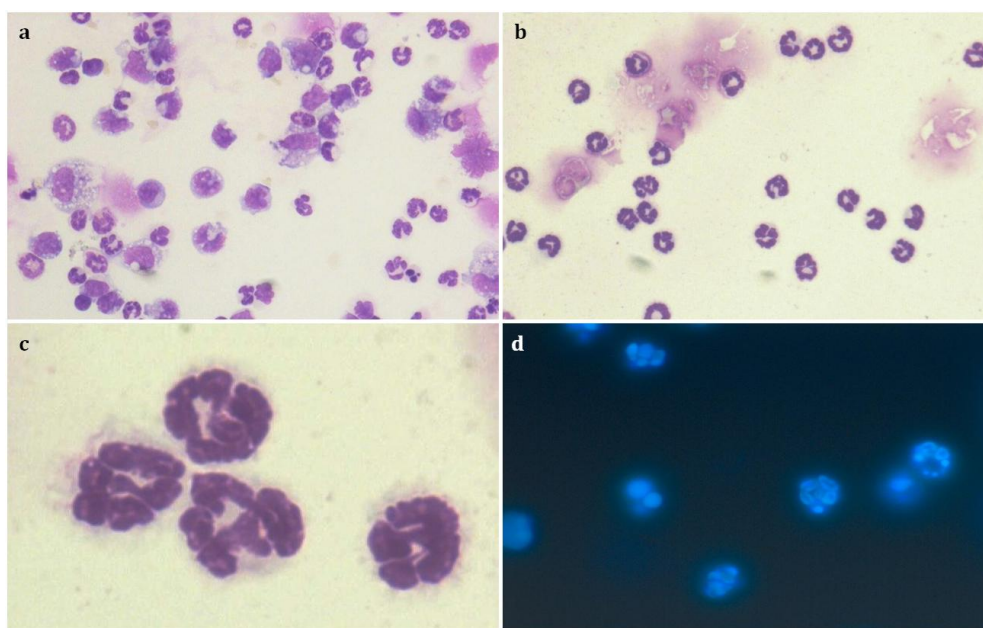
### **2.3.2 Isolamento e purificação de neutrófilos**

Quatro ou cinco murganhos foram injectados por via intraperitoneal com 0.5 ml de tioglicolato a 10% (Sigma-Aldrich) para provocar um estímulo inflamatório e consequente migração de PMN para a cavidade peritoneal dos animais. Dezoito horas (h) depois, os animais foram sacrificados pela inalação de  $\text{CO}_2$  e as células foram recolhidas de cada animal através de uma lavagem peritoneal com 10 ml de solução tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) 1x, frio a pH 7.2, (Lonza, Germany) (Fig. 2.1a). A suspensão foi filtrada com um filtro celular de 70 $\mu\text{m}$  (BD Biosciences, USA) e lavada duas vezes a 300xg, a 4°C e durante 10 minutos (min) com PBS. A suspensão celular foi ressuspendida em 1ml de PBS 1x. Paralelamente, foi preparada uma solução de Percoll® (Sigma-Aldrich) a pH 7.2 com PBS (10x) na proporção de 9:1. Preparou-se um gradiente contínuo misturando 9ml desta solução de Percoll com a suspensão celular. Após uma ultracentrifugação a 60000xg, a 4°C e durante 1h e 10 minutos (Beckman Coulter, USA) foi retirada a camada inferior de células que corresponde à camada mais rica em granulócitos (Fig. 2.1b). Foi efectuada uma lavagem (300xg, 10 minutos a 4°C) e os PMN foram ressuspendidos em meio RPMI completo.



**Figura 2.1.** Isolamento e purificação de neutrófilos (1). (a) Lavagem da cavidade peritoneal de um murganho C57BL/6 para isolamento de neutrófilos; (b) Purificação da população de neutrófilos após uma ultracentrifugação e através de um gradiente de Percoll.

Regularmente, foi realizada a contagem das células peritoneais e dos PMN purificados através da coloração com azul de tripan em câmara de Neubauer para a determinação da percentagem de rendimento e viabilidade da população de PMN. O número percentual de PMN antes e depois da ultracentrifugação e a pureza da população de PMN foram determinados após citocentrifugação (*citospin*), em lâminas de vidro, de  $2 \times 10^5$  células, a  $55 \times g$  durante 4 min (StatSpin® Cytofuge 2, USA) e observação microscópica das lâminas após fixação com metanol (VWR International) e coloração com Giemsa (1:7) (Sigma-Aldrich) (Fig. 2.2a,b,c) e observação ao microscópio de fluorescência (Axioskop20, Zeiss, Germany) em meio de montagem (VECTASHIELD®, Vector Laboratories, USA) contendo o corante nuclear fluorescente *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI) (Fig. 2.2d). Em regra, a viabilidade dos PMN isolados foi acima de 98%, enquanto a pureza foi sempre superior a 90% apesar do rendimento se situar apenas nos  $16.5 \pm 8.1\%$ , uma vez que a percentagem de PMN na população inicial de células peritoneais era de cerca de 60%.



**Figura 2.2.** *Isolamento e purificação de neutrófilos (II).* Lâminas de *citospin* da suspensão celular obtida de murganhos C57BL/6, coradas com Giemsa (a) antes do isolamento de neutrófilos (ampliação de 400x), (b) e (c) após purificação através de um gradiente de Percoll (ampliação de 400x e 1000x, respectivamente) e (d) coradas com DAPI e após observação ao microscópio de fluorescência (ampliação 400x).

### **2.3.3 Infecção *in vitro* com *L. infantum* e determinação da capacidade fagocitária de neutrófilos**

Os promastigotas foram incubados em placas de cultura de 96 poços com  $5 \times 10^5$  PMN numa proporção de parasita-PMN de 5:1, num volume total de  $200 \mu\text{l}$ , a  $37^\circ\text{C}$  numa atmosfera humidificada contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 1 e 3 h de incubação, foi efectuada uma citocentrifugação em lâminas de vidro com  $2 \times 10^5$  PMN a  $55 \times g$  durante 4 min. As lâminas foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa (1:7). A percentagem de PMN infectados foi determinada por contagem das células infectadas e células totais em 10 campos microscópicos (1000x) por lâmina e de pelo menos seis experiências independentes. Paralelamente, lâminas de culturas de PMN e promastigotas-GFP foram fixadas durante 10 min com paraformaldeído (Sigma-Aldrich) a 2% (w/v) em PBS 1x e colocadas com meio de montagem VECTASHIELD®

(Vector Laboratories, USA) que já contém o corante nuclear fluorescente DAPI. As lâminas foram cobertas por lamelas e observadas ao microscópio de fluorescência (Axioskop20), com comprimento de onda de excitação compatível com DAPI e GFP, para observação de parasitas intracelulares.

#### **2.3.4 Crescimento e viabilidade de *L. infantum* após o contacto com neutrófilos**

A promastigotas foram incubados durante 1h na presença ou ausência de neutrófilos, como descrito anteriormente em 2.3.3, foi adicionado sobrenadantes congelados de culturas de PMN e *L. infantum* com 1h de incubação. Parte da cultura (50µl) foi transferida para uma placa de 96 poços contendo 200µl de meio Schneider (Sigma-Aldrich) completo e foram efectuadas diluições seriadas (1:4). De seguida a placa foi incubada a 24°C durante 2 e 4 dias. O número de parasitas viáveis.ml<sup>-1</sup> foi obtido, contando em cada poço e numa câmara de Neubauer, o número de parasitas móveis. Este número foi multiplicado pelo respectivo factor de diluição para estimar o crescimento ou a capacidade de replicação do parasita. Para determinar a viabilidade intracelular do parasita, os promastigotas não fagocitados pelos PMN após 1h de incubação foram removidos através de uma selecção positiva dos PMN usando um kit comercial *Anti-Ly-6G MicroBead Kit mouse* (Miltenyi Biotec, Germany). Após a ligação de um receptor de membrana altamente expresso em PMN a micropartículas magnéticas revestidas por um anticorpo monoclonal específico, os PMN foram re-obtidos por separação magnética em colunas. A suspensão celular foi centrifugada (300xg, 4 °C durante 10 min), e o sedimento (*pellet*) ressuspendido em 200µl de tampão PBS frio e desgaseificado, com 0.5% de FBS e 2mM de EDTA (VWR International). Foram adicionados 50µl do anticorpo monoclonal Ly-6G conjugado com Biotina (Anti-Ly-6G-Biotin) e incubado a 4°C durante 10 min. Foram adicionados mais 150µl de tampão e 100µl de micropartículas conjugadas com Biotina (Anti-Biotin MicroBeads). Após incubação de 15 min a 4°C, foi efectuada uma lavagem (300xg, 4°C durante 10 min) e o

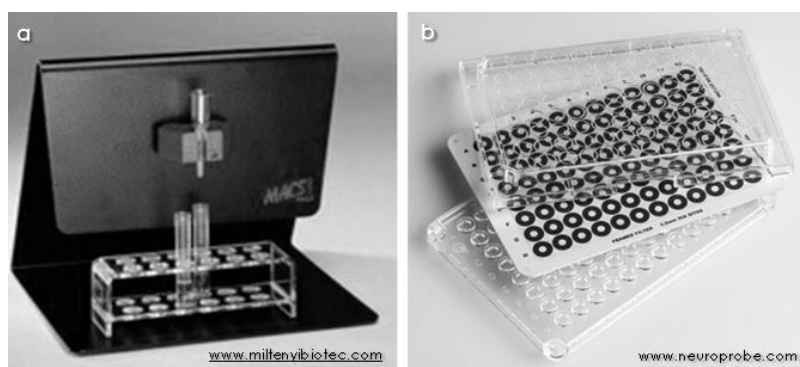
sedimento foi ressuspensionado em 500µl de tampão. Esta suspensão celular foi aplicada em colunas MS (Miltenyi Biotec) que por sua vez estavam associadas a um campo magnético de um separador MiniMACS™ (Miltenyi Biotec) (Fig. 2.3a). As células não marcadas (Ly-6G<sup>-</sup>), maioritariamente os parasitas extracelulares, foram colectados lavando três vezes a coluna com 500µl de tampão. Os PMN retidos na coluna (células Ly-6G<sup>+</sup> magneticamente marcadas), foram eluídos em 1 ml de tampão após se retirar a coluna do separador magnético. Os PMN foram centrifugados (300xg, 4°C, durante 10 min), ressuspensionados em meio Schneider completo e incubados a 24°C em tubos contendo meio sólido NNN. As culturas foram examinadas semanalmente por microscopia óptica (Olympus, Germany) para observação de promastigotas viáveis.

### **2.3.5 Quimiotaxia**

Quimiotaxia é o nome dado ao processo de locomoção de células em direcção a um gradiente de concentração químico detectado por receptores de membrana das células. Este mecanismo permite a polarização e a migração dos PMN ou outros leucócitos aos locais de infecção ou inflamação no organismo mediante a ocorrência de estímulos ou factores quimiotáticos externos que podem ser componentes microbianos ou do próprio hospedeiro, tais como produtos do complemento, citocinas, quimiocinas ou ainda outras moléculas inflamatórias libertadas pelos próprios neutrófilos ou por outras populações de leucócitos (Nathan 2006).

Para avaliar a capacidade de migração dos PMN após o contacto com o parasita foi utilizada uma câmara de Boyden modificada (ChemoTx® System; Neuroprobe Inc., USA) composta por dois compartimentos separados por uma membrana de policarbonato com microporos de 3µm (Fig. 2.3b). No compartimento inferior foram colocados 29µl de meio RPMI ou 10<sup>-4</sup>M do agente quimiotático N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP; Sigma-Aldrich). O compartimento superior foi preenchido com 25µl de culturas de PMN ou PMN incubados 1h com parasitas de *L. infantum* às quais foram retirados os promastigotas extracelulares como descrito anteriormente em 2.3.3. A

concentração final de células no compartimento superior foi de  $1.8 \times 10^6$  PMN.ml<sup>-1</sup>. A placa foi incubada durante 60 min a 37°C, numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O número de PMN que atravessaram a membrana e migraram do compartimento superior para o inferior do sistema quimiotático foi quantificado usando um microscópio invertido (Olympus, Germany) com a ampliação de 1000x.



**Figura 2.3.** Sistema de separação de células e de quimiotaxia. Separador MiniMACS™ e colunas magnéticas (Miltenyi Biotec, Germany) (a) câmara de Boyden modificada (b).

### **2.3.6 Respiração oxidativa**

O aumento do consumo de O<sub>2</sub> durante a fagocitose de agentes patogénicos ou outras partículas (p.e. restos celulares) ou após interacção das células fagocíticas com mediadores solúveis e/ou inflamatórios denomina-se respiração oxidativa ou stress oxidativo. A cascata de reacções de oxidação/redução tem um papel essencial no sistema imunitário do hospedeiro uma vez que gera espécies reactivas de oxigénio que são altamente anti-microbicas (Nauseef 2007).

A produção do ião superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) foi medida através do método colorométrico de redução de azul de nitrotetrazólio (NBT, do inglês *nitroblue tetrazolium*,) adaptado de Choi *et al.* (2006) e Sukhumavasi *et al.* (2007). Este método tem como princípio básico a absorção celular de NBT de cor amarela e a sua redução intracelular em partículas de *formazan* de cor azul na presença do O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Os depósitos, de cor azul podem ser observados por microscopia óptica e quantificados

espectrofotometricamente após solubilização das partículas de *formazan* em solventes orgânicos. As culturas de  $5 \times 10^5$  PMN e PMN-*Leishmania* foram incubadas em placas de 96 poços, a 37°C durante 1h, numa atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, em 1ml de meio RPMI incompleto, contendo 0.2% de NBT (Sigma-Aldrich) e na presença ou ausência de 0.2µg.ml<sup>-1</sup> de acetato de forbol miristato (PMA, do inglês *phorbol myristate acetate*) ou 10<sup>-4</sup>M fMLP, dois activadores da respiração oxidativa. As células foram lavadas com PBS morno e solubilizadas com 100µl de 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*; Sigma-Aldrich) e 100µl de HCl 0.1N. A absorvância foi quantificada a 550nm num espectrofotómetro, usando um leitor de placas Anthos 2010 (Biochrom, UK). Poços sem PMN foram usados como controlos negativos. Paralelamente, foi efectuada a citocentrifugação das células em lâminas que foram posteriormente fixadas com metanol e coradas com 1% de safranina O (Sigma-Aldrich). As partículas de *formazan* resultantes da redução do NBT pelo ião superóxido foram observadas nas lâminas ao microscópio óptico.

### **2.3.7 Desgranulação**

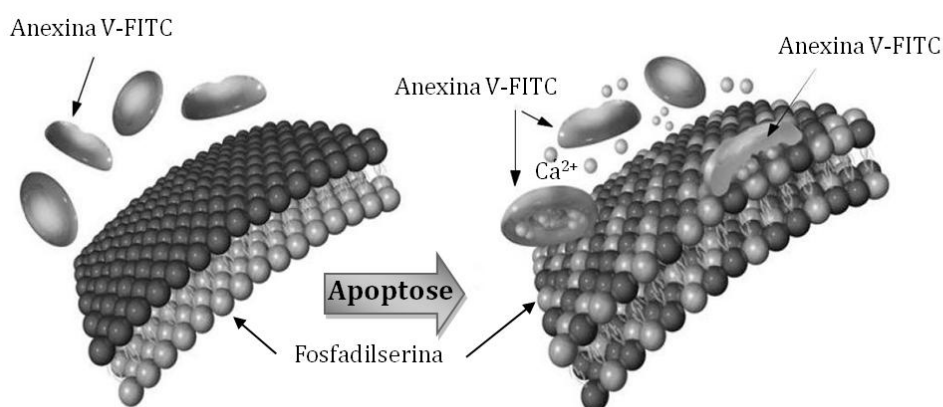
Alguns dos componentes dos grânulos primários, tais como a mieloperoxidase (MPO) e a elastase neutrofílica (NE) estão envolvidos na regulação a formação extracelular das NETs (Papayannopoulos & Zychlinsky 2009) e a NE é também parte estruturante destas formações neutrofílicas durante a infecção com *L. amazonensis* (Guimarães-Costa *et al.* 2009). Ao contrário do que se pensava inicialmente os grânulos primários não são apenas libertados dentro dos fagossomas. Estas moléculas são libertadas para o espaço extracelular por exocitose. A exocitose de enzimas dos grânulos primários dos PMN foi medida pela actividade da MPO, NE e outra enzima granular, catepsina G (CatG) nos sobrenadantes de culturas de  $5 \times 10^5$  neutrófilos com 1h e 3h de incubação com *L. infantum*. Em placas de 96 poços foram adicionados substratos específicos para cada uma das enzimas. Para a MPO, foi utilizado 50µl do substrato 3,3',5,5'-

tetrametilbenzidina (TMB, Sigma-Aldrich) que é um reagente que combina o cromagénio TMB contendo 2% do substrato da MPO, peróxido de hidrogénio (VWR) (Quade & Roth 1997) a 50µl dos sobrenadantes. Por acção da enzima sobre o substrato é formado um produto de reacção de cor azul que por sua vez, após a adição de ácido, resulta num composto amarelo estável que pode ser quantificado num espectrofotómetro. Assim, após uma incubação de 30 min a reacção foi terminada com 25µl de uma solução de 0.5M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a absorvância a 450nm foi medida num leitor de placas, Stat Fax<sup>®</sup> 3200 Microplate reader (Awareness Technology Inc., USA). Como controlos usaram-se poços com meio RPMI e poços sem TMB. A actividade enzimática da NE e da CatG foi medida usando 1mM dos substratos sintéticos e colorométricos *N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-pNA* (Sigma-Aldrich) e 2.5mM do substrato *N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA* (Sigma-Aldrich), respectivamente (Morohoshi *et al.* 2006; Mydel *et al.* 2008). Resumidamente, a 100µl dos sobrenadantes foi adicionado 100µl do substrato apropriado em 25 mM do tampão de reacção (Tris-HCl pH 7.5) numa placa de 96 poços. A absorvância a 405 nm foi lida num leitor de placas após 24h e 96h de incubação a 37°C para a NE e 24h, 48h e 96h para a CatG. Como controlo, foram lidas as absorvâncias de poços contendo meio RPMI ou apenas os substratos. Para todos os ensaios foi assumido que a intensidade da reacção colorimétrica é proporcional à quantidade/actividade da enzima em estudo.

### **2.3.8 Apoptose**

Na fase inicial do processo de morte celular por apoptose, fosfolípidos, como por exemplo moléculas de fosfadilserina (PS), são deslocadas do folheto interno para o folheto externo da membrana citoplasmática. Este fenómeno permite o reconhecimento das células apoptóticas, nomeadamente dos PMN apoptóticos pelos macrófagos, e a sua rápida e segura remoção (Elbim & Lizard 2009). A apoptose nos PMN foi analisada utilizando o kit comercial TACS<sup>™</sup> Annexin V-FITC (R&D Systems, USA). As alterações membranares associadas à apoptose são detectadas por

citometria de fluxo e/ou detecção *in situ* através da adição de conjugados de Anexina V que é uma proteína anticoagulante que na presença de íons cálcio se liga reversivelmente mas de maneira forte a moléculas de PS do folheto externo da membrana celular (Fig. 2.4). Adicionalmente, a marcação com iodeto de propídio (PI) permite identificar as células que perderam a integridade da membrana (apoptose tardia ou necrose).



**Figura 2.4.** Esquema representativo da apoptose celular. Esquema representativo da deslocação de fosfatidilserina (PS) do folheto interno para o folheto externo da membrana celular durante a apoptose e ligação de moléculas de anexina V marcadas com FITC a moléculas de PS da superfície celular na presença de íons cálcio (adaptado de SouthernBiotech, USA, [www.southernbiotech.com](http://www.southernbiotech.com)).

PMN ( $1 \times 10^6$ ) foram incubados durante 1h com *L. infantum*. Os parasitas extracelulares foram removidos como descrito no em 2.3.3. Células incubadas ou não com promastigotas foram centrifugadas a  $300 \times g$ , 10 minutos à temperatura ambiente, lavadas duas vezes ( $300 \times g$ , 6 min,  $4^\circ C$ ) em  $500 \mu l$  de PBS 1X frio, ressuspendidas em  $100 \mu l$  do reagente de incubação da Anexina V [ $10 \mu l$  de 10X tampão de ligação (10mM Hepes, pH 7.4, 1.5M NaCl, 50mM KCl, 10mM  $MgCl_2$ , 18 mM  $CaCl_2$ ),  $80 \mu l$  de água mili Q e  $1 \mu l$  Anexina V-FITC] e incubadas no escuro durante 25 minutos à temperatura ambiente. Após uma lavagem com 1ml de 1x tampão de ligação a suspensão celular foi ressuspendida em  $500 \mu l$  de 1X tampão de ligação à qual se adicionou  $10 \mu l$  de PI. Para

detecção *in situ*, as células foram observadas ao microscópio de fluorescência (Axioskop20, Zeiss, Germany) após colocar 10µl da suspensão entre lâmina e lamela com meio de montagem VECTASHIELD® (Vector Laboratories) com filtro compatível com fluoresceína de isotiocianato-FITC). A aquisição da restante suspensão celular foi efectuada num citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) usando o software CellQuestPro (BD Biosciences) e a análise dos dados, com o programa FlowJo 7.6.1 (Tree Star Inc., USA) e o programa Cyflogic 1.2.1 (CyFlo Ltd., Filand). Células não marcadas, células marcadas apenas com Anexina V-FITC e células marcadas só com PI foram utilizadas para calibrar o citómetro, compensando a autofluorescência e a sobreposição dos espectros e definindo os limites de cada população.

### **2.3.9 Quantificação da expressão de citocinas, quimiocinas, TLR-2 e gp91phox**

A expressão de mRNA de genes de citocinas, quimiocinas, do receptor *toll-like* (TLR)-2 e da subunidade gp91phox da enzima NADPH foi quantificada em culturas de neutrófilos incubadas ou não com parasitas de *L. infantum* por PCR em tempo real.

#### **2.3.9.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA**

O RNA total foi extraído de  $5 \times 10^5$  neutrófilos com 1 e 3h de incubação com e sem *L. infantum*. Após a remoção dos parasitas não fagocitados como descrito em 2.3.3, o RNA foi extraído utilizando o teste comercial *RNeasy Mini Kit* (Quiagen, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. Após a lise e homogeneização com um tampão desnaturante contendo guanidina-tiocianato que inactiva possíveis ribonucleases (RNases), permitindo a purificação de RNA intacto, foi adicionado etanol 70% (v/v) tratado com dietilpirocarbonato (DEPC; Sigma-Aldrich) 0.1% que promove a ligação selectiva do RNA à membrana de uma coluna de separação. Foi efectuada uma série consecutiva de centrifugações e lavagens que permitiu que o RNA fosse eluído em 35µl de água. O protocolo inclui também um tratamento com desoxiribonuclease (DNase) para prevenir e remover DNA contaminante (RNase Free-DNase set; Quiagen). As

amostras de RNA foram desnaturadas durante 5 min a 65°C e posteriormente sintetizadas em cDNA através de uma reacção de transcrição reversa a 37 °C, durante 60 min, na presença de 200U da enzima *Moloney Murine Leukemia Virus – Reverse Transcriptase* (MMLV-RT; Promega, USA), 3mM 5X MMLV-RT buffer (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl e 15mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM DTT; Promega), 10mM albumina de soro bovino (BSA; Roche, USA), 0.5mM desoxirribonucleótidos (dNTPs) (Bioline, UK), 0.1µg Oligo (dT)15 (Promega) e 40U da enzima Ribonuclease inhibitor (RNAsin; Promega) por cada µg de RNA. Por último, as amostras foram aquecidas a 95°C, durante 5 min, para inactivação da enzima RT, arrefecidas a 4°C e conservadas a -20°C até à sua utilização. Em cada reacção foi incluído um controlo negativo (amostra sem RNA).

#### 2.3.9.2 Selecção dos genes-alvo e sequência de *primers*

Para além dos genes do receptor *toll-like* (TLR)-2 e da subunidade gp91phox da enzima NADPH foi também analisada a expressão dos genes do factor de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , da interleucina (IL)-1 $\beta$  e da IL-6. As quimiocinas analisadas foram a proteína inflamatória de macrófagos (MIP/CCL3)-1 $\alpha$ , MIP-2/CXCL2, quimiocina derivada de queratinócitos (homólogo funcional da IL-8 humana) (KC/CXCL1) e a proteína quimiotática de monócitos (MCP/CCL2)-1. Para corrigir possíveis ineficiências da reacção de transcrição reversa, a quantificação da expressão génica é sempre normalizada em relação a um gene de controlo interno (*housekeeping*) que é expresso a um nível constante em diferentes tecidos, em diferentes fases do desenvolvimento de um organismo e que não deverá ser afectado pelo processo experimental. Assim, para controlo endógeno da expressão de genes, foi utilizado o gene HPRT (*hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*). As sequências de iniciação, ou *primers forward* e *reverse* de cada gene (Tabela 2.1), foram pesquisadas na bibliografia existente, tendo em conta determinados critérios importantes para a optimização da reacção de PCR em tempo real, nomeadamente, as sequências terem um tamanho aproximado de 20 pares de base (pb) e uma percentagem de GC entre 30% e 80%, terem sido previamente utilizados em PCR em tempo

real usando SYBR *green* como marcador das cadeias duplas de DNA e o produto de PCR ter um tamanho entre 50 e 150 pb. Procurámos que todos os aspectos relacionados com esta técnica, como extracção de RNA, a obtenção dos resultados por PCR em tempo real, passando pelo desenho experimental e incluindo a escolha dos *primers* e do gene de controlo interno, seguissem as exigências necessárias para publicações de resultados de PCR quantitativo em tempo real (MIQE *guidelines*), descritas por Bustin *et al.* (2009, 2010).

Genes alvo	Sequências <i>forward</i> (FW) e <i>reverse</i> (REV)	N.º pares de bases	Referências
<b>HPRT</b>	FW – 5' GCT CGA GAT GTC ATG AAG GAG AT 3' REV – 5' CCA GCA GGT CAG CAA AGA ACT 3'	91	Rodrigues <i>et al.</i> (2006)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	FW – 5' ATG ATC CGC GAC GTG GAA 3' REV – 5' ACC GCC TGG AGT TCT GGA A 3'	73	Rodrigues <i>et al.</i> (2006)
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	FW – 5' CAA CCA ACA AGT GAT ATT CTC CAT G 3' REV – 5' ATC CAC ACT CTC CAG CTG CA 3'	151	Zaheer <i>et al.</i> (2007)
<b>IL-6</b>	FW – 5' GAG GAT ACC ACT CCC AAC AGA CC 3' REV – 5' AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA 3'	141	Godinez <i>et al.</i> (2008)
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	FW – 5' CCA TGA CAC TCT GCA ACC AAG T 3' REV – 5' TCC GGC TGT AGG AGA AGC A 3'	81	Godinez <i>et al.</i> (2008)
<b>MIP-2</b>	FW – 5' TGT CAA TGC CTG AAG ACC CTG CC 3' REV – 5' AAC TTT TTG ACC GCC CTT GAG AGT GG 3'	126	Huang. <i>et al.</i> (2007)
<b>MCP-1</b>	FW – 5' GCC CTA AGG TCT TCA GCA CCT T 3' REV – 5' TGC TTG AGG TGG TTG TGG AA 3'	100	Chintakuntlawar <i>et al.</i> (2007)
<b>KC</b>	FW – 5' GCG CCT ATC GCC AAT GAG 3' REV – 5' AGG GCA ACA CCT TCA AGC TCT 3'	91	Chintakuntlawar <i>et al.</i> (2007)
<b>TLR-2</b>	FW – 5' AAC CTC AGA CAA AGC GTC AAA TC 3' REV – 5' ACC AAG ATC CAG AAG AGC CAA A 3'	65	Sutmuller <i>et al.</i> (2006)
<b>gp91phox</b>	FW – 5' CTG CTC TCC TTT CTC AGG GGT 3' REV – 5' GTG TGC AGT GCT ATC ATC CAA 3'	113	Velayudham <i>et al.</i> (2006)

**Tabela 2.1.** Sequência de *primers forward* e *reverse* de cada gene. Genes-alvo, sequências dos *primers forward* e *reverse*, tamanho do produto obtido em pares de bases e referência bibliográfica das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, das quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, MCP-1 e KC, do receptor TLR-2, da subunidade gp91phox e do gene de controlo interno HPRT.

### 2.3.9.3 PCR convencional, purificação e clonagem do produto amplificado em vectores plasmídicos

O cDNA (2µl) de cada gene foi amplificado por PCR convencional usando uma concentração final de 0.3µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 1X tampão de reacção [160mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% Tween 20] (Bioline, UK), 2.5µM MgCl<sub>2</sub> (Bioline), 0.2mM dNTPs e 0.04U.µl<sup>-1</sup> da enzima *Taq* polimerase (Bioline) em um volume final de 18µl. Para a desnaturação, o cDNA foi deixado 5 min a 94°C seguido por 30 ciclos de 20 segundos (seg) a 94°C, 30 seg a 59°C (temperatura de *annealing*) e extensão de 30 segundos a 72°C. A extensão final dos genes HPRT, TNF-α e TGF-β decorreram durante 3 min a 72°C. Para o gene gp91phox, as condições de amplificação foram as seguintes: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 10 seg a 95°C, 10 seg a 60°C e 25 seg a 72°C, e uma extensão final a 72°C durante 5 min. Os genes IL-1β, IL-6, MIP-1α/CCL3 e MIP-2/CXCL2 foram amplificados nas seguintes condições: 5 min a 94°C, 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 15 seg a 60°C e 30 seg a 72°C, e uma extensão final a 72°C durante 3 min. Os genes KC/CXCL1 e MCP-1/CCL2 foram amplificados nas condições descritas anteriormente, diferindo apenas no número de ciclos de amplificação (35 ciclos). Os fragmentos amplificados de cDNA foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 3% (p/v) (Sigma-Aldrich) ao qual se adicionou brometo de etídio (concentração final 0.5µg.ml<sup>-1</sup>) em tampão TAE 1X (0.04M Tris-HCl pH 8.0, 0.02M acetato de sódio, 0.002M EDTA) durante cerca de 80min a 100V. A presença dos genes foi confirmada através da sua visualização no sistema UVIDOC (Alfagene, USA) sob luz ultravioleta, por emissão de fluorescência do brometo de etídio intercalado com DNA. Os produtos obtidos foram purificados usando o kit comercial *High Pure PCR Product Purification* (Roche) de acordo com as instruções do fabricante. Este protocolo é realizado para remover sais, restos de *primers* e nucleótidos não incorporados que podem interferir com a inserção do gene no vector plasmídico. Resumidamente, adicionou-se e homogeneizou-se o produto de PCR com um tampão de ligação contendo 3M guanidina-tiocianato, 10mM Tris-HCl e 5% etanol (v/v) pH 5.5, que promove a retenção do DNA a discos de fibra de vidro de colunas de purificação. Após uma série

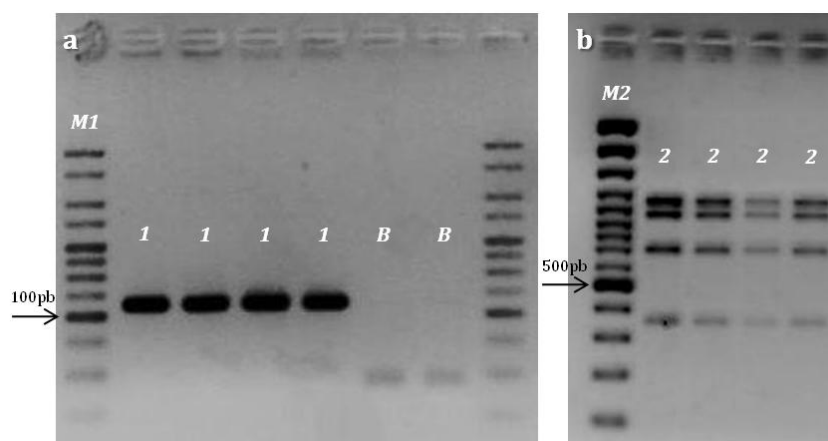
de centrifugações e duas lavagens, o produto foi eluído em tampão de eluição (10mM Tris-HCl pH 8.5). O produto purificado foi quantificado usando o espectrofotómetro *NanoDrop 1000* (Thermo Fisher Scientific, USA) e inserido num vector plasmídico pGEM®-T Easy Vector (Promega). A enzima utilizada (*Taq* polimerase) durante a amplificação por PCR dos genes em estudo apresenta actividade *proofreading*, ou seja, adiciona ao gene uma cauda 3'-A que se liga aos terminais T no vector pGEM Easy linearizado. Para cada reacção, foi utilizado 5µl de 2X tampão de ligação, 1µl da enzima T4 DNA ligase, 1µl do vector pGEM®-T Easy Vector e a quantidade apropriada do *insert* (DNA purificado), num volume final de 10µl, incubando-se de seguida a 4°C, durante 12h.

A quantidade necessária de *insert* para a reacção de ligação foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{ng insert usado} = \frac{\text{ng vector} \times \text{tamanho do insert } 0.5 \text{ (kb)} \times \text{ratio insert:vector}}{\text{tamanho de vector (kb)}}$$

A proporção *insert:vector* foi otimizada para 9:1, a quantidade de vector utilizada foi 50ng e o tamanho do vector em kb é de 3.015. A transformação dos fragmentos ligados ocorreu em células competentes (*JM 109 High Efficiency Competent Cells*; Promega). A suspensão celular (50µl) e 2µl da reacção de ligação foram colocadas no gelo durante 20 min. As células foram posteriormente submetidas a um choque térmico a 42°C durante 45-50 seg e imediatamente colocadas no gelo durante 2 min. A cada reacção contendo as células transformadas foi adicionado 950µl de meio SOC (Promega). As células foram incubadas a 37°C com agitação (150 rotações por minuto) durante 1h30min. Cada cultura transformada (100µl) foi plaqueada em placas de Luria broth (Lennox, Scharlau Microbiology, Spain) contendo 100µg.ml<sup>-1</sup> de ampicilina (Sigma-Aldrich), 0.5mM de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo, Sigma-Aldrich) e 80µg.ml<sup>-1</sup> de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactopiranosídeo, Sigma-Aldrich) permitindo a identificação dos recombinantes através da diferenciação de colónias brancas e azuis. As placas foram incubadas a 37°C durante cerca de 16-18h. As colónias de cor branca resultantes da

interrupção da funcionalidade da sequência do gene que codifica a  $\beta$ -galactosidase (*lacZ*) devido à presença dos plasmídeos recombinantes com o *insert* correctamente clonado, foram colocadas a crescer em 5ml de meio LB com ampicilina e agitação (250 rotações por minuto), durante 12-16h. O DNA plasmídico foi extraído usando o kit *High Pure Plasmid Isolation* (Roche) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, a 1 ml suspensão celular foi adicionado RNase para remover todo o RNA da amostra, tampão de lise para libertar o plasmídeo das células bacterianas e o tampão de ligação que contém guanidina-HCl para promover a ligação do plasmídeo às fibras de vidro da coluna. Após uma série de centrifugações a 20800xg e lavagens com tampões de lavagem, o plasmídeo foi eluído (13000xg) em 10mM de Tris-HCl, pH 8.5. A confirmação da presença os genes pretendidos foi realizada por PCR convencional e electroforese em gel de 3% de agarose (Fig. 2.5a), como descrito anteriormente, e por fragmentação do DNA plasmídico recombinante com a enzima de restrição *Bcn I*, que corta em sítios específicos do vector pGEM Easy-T, gerando quatro fragmentos ou bandas de diferentes tamanhos (351pb, 696pb, 867pb + tamanho do *insert* e 1101bp). Assim, o plasmídeo recombinante (4 $\mu$ l) juntamente com 1 $\mu$ l da enzima de restrição *Bcn I* (Fermentas, USA), 10 $\mu$ l de 1x tampão Tango™ (33 mM de Tris-acetato, pH 7.9, 10mM de acetato de magnésio, 66mM de acetato de potássio e 0.1mg.ml<sup>-1</sup> de BSA) e 4 $\mu$ l de água Mili Q foi incubado durante 2h a 37°C. Os fragmentos obtidos foram visualizados após eletroforese (1h a 110V) em gel de agarose (1.5%) (Fig. 2.5b).



**Figura 2.5.** Géis de agarose com produtos de PCR e produtos da digestão de DNA plasmídico. Exemplos da visualização em gel de agarose de 3 % do produto de PCR (a) e gel de 1.5 % da fragmentação do DNA plasmídico recombinante de gp91phox com a enzima de restrição *Bcn I* com as quatro bandas esperadas (b). *M1*, marcador *Hyperladder V* (Bioline); *1*, produto de PCR esperado de 113pb para o DNA plasmídico recombinante de gp91phox; *B*, branco; *M2*, marcador *GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder* (Fermentas); *2*, quatro fragmentos de restrição esperados para o DNA plasmídico recombinante de gp91phox de 351pb, 696pb, 980pb (fragmento de 867pb + tamanho do *insert* de 113pb) e 1101pb.

#### 2.3.9.4 Construção de curvas-padrão e PCR em tempo real para a quantificação absoluta da expressão génica

As curvas-padrão para cada gene foram construídas após a quantificação do DNA plasmídico recombinante obtido por clonagem (*NanoDrop 1000*). Foram efectuadas diluições em série de 1:5 (de 250pg.µl<sup>-1</sup> a 0.016pg.µl<sup>-1</sup>) e reacções independentes de PCR em tempo real, nas quais as amostras das soluções-padrão foram utilizadas em duplicado. A partir das curvas-padrão obtidas foi calculado a eficiência de amplificação ( $E=10^{1/-DECLIVE} - 1$ ) para cada gene. Consideraram-se aceitáveis os ensaios com percentagens de eficiência superiores a 90%. O PCR em tempo real foi realizado num aparelho ABI GeneAmp 5700-sequence detection system (Applied Biosystems, USA) num volume total de 20µl contendo 2µl de cDNA de cada amostra ou de cada diluição do DNA plasmídico (padrão), 300nM dos *primers forward* e *reverse* específicos de cada gene e 10µl de SYBR® PCR Master Mix (Applied Biosystems) que contém SYBR Green I Dye, a DNA Polimerase AmpliTaq Gold, dNTPs, e tampões otimizados. Cada amostra foi

realizada em duplicado, com as seguintes condições: 10 min a 95°C para a activação da AmpliTaq Gold, seguidos de um total de 40 ciclos de 15 seg a 95°C e 1 min a 60°C. O número de cópias de cada gene foi normalizado para o gene HPRT e os resultados foram expressos como o número de cópias de cada gene por cada 1000 cópias de HPRT.

### **2.3.10 Análise estatística**

Em todo o estudo usaram-se, no mínimo, triplicados de cada amostra e os dados foram representados como médias e erros-padrão de pelo menos duas experiências independentes. O teste não paramétrico Mann-Whitney U foi utilizado para comparar:

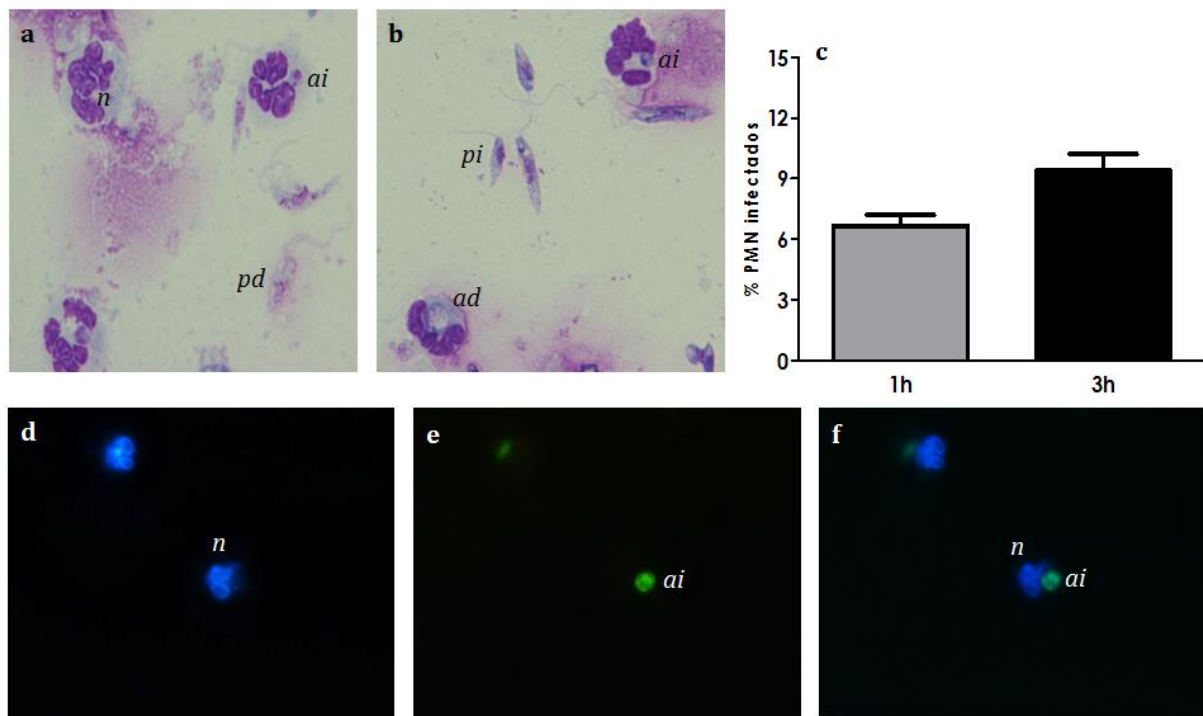
- os níveis de multiplicação do parasita em culturas de *Leishmania* (Leish) vs culturas de *Leishmania* e sobrenadantes de culturas de *Leishmania* e PMN (Leish+sobre) vs culturas de *Leishmania* e PMN (Leish+PMN);
- a produção de ião superóxido e migração de PMN na presença e na ausência do parasita e do também do agente quimiotático (PMN vs PMN+Leish e PMN+fMLP vs PMN+L+fMLP);
- o número de cópias de cada gene por cada 1000 cópias do gene de controlo interno HPRT em PMN (PMN) vs PMN-*Leishmania* (PMN+Leish);
- os valores de absorvância da actividade enzimática de sobrenadantes de PMN vs PMN-*Leishmania* (PMN+Leish);
- a frequência de células das sub-populações de PMN na presença e na ausência do parasita (PMN vs PMN+Leish);
- a frequência de PMN viáveis, necróticos, apoptóticos na fase final e na fase inicial da apoptose, na presença e na ausência do parasita (PMN vs PMN+Leish).

Considerou-se estatisticamente significativo um valor de  $p$  inferior a 0.05 ( $p < 0.05$ ). A análise estatística e os gráficos foram gerados com o programa *Graphpad Prism 5.0* (USA).

## 2.4 Resultados

### **2.4.1 Promastigotas de *L. infantum* são fagocitados por PMN e diferenciaram-se em amastigotas**

A observação por microscopia óptica de lâminas de *citospin* de PMN incubados com parasitas de *L. infantum* durante 1 e 3h, coradas com Giemsa, permitiu constatar que os promastigotas são fagocitados pelos PMN. Os promastigotas incorporados por neutrófilos são capazes de se diferenciar morfológicamente na forma amastigota, caracterizada pela sua forma ovóide e ausência de flagelo (Fig. 2.6a,b). Os promastigotas não fagocitados mantêm a sua estrutura alongada, com um flagelo livre na parte anterior (Fig. 2.6b). Em ambas as formas, a posição e a aparência morfológica do núcleo e cinetoplasto mostravam-se típicas de parasitas viáveis (Fig. 2.6a, b, f). Por outro lado, foram também observados parasitas intra e extracelulares aparentemente destruídos (Fig. 2.6a). A percentagem de infecção dos PMN foi de  $6.7 \pm 1.4\%$  após 1h de co-cultura. Com 3h de incubação a percentagem aumentou para  $9.4 \pm 1.6\%$  (Fig. 2.6c). Em lâminas de *citospin* com PMN coradas com DAPI (Fig. 2.6d) e *L. infantum*-GFP (Fig. 2.6e) foram também observados por microscopia de fluorescência amastigotas intracelulares aparentemente intactos (Fig. 2.6f).

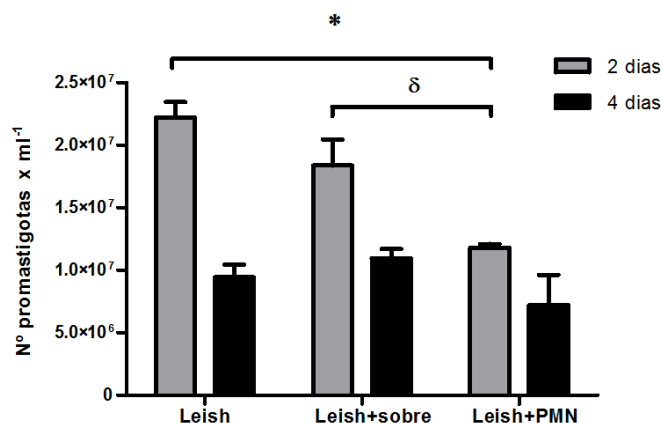


**Figure 2.6.** Fagocitose de *L. infantum* por PMN. Lâminas de *cytospin* de PMN incubados com promastigotas durante 1 e 3h foram observadas por microscopia óptica (ampliação 1000x). Os promastigotas foram fagocitados pelos PMN, transformando-se na forma amastigota (a, b). Alguns parasitas não fagocitados mantêm a sua forma alongada de promastigotas (a, b). Observaram-se também parasitas intra e extracelulares aparentemente intactos e também parasitas degradados (a, b). A percentagem de PMN contendo pelo menos um parasita intracelular foi calculada e no gráfico estão representadas as médias e erros-padrão de pelo menos 6 experiências independentes (c). Foram observadas por microscopia de fluorescência (ampliação 1000x) lâminas de *cytospin* corados com DAPI de PMN (d) incubados com promastigotas-GFP (e) (1000x). As imagens de fluorescência sobrepostas mostram um amastigota intracelular intacto (f). *n*, neutrófilo; *ai*, amastigota intacto; *pd*, promastigota destruído; *pi*, promastigota intacto; *ad*, amastigota destruído.

#### **2.4.2 Os parasitas mantêm a viabilidade mas a multiplicação é inibida pela presença de PMN**

A viabilidade dos amastigotas internalizados por PMN foi investigada após transferir culturas de PMN-*L. infantum* livres de promastigotas extracelulares para meio de Schneider completo e NNN. Verificou-se que os amastigotas intracelulares diferenciaram-se novamente em promastigotas viáveis. No entanto, o contacto prévio com PMN afecta a taxa de multiplicação do parasita. Quando comparada com culturas de promastigotas ( $p=0.0012$ ) e com promastigotas incubados com sobrenadantes de culturas de PMN-*Leishmania* ( $p=0.0043$ ) a multiplicação dos

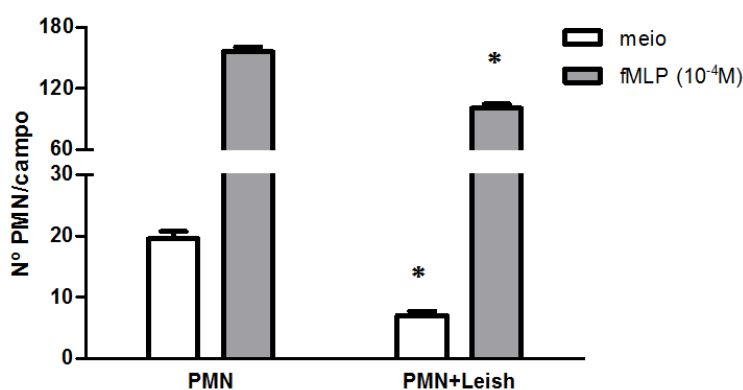
parasitas que estiveram em contacto com PMN foi significativamente inferior com 2 dias de incubação. A diminuição da taxa de multiplicação foi também inferior em promastigotas incubados com sobrenadantes de culturas de PMN-*Leishmania*, porém não há diferenças significativas quando comparado com o nível de multiplicação de promastigotas (Fig. 2.7). Após quatro dias de incubação verificou-se um decréscimo na capacidade de multiplicação do parasita em todas as situações, havendo mesmo uma elevada concentração de promastigotas imóveis, aparentemente inviáveis. Este facto deve-se provavelmente ao esgotamento do meio e/ou falta de espaço de crescimento do parasita nas microplacas de 96 poços. Ao fim de quatro dias de incubação não se verificaram diferenças significativas na multiplicação parasitária nas diferentes culturas.



**Figura 2.7.** Níveis de multiplicação de promastigotas de *L. infantum* na presença de PMN ou de sobrenadantes de co-culturas de PMN-*L. infantum*. Promastigotas incubados ou não com PMN ou com sobrenadantes de co-culturas PMN-*L. infantum* foram transferidos para microplacas com meio Schneider's *Drosophila* completo. Após 2 e 4 dias de incubação a 24°C, o número de promastigotas viáveis foi quantificado em câmara de Neubauer. O crescimento do parasita é expresso como o número de promastigotas móveis por ml. Usaram-se no mínimo triplicados de cada amostra e os dados representam as médias e erros-padrão de duas experiências independentes. O teste não paramétrico Mann-Whitney U foi usado para comparar os níveis de multiplicação do parasita. \* e δ (p<0.05) indicam diferenças significativas quando se compararam culturas de *Leishmania* (Leish) vs culturas de *Leishmania* e sobrenadantes de culturas de *Leishmania* e PMN (Leish+sobre) ou culturas de *Leishmania* e PMN (Leish+PMN).

### **2.4.3 O contacto com parasitas de *L. infantum* inibe a migração de PMN**

Ensaio de quimiotaxia realizados em placas foram executados para compreender a influência do parasita na capacidade de migração dos PMN. O número de PMN que migraram num sistema de Boyden modificado foi quantificado por observação das células num microscópio invertido. Foi verificado que a função quimiotática dos PMN é afectada pela presença de parasitas intracelulares (Fig. 2.8). Quando foram previamente expostos a *L. infantum* o número de PMN que migraram do compartimento superior para o inferior da câmara de Boyden modificada foi significativamente reduzido ( $p < 0.000$ ). Apesar do número de células migrantes ter aumentado em ambas as situações quando se adicionou ao meio o agente quimiotático fMLP, o valor permaneceu comparativamente inferior em culturas de PMN infectados ( $p < 0.000$ ).

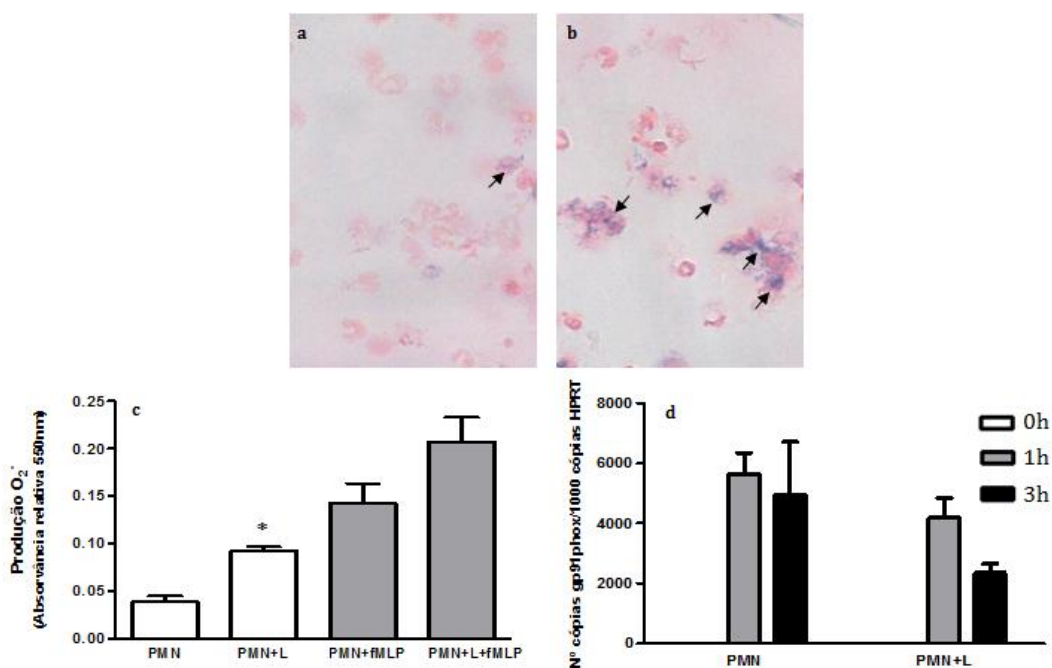


**Figura 2.8.** Migração de PMN na presença de *L. infantum*. Culturas de PMN e PMN+*Leishmania* (PMN+Leish) foram colocadas no compartimento superior de uma câmara de Boyden modificada, separada por uma membrana de 3µm. O compartimento inferior foi preenchido por fMLP (10<sup>-4</sup> M) ou meio RPMI. O número de PMN que migraram para o compartimento inferior foi quantificado em 10 campos de um microscópio óptico invertido com uma ampliação de 1000x. Este ensaio foi executado 3 vezes e os dados representam médias e erros-padrão de triplicados de cada amostra. O teste não paramétrico Mann-Whitney U foi usado para comparar a migração de PMN na presença e na ausência do parasita e também do agente quimiotático. \* ( $p < 0.05$ ) indica diferenças estatisticamente significativas entre PMN vs PMN+Leish e PMN+fMLP vs PMN+L+fMLP.

#### **2.4.4 *L. infantum* induz a produção de ião superóxido mas a expressão da subunidade da enzima NADPH, gp91phox, não sofre alterações**

A produção de  $O_2^-$  por PMN incubados com *L. infantum* foi quantificada espectrofotometricamente através da medição indirecta de depósitos intracelulares de *formazan* formados nos PMN após a redução de NBT. Os depósitos de *formazan* foram também observados por microscopia óptica em culturas de PMN na presença de *Leishmania* e em culturas de PMN. As culturas de PMN apresentaram menor intensidade dos depósitos (Fig. 2.9a) quando comparada com as culturas de PMN-*L. infantum* (Fig. 2.9b). Adicionalmente, verificou-se um aumento significativo ( $p=0.008$ ) na produção de  $O_2^-$  pelos PMN na presença do parasita. A adição de fMLP, um indutor da respiração oxidativa, aos PMN também aumenta, como seria de esperar, a produção de  $O_2^-$ . Porém, apesar de na presença do parasita os valores de absorvância serem ligeiramente superiores, não houve diferenças significativas em relação aos valores apresentados pelos PMN não infectados (Fig. 2.9c).

Uma vez que o sistema da enzima NADPH oxidase intervém na formação de iões superóxido em células fagocíticas, a expressão de gp91phox, um dos componentes da NADPH oxidase, foi quantificada por PCR em tempo real. Não houve diferenças significativas entre os níveis de mRNA de gp91phox em PMN e PMN-*Leishmania*, apesar de haver uma ligeira diminuição dos níveis de expressão gp91phox nos PMN infectados (Fig. 2.9d).

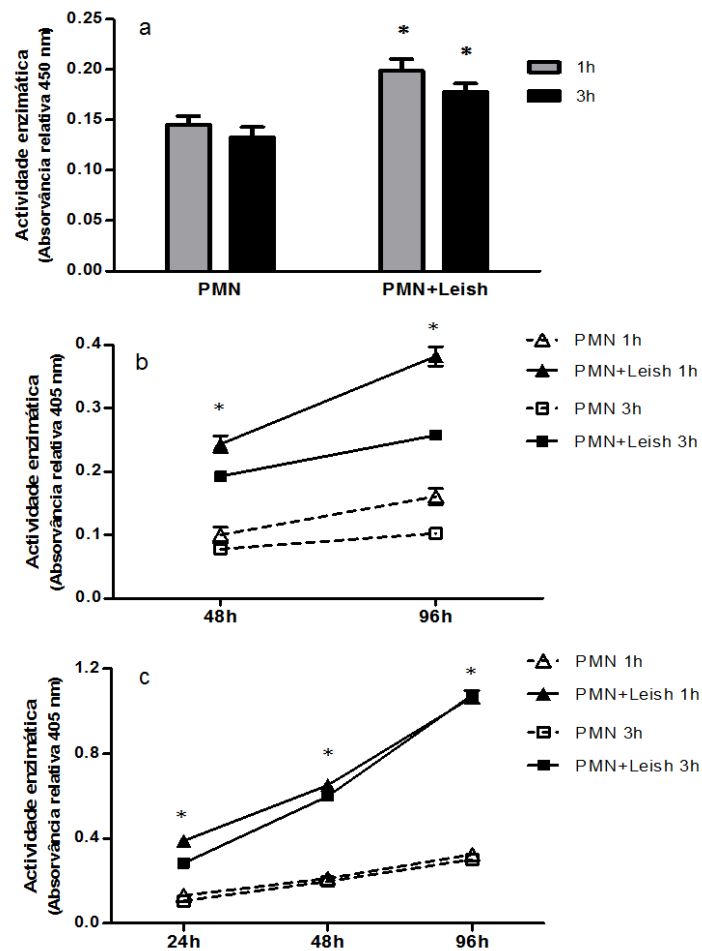


**Figure 2.9.** *Respiração oxidativa e expressão da subunidade gp91phox da NADPH oxidase.* Culturas de PMN e co-culturas de PMN-*Leishmania* foram estimuladas com PMA ou fMLP e incubadas com uma solução de NBT. Após um período de 1h, as células foram contrastadas com safranina O e as partículas de formazan observadas em lâminas num microscópio óptico (1000x). As partículas de formazan geradas pela redução do NBT pelo O<sub>2</sub><sup>-</sup> presentes nas células estão indicadas com setas nas figuras relativas às culturas de PMN (a) e PMN+*Leishmania* (b). Os cristais de formazan foram solubilizados e a absorvância lida a 570 nm (c). A expressão de gp91phox foi quantificada por PCR em tempo real, usando *primers* específicos, SYBR<sup>®</sup> Green I e padrões plasmídicos de cDNA de gp91phox. Os resultados estão representados como o número de cópias de gp91phox por cada 1000 cópias do gene de controlo interno, HPRT. As amostras foram processadas em triplicado e foram representadas médias e erros-padrão de três experiências independentes. O teste não paramétrico Mann-Whitney U foi usado para comparar culturas de PMN (PMN) vs PMN-*Leishmania* (PMN+L) e culturas de PMN com fMLP (PMN+fMLP) vs PMN-*Leishmania* e fMLP (PMN+L+fMLP). \* (p<0.05) indica diferenças estatísticas entre PMN e PMN+L.

#### **2.4.5 Aumento da desgranulação/excitose das enzimas MPO, NE and Cat G na presença de *L. infantum***

A actividade enzimática da MPO e das proteases serínicas, NE e CatG, foi medida espectrofotometricamente em sobrenadantes de neutrófilos incubados durante 1 e 3h com parasitas de *L. infantum*, após a adição de substratos específicos para cada uma das enzimas. A absorvância dos substratos clivados varia directamente com a concentração e actividade das

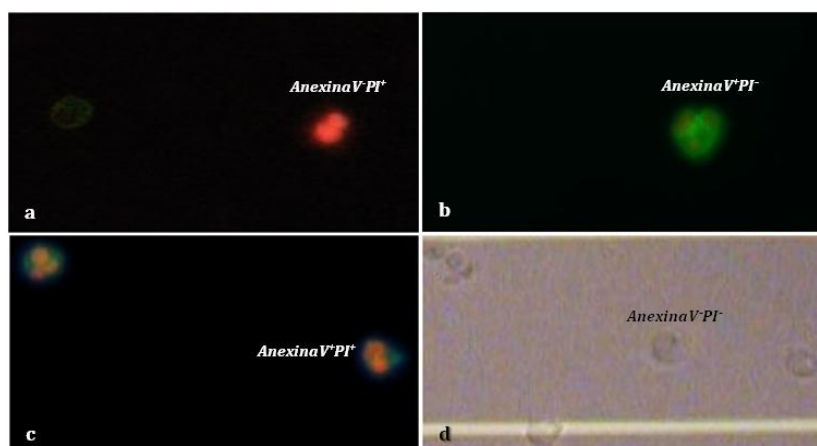
enzimas que são libertadas pelos PMN nos sobrenadantes das culturas. Foram observados níveis significativamente elevados de absorvância para a actividade da MPO, em sobrenadantes de culturas de PMN-*Leishmania* com 1h ( $p=0.0032$ ) e 3h ( $p=0.0043$ ) (Fig. 2.10a) de incubação. Os valores de absorvância para a actividade da NE e CatG, quer para sobrenadantes de culturas de PMN quer de culturas de PMN-*Leishmania*, foram aumentando com o tempo de incubação com o substrato. Ainda assim, foi verificado um aumento significativo da actividade de ambas as proteases ( $p<0.000$ ) em sobrenadantes de culturas de 1 e 3h de PMN-*Leishmania* e em todos os tempos de incubação com o substrato (Fig. 2.10b,c).



**Figura 2.10.** Desgranulação/atividade enzimática de proteínas dos grânulos primários. A actividade enzimática foi quantificada em sobrenadantes de PMN e PMN+*Leishmania* após 1h e 3h de cultura, através de uma reacção colométrica enzima-substrato. Para a MPO usou-se como substrato  $H_2O_2$  conjugado com TMB. A absorvância do TMB oxidado foi medida a 450nm. A actividade enzimática da NE e CatG foi determinada usando substratos péptidicos específicos que são clivados pelas respectivas enzimas, produzindo p-NA colorométrico que é quantificado a 405nm. As reacções foram efectuadas em triplicado para cada situação e os valores de absorvância obtidos após 30 minutos de incubação com o substrato, no caso da MPO (a), e em diferentes tempos de incubação para a NE (b) e CatG (c). Os resultados são expressos como médias e erros-padrão de pelo menos 3 experiências independentes. O teste não paramétrico Mann-Whitney U foi usado para comparar estatisticamente os valores de absorvância de sobrenadantes com 1 e 3h de cultura \* ( $p < 0.05$ ) indica diferenças estatisticamente significantes entre PMN e PMN-*Leishmania* (PMN+Leish).

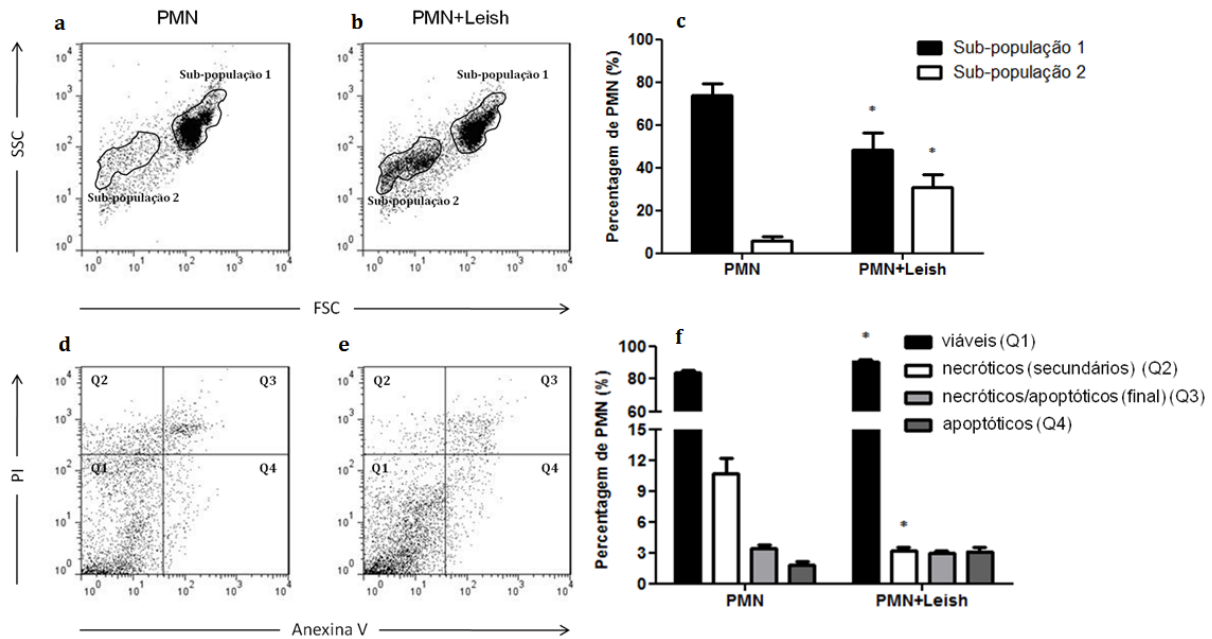
#### **2.4.6 Aumento do número de PMN viáveis e diminuição do tamanho e complexidade de PMN na presença do parasita**

A apoptose é um dos processos espontâneos de morte celular dos PMN. Através da exteriorização de diversos receptores à superfície dos PMN e de mecanismos de sinalização, a célula apoptótica é reconhecida e removida por macrófagos, impedindo ou diminuindo o dano nos tecidos do hospedeiro que pode ocorrer devido ao excesso de resposta inflamatória por parte dos PMN (Elbim & Lizard 2009). À medida que as células se desintegram, a alteração da composição do folheto interno da membrana celular, devido ao aumento da fosfodilserina, permite a ligação de moléculas de anexina V. Assim, a dupla marcação com anexina V-FITC e com o corante vital PI permite diferenciar células apoptóticas da fase inicial (anexina V-FITC<sup>+</sup> PI<sup>-</sup>). Estas células adquirem a cor verde quando observadas no microscópio de fluorescência usando um filtro compatível com a fluoresceína (Fig. 2.11a) e encontram-se representadas no quadrante inferior direito dos *dot plot* (Q4) (Fig. 2.12d,e) após a análise por citometria de fluxo. Na fase final da apoptose, em que as células são permeáveis ao PI, podendo ser consideradas necróticas (anexina V-FITC<sup>+</sup> PI<sup>+</sup>), para além da fluorescência verde as células adquirem igualmente a cor laranja do PI (Fig. 2.11b,c), e estão localizadas no quadrante superior direito (Q3) dos *dot plot* de citometria. (Fig. 2.12d,e). As células negativas para a anexina e PI (anexina V-FITC<sup>-</sup> PI<sup>-</sup>) são consideradas células viáveis e portanto não fluorescem (Fig. 2.11d), aparecendo no quadrante inferior esquerdo dos *dot plots* (Q1) (Fig. 2.12d,e). As células que apenas emitem a cor laranja quando observadas ao microscópio de fluorescência (Fig. 2.11a) são positivas para PI (anexina V-FITC<sup>-</sup> PI<sup>+</sup>), sendo consideradas células necróticas secundárias. Nos *dot-plots* estas células encontram-se representadas no quadrante superior esquerdo (Q2) (Fig. 2.12d,e).



**Figura 2.11.** Detecção *in situ* da apoptose dos PMN na presença de parasitas de *L. infantum*. Observação de PMN ao microscópio de fluorescência (ampliação 1000x) após uma dupla marcação com anexina V-FITC e o corante vital PI (a-c). Observaram-se PMN na fase inicial de apoptose (anexina V-FITC+PI-) (a), na fase final da apoptose ou necróticos (anexina V-FITC+PI+) (b e c) e PMN necróticos (anexina V-FITC-PI+) (a). A imagem (d), observada ao microscópio óptico (ampliação 1000x), representa PMN que não apresentam fluorescência (anexina V-FITC-PI-).

Não foram observadas diferenças significativas em relação a células marcadas com anexina-V entre PMN e PMN cultivados com *L. infantum*, ou seja, a percentagem de células na fase inicial da apoptose e na fase final da apoptose é estatisticamente igual na presença ou na ausência de *Leishmania* (Fig.2.12f). No entanto, houve um aumento significativo das células viáveis ( $p=0.0152$ ) e uma diminuição dos PMN necróticos secundários ( $p=0.0022$ ) (Fig.2.12f). Quando da aquisição dos PMN, verificámos a existência de uma grande variedade morfológica nas células adquiridas. Foram definidas duas grandes sub-populações celulares que variavam em volume (FSC) e complexidade (SSC) celular (Fig. 2.12a,b) e que, na presença ou na ausência do parasita, apresentavam números significativamente diferentes. Grande parte dos PMN adquiridos encontrava-se na sub-população 1 que apresentava um maior volume e complexidade celular. Contudo, quando estas células são incubadas durante 1h com *L. infantum* apresentam uma redução significativa ( $p=0.0411$ ) (Fig. 2.12c). A relação contrária é verificada para as células da sub-população 2, que apresentam um tamanho e complexidade menores, mas que na presença do parasita aumentam drasticamente o seu número ( $p=0.0022$ ) (Fig. 2.12c).

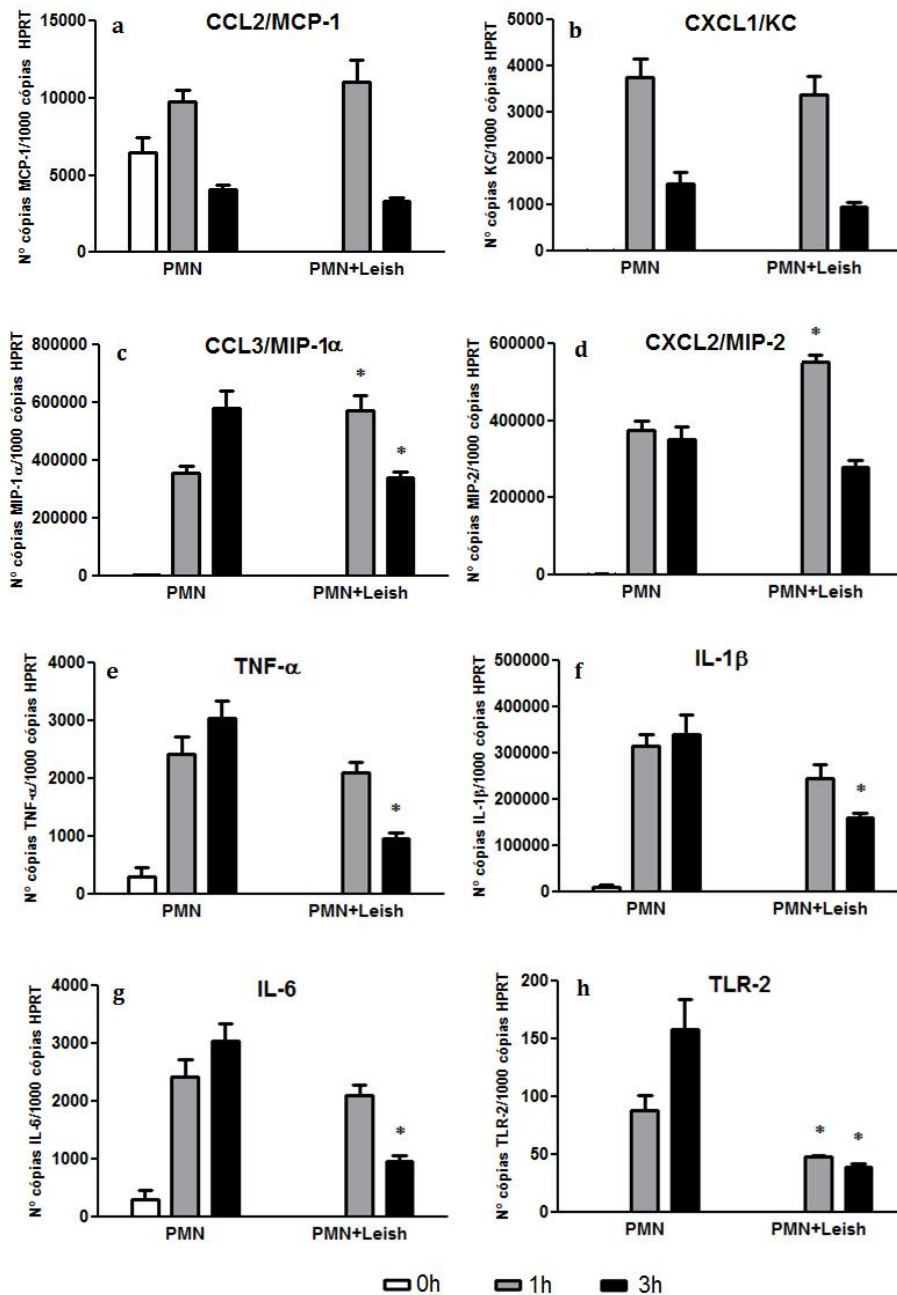


**Figura 2.12.** Fenotipagem dos PMN apoptóticos na presença e na ausência de parasitas de *L. infantum*. Os PMN foram analisados morfológicamente (complexidade e tamanho) após aquisição das células num citómetro de fluxo. (a) e (b) são *dot plots* SSC (*side scatter*)/FCS (*forward scatter*) representativos de duas experiências independentes de culturas de PMN e PMN+*Leishmania* (PMN+Leish). As médias e erros-padrão das percentagens de triplicados de cada subpopulação e de cada experiência foram representadas no gráfico (c). O teste não paramétrico Mann-Whitney U foi usado para comparar as células da sub-população 1 e subpopulação 2 na presença e na ausência do parasita. \* ( $p < 0.05$ ) indica diferenças estatisticamente significativas entre PMN e PMN+Leish. A apoptose foi analisada após uma dupla marcação com anexina V-FITC e o corante vital PI. (d) e (e) são *dot plots* da dupla marcação, representativos de duas experiências independentes de culturas de PMN e PMN+*Leishmania* (PMN+Leish). As médias e erros-padrão das percentagens de triplicados de cada amostra estão representadas no gráfico (f). O teste não paramétrico Mann-Whitney U foi usado para comparar as células viáveis, necróticas, apoptóticas na fase final/necróticas e na fase inicial da apoptose, na presença e na ausência do parasita. \* ( $p < 0.05$ ) indica diferenças estatisticamente significativas entre PMN e PMN+Leish.

### **2.4.7 A presença do parasita regula negativamente a expressão de quimiocinas, citocinas e TLR2**

A indução da produção de citocinas pelos PMN é normalmente precedida pelo aumento e acumulação dos respectivos mRNA (Tamassia *et al.* 2007). Por outro lado, a actividade proteolítica das proteases serínicas dos PMN está envolvida na regulação da bioactividade e libertação de citocinas e quimiocinas, podendo afectar a produção destas proteínas (Pham 2008). Assim, optou-se por medir a expressão de quimiocinas CXC e CC, citocinas pro-inflamatórias e TLR-2 em PMN expostos ao parasita por PCR em tempo real.

Como era esperado, observou-se a expressão residual de todos os genes nos PMN não infectados, logo após o seu isolamento, indicando que as células não estão activadas pelo método de isolamento dos PMN, incluindo a injeção de tioglicolato. A única excepção foi para o gene CCL2/MCP-1 em que as células expressaram uma quantidade considerável de mRNA (6499±909 cópias de CCL2/MCP-1/1000 cópias de HPRT) (Figure 2.13d). A expressão de mRNA das quimiocinas CCL2/MCP-1 e CXCL1/KC revelou-se idêntica nos PMN não infectados e infectados (Fig. 2.13c, d) com 1 e 3h de incubação. Mas por outro lado, os PMN exibiram um aumento significativo de moléculas transcritas de CXCL2/MIP-2 ( $p=0.003$ ) e CCL3/MIP-1 $\alpha$  ( $p<0.000$ ) após de 1h de exposição ao parasita (Fig. 2.13a, b). Porém, após 3h de cultura a expressão de CCL3/MIP-1 $\alpha$  decresceu substancialmente ( $p=0.014$ ) quando comparada com a expressão em culturas de PMN não infectados (Figure 2.13a). Este último padrão foi também observado nas citocinas estudadas (Fig. 2.13e,f,g). Com 3h de exposição ao parasita, o número de cópias de TNF- $\alpha$  ( $p=0.006$ ), IL-1 $\beta$  ( $p=0.004$ ) e IL-6 ( $p<0.000$ ) sofreu acentuada redução quando comparado com o número de cópias de mRNA nos PMN não infectados. A expressão de TLR-2 foi significativamente inferior em PMN infectados e em ambos os tempos de incubação ( $p=0.009$  com 1h e  $p=0.029$  com 3h) (Fig. 2.13h).



**Figura 2.13.** Expressão de quimiocinas, citocinas e TLR-2 gene. A expressão dos genes CCL2/MCP-1 (a), CXCL1/KC (b), CCL3/MIP1- $\alpha$  (c), CXCL2/MIP-2 (d), TNF- $\alpha$  (e), IL-1 $\beta$  (f), IL-6 (g) e TLR-2 (h) foi quantificada por PCR em tempo real em PMN após 1 e 3h de incubação com *L. infantum* usando *primers* específicos, SYBR® Green I e padrões externos de cDNA plasmídico para cada gene. Os dados estão representados como médias e erros-padrão de pelo menos três experiências com três replicados por amostra e expressos como o número de cópias do gene por cada 1000 cópias do gene de controlo interno, HPRT. O teste não-paramétrico Mann-Whitney U foi usado para comparar o número de cópias do gene em PMN vs PMN-*Leishmania*. \* (p<0.05) indica diferenças estatisticamente significativas entre PMN e PMN+Leish

## 2.5 Discussão

PMN são as primeiras células antimicrobianas efectoras que são recrutadas para o local da infecção para fagocitar e destruir os agentes patogénicos. A interação entre microrganismos e PMN tem vindo a suscitar elevado interesse entre os investigadores, uma vez que alguns agentes patogénicos intracelulares conseguem sobreviver no ambiente intra e extracelular hostil criado pelos PMN. *Leishmania ssp.* é um dos microrganismos que tem capacidade de sobreviver dentro dos PMN, pelo que neste capítulo avalia-se a possível interferência de *L. infantum* na actividade funcional de PMN murinos. Apesar dos M $\Phi$  serem as células hospedeiras definitivas de *Leishmania*, os PMN são também células importantes no início da infecção, servindo como células hospedeiras provisórias ou intermediárias do parasita (Santos-Gomes *et al.* 2000, Peters *et al.* 2008, 2009). De facto, ao fim de 3h de incubação a percentagem de PMN infectados não era muito diferente da percentagem de M $\Phi$  peritoneais infectados ( $12.05 \pm 1.4\%$ ), nas mesmas condições (ver ponto 3.4.1 e Fig. 3.4 do capítulo 3). Além disso, alguns parasitas incorporados pelos PMN adquirem a forma morfológica de amastigota, mantendo a sua viabilidade e capacidade de se transformarem *in vitro* novamente em promastigotas. Estes resultados sugerem que apesar de os PMN serem capazes de incorporar promastigotas de *L. infantum*, e de inibirem o seu crescimento, alguns dos parasitas, provavelmente os mais virulentos, sofrem o processo de diferenciação morfológica para a forma intracelular obrigatória, mantendo-se viáveis. Efectivamente, diversos estudos realizados com outras espécies de *Leishmania* demonstraram que o parasita é fagocitado pelos PMN durante o estadio inicial da infecção, transformando-se em amastigota e mantendo a sua viabilidade (Grimaldi *et al.* 1984; Pimenta *et al.* 1987; Wilson *et al.* 1987; Laurenti *et al.* 1996), sugerindo que *Leishmania* possui mecanismos que permitem evitar a sua destruição pela actividade lítica dos PMN, permitindo assim a sua transferência para a célula hospedeira definitiva. Ainda assim, nem todas os parasitas sobreviveram ao contacto com os PMN, já que alguns parasitas extra e intracelulares sofreram

degradação celular. É possível que estes parasitas degradados expressem menos factores de virulência e por isso sejam mais susceptíveis à resposta imunitária dos PMN. De facto, Gueirard *et al.* (2008), mostraram que uma proporção de parasitas de *L. donovani* tinha a capacidade de sobreviver dentro dos PMN, após serem direccionados para fagossomas não-degradativos dependentes do retículo endoplasmático, enquanto que os parasitas destruídos eram encontrados em compartimentos com elevada actividade lítica e dependentes dos lisossomas. A persistência do parasita dentro dos compartimentos não-líticos requiere fosfoglicanos e particularmente lipofosfoglicano (LPG), o fosfoglicano que se encontra em maior quantidade à superfície de *Leishmania* e que é expresso durante a metaciclologénese e portanto, directamente associado à virulência do parasita (Gueirard *et al.* 2008).

A infiltração dos PMN nos tecidos é crucial para a rápida remoção dos microrganismos patogénicos e portanto o recrutamento dos PMN é um elemento chave da resposta imunológica inata. Em resposta a sinais quimiotácticos do hospedeiro e/ou dos agentes patogénicos, que podem incluir factores dos microrganismos, sinalização via receptores *toll-like*, citocinas e quimiocinas, os PMN são mobilizados para o local da infecção (Nathan, 2006; Cascão *et al.* 2009). Contudo, quando expostos a promastigotas de *L. infantum*, a função quimiotáctica dos PMN parece estar regulada negativamente, mesmo quando um segundo estímulo, o indutor quimiotáctico fMLP, está presente. Estes resultados sugerem que o parasita induz fortemente a retenção dos PMN no local da infecção. Outros agentes patogénicos como *Echinococcus granulosus* e *Borrelia burgdorferi*, ou alguns dos seus factores solúveis impedem marcadamente a mobilidade de PMN (Shepherd *et al.* 1991; Hartiala *et al.* 2008). Além disso, a incubação do PMN humanos com a protease gp63 (glicoproteína de 63kDa), factor de virulência que se encontra em grande quantidade na superfície celular de *Leishmania*, e a incubação de PMN caninos com LPG de *L. donovani* causam a redução da actividade quimiotáctica dos PMN (Sørensen *et al.* 1994; Panaro *et al.* 1996). A via pela qual *L. infantum* inibe a migração dos PMN fica por esclarecer mas pode-se assumir que o parasita, moléculas de superfície ou ainda

proteínas libertadas podem estar a bloquear receptores da quimiotaxia ou suprimir a sua expressão nos PMN, prevenindo assim a ligação de moléculas quimiotáticas, como as quimiocinas. Depois de contactar com o parasita, os PMN ficam activados e apresentam um pico de actividade transcripcional que resulta na produção e libertação de mediadores inflamatórios e quimiocinas (Lapinet *et al.* 2000; Scapini *et al.* 2000; Brenier-Pinchart *et al.* 2001). Os mediadores inflamatórios e as quimiocinas modulam as funções dos PMN, mas também estabelecem a ligação entre a resposta inata e a adaptativa e influenciando a actividade subsequente de monócitos/macrófagos, células dendríticas e linfócitos (Kumar & Sharma 2010). Durante a resposta inflamatória, as quimiocinas do tipo CXC, como CXCL2/MIP-2 ou CXCL1/KC, afectam principalmente a mobilização de PMN, enquanto que as quimiocinas do tipo CC, como CCL3/MIP-1 $\alpha$  ou CCL2/MCP-1, apesar de participarem no processo de migração de PMN e linfócitos, atraem predominantemente monócitos/macrófagos (Brenier-Pinchart *et al.* 2001). A adição de CCL2/MCP-1 e CCL3/MIP-1 $\alpha$  a culturas de macrófagos infectados com *L. infantum*, induz a activação celular com produção de óxido nítrico (NO), que é uma molécula leishmanicida importante no controlo do parasita (Brandonisio *et al.* 2002). Recentemente, a quimiocina CCL3/MIP-1 $\alpha$  expressa e produzida pelos PMN foi também associada à mobilização das células dendríticas para a derme de murganhos C57BL/6 infectados com *L. major* (Charmoy *et al.* 2010). No presente estudo, o contacto de PMN murinos com promastigotas de *L. infantum* induziu a expressão inicial (1h) de CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CXCL2/MIP-2, apontando para a activação e recrutamento dos PMN e possivelmente de células dendríticas e monócitos/macrófagos para os locais de infecção. Contudo, a diminuição significativa da expressão de CCL3/MIP-1 $\alpha$ , numa fase posterior (3h), sugere a redução na migração de PMN em resposta ao estímulo inflamatório/infeccioso, privilegiando a necessidade de maximizar funções anti-microbidas, tais como a produção de espécies reactivas de oxigénio ou a libertação do conteúdo dos grânulos. Para além do recrutamento leucocitário, as quimiocinas participam também na activação celular, na imunidade mediada por células e na regulação da diferenciação das células

T *helper* em modelos murinos de leishmaniose cutânea e visceral (Brandonisio *et al.* 2002; Antoniazzi *et al.* 2004; Charmoy *et al.* 2010). Por esta razão, as quimiocinas podem estar sinergeticamente relacionadas com a expressão de algumas citocinas. Por exemplo, as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  libertadas por PMN e M $\Phi$  activados estão relacionados com a síntese de quimiocinas em diferentes tipos de células, incluindo os PMN (Moser *et al.* 2004). Por outro lado, a citocina IL-6, que tem um papel antagónico, pode funcionar como indutor da resposta inflamatória, mas também como um mediador anti-inflamatório, modula a produção de TNF, sendo também estimulada ou inibida pela libertação ou supressão de TNF (Jablonska, 2002). De facto, o presente estudo mostra a inibição da expressão de CCL3/MIP-1 $\alpha$  em PMN com 3h de infecção acompanhada pela diminuição do numero de cópias de mRNA das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6.

Os TLRs são receptores transmembranares que desempenham um papel vital no reconhecimento dos microrganismos (Parker *et al.* 2005). A activação dos PMN através dos TLR está intimamente associada à fagocitose, à produção de superóxido, citocinas e quimiocinas (Hayashi *et al.* 2003; Parker *et al.* 2005). A sinalização de TLR-2 através da via do adaptador MyD88 activa o factor de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) que por sua vez regula a produção de citocinas pró-inflamatórias e outras moléculas envolvidas na resposta inflamatória. Adicionalmente, a expressão de TLR-2 na superfície de PMN é também regulada positivamente por citocinas pró-inflamatórias e factores de crescimento (Kurt-Jones *et al.* 2002). Este receptor parece estar envolvido no reconhecimento de *Leishmania* e na consequente fagocitose deste parasita (Flandin *et al.* 2006). Existem poucos estudos que explorem moléculas específicas ou agonistas do parasita, reconhecidos na via de sinalização de TLR-2, mas sabe-se que o LPG de *Leishmania* activa este receptor em macrófagos de murganhos, células humanas *Natural Killer* (NK) e células mononucleares (Becker *et al.* 2003; de Veer *et al.* 2003; Kavooosi *et al.* 2009). Recentemente, foi observada a activação de células dendríticas e linfócitos B murinos pela proteína SIR2RP1 de *L. infantum* através da sinalização TLR-2 (Silvestre *et al.* 2009). Os nossos

resultados mostraram que a exposição de PMN murinos a parasitas de *L. infantum* parecem causar uma redução específica da expressão deste receptor. A regulação negativa de TLR-2 pode ser associada à diminuição da expressão de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias e à inibição da migração dos PMN, mas também com o aumento da produção de  $O_2^-$ . De facto, foi verificado que o tratamento de PMN com diversos agonistas de TLR-2 e TLR-4 induz a desregulação dos receptores das quimiocinas CXCL1 (KC) e CXCL2 (MIP-2), juntamente com o decréscimo da quimiotaxia e incremento da respiração oxidativa (Sabroe *et al.* 2005). Actividade imunossupressiva foi também observada em PMN murinos infectados com *Toxoplasma gondii*, com a inibição do mecanismo dependente de TLR e a mobilização de TNF- $\alpha$  do interior da célula para a superfície dos PMN (Bennouna *et al.* 2006). De qualquer forma, os resultados deste trabalho não excluem o reconhecimento de *L. infantum* por parte de PMN, através de mecanismos de opsonização, por outros TLRs ou até mesmo através de NLRs.

A NADPH oxidase é um complexo enzimático formado por duas subunidades membranares que formam o citocromo b558 (gp91phox e p22phox) e quatro proteínas do citosol (p47phox, p67phox, p40phox e rac1/rac2). Durante a fagocitose ou no decurso da estimulação celular por factores solúveis as sub-unidades do citosol são translocadas para a membrana celular, estimulando a formação do subcomplexo *phox* activo, ou da enzima activa que reduz o oxigénio em  $O_2^-$ . Posteriormente, o ião superóxido dará origem a outras espécies reactivas de oxigénio anti-microbicidas como o  $H_2O_2$  que juntamente com iões cloreto ( $Cl^-$ ) é convertido pela MPO em ácido hipocloroso (HClO) e cloraminas. Este mecanismo oxidativo dos PMN tem um papel marcante na resposta imunológica inata (Nauseef, 2007). Neste trabalho, a presença de *L. infantum* induziu a exocitose de MPO activa e a produção e libertação de  $O_2^-$  pelos PMN. No entanto, a expressão de gp91phox, uma das subunidades catalíticas da NADPH oxidase, não reflecte o aumento de  $O_2^-$  observado nos PMN. Portanto, é provável que a capacidade dos PMN para produzir esta espécie reactiva de oxigénio pode não estar ligada directamente com a quantidade de expressão e concentração intracelular de gp91phox. Estudos conduzidos em

diferentes células fagocíticas e linhas celulares mielóides humanas também mostraram que a quantidade de gp91phox não estava directamente correlacionada com a capacidade funcional da enzima NADPH. Níveis reduzidos de expressão de gp91phox podiam ser suficientes para suportar a completa actividade da enzima (Yagisawa *et al.* 1996; Inoue *et al.* 2001). Foi também observado um aumento da patogenia em fígados de murganhos *knockout* para gp91phox (gp91phox<sup>-/-</sup>) infectados com a espécie visceral *L. donovani*, sendo esta susceptibilidade transitória, já que os animais acabam por resolver a infecção (Murray & Nathan, 1999). Assim, é possível que mecanismos ainda não descritos estejam envolvidos na regulação da actividade da NADPH oxidase. De qualquer forma, os resultados sugerem que a respiração oxidativa é um mecanismo inato dos PMN activado no início da infecção por *L. infantum* e a NADPH oxidase deverá estar envolvida no processo de activação da respiração oxidativa, embora de uma forma ainda não totalmente esclarecida.

A produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> pelos PMN, observada na presença de *L. infantum*, juntamente com a expressiva exocitose de MPO e proteases serínicas (NE e CatG) apontam para a activação de mecanismos oxidativos e não oxidativos nos PMN, provavelmente com o objectivo de destruir os parasitas que permanecem no ambiente extracelular e os intracelulares. A NE tem um papel relevante na resposta imunológica do hospedeiro durante a infecção por *L. major* já que é um factor essencial na indução e actividade leishmanicida dos macrófagos pelos PMN (Ribeiro-Gomes *et al.* 2007). Esta enzima é também libertada pelos PMN juntamente com outras moléculas granulares e cromatina, fazendo parte da constituição das NETs. Estas estruturas e esta via alternativa de morte celular dos PMN está na origem da destruição de promastigotas extracelulares de *L. amazonensis* (Guimarães-Costa *et al.* 2009). As NETs também dependem da libertação de espécies reactivas de oxigénio que resultam da actividade das enzimas NADPH oxidase e MPO (Fuchs *et al.* 2007; Ermert *et al.* 2009; Patel *et al.* 2010). Porém, um estudo recente com *L. donovani* sugere que a libertação das NETs é independente da produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> pelos PMN e que *L. donovani* consegue evadir-se ao efeito leishmanicida das NETs (Gabriel *et al.*

2010). De qualquer forma os resultados do presente trabalho obtidos através de citometria de fluxo parecem também sugerir a desgranulação e possível formação das NETs. A perda de tamanho e complexidade dos PMN na presença do parasita poderá ser devida à exocitose dos grânulos celulares e este fenómeno, ao contrário do que se podia esperar, não está associado à morte celular por apoptose, uma vez que não há alteração nas células marcadas com anexina-V. Os PMN apoptóticos são normalmente células não funcionais que perdem a capacidade de realizar a respiração oxidativa e de desgranular, devido à falha nos seus mecanismos de activação por diminuição e/ou alteração de receptores inflamatórios à superfície da célula, são reconhecidos e removidos pelos MΦ (Filep & Kebir, 2009; Mikołajczyk *et al.* 2009). De acordo com os resultados expostos, para além da produção e libertação do conteúdo dos grânulos, verificou-se também a diminuição de células necróticas secundárias, ou seja células que poderão ter sofrido morte celular por outro processo diferente da apoptose, nomeadamente a NETose (formação das NETs), mas também por outros mecanismos menos caracterizados como a autofagia, a piroptose ou oncoptose (Cabrini *et al.* 2010), e um aumento significativo de células viáveis. Assim, para que as funções defensivas dos PMN sejam completamente efectivas será necessário o prolongamento da sobrevivência dos PMN. Por outro lado, a indução da extensão do tempo de vida dos PMN tem sido descrita como um mecanismo usado pelos microrganismos intracelulares para manterem o nicho de sobrevivência e até de multiplicação. Este fenómeno foi descrito durante a infecção *in vitro* de PMN com parasitas de *L. major* através da inibição da apoptose espontânea dos PMN, evitando especificamente a transição da pró-caspase-3 à forma enzimaticamente activa, a caspase-3 (Aga *et al.* 2002), uma das enzimas da cascata das caspases responsável pelo processo da morte programada das células. O aumento do tempo de vida dos PMN é acompanhado pela produção da quimiocina MIP-1β (CCL4) (van Zandbergen *et al.* 2004). Apesar de alguns parasitas intra e extracelulares parecerem degradados, provavelmente como consequência da destruição intra-fagossomal, da desgranulação e libertação de metabolitos reactivos de oxigénio e enzimas líticas que podem estar incorporadas nas NETs, os

sobrenadantes de culturas de PMN e *L. infantum*, nos quais poderíamos encontrar estas moléculas, aparentemente não reduzem a multiplicação de promastigotas *in vitro*. Contudo, esta aparente incapacidade dos sobrenadantes de PMN-*Leishmania* afectarem a taxa de multiplicação dos parasitas pode ser decorrente do prévio congelamento (-20°C) dos sobrenadantes. A conservação dos sobrenadantes congelados poderá ter inativado possíveis factores microbicidas dos PMN. Ainda assim, existem amastigotas intracelulares de *L. infantum* que conseguem sobreviver dentro dos PMN. Estes parasitas, que podem reflectir um fenótipo de maior virulência e podem estar dentro de compartimentos não-líticos dos PMN (Gueirard *et al.* 2008), mantêm a capacidade de se transformarem na forma morfológica de promastigota, replicando-se em condições apropriadas de cultura e temperatura.

Resumindo, algumas das características da imunidade inata dos PMN são activadas em contacto com *L. infantum*, porém os parasitas mais aptos parecem poder causar a desregulação de alguns dos principais mecanismos dos PMN que levam à activação de outras populações celulares, comprometendo o vínculo entre a imunidade inata e a adaptativa.

## 2.6 Referências bibliográficas

**Aga E**, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Müller K, Solbach W, Laskay T. 2002. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol.* 169: 898-905.

**Antoniazzi S**, Price HP, Kropf P, Freudenberg MA, Galanos C, Smith DF, Müller I. 2004. Chemokine gene expression in toll-like receptor-competent and -deficient mice infected with *Leishmania major*. *Infect Immun.* 72: 5168-5174.

**Becker I**, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N, González A, Maldonado C, Isibasi A. 2003. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol.* 130: 65-74.

**Bennouna S**, Sukhumavasi W, Denkers EY. 2006. *Toxoplasma gondii* inhibits toll-like receptor 4 ligand-induced mobilization of intracellular tumor necrosis factor alpha to the surface of mouse peritoneal neutrophils. *Infect Immun.* 74: 4274-4278.

**Brandonisio O**, Panaro MA, Fumarola I, Sisto M, Leogrande D, Acquafredda A, Spinelli R, Mitolo V. 2002. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. *Clin Exp Med.* 2: 125-129.

**Brandonisio O**, Panunzio M, Faliero SM, Ceci L, Fasanella A, Puccini V. 1996. Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 53: 95-103.

**Brenier-Pinchart MP**, Pelloux H, Derouich-Guergour D, Ambroise-Thomas P. 2001. Chemokines in host-protozoan-parasite interactions. *Trends Parasitol.* 17: 292-296.

**Bustin SA**, Beaulieu JF, Huggett J, Jaggi R, Kibenge FS, Olsvik PA, Penning LC, Toegel S. 2010. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol Biol.* 11:74.

**Bustin SA**, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 55: 611-622.

**Cabrini M**, Nahmod K, Geffner J. 2010. New insights into the mechanisms controlling neutrophil survival. *Curr Opin Hematol.* 17: 31-35.

**Cascão R**, Rosário HS, Fonseca JE. 2009. Neutrophils: warriors and commanders in immune mediated inflammatory diseases. *Acta Reumatol Port.* 34: 313-326.

**Charmoy M**, Brunner-Agten S, Aebischer D, Auderset F, Launois P, Milon G, Proudfoot AE, Tacchini-Cottier F. 2010. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog* 6: e1000755.

**Chintakuntlawar AV**, Astley R, Chodosh J. 2007. Adenovirus type 37 keratitis in the C57BL/6J mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 781-788.

**Choi HS**, Kim JW, Cha YN, Kim C. 2006. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunoassay Immunochem.* 27: 31-44.

**Denkers EY**, Del Rio L, Bennouna S. 2003. Neutrophil production of IL-12 and other cytokines during microbial infection. *Chem Immunol Allergy.* 83: 95-114.

**de Veer MJ**, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, Handman E, Schofield L. 2003. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol.* 33: 2822-2831.

**Ekman AK**, Cardell LO. 2010. The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology.* 130: 55-63.

**Elbim C**, Lizard G. 2009. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *Cytometry A.* 75: 475-481.

**Ermert D**, Urban CF, Laube B, Goosmann C, Zychlinsky A, Brinkmann V. 2009. Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *J Innate Immun.* 1: 181-193.

**Filep JG**, El Kebir D. 2009. Neutrophil apoptosis: a target for enhancing the resolution of inflammation. *J Cell Biochem.* 108: 1039-1046.

**Flandin JF**, Chano F, Descoteaux A. 2006. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *Eur J Immunol.* 36: 411-420.

**Fuchs TA**, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 176: 231-241.

**Gabriel C**, McMaster WR, Girard D, Descoteaux A. 2010. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *J Immunol.* 185:4319-4327.

**Godinez I**, Haneda T, Raffatellu M, George MD, Paixão TA, Rolán HG, Santos RL, Dandekar S, Tsolis RM, Bäumlér AJ. 2008. T cells help to amplify inflammatory responses induced by *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* in the intestinal mucosa. *Infect Immun* 76: 2008-2017.

**Grimaldi G Jr**, Soares MJ, Moriearty PL. 1984. Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 6: 397-408.

**Gueirard P**, Laplante A, Rondeau C, Milon G, Desjardins M. 2008. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cell Microbiol.* 10: 100-111.

**Guimarães-Costa AB**, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceição-Silva F, Saraiva EM. 2009. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 6748-6753.

**Hayashi F**, Means TK, Luster AD. 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood.* 102: 2660-2669.

**Hartiala P**, Hytönen J, Suhonen J, Leppäranta O, Tuominen-Gustafsson H, Viljanen MK. 2008. *Borrelia burgdorferi* inhibits human neutrophil functions. *Microbes Infect.* 10: 60-68.

**Huang X**, Du W, Barrett RP, Hazlett LD. 2007. ST2 is essential for Th2 responsiveness and resistance to *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 4626-4633.

**Inoue Y**, Yagisawa M, Saeki K, Imajoh-Ohmi S, Kanegasaki S, Yuo A. 2001. Induction of phagocyte oxidase components during human myeloid differentiation: independent protein expression and discrepancy with the function. *Biosci Biotechnol Biochem.* 65: 2581-2584.

**Jablonska E**. 2002. Effect of soluble interleukin-6 receptor alpha and interleukin-6 secreted by polymorphonuclear leukocytes on tumor necrosis factor-alpha expression and its production by peripheral blood mononuclear cells. *Mediators Inflamm.* 11: 325-328.

**Kavoosi G**, Ardestani SK, Kariminia A. 2009. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). *Parasitology.* 136: 1193-1199.

**Kelly JM**, Ward HM, Miles MA, Kendall G. 1992. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 20: 3963-3969.

**Kennedy AD**, DeLeo FR. 2009. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res.*43: 25-61.

**Kumar V**, Sharma A. 2010. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol.* 10: 1325-1334.

**Kurt-Jones EA**, Mandell L, Whitney C, Padgett A, Gosselin K, Newburger PE, Finberg RW. 2002. Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood.* 100: 1860-1868.

**Lapinet JA**, Scapini P, Calzetti F, Pérez O, Cassatella MA. 2000. Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. *Infect Immun.* 68: 6917-6923.

**Laurenti MD**, Corbett CE, Sotto MN, Sinhorini IL, Goto H. 1996. The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host-parasite interaction in hamsters inoculated with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Int J Exp Pathol.* 77: 15-24.

**Lehmann J**, Enssle KH, Lehmann I, Emmendorfer A, Lohmann-Matthes ML. 2000. The capacity to produce IFN-gamma rather than the presence of interleukin-4 determines the resistance and the degree of susceptibility to *Leishmania donovani* infection in mice. *J Interferon Cytokine Res.* 20: 63-77.

**McFarlane E**, Perez C, Charmoy M, Allenbach C, Carter KC, Alexander J, Tacchini-Cottier F. 2008. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun.* 76: 532-541.

**Mikołajczyk TP**, Skrzeczyńska-Moncznik JE, Zarebski MA, Marewicz EA, Wiśniewska AM, Dzieba M, Dobrucki JW, Pryjma JR. 2009. Interaction of human peripheral blood monocytes with apoptotic polymorphonuclear cells. *Immunology* 128: 103-1013.

**Morohoshi Y**, Matsuoka K, Chinen H, Kamada N, Sato T, Hisamatsu T, Okamoto S, Inoue N, Takaishi H, Ogata H, Iwao Y, Hibi T. 2006. Inhibition of neutrophil elastase prevents the development of murine dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Gastroenterol.* 41: 318-324.

**Moser B**, Wolf M, Walz A, Loetscher P. 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* 25: 75-84.

**Murray HW**, Nathan CF. 1999. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J Exp Med.* 189: 741-746.

**Mydel P**, Shipley JM, Adair-Kirk TL, Kelley DG, Broekelmann TJ, Mecham RP, Senior RM. 2008. Neutrophil elastase cleaves laminin-332 (laminin-5) generating peptides that are chemotactic for neutrophils. *J Biol Chem.* 283: 9513-9522.

**Nathan C**. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. 2006. *Nat Rev Immunol.* 6: 173-182.

**Nauseef W**. 2007. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological Reviews.* 219: 88-102.

**Panaro MA**, Puccini V, Faliero SM, Marzio R, Marangi A, Lisi S, Brandonisio O. 1996. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan (LPG) inhibits respiratory burst and chemotaxis of dog phagocytes. *New Microbiol.* 19: 107-112.

**Papayannopoulos V**, Zychlinsky A. 2009. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* 30: 513-521.

**Parker LC**, Whyte MK, Dower SK, Sabroe I. 2005. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol.* 77: 886-92.

**Patel S**, Kumar S, Jyoti A, Srinag BS, Keshari RS, Saluja R, Verma A, Mitra K, Barthwal MK, Krishnamurthy H, Bajpai VK, Dikshit M. 2010. Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation. *Nitric Oxide.* 22: 226-234.

**Peters NC**, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. 2008. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. 321: 970-974.

**Peters NC**, Kimblin N, Secundino N, Kamhawi S, Lawyer P, Sacks DL. 2009. Vector transmission of *Leishmania* abrogates vaccine-induced protective immunity. *PLoS Pathog.* 5: e1000484.

**Pham CT**. 2008. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *Int J Biochem Cell Biol.* 40: 1317-1333.

**Pimenta PF**, Dos Santos MA, De Souza W. 1987. Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Leishmania mexicana amazonensis* and rat neutrophils and eosinophils. *J Submicrosc Cytol.* 19: 387-395.

**Quade MJ**, Roth JA. 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet Immunol Immunopathol.* 58: 239-248.

- Ribeiro-Gomes FL**, Moniz-de-Souza MC, Alexandre-Moreira MS, Dias WB, Lopes MF, Nunes MP, Lungarella G, DosReis GA. 2007. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J Immunol.* 179: 3988-3994.
- Rodrigues OR**, Moura RA, Gomes-Pereira S, Santos-Gomes GM. 2006. H-2 complex influences cytokine gene expression in *Leishmania infantum*-infected macrophages. *Cell Immunol.* 243: 118-126.
- Rosa R**, Rodrigues OR, Marques C, Santos-Gomes GM. 2005. *Leishmania infantum*: soluble proteins released by the parasite exert differential effects on host immune response. *Exp Parasitol.* 109: 106-114.
- Rousseau D**, Demartino S, Ferrua B, Michiels JF, Anjuère F, Fragaki K, Le Fichoux Y, Kubar J. 2001. *In vivo* involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. *BMC Microbiol.* 1:17.
- Sabroe I**, Jones EC, Whyte MK, Dower SK. 2005. Regulation of human neutrophil chemokine receptor expression and function by activation of Toll-like receptors 2 and 4. *Immunology.* 115: 90-98.
- Santos-Gomes GM**, Abranches P. 1996. Comparative study of infectivity caused by promastigotes of *Leishmania infantum* MON-1, *L. infantum* MON-24 and *L. donovani* MON-18. *Folia Parasitol.* 43: 7-12.
- Santos-Gomes GM**, Campino L, Abranches P. 2000. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 952: 193-198.
- Scapini P**, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. 2000. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev.* 177: 195-203.
- Shepherd JC**, Aitken A, McManus DP. 1991. A protein secreted *in vivo* by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol Biochem Parasitol.* 44: 81-90.
- Silvestre R**, Silva AM, Cordeiro-da-Silva A, Ouaisi A. 2009. The contribution of Toll-like receptor 2 to the innate recognition of a *Leishmania infantum* silent information regulator 2 protein. *Immunology.* 128: 484-499.
- Sørensen AL**, Hey AS, Kharazmi A. 1994. *Leishmania major* surface protease Gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils *in vitro*. *APMIS.* 102: 265-271.
- Sukhumavasi W**, Egan CE, Denkers EY. 2007. Mouse neutrophils require JNK2 MAPK for *Toxoplasma gondii*-induced IL-12p40 and CCL2/MCP-1 release. *J Immunol.* 179: 3570-3577.

**Sutmuller RP**, den Brok MH, Kramer M, Bennink EJ, Toonen LW, Kullberg BJ, Joosten LA, Akira S, Netea MG, Adema GJ. 2006. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest.* 116: 485-494.

**Tamassia N**, Cassatella MA, Bazzoni F. 2007. Fast and accurate quantitative analysis of cytokine gene expression in human neutrophils by reverse transcription real-time PCR. *Methods Mol Biol.* 412: 455-471.

**Urban CF**, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A. 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 5:e1000639.

**van Zandbergen G**, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* 173: 6521-6525.

**Velayudham A**, Hritz I, Dolganiuc A, Mandrekar P, Kurt-Jones E, Szabo G. 2006. Critical role of toll-like receptors and the common TLR adaptor, MyD88, in induction of granulomas and liver injury. *J Hepatol* 45: 813-824.

**Wilson ME**, Innes DJ, Sousa AD, Pearson RD. 1987. Early histopathology of experimental infection with *Leishmania donovani* in hamsters. *J Parasitol.* 73: 55-63.

**Yagisawa M**, Yuo A, Yonemaru M, Imajoh-Ohmi S, Kanegasaki S, Yazaki Y, Takaku F. 1996. Superoxide release and NADPH oxidase components in mature human phagocytes: correlation between functional capacity and amount of functional proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 228: 510-516.

**Zaheer A**, Sahu SK, Wu Y, Zaheer A, Haas J, Lee K, Yang B. 2007. Diminished cytokine and chemokine expression in the central nervous system of GMF-deficient mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res.* 1144: 239-247.

## **CAPÍTULO 3**

**Interacção entre neutrófilos e macrófagos**

**durante a infecção *in vitro* com *L. infantum***



### 3.1 Introdução

É amplamente aceite que em modelos murinos de leishmaniose, a activação dos macrófagos (MΦ) por citocinas (por exemplo, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) leva à produção de espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio que são responsáveis pela actividade leishmanicida, sendo a molécula de óxido nítrico (NO) reconhecida como o principal microbicida em MΦ murinos (Bogdan *et al.* 2000; Dey *et al.* 2007). No entanto, sendo *Leishmania* um parasita intracelular obrigatório que se multiplica dentro de MΦ, desenvolveu estratégias que permitem escapar à resposta imunitária inicial, inactivando, estimulando ou inibindo determinados fenótipos imunológicos em diferentes tipos de células do hospedeiro. Algumas das formas de subverter a resposta do hospedeiro é expressar determinadas moléculas de superfície (por exp. LPG, gp63, proteofosfoglicanos, etc.) e/ou libertar enzimas bloqueantes (por exp. ISPs, catepsinas, metaloproteases, etc.) que reprimam a actividade microbicida dos MΦ, nomeadamente ao nível da produção de mediadores citotóxicos como o NO (Olivier *et al.* 2005; Naderer & McConville 2008). O parasita também pode regular a expressão de citocinas e quimiocinas associadas ao recrutamento celular, à resposta inflamatória inicial, à apresentação antigénica e activação dos linfócitos T (Olivier *et al.* 2005; (Naderer & McConville 2008; Stäger *et al.* 2010). A interacção dos PMN com os MΦ, durante o início da infecção por *Leishmania*, pode afectar claramente a possível progressão ou resolução da doença. Evidências demonstram que os PMN são células hospedeiras transitórias de *Leishmania* até os MΦ migrem para o local de infecção, tornando-se então a população celular predominante (Santos-Gomes *et al.* 2000; Peters *et al.* 2008, 2009). Portanto, os PMN podem providenciar um lugar temporário e seguro durante as primeiras horas ou dias de infecção, provavelmente em compartimentos não líticos, que permitem às *Leishmanias* mais virulentas adaptarem-se ao ambiente intracelular de células de mamífero e, simultaneamente escapar à actividade microbicida dos MΦ (Laskay *et al.* 2003; van Zandbergen *et al.* 2004; Gueirard *et al.* 2008). No entanto, estudos recentes mostraram que o contacto de MΦ

infectados com PMN viáveis, provenientes de murganhos com diferentes backgrounds genéticos, aumenta a eficácia da destruição de parasitas de *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *L. amazonensis* (Novais *et al.* 2009; de Souza Carmo *et al.* 2010). No caso da infecção por *L. braziliensis*, a redução da carga parasitária está associada ao contacto directo entre MΦ e PMN com produção de TNF- $\alpha$  e ião superóxido (Novais *et al.* 2009). Enquanto que a destruição de *L. amazonensis* na presença de PMN é independente do contacto MΦ-infectados PMN, mas mediado pela produção de TNF- $\alpha$  e moléculas leishmanicidas como a NE e o factor de activação de plaquetas (de Souza Carmo *et al.* 2010).

## 3.2 Objectivo

Este trabalho teve como objectivo avaliar a influência dos neutrófilos sobre os macrófagos durante a infecção *in vitro* por *L. infantum*, através da análise da capacidade fagocitária, expressão de citocinas, quimiocinas e receptores *toll-like* por macrófagos, e produção de metabolitos do óxido nítrico.

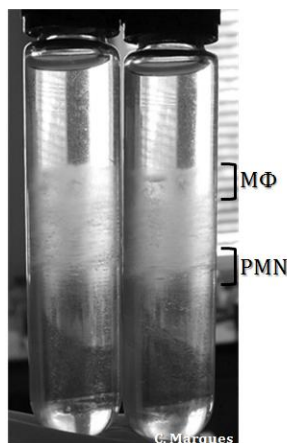
## 3.3 Material e Métodos

### 3.3.1 Animais e parasitas

A escolha dos murganhos e respectiva estirpe, a sua proveniência, manutenção e ainda os procedimentos relativos ao isolamento e manutenção dos parasitas de *L. infantum* e *L. infantum*-GFP estão descritos no ponto 2.3.1 do Capítulo 2 desta dissertação.

### **3.3.2 Isolamento e purificação de neutrófilos e macrófagos**

PMN peritoneais foram isolados e purificados de acordo com o protocolo descrito no ponto 2.3.2 do Capítulo 2. Foi também efectuado em simultâneo o isolamento de MΦ peritoneais. Após a ultracentrifugação (60000xg, 4°C, 1h10min) da suspensão celular peritoneal num gradiente contínuo de Percoll, foi retirada a camada inferior de células que correspondente à região mais rica em PMN e a camada superior de MΦ (Fig. 3.1).



**Figura 3.1.** *Isolamento e purificação de neutrófilos e macrófagos.* O isolamento e purificação celular foram obtidos após ultracentrifugação das células peritoneais num gradiente contínuo de *Percoll* em tubos de policarbonato.

Ambas as populações leucocitárias foram lavadas (300xg, 10 min a 4°C) e ressuspendidas em meio RPMI completo. Regularmente, foi realizada a contagem dos MΦ purificados através da coloração com azul de tripan em câmara de Neubauer para a determinação da viabilidade da população de MΦ. A pureza da população de MΦ foi determinada após citocentrifugação de  $2 \times 10^5$  células em lâminas de vidro, a 55xg durante 4 min (StatSpin® Cytofuge 2) e observação microscópica das lâminas fixadas com metanol (VWR International) e coradas com Giemsa (1:7) (Sigma-Aldrich). Em regra, a viabilidade dos MΦ isolados foi acima de 98%, enquanto a sua pureza foi sempre superior a 90%. Os MΦ ( $5 \times 10^5$  MΦ.ml<sup>-1</sup> num volume final de 300μl) foram

incubados em câmaras de cultura de 0.8 cm<sup>2</sup> associadas a lâminas de permanox (Lab-Tek™ Chamber Slides; Thermo Fisher Scientific, USA), que é um material de plástico que facilita a aderência de MΦ mas não a dos PMN, durante 2h a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, foi efectuada a lavagem das câmaras de cultura com 300μl tampão PBS 1x morno e confirmada a aderência das células ao microscópio óptico invertido.

### **3.3.3 Infecção *in vitro* de neutrófilos com *L. infantum* e co-cultura de macrófagos com neutrófilos infectados. Caracterização da capacidade fagocitária dos macrófagos**

Promastigotas e promastigotas-GFP foram incubados durante 1h em placas de cultura de 96 poços com ou sem 2x10<sup>5</sup> PMN numa proporção de parasita-PMN de 5:1, num volume total de 200μl, a 37°C e numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> como descrito no ponto 2.3.3 do Capítulo 2. O conteúdo de cada poço contendo promastigotas na presença ou não de PMN foi ressuspenso e adicionado às câmaras de cultura contendo MΦ aderidos. A proporção inicial de PMN-MΦ foi de 2:1, enquanto a de *Leishmania*-MΦ foi de 10:1. Em algumas das câmaras de cultura, os MΦ aderidos foram também incubados com culturas de PMN-*Leishmania* em que os parasitas não fagocitados foram previamente removidos por separação magnética em colunas através de uma selecção positiva dos PMN, utilizando o kit comercial *Anti-Ly-6G MicroBead Kit mouse* (Miltenyi Biotec) de acordo com as instruções do fabricante descritas no ponto 2.3.4 do Capítulo 2. As co-culturas MΦ-PMN-*Leishmania* foram incubadas durante 3 e 18 h a 37°C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Terminados os tempos de incubação, os sobrenadantes foram centrifugados a 300g, 10 min a 4°C, para eliminar a maior parte de restos celulares, PMN e promastigotas e congelados a -20°C para posterior quantificação de óxido nítrico. As câmaras de cultura com os MΦ aderidos foram lavadas com PBS 1x morno e algumas das lâminas foram fixadas e coradas com metanol e Giemsa (1:7). A percentagem de MΦ

infectados em co-culturas de MΦ-*Leishmania* e MΦ-PMN-*Leishmania* foi determinada pela contagem dos MΦ infectados e MΦ totais em 10 campos microscópicos (1000x) de pelo menos três experiências independentes. Paralelamente, lâminas de culturas de MΦ e promastigotas-GFP foram fixadas durante 10 min com paraformaldeído (Sigma-Aldrich) a 2% (w/v) em PBS 1x e colocadas com meio de montagem VECTASHIELD® contendo o corante nuclear DAPI (Vector Laboratories). As lâminas foram cobertas com lamelas e a observação foi feita ao microscópio de fluorescência (Axioskop20, Zeiss) para examinação de parasitas intracelulares.

#### **3.3.4 Quantificação da expressão de receptores *toll-like*, quimiocina MCP-1 e citocinas**

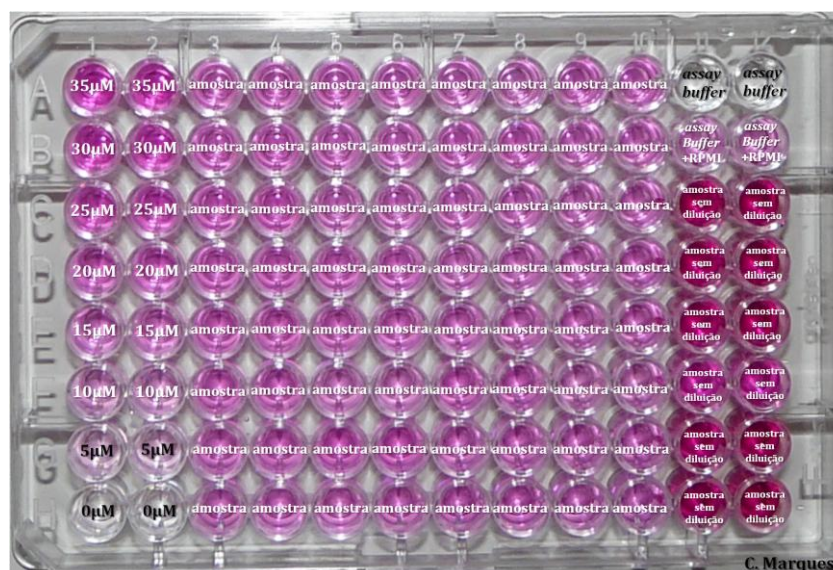
A expressão de mRNA de genes dos receptores *toll-like* (TLR-2 e TLR-4), da quimiocina CCL2/MCP-1 e das citocinas IL-1β, IL-6, TNF-α e TGF-β foi quantificada em MΦ com ou sem *Leishmania* e na presença de PMN incubados ou não com parasitas de *L. infantum*. Foi efectuada a extracção de RNA, síntese de cDNA e clonagem dos genes em vectores plasmídicos para posterior construção de curvas-padrão necessárias à quantificação absoluta da expressão dos respectivos genes por PCR em tempo real. Resumidamente, a extracção de RNA total e síntese de cDNA foi realizada após a lise dos MΦ aderidos nas câmaras de cultura, de acordo com as instruções do fabricante e protocolo previamente resumido no ponto 2.3.9.1 do Capítulo 2. As sequências do *primer forward* (FW - 5' ACA CTA CCA CAA TAA CCT TCC GGC TC 3') e *reverse* (REV - 5' ACA CTA CCA CAA TAA CCT TCC GGC TC 3') do gene TLR-4 foram seleccionadas na bibliografia existente (Huang *et al.* 2006), tendo em conta os critérios referidos no ponto 2.3.9.2 do Capítulo 2 e segundo as MIQE *guidelines* (Bustin *et al.* 2009, 2010). Para corrigir possíveis ineficiências da reacção de transcrição reversa, foi utilizado como controlo endógeno da expressão de genes, HPRT (*housekeeping gene*), como descrito no ponto 2.3.9.2 do Capítulo 2. A partir do cDNA, o gene TLR-4 foi amplificado por PCR convencional usando as concentrações dos reagentes enumerados no ponto 2.3.9.3 do Capítulo 2. As condições para o PCR convencional

foram: um ciclo de desnaturação (5 min a 94°C) seguido de 35 ciclos de desnaturação (30 seg a 94°C); 15 seg a 60°C (temperatura de *annealing*); extensão (30 seg a 72°C) e por fim a extensão final (3 min a 72°C). O produto obtido de 109pb foi purificado e inserido no vector plasmídico pGEM®-T Easy Vector (Promega). A transformação dos fragmentos ligados ocorreu em células competentes. O DNA plasmídico foi extraído, confirmando-se a presença dos genes através de electroforese em gel de agarose após fragmentação do DNA plasmídico recombinante por enzima de restrição. As curvas-padrão do gene TLR-4 foram construídas após a realização de diluições seriadas (de 250pg.µl<sup>-1</sup> a 0.01pg.µl<sup>-1</sup>) de DNA plasmídico e reacções independentes de PCR em tempo real. Finalizando, todo o processo de PCR convencional, purificação e clonagem do produto amplificado em vectores plasmídicos, construção de curvas padrão e PCR em tempo real (iCycler iQ™, Bio-Rad) para a quantificação absoluta da expressão génica de TLR-4 e dos outros genes foram realizados de acordo com a exposição efectuada nos pontos 2.3.9.3 e 2.3.9.4 do Capítulo 2.

### **3.3.5 Quantificação da produção de metabolitos do óxido nítrico**

Tendo em consideração a relevância biológica da libertação de NO, em particular pelos macrófagos durante a infecção por *Leishmania* (Naderer & McConville 2008), o curto tempo de vida e a baixa concentração desta molécula, é um desafio encontrar um bom procedimento técnico que seja capaz de detectar a sua presença. Na célula, após uma série de reacções o NO é metabolizado em iões nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Assim, a melhor forma de quantificar a produção NO é medir estes dois metabolitos. Actualmente, estão disponíveis no mercado vários kits comerciais colorimétricos (versões modificadas do método de Griess) que permitem quantificar os dois iões em diversos fluidos biológicos, mas também em sobrenadantes de culturas *in vitro*.

Neste trabalho, o NO foi estimado em sobrenadantes de culturas de MΦ, MΦ com *Leishmania*, MΦ com PMN e MΦ com PMN e *Leishmania* usando o kit *Nitrite/Nitrate colorimetric assay* (Cayman, USA). Esta metodologia tem como princípio a conversão dos iões  $\text{NO}_3^-$  presentes nos sobrenadantes em iões  $\text{NO}_2^-$  através da enzima nitrato reductase. A posterior adição do reagente de Griess converte  $\text{NO}_2^-$  num composto de cor rosa/roxa (cromóforo azo) (Fig. 3.2). A absorvância deste composto pode ser lida espectrofotometricamente e a partir da construção de uma curvão-padrão com quantidades conhecidas de  $\text{NO}_3^-$  é possível estimar a concentração dos dois metabolitos em cada amostra. Resumidamente, para a preparação da curva-padrão de  $\text{NO}_3^-$ , foi adicionado 100 $\mu\text{l}$  do padrão reconstituído a 900 $\mu\text{l}$  de tampão do ensaio, ficando esta solução a uma concentração de 200 $\mu\text{M}$ . Para obter concentrações finais entre 35 $\mu\text{M}$  e 5 $\mu\text{M}$ , foram efectuadas diluições seriadas do padrão de 1:1.167.



**Figura 3.2.** Ensaio colorimétrico para detecção de metabolitos de NO. Exemplo do resultado final do ensaio que permite quantificar nitritos e nitratos (kit *Nitrite/Nitrate colorimetric assay*, Cayman) em sobrenadantes. Na placa podem-se observar poços com as diluições seriadas do padrão de nitrato (0-35 $\mu\text{M}$ ), poços com as amostras e RPMI diluídos em *tampão de ensaio* (*assay buffer*), poços com *tampão de ensaio* e com amostras sem diluição.

Colocou-se 80µl de cada uma das concentrações numa placa de 96 poços, como está exemplificado na Fig. 3.2. As amostras foram diluídas (1:20) em tampão de ensaio. Dado que o meio RPMI contém níveis relativamente elevados de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, quando adicionado às amostras podem elevar a absorvância para valores maiores de que o limite superior de detecção (os valores de absorvância deverão situar-se entre 0.05 e 1.2), foi também diluído em tampão de ensaio e utilizado como controlo. Tampão de ensaio (200µl), 80µl de RPMI (controlos) e as amostras diluídas foram colocados em duplicado nos poços. O co-factor e a enzima nitrato reductase (10µl) previamente reconstituída em tampão de ensaio foram adicionados a cada amostra, incluindo o padrão. A placa foi incubada durante 2h, findo as quais foram adicionados 50µl do reagente de Griess R1, seguidos de 5µl do reagente de Griess R2. Dez minutos depois a absorvância foi lida a 550 nm num leitor de placas Anthos 2010 (Biochrom). A curva-padrão foi construída e os valores da concentração da soma de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foram extrapolados a partir da seguinte fórmula:

$$[\text{Nitrato+Nitrito}] (\mu\text{M}) = \left( \frac{\text{Absorvância}_{550\text{nm}} - y}{\text{Declive da recta}} \right) \left( \frac{200 \mu\text{l}}{\text{Volume de amostra } (\mu\text{L})} \right) \times \text{diluição}$$

em que *y* é o valor de intersecção da recta-padrão no eixo dos *yy*. Os valores finais foram obtidos após subtrair a cada amostra os valores de concentração de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> das amostras contendo apenas RPMI. Todas as amostras foram examinadas em duplicado, incluindo as diluições do padrão.

### **3.3.6 Análise estatística**

Em todo o estudo foram utilizados no mínimo triplicados (com exceção do ensaio de óxido nítrico em que foram utilizados duplicados) de cada amostra e os dados foram representados como médias e erros-padrão de pelo menos três experiências independentes. O teste não paramétrico Mann-Whitney U foi utilizado para comparar:

- o número de cópias de cada gene por cada 1000 cópias do gene de controlo interno HPRT em MΦ de co-culturas de MΦ (Mo) vs MΦ-*Leishmania* (Mo+Leish), MΦ vs MΦ-PMN (Mo+PMN), MΦ-*Leishmania* vs MΦ-PMN-*Leishmania* (Mo+PMN+Leish) e MΦ-PMN vs MΦ-PMN-*Leishmania*;
- a produção de NO em sobrenadantes de co-culturas de MΦ (Mo) vs MΦ-*Leishmania* (Mo+Leish), MΦ vs MΦ-PMN (Mo+PMN), MΦ-*Leishmania* vs MΦ-PMN-*Leishmania* (Mo+PMN+Leish) e MΦ-PMN vs MΦ-PMN-*Leishmania*;

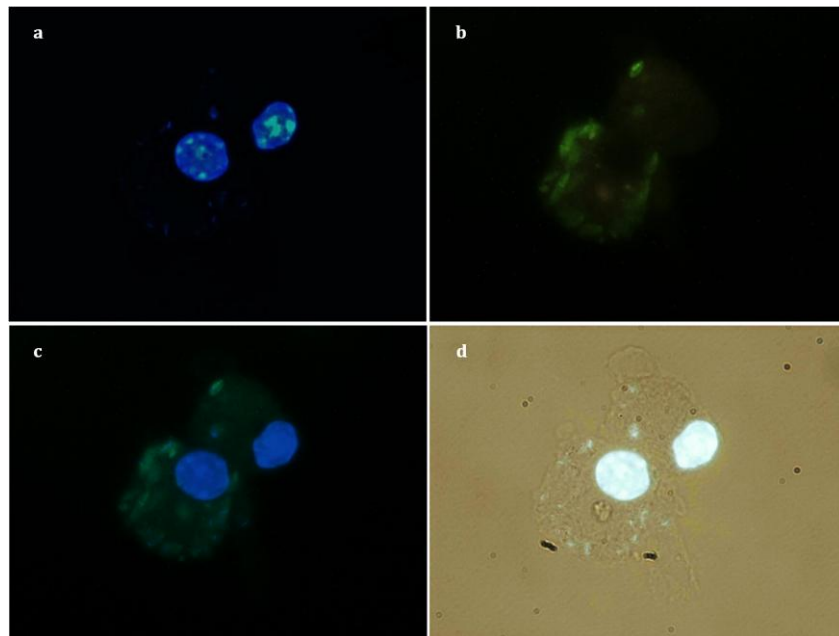
O teste exacto de Fisher foi usado para comparar a percentagem de MΦ infectados com *Leishmania* (Mo+Leish) e MΦ infectados com parasitas previamente incubados com PMN (Mo+PMN+Leish).

Foi considerado estatisticamente significativo um valor de  $p$  inferior a 0.05 ( $p < 0.05$ ). A análise estatística e os gráficos foram gerados com o programa *Graphpad Prism 5.0* (USA).

### 3.4 Resultados

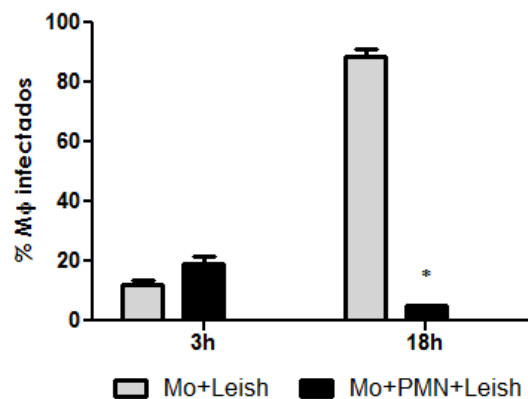
#### 3.4.1 A infecção de macrófagos parece ser influenciada pela presença inicial de neutrófilos previamente infectados com *L. infantum*

A microscopia de fluorescência permitiu verificar qualitativamente a infecção de MΦ peritoneais por promastigotas que expressam GFP e observar parasitas intracelulares (Fig. 3.3a, b, c, d).

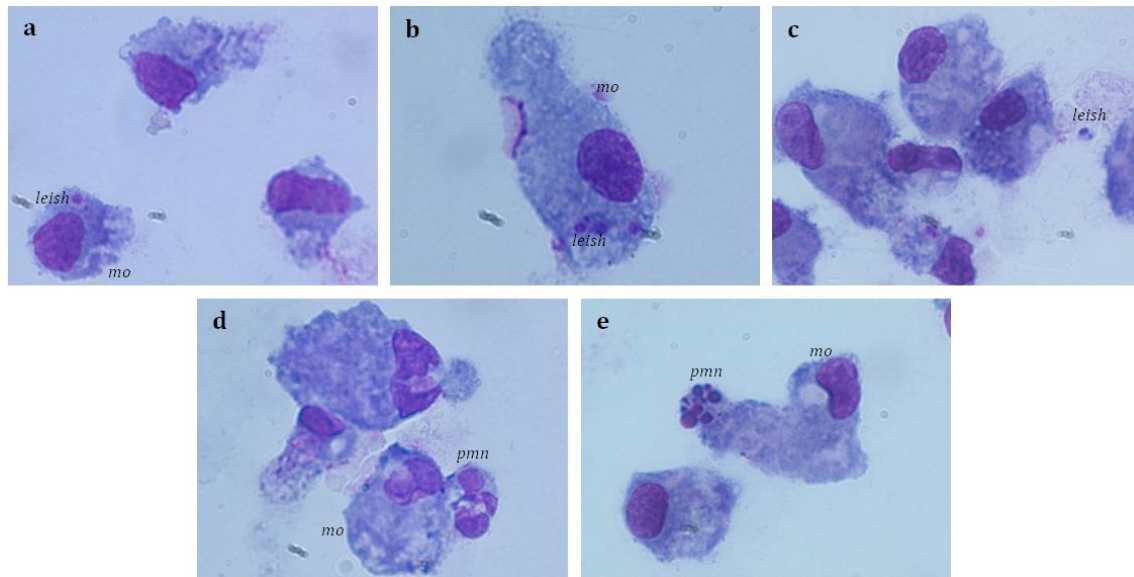


**Figura 3.3.** Infecção de MΦ com parasitas de *L. infantum*. Foram observadas por microscopia de fluorescência (ampliação 1000x) lâminas de MΦ corados com DAPI (a) incubados durante 3h com promastigotas-GFP (b). As imagens de fluorescência (a) e (b) sobrepostas mostram promastigotas intracelulares (c). A imagem (d) representa a observação das células com luz branca (microscopia óptica) e simultaneamente com o filtro de fluorescência compatível com DAPI para se poder examinar os limites celulares em conjunto com os núcleos dos parasitas intracelulares.

A percentagem de MΦ contendo pelo menos um parasita intracelular foi quantificada em lâminas de *citospin* coradas com Giemsa. Com 3h de incubação verificou-se que a percentagem de MΦ infectados que foram colocados em cultura com PMN previamente incubados com *L. infantum* e livres de parasitas não fagocitados foi ligeiramente superior ( $19.19 \pm 2.2\%$ ) aos níveis apresentados por MΦ apenas incubados com o parasita ( $12.05 \pm 1.4\%$ ), não sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p=0.1207$ ) (Fig. 3.4). Com 18h de incubação foi observada uma subida acentuada de percentagem de MΦ infectados na presença apenas do parasita ( $88.49 \pm 2.60\%$ ) e um decréscimo significativo ( $p<0.0001$ ) quando os MΦ são incubados com PMN e *Leishmania* ( $5.11 \pm 0,17\%$ ), (Fig. 3.4).



**Figura 3.4.** Fagocitose de *L. infantum* por MΦ. Foram observadas por microscopia óptica (ampliação 1000x) lâminas coradas com Giemsa de MΦ incubados durante 3h com culturas de PMN previamente expostos a *L. infantum*. A percentagem MΦ contendo pelo menos um parasita intracelular foi calculada e os dados representam as médias e erros-padrão de pelo menos três experiências independentes. O teste exacto de Fisher foi usado para comparar MΦ infectados com *Leishmania* (Mo+Leish) e MΦ infectados com parasitas previamente incubados com PMN (Mo+PMN+Leish). \* ( $p<0.05$ ) indicam diferenças estatisticamente significativas.

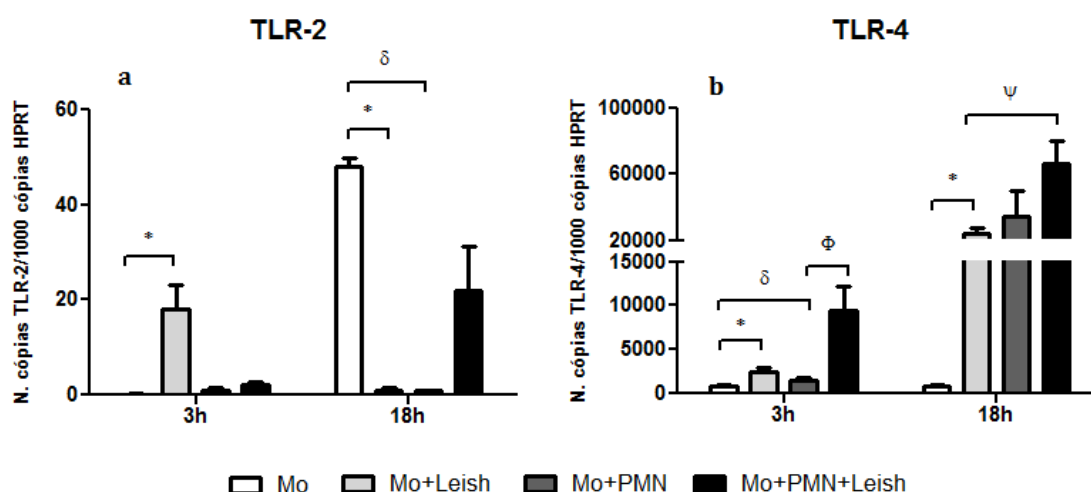


**Figura 3.5.** Co-culturas de MΦ e PMN infectados. Foram observadas por microscopia óptica (ampliação 1000x) lâminas coradas com Giemsa de MΦ incubados durante 3h com culturas de PMN previamente expostos a *L. infantum* mas livres de parasitas extracelulares. As imagens (a) e (b) mostram amastigotas fagocitados/internalizados por MΦ. Na imagem (c) pode ser observado um amastigota extracelular. A imagem (d) e (e) exibem PMN a ser incorporados por macrófagos. *mo*, macrófago; *Leish*, *L. infantum*; *pmn*, neutrófilos.

No intuito de perceber se os parasitas incorporados pelos PMN seriam transferidos para os MΦ e se a infecção macrofágica se mantinha, culturas de PMN e *Leishmania* em que se procedeu à remoção dos promastigotas extracelulares foram incubadas com MΦ durante 3h. A análise microscópica de lâminas coradas com Giemsa permitiu a observação de parasitas dentro dos MΦ (Fig. 3.5a,b) mas também amastigotas extracelulares com o núcleo e cinetoplasto aparentemente intactos (Fig. 3.5c). Foi também observada a aparente fagocitose de PMN por MΦ visivelmente intactos (Fig. 3.5d) e PMN que apresentavam picnose (condensação da cromatina) e cariorrexia nuclear (fragmentação do núcleo picnótico) (Fig. 3.5e), processos que indiciam necrose celular. Contudo, em nenhuma destas situações foram visualizados parasitas no interior dos PMN.

### 3.4.2 A presença inicial de neutrófilos e *L. infantum* afecta a expressão de receptores toll-like em macrófagos

A expressão de mRNA dos receptores celulares TLR-2 e TLR-4 foi quantificada por PCR em tempo real em MΦ após incubação de 3 e 18h com parasitas de *L. infantum* e PMN previamente expostos, ou não, ao parasita. Verificou-se que após 3h de incubação houve uma sobreexpressão significativa de TLR-2 (MΦ vs MΦ+Leish 3h,  $p=0.006$ ) nos MΦ quando na presença do parasita (Fig. 3.6a).



**Figura 3.6.** Expressão de receptores toll-like. A expressão dos genes TLR-2 (a) e TLR-4 (b) foi quantificada por PCR em tempo real em MΦ, após a incubação de 3 e 18h com *L. infantum* ou PMN infectados com *L. infantum*. Usaram-se primers específicos, SYBR® Green I e padrões externos de cDNA plasmídico para cada gene. Os dados são apresentados como médias e erros-padrão de pelo menos três experiências com três réplicas por amostra e expressos como o número de cópias de cada gene por 1000 cópias do gene de controlo interno, HPRT. O teste não-paramétrico Mann-Whitney U foi usado para comparar o número de cópias do gene em MΦ (Mo) vs MΦ-*Leishmania* (Mo+Leish), MΦ vs MΦ-PMN (Mo+PMN), MΦ-*Leishmania* vs MΦ-PMN-*Leishmania* (Mo+PMN+Leish) e MΦ-PMN vs MΦ-PMN-*Leishmania*. Os símbolos \*,  $\delta$ ,  $\psi$ ,  $\phi$  ( $p<0.05$ ) indicam diferenças estatisticamente significativas.

Com 18h de incubação observou-se uma elevação substancial do número de cópias deste gene em MΦ não infectados, havendo diferenças significativas entre este valor e os níveis bastante inferiores obtidos na presença do parasita (*Mo vs Mo+Leish* 18h,  $p=0.001$ ) e na presença de PMN

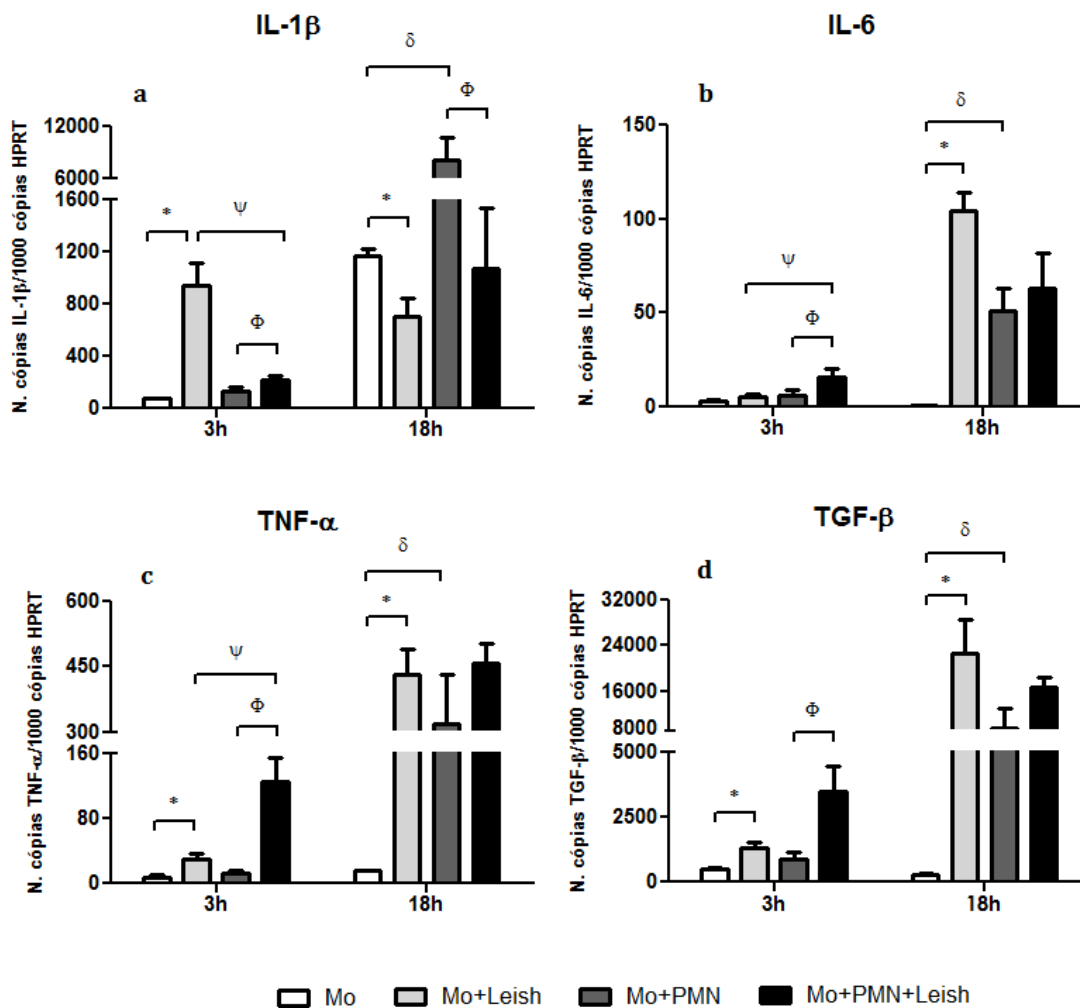
(*Mo vs Mo+PMN* 18h,  $p=0.003$ ) (Fig. 3.6a). A expressão do gene TLR-4 nos MΦ com 3 e 18h de cultura foi superior na presença do parasita (*Mo vs Mo+Leish* 3h,  $p=0.003$ ; 18h  $p=0.006$ ) (Fig. 3.6b). Na presença de PMN, a expressão deste receptor é aumentada, atingindo valores significativos às 3h (*Mo vs Mo+PMN* 3h  $p=0.036$ ). Os níveis de expressão do TLR-4 foram ainda significativamente incrementados quando na presença de PMN-*L. infantum* (*Mo+PMN vs Mo+PMN+Leish* 3h  $p=0.009$ ; *Mo+Leish vs Mo+PMN+Leish* 18h  $p=0.013$ ) (Fig. 3.6b).

Os níveis médios de expressão de TLR-2 foram bastante inferiores aos valores de TLR-4. O mínimo e o máximo registado para o número de cópias de TLR-2 situou-se entre  $0.35\pm 0.34$  (*Mo* 3h) e  $47.82\pm 2.00$  (*Mo* 18h), enquanto que valores situados entre  $788.62\pm 133.05$  (*Mo* 3h) e  $66749.40\pm 13892.82$  (*Mo* 18h) foram observados para o receptor TLR-4 (Fig. 3.6a, b).

### **3.4.3 A presença inicial de neutrófilos e *L. infantum* afecta a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias por macrófagos**

A expressão dos genes de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ) foi quantificada por PCR em tempo real em MΦ após incubação de 3 e 18h com parasitas de *L. infantum* e PMN previamente expostos ou não ao parasita. Nos MΦ incubados durante 3h com o parasita (*Mo vs Mo+Leish* 3h) observou-se aumento da expressão de todas as citocinas (Fig. 3.7a, b, c, d), sendo este aumento significativo para os genes IL-1 $\beta$  ( $p=0.001$ ), TNF- $\alpha$  ( $p=0.004$ ) e TGF- $\beta$  ( $p=0.025$ ) (Fig. 3.7a, c, d). Verificou-se uma redução marcante da expressão do gene IL-1 $\beta$  ( $p=0.001$ ) em MΦ infectados com parasitas previamente incubados com PMN (*Mo+Leish vs Mo+PMN+Leish* 3h) (Fig. 3.7a), contudo o perfil oposto foi observado para as restantes citocinas. Os genes TNF- $\alpha$  ( $p=0.016$ ) e IL-6 ( $p=0.039$ ) evidenciaram aumentos estatisticamente significativos (Fig. 3.7b, c, d). Apesar da ordem de grandeza do número de cópias variar bastante, os níveis de expressão de todos os genes foram significativamente superiores em MΦ cultivados durante 3h com PMN

anteriormente expostos ao parasita (IL-1 $\beta$   $p=0.001$ , IL-6  $p=0.016$ , TNF- $\alpha$   $p=0.003$ , TGF- $\beta$   $p=0.019$ ) quando comparado com a expressão em M $\Phi$  em cultura com PMN (*Mo+PMN* vs *Mo+PMN+Leish* 3h) (Fig. 3.7a, b, c, d).

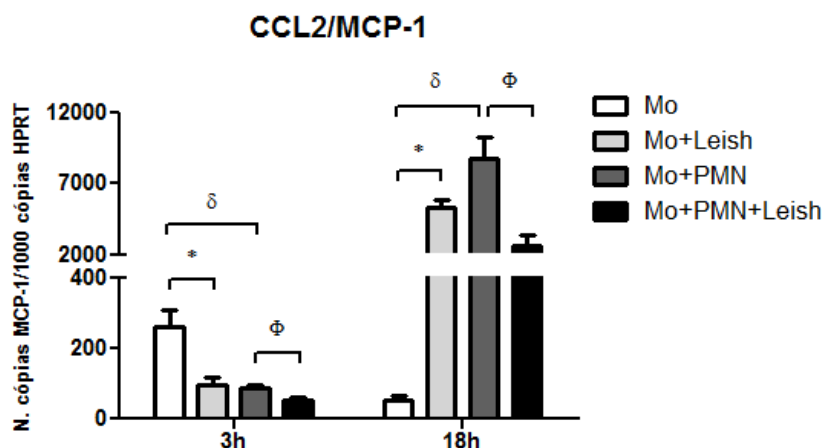


**Figura 3.7.** Expressão de citocinas. A expressão dos genes IL-1 $\beta$  (a), IL-6 (b), TNF- $\alpha$  (c) e TGF- $\beta$  (d) foi quantificada por PCR em tempo real em M $\Phi$ , após a incubação de 3 e 18h com *L. infantum* e PMN expostos a *L. infantum*. Usaram-se primers específicos, SYBR<sup>®</sup> Green I e padrões externos de cDNA plasmídico para cada gene. Os resultados são apresentados como médias e erros-padrão de pelo menos três experiências com três réplicas por amostra expressos como o número de cópias do gene por cada 1000 cópias do gene de controlo interno, HPRT. O teste não-paramétrico Mann-Whitney U foi usado para comparar o número de cópias dos genes em M $\Phi$  (Mo) vs M $\Phi$ -*Leishmania* (Mo+Leish), M $\Phi$  vs M $\Phi$ -PMN (Mo+PMN), M $\Phi$ -*Leishmania* vs M $\Phi$ -PMN-*Leishmania* (Mo+PMN+Leish) e M $\Phi$ -PMN vs M $\Phi$ -PMN-*Leishmania* co-culturas. Os símbolos \*,  $\delta$ ,  $\psi$ ,  $\Phi$  ( $p < 0.05$ ) indicam diferenças estatisticamente significativas.

Após 18h de cultura, a expressão de IL-1 $\beta$  sofreu um decréscimo significativo ( $p=0.039$ ) em M $\Phi$  incubados com *Leishmania* (*Mo vs Mo+Leish 3h*) (Fig. 3.7a). No entanto a relação inversa foi observada para as restantes citocinas, IL-6 ( $p=0.002$ ), TNF- $\alpha$  ( $p=0.004$ ) e TGF- $\beta$  ( $p=0.004$ ) (Fig. 3.7b, c, d). Verificámos também que a presença de PMN induziu aumento substancial da expressão de todas as citocinas (IL-1 $\beta$   $p=0.010$ , IL-6  $p=0.001$ , TNF- $\alpha$   $p=0.002$ , TGF- $\beta$   $p=0.028$ ) em M $\Phi$  (*Mo vs Mo+PMN 18h*) (Fig. 3.7a, b, c, d). Unicamente a expressão de mRNA de IL-1 $\beta$  decresceu significativamente em M $\Phi$  incubados com PMN e *Leishmania* ( $p=0.012$ ) quando comparado com co-culturas de M $\Phi$  e PMN (*Mo+PMN vs Mo+PMN+Leish 18h*) (Fig. 3.7a).

#### **3.4.4 A presença inicial de neutrófilos e *L. infantum* afecta a expressão da quimiocina MCP-1 nos macrófagos**

A expressão da quimiocina CCL2/MCP-1 foi também quantificada por PCR em tempo real em M $\Phi$  após 3 e 18h de incubação com parasitas de *L. infantum* e PMN previamente expostos ou não ao parasita (Fig. 3.8). Com 3h de cultura verificou-se a redução significativa da expressão deste gene ( $p=0.005$ ) em M $\Phi$  cultivados com *Leishmania* (*Mo vs Mo+Leish 3h*). A presença de PMN induziu também um decréscimo ( $p=0.002$ ) dos níveis de expressão nos M $\Phi$ .

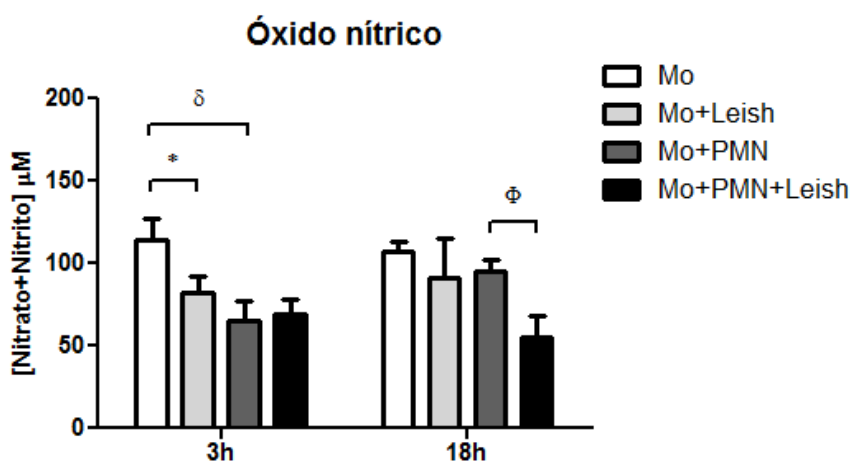


**Figura 3.8.** Expressão da quimiocina CCL2/MCP-1. A expressão do gene CCL2/MCP-1 foi quantificada por PCR em tempo real em MΦ, após a incubação de 3 e 18h com *L. infantum* e PMN infectados com *L. infantum*. Usaram-se *primers* específicos, SYBR® Green I dye e padrões externos de cDNA plasmidico para cada gene. Os resultados estão apresentados como médias e erros-padrão de pelo menos três experiências com três réplicas por amostra e expressos como o número de cópias do gene por cada 1000 cópias do gene de controlo interno, HPRT. O teste não-paramétrico Mann-Whitney U foi usado para comparar o número de cópias do gene em MΦ (Mo) vs MΦ-*Leishmania* (Mo+Leish), MΦ vs MΦ-PMN (Mo+PMN), MΦ-*Leishmania* vs MΦ-PMN-*Leishmania* (Mo+PMN+Leish) e MΦ-PMN vs MΦ-PMN-*Leishmania* co-culturas. Os símbolos \*, δ, Φ ( $p < 0.05$ ) indicam diferenças estatisticamente significativas.

Nos MΦ incubados com PMN anteriormente incubados com *Leishmania*, o número de cópias da quimiocina era significativamente inferior ( $p=0.038$ ) (Mo+PMN vs Mo+PMN+Leish 3h) quando comparado com MΦ cultivados com PMN. O mesmo padrão de expressão ( $p=0.009$ ) foi observado às 18h nos grupos Mo+PMN e Mo+PMN+Leish (Mo+PMN vs Mo+PMN+Leish 18h). Porém, em ambos os casos, os números de cópias de MCP-1 foram bastante mais elevados às 18h ( $p=0.039$ ) do que os números registados com 3h de cultura.

### 3.4.5 A presença de neutrófilos e *L. infantum* afecta os níveis de óxido nítrico

A produção de NO foi analisada em sobrenadantes de culturas de MΦ com 3 e 18h de incubação com parasitas de *L. infantum* e PMN anteriormente cultivados ou não com parasita. A quantificação de iões  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  (Fig. 3.9) foi efectuada através da adaptação do método de Griess. Com 3h de incubação, as culturas de MΦ apresentaram concentrações expressivas de nitritos e nitratos ( $113.73 \pm 13.47 \mu\text{M}$ ). No entanto, a produção decresceu significativamente na presença da *Leishmania* (Mo vs Mo+Leish 3h) ( $p=0.027$ ) e na presença de PMN (Mo vs Mo+PMN 3h) ( $p=0.028$ ). Após 18h de cultura, a concentração de metabolitos de NO manteve-se semelhante à verificada às 3h, mas consideravelmente diminuída nos sobrenadantes de culturas de MΦ com PMN e *Leishmania* ( $p=0.015$ ) quando comparado com culturas de MΦ e PMN (Mo+PMN vs Mo+PMN+Leish 18h).



**Figura 3.9.** Produção de óxido nítrico. A libertação de metabolitos do óxido nítrico,  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ , foi quantificada em sobrenadantes de culturas de MΦ, MΦ com *Leishmania*, MΦ com PMN e MΦ com PMN e *Leishmania* segundo as instruções fornecidas pelo kit comercial *Nitrite/Nitrate colorimetric assay* (Cayman). Os dados estão representados como médias e erros-padrão de três experiências com duas réplicas por amostra. O teste não-paramétrico Mann-Whitney U foi usado para comparar a concentração de iões  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  em sobrenadantes de MΦ (Mo) vs MΦ-*Leishmania* (Mo+Leish), MΦ vs MΦ-PMN (Mo+PMN), MΦ-*Leishmania* vs MΦ-PMN-*Leishmania* (Mo+PMN+Leish) e MΦ-PMN vs MΦ-PMN-*Leishmania* co-culturas. Os símbolos \*, δ, Φ ( $p<0.05$ ) indicam diferenças estatisticamente significativas.

### 3.5 Discussão

Neste trabalho foram analisadas as interações funcionais que se estabelecem entre MΦ e PMN durante a infecção *in vitro* por *L. infantum*. A maioria dos estudos *in vitro* que analisam as relações estabelecidas entre MΦ, PMN e *Leishmania*, utilizaram uma metodologia bastante díspar da utilizada neste estudo. Nesses trabalhos, os MΦ são infectados com o parasita e posteriormente incubados com PMN (Ribeiro-Gomes *et al.* 2004; Ribeiro-Gomes *et al.* 2007; Afonso *et al.* 2008; Novais *et al.* 2009; de Souza Carmo *et al.* 2010). No presente estudo optámos por procurar reflectir a ordem natural dos acontecimentos. Os PMN são as primeiras células a atingir o local de infecção, podendo servir como hospedeiras provisórias ou intermediárias do parasita, e os MΦ que usualmente ocorrem de seguida ao local da infecção, são as células hospedeiras definitivas de *Leishmania* (Santos-Gomes *et al.* 2000; Peters *et al.* 2008, 2009). Assim, em primeiro lugar, os PMN foram expostos aos parasitas e só depois foram incubados com os MΦ. São igualmente escassos os trabalhos que relacionam TLRs e espécies viscerais de *Leishmania* e o seu papel no reconhecimento de moléculas específicas e agonistas. Sabe-se que os receptores TLR-2 e TLR-4 estão envolvidos no reconhecimento de *L. donovani* e *L. infantum* e na consequente activação da resposta imunitária do hospedeiro a (Flandin *et al.* 2006; Chandra & Naik 2008; Silvestre *et al.* 2009). Em 2007, Charmoy *et al.* observaram que durante a infecção de PMN com *L. major* os níveis de mRNA de TLR-2 eram significativamente superiores em murganhos resistentes (C57BL/6) quando comparado com murganhos susceptíveis (BALB/c). No presente estudo, apesar de haver diferenças significativas na expressão de TLR-2 entre diferentes grupos nos dois tempos de incubação, o reduzido número de cópias obtidas para este receptor quando comparada com o número largamente superior de cópias de TLR-4 parece indicar que este último receptor desempenha um papel relevante durante a infecção, nomeadamente no reconhecimento do parasita e possivelmente na posterior activação de mecanismos da via NF-κB, que regula a expressão de quimiocinas e citocinas e a consequente

produção de óxido nítrico e espécies reactivas de oxigénio. Murganhos C57BL/10ScN, que possuem uma deleção homozigótica no gene que codifica o TLR-4, infectados por *L. major* mostraram carga parasitária e produção de citocinas anti-inflamatórias mais elevadas (Kropf *et al.* 2004a, 2004b), comprovando que o TLR-4 contribui para o controlo da infecção. Em 2008, Whitaker *et al.* descreveram que o complexo proteoglicolípido P8, expresso à superfície de amastigotas de *L. pifoni*, interagia com TLR-4 existente na superfície de macrófagos peritoneais e induzia a expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , e a produção de IL-12p40 e TNF- $\alpha$ . Paralelamente, para além da observação *in vivo* de taxas elevadas de carga parasitária em murganhos TLR4 $^{-/-}$ , M $\Phi$  derivados da medula dos murganhos TLR4 $^{-/-}$  exibiram diminuição da produção de TNF- $\alpha$  durante a infecção *in vitro* com amastigotas de *L. pifanoi* (Whitaker *et al.* 2008). No presente trabalho os M $\Phi$  que estiveram em contacto com o parasita, PMN ou PMN previamente incubados com o parasita apresentaram regulação positiva deste receptor, sugerindo a ocorrência de reconhecimento de PAMPs do parasita pelos M $\Phi$ . Porém, a indução da expressão deste receptor pode também ser consequência da interacção entre os M $\Phi$  e os PMN durante a fagocitose destas últimas células ou devido a componentes extracelulares libertados pelos PMN, tais como espécies reactivas de oxigénio ou enzimas granulares, nomeadamente a enzima NE. Apesar de esta enzima não ter sido quantificada neste estudo, os resultados do capítulo 1 mostraram que os PMN, na presença de *L. infantum*, libertam grandes quantidades de NE activa. Por outro lado, esta enzima libertada por PMN reduz *in vivo* a multiplicação de *L. major* e induz a actividade microbicida dos M $\Phi$  de murganhos C57BL/6 através da activação da via TLR-4, com produção de TNF- $\alpha$  (Ribeiro-Gomes *et al.* 2007). A indução de destruição de *L. amazonensis* em macrófagos humanos é também dependente da NE, ocorrendo na presença de PMN necróticos (Afonso *et al.* 2008). Contudo, recentemente, foi demonstrado que um inibidor da peptidase serínica 2 (ISP2) presente na forma amastigota do parasita pode controlar a actividade da NE evitando a activação da cascata de sinalização via TLR-4, promovendo assim a sobrevivência e multiplicação do parasita em M $\Phi$  murinos.

(Eschenlauer *et al.* 2009; Faria *et al.* 2011). No entanto, os nossos dados não sugerem este mecanismo, pois para além da elevada expressão de TLR-4 houve também uma redução expressiva da carga parasitária em MΦ que foram infectados com parasitas previamente incubados com PMN. Estes resultados indicam a possível actividade microbicida dos PMN, mas também dos MΦ, possivelmente activados pela presença dos PMN. Por outro lado, a observação microscópica permitiu verificar que parasitas intracelulares dos PMN são transferidos para os MΦ, permanecendo aparentemente intactos. Contudo, duas questões importantes ficaram por esclarecer: 1. Estes parasitas são transferidos quando os PMN são fagocitados pelos MΦ, como sugerem os autores do modelo do *cavalo de Tróia* (Laskay *et al.* 2003; van Zandbergen *et al.* 2004) ou são libertados pelos PMN após a sua morte e são posteriormente fagocitados por MΦ (Peters *et al.* 2008, 2009)? 2. Estes parasitas aparentemente intactos são capazes de voltar a reinfectar novas células. Ainda assim, se assumíssemos que alguns dos parasitas infectam MΦ utilizando como vector os PMN, seria possível que a elevada expressão da citocina anti-inflamatória TGF-β verificada no início da infecção em MΦ incubados com PMN-*L. infantum* estivesse associada a esta situação. Na verdade, já foi demonstrado que a quantidade de TGF-β libertada por MΦ humanos após a fagocitose de PMN infectados com promastigotas de *L. major* é consideravelmente superior à concentração medida quando os parasitas são directamente incorporados pelos MΦ, indicando a existência de um ambiente anti-inflamatório e imunossupressor benéfico à sobrevivência do parasita (van Zandbergen *et al.* 2004). Porém, no nosso estudo e apesar de os níveis de TGF-β serem superiores na presença de PMN infectados, não houve diferenças significativas em relação a MΦ infectados só com o parasita. O mesmo sucedeu com a percentagem de MΦ infectados às 3h. De acordo com os nossos resultados, na fase inicial da infecção (3h) os MΦ incubados apenas com *L. infantum* também mostraram uma elevada expressão de TGF-β associada à regulação positiva da expressão de mRNA das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-1β, exacerbada pela presença de PMN no caso de TNF-α e IL-6. As citocinas TNF-α, IL-1β e IL-6 são os primeiros mediadores pró-inflamatórios produzidos por MΦ

activados através da via de sinalização dos TLR (Dale *et al.* 2008). Na presença de PMN e *Leishmania* os MΦ exibem um fenótipo misto, com expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias. De facto, durante a leishmaniose visceral humana, ocorre produção de citocinas activadoras de MΦ (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) mas também citocinas imunossupressoras, como a IL-10 (Peruhype-Magalhães *et al.* 2006). As infecções experimentais murinas e caninas com espécies viscerais também mostraram um perfil misto de citocinas inflamatórias e regulatórias (Honoré *et al.* 1998; Rolão *et al.* 2007; Panaro *et al.* 2009; Menezes-Souza *et al.* 2010).

O contacto mais prolongado (18h) com PMN induz o aumento substancial da expressão de citocinas pelos MΦ, indicando que o tempo de contacto entre estas duas células, directamente através de receptores na superfície celular ou por factores inflamatórios libertados pelos PMN (Dale *et al.* 2008; Soehnlein & Lindbom 2010), é um factor a ter em consideração na indução de resposta imunológica mista inflamatória/imunossupressora. Paralelamente, a expressão de todas as citocinas em MΦ, sofre também um aumento na presença do parasita, com excepção da IL-1 $\beta$ . A expressão de mRNA de IL-1 $\beta$  parece ter sido inibida pelo parasita, mesmo com uma incubação prévia com PMN. Sabe-se que LPG de *L. donovani* reprime a transcrição de mRNA de IL-1 $\beta$  em monócitos humanos através do bloqueio de uma sequência promotora (Hatzigeorgiou *et al.* 1996) e estudos *in vivo* conduzidos em murganhos C57BL/6 alimentados com vectores infectados por *L. major* mostraram que o recrutamento e possível apoptose dos PMN nos tecidos onde habitualmente o parasita se multiplica são acompanhados pela diminuição da produção de IL-1 (Peters *et al.* 2008). No presente estudo a inibição da expressão de IL-1 $\beta$  parece não influenciar a fagocitose do parasita pelos MΦ, já que às 18h, apesar da percentagem de MΦ infectados ser notoriamente inferior na presença de PMN do que na sua ausência, não existem diferenças entre a expressão de IL-1 $\beta$  nas duas situações.

As quimiocinas são moléculas preponderantes no recrutamento e infiltração de outras células do sistema imunológico durante o processo infeccioso, podendo induzir um determinado fenótipo inflamatório. A quimiocina da família C-C, CCL2/MCP-1, induz predominantemente o

recrutamento de monócitos e linfócitos T (Brenier-Pinchart *et al.* 2001). Macrófagos infectados com *L. infantum* e *L. donovani* tratados com CCL2/MCP-1 e também com CCL3/MIP-1 $\alpha$  produzem quantidades significativas de NO comparativamente aos não tratados (Bhattacharyya *et al.* 2002; Brandonisio *et al.* 2002). Em monócitos humanos, MCP-1 foi também associada à activação dos mecanismos leishmanicidas e, conseqüente eliminação de amastigotas intracelulares de *L. major* (Ritter & Moll 2000). Adicionalmente, estudos realizados com *L. donovani* mostraram que as quimiocinas CCL2/MCP-1 e CCL3/MIP-1 $\alpha$  conseguem estimular uma resposta imunológica protectora do tipo Th1 e, simultaneamente, inibir a resposta Th2, induzindo a expressão e produção de IL-12p40 e inibição de TGF- $\beta$  e IL-10 por macrófagos peritoneais, aumentando a frequência de células CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  no baço e induzindo a expressão de sintetase indutora de NO (iNOS, do inglês *inducible NO synthetase*) no baço e fígado de animais infectados (Dey *et al.* 2007). Segundo os nossos resultados, no início da infecção, o parasita e os PMN, inibem, de forma independentemente, a expressão da quimiocina MCP-1 em M $\Phi$ . Este decréscimo parece ser potenciado na presença de co-culturas de M $\Phi$  e PMN infectados. Com 18h de incubação, observa-se a relação inversa, ou seja, isoladamente *Leishmania* e os PMN induzem à sobreexpressão desta quimiocina, permanecendo a inibição da expressão desta quimiocina em M $\Phi$  cultivados com PMN infectados.

O óxido nítrico produzido em M $\Phi$  resulta da actividade iNOS e é um importante mediador citotóxico de células efectoras, regulando a multiplicação parasitária (Bogdan *et al.* 2000). No entanto, alguns trabalhos referem que a produção de NO durante a infecção de macrófagos por *Leishmania* pode ser bloqueada (Melby *et al.* 2001; Kima 2007; Goto & Prianti 2009; Sarkar *et al.* 2011). Este facto parece estar de acordo com os resultados obtidos que apontam para a diminuição inicial (3h) da produção de NO por macrófagos na presença de *L. infantum*. Factores dos parasitas *L. donovani* e *L. chagasi*, como a proteína catepsina B, podem induzir directamente a produção de TGF- $\beta$ . Por outro lado, a arginase produzida pelo parasita após activação por um factor inespecífico do hospedeiro que está presente em vários tecidos (factor de crescimento I

insulina-like) inibe a iNOS, e conseqüentemente a produção de NO (Vendrame *et al.* 2007; Goto & Prianti 2009). Foi também descrito que a internalização de amastigotas via receptores PS pelos macrófagos induz a libertação de IL-10 e TGF- $\beta$ , que por sua vez resulta na diminuição da produção de NO (Wanderley *et al.* 2006; Kima 2007). De facto, durante a infecção experimental de leishmaniose visceral notou-se o decréscimo na expressão de mRNA de iNOS associado à deficiente eliminação do parasita e conseqüente progressão da doença (Melby *et al.* 2001). De acordo com os nossos resultados, a presença de PMN parece também induzir a inibição inicial da produção de NO pelos M $\Phi$ , que pode estar associado à fagocitose de algumas destas células via receptores da apoptose, que por sua vez induzem a libertação de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10 ou TGF- $\beta$ , que têm um efeito supressor na actividade dos M $\Phi$  (Mikołajczyk *et al.* 2009; Kobayashi 2010; Soehnlein & Lindbom 2010). Todavia, na presença de PMN previamente expostos ao parasita (3h) a quantidade de NO produzido por M $\Phi$  é sensivelmente igual quando se encontram apenas na presença do parasita ou de PMN. Com 18h de incubação as co-culturas de M $\Phi$ -PMN-*Leishmania* apresentam quantidades de iões NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> significativamente inferiores quando comparadas com culturas de M $\Phi$ -PMN. Este facto, juntamente com o decréscimo da expressão de MCP-1 e IL-1 $\beta$  indicia o desenvolvimento de um fenótipo anti-inflamatória nos M $\Phi$  induzido por parasitas que foram primeiramente expostos aos PMN e que poderá estar relacionado com a prevenção do excesso de inflamação que advém da cooperação entre M $\Phi$  e PMN. No entanto, como a expressão desses genes e a produção de NO não difere entre M $\Phi$ +*Leishmania* e M $\Phi$ +PMN+*Leishmania* é possível que existam outros factores implicados no decréscimo da percentagem de M $\Phi$  infectados em co-culturas M $\Phi$ -PMN-*Leishmania*, nomeadamente a presença de espécies reactivas de oxigénio, que são produzidas em elevadas quantidades pelos PMN na presença do parasita, como ficou demonstrado no Capítulo 2 desta dissertação ou a expressão de outras citocinas que directamente activam factores leishmanicidas nos M $\Phi$ , como é o caso da IL-12.

A elevada concentração de NO presente em sobrenadantes de culturas de MΦ também já foi verificada anteriormente. Segundo Sarkar *et al.* (2011), MΦ de animais saudáveis em cultura tendem a produzir continuamente espécies reactivas de azoto. No entanto, tal como referido neste trabalho MΦ infectados de indivíduos com leishmaniose visceral apresentam níveis de NO significativamente inferiores.

Os resultados apresentados neste capítulo são em algumas situações semelhantes à bibliografia existente, mas noutras bastante discrepantes, e este facto deve-se sobretudo à diferença na metodologia utilizada, mas também por este trabalho ser o primeiro até ao momento que relaciona MΦ e PMN na infecção com a espécie visceral zoonótica *L. infantum*. Resumindo, os nossos resultados sugerem que no contexto da via de estimulação do TLR-4 de MΦ por *L. infantum* ocorre tanto a supressão como a estimulação da inflamação aguda, com modulação da expressão de quimiocinas e citocinas pró e anti-inflamatórias, que é potenciada pela presença inicial de PMN. Este parasita parece também bloquear a produção de NO. No entanto, na fase mais tardia da infecção e na presença de PMN, este bloqueio, associa-se a níveis reduzidos da citocina pro-inflamatória IL-1 $\beta$  e da quimiocina MCP-1, parecendo induzir no hospedeiro um fenótipo anti-inflamatório, possivelmente para evitar o excesso de resposta inflamatória que advém das relações de cooperação que se estabelecem entre PMN e MΦ. No entanto, o decréscimo drástico do parasitismo macrófágico deverá estar associado a outros factores imunológicos que podem ser potenciados pela cooperação dos MΦ com os PMN ou pela interacção dos PMN com o parasita. Todavia, ficam por aprofundar os mecanismos moleculares envolvidos nestas interacções, sendo por isso necessário tentar perceber como *Leishmania* suprime ou estimula a resposta inflamatória dos MΦ, sabendo que essa análise não poderá ser aprofundada sem ter em conta o papel inicial dos PMN.

### 3.5 Referências bibliográficas

**Afonso L**, Borges VM, Cruz H, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, Dutra AN, Clarêncio J, de Oliveira CI, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI. 2008. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc Biol.* 84: 389-396.

**Bhattacharyya S**, Ghosh S, Dasgupta B, Mazumder D, Roy S, Majumdar S. 2002. Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. *J Infect Dis.* 185:1704-1708.

**Bogdan C**, Rölinghoff M, Diefenbach A. 2000. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev.* 173: 17-26.

**Brandonisio O**, Panaro MA, Fumarola I, Sisto M, Leogrande D, Acquafredda A, Spinelli R, Mitolo V. 2002. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. *Clin Exp Med.* 2: 125-129.

**Brenier-Pinchart MP**, Pelloux H, Derouich-Guergour D, Ambroise-Thomas P. 2001. Chemokines in host-protozoan-parasite interactions. *Trends Parasitol.* 17: 292-296.

**Bustin SA**, Beaulieu JF, Huggett J, Jaggi R, Kibenge FS, Olsvik PA, Penning LC, Toegel S. 2010. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol Biol.* 11:74.

**Bustin SA**, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 55: 611-622.

**Chandra D**, Naik S. 2008. *Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. *Clin Exp Immunol.* 154: 224-234.

**Charmoy M**, Megnekou R, Allenbach C, Zweifel C, Perez C, Monnat K, Breton M, Ronet C, Launois P, Tacchini-Cottier F. 2007. *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *J Leukoc Biol.* 82: 288-299.

**Dale DC**, Boxer L, Liles WC. 2008. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood.* 112: 935-945.

**de Souza Carmo EV**, Katz S, Barbiéri CL. 2010. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. PLoS One. 5: e13815.

**Dey R**, Majumder N, Bhattacharyya Majumdar S, Bhattacharjee S, Banerjee S, Roy S, Majumdar S. 2007. Induction of host protective Th1 immune response by chemokines in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice. Scand J Immunol. 66: 671-683.

**Eschenlauer SC**, Faria MS, Morrison LS, Bland N, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, Coombs GH, Lima AP, Mottram JC. 2009. Influence of parasite encoded inhibitors of serine peptidases in early infection of macrophages with *Leishmania major*. Cell Microbiol. 11: 106-120.

**Faria MS**, Reis FC, Azevedo-Pereira RL, Morrison LS, Mottram JC, Lima AP. 2011. *Leishmania* inhibitor of serine peptidase 2 prevents TLR4 activation by neutrophil elastase promoting parasite survival in murine macrophages. J Immunol. 186: 411-422.

**Flandin JF**, Chano F, Descoteaux A. 2006. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. Eur J Immunol. 36: 411-420.

**Gueirard P**, Laplante A, Rondeau C, Milon G, Desjardins M. 2008. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. Cell Microbiol. 10: 100-111.

**Goto H**, Prianti MG. 2009. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 51: 241-246.

**Hatzigeorgiou DE**, Geng J, Zhu B, Zhang Y, Liu K, Rom WN, Fenton MJ, Turco SJ, Ho JL. 1996. Lipophosphoglycan from *Leishmania* suppresses agonist-induced interleukin 1 beta gene expression in human monocytes via a unique promoter sequence. Proc Natl Acad Sci U S A. 93: 14708-14713.

**Honoré S**, Garin YJ, Sulahian A, Gangneux JP, Derouin F. 1998. Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral *Leishmania infantum* infection. FEMS Immunol Med Microbiol. 21: 231-239.

**Huang X**, Du W, McClellan SA, Barrett RP, Hazlett LD. 2006. TLR4 is required for host resistance in *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 47: 4910-4916.

**Kima PE**. 2007. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. Int J Parasitol 37: 1087-1096.

**Kobayashi Y.** 2010. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J Leukoc Biol.* 88: 1157-1162.

**Kropf P,** Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazzi S, Galanos C, Smith DF, Müller I. 2004a. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun.* 72: 1920-1928.

**Kropf P,** Freudenberg N, Kalis C, Modolell M, Herath S, Galanos C, Freudenberg M, Müller I. 2004b. Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNcr mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication. *J Leukoc Biol.* 76: 48-57.

**Laskay T,** van Zandbergen G, Solbach W. 2003. Neutrophil granulocytes-Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* 11: 210-214.

**Melby PC,** Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE. 2001. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol.* 166: 1912-1920.

**Menezes-Souza D,** Corrêa-Oliveira R, Guerra-Sá R, Giunchetti RC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Oliveira GC, Reis AB. 2010. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. *Vet Parasitol.* doi:10.1016/j.vetpar.2010.11.025.

**Mikołajczyk TP,** Skrzeczyńska-Moncznik JE, Zarebski MA, Marewicz EA, Wiśniewska AM, Dzieba M, Dobrucki JW, Pryjma JR. 2009. Interaction of human peripheral blood monocytes with apoptotic polymorphonuclear cells. *Immunology* 128: 103-1013.

**Naderer T & McConville MJ.** 2008. The *Leishmania*-macrophage interaction: A metabolic perspective. *Cell Microbiol.* 10: 301-308.

**Novais FO,** Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A, de Oliveira CI. 2009. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J Immunol.* 183: 8088-8098.

**Olivier M,** Gregory DJ, Forget G. 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev.* 18: 293-305.

**Panaro MA,** Brandonisio O, Cianciulli A, Cavallo P, Lacasella V, Paradies P, Testini G, De Caprariis D, Mitolo V, Otranto D. 2009. Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Parasitology.* 136: 823-831.

**Peruhype-Magalhães V**, Martins-Filho OA, Prata A, Silva Lde A, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, Figueiredo RM, Guimarães-Carvalho SF, Ferrari TC, Van Weyenbergh J, Correa-Oliveira R. 2006. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. Clin Exp Immunol. 146: 124-132.

**Peters NC**, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. 2008. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. Science 321: 970-974.

**Peters NC**, Kimblin N, Secundino N, Kamhawi S, Lawyer P, Sacks DL. 2009. Vector transmission of *Leishmania* abrogates vaccine-induced protective immunity. PLoS Pathog. 5: e1000484.

**Ribeiro-Gomes FL**, Moniz-de-Souza MC, Alexandre-Moreira MS, Dias WB, Lopes MF, Nunes MP, Lungarella G, DosReis GA. 2007. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. J Immunol. 179: 3988-3994.

**Ribeiro-Gomes FL**, Otero AC, Gomes NA, Moniz-De-Souza MC, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, Calich VL, Coutinho SG, Lopes MF, DosReis GA. 2004. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. J Immunol. 172: 4454-4462.

**Ritter U**, Moll H. 2000. Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of *Leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. Eur J Immunol. 30: 3111-3120.

**Rolão N**, Cortes S, Gomes-Pereira S, Campino L. 2007. *Leishmania infantum*: mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. Exp Parasitol. 115: 270-276.

**Santos-Gomes GM**, Campino L, Abranches P. 2000. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 952: 193-198.

**Sarkar A**, Saha P, Mandal G, Mukhopadhyay D, Roy S, Singh SK, Das S, Goswami RP, Saha B, Kumar D, Das P, Chatterjee M. 2011. Monitoring of intracellular nitric oxide in leishmaniasis: its applicability in patients with visceral leishmaniasis. Cytometry A. 79: 35-45.

**Silvestre R**, Silva AM, Cordeiro-da-Silva A, Ouaisi A. 2009. The contribution of Toll-like receptor 2 to the innate recognition of a *Leishmania infantum* silent information regulator 2 protein. Immunology. 128: 484-499.

**Stäger S**, Joshi T, Bankoti R. 2010. Immune evasive mechanisms contributing to persistent *Leishmania donovani* infection. *Immunol Res.* 47: 14-24.

**Soehnlein O**, Lindbom L. 2010. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 10: 427-439.

**van Zandbergen G**, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* 173: 6521-6525.

**Vendrame CM**, Carvalho MD, Rios FJ, Manuli ER, Petitto-Assis F, Goto H. 2007. Effect of insulin-like growth factor-I on *Leishmania amazonensis* promastigote arginase activation and reciprocal inhibition of NOS2 pathway in macrophage *in vitro*. *Scand J Immunol.* 66: 287-296.

**Wanderley JL**, Moreira ME, Benjamin A, Bonomo AC, Barcinski MA. 2006. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol.* 176: 1834-1839.

**Whitaker SM**, Colmenares M, Pestana KG, McMahon-Pratt D. 2008. *Leishmania pifanoi* proteoglycolipid complex P8 induces macrophage cytokine production through Toll-like receptor 4. *Infect Immun.* 76: 2149-2156.

## **CAPÍTULO 4**

**Papel dos neutrófilos durante a fase  
inicial da infecção *in vivo* por *L. chagasi***



## 4.1 Introdução

O papel dos PMN durante as infecções *in vivo* com *Leishmania* spp. tem sido, nos últimos anos, alvo de grande interesse da comunidade científica, mas está também envolto em controvérsia, uma vez que já foram atribuídas a esta população celular funções protectoras mas também de responsabilidade na progressão da doença. Uma das estratégias para explorar o impacto destas células durante a infecção com *Leishmania* é depletar os PMN com anticorpos específicos. Até ao momento, apenas três anticorpos monoclonais, RB6-8C5, NIMP-R14 e 1A8, foram descritos e utilizados na depleção *in vivo* de PMN. Infelizmente, nenhum deles é comercializável e apenas dois (RB6-8C5, NIMP-R14) têm sido extensivamente utilizados em estudos de infecção com várias espécies de *Leishmania* e em murganhos com diferentes características genéticas (Lima *et al.* 1998; Tacchini-Cottier *et al.* 2000; Rousseau *et al.* 2001; Ribeiro-Gomes *et al.* 2004; Chen *et al.* 2005; McFarlane *et al.* 2008; Peters *et al.* 2008, 2009; Novais *et al.* 2009; Thalhoffer *et al.* 2011). A função prejudicial dos PMN foi identificada em estudos conduzidos em murganhos C57BL/6 depletados. Trabalhos efectuados com *L. major* demonstraram um decréscimo significativo no número de parasitas no local da infecção associado a uma regulação positiva da citocina pró-inflamatória IL-1 e activação celular mediada por linfócitos (Peters *et al.* 2009). Na estirpe de murganho susceptível, BALB/c, infectada por *L. major*, a depleção dos PMN reduziu a produção de IL-4, preveniu o aparecimento de lesões cutâneas e diminuiu a carga parasitária (Tacchini-Cottier *et al.* 2000). Pelo contrário, outros autores salientam o papel protector e imunomodulatório dos PMN na fase inicial da infecção por *L. major*, já que a depleção induz à acumulação de mRNA de IL-4 em murganhos BALB/c (Chen *et al.* 2005). A exacerbação da patologia (lesões e carga parasitária) foi também observada em murganhos resistentes C57BL/6 (Lima *et al.* 1998; Ribeiro-Gomes *et al.* 2004; Chen *et al.* 2005) e susceptíveis BALB/c infectados com *L. braziliensis* (Novais *et al.* 2009). Em estudos com *L. donovani* e BALB/c depletados foi observado aumento do número de parasitas e desenvolvimento de uma resposta Th2

(McFarlane *et al.* 2008), sugerindo que os PMN favorecem o controlo da leishmaniose visceral. Na realidade, a depleção dos PMN, durante a fase aguda de murganhos BALB/c infectados com *L. infantum* levou ao abrandamento da remoção de promastigotas extracelulares no local da infecção (Thalhofer *et al.* 2011) e ao aumento da densidade parasitária no baço (Rousseau *et al.* 2001). No entanto, na fase crónica (30 dias) não houve qualquer efeito nos órgãos viscerais do hospedeiro como consequência da depleção (Rousseau *et al.* 2001).

## 4.2 Objectivo

Este trabalho teve como finalidade avaliar *in vivo* o papel dos PMN durante o início da infecção experimental por *L. chagasi*, através da imunofenotipagem das populações leucocitárias recrutadas para o local da inoculação dos parasitas, da determinação da presença do parasita e da quantificação da expressão de citocinas em órgãos internos após depleção de PMN.

Embora com nomes específicos diferentes, não foram encontradas diferenças imunológicas, moleculares e bioquímicas entre *L. infantum* (Velho Mundo) e *L. chagasi* (Novo Mundo) (Maurício *et al.* 2000; Coelho-Finamore *et al.* 2011), sendo actualmente consideradas uma única espécie de *Leishmania*. Neste capítulo optámos por utilizar a designação *L. chagasi*, já que utilizámos uma estirpe brasileira.

## 4.3 Material e Métodos

### 4.3.1 Animais e parasitas

Neste estudo foram utilizados murganhos (*Mus musculus*) machos com 6 a 8 semanas, pertencentes à estirpe C57BL/6, provenientes do biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório em São Paulo, Brasil. Os

animais foram mantidos no Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM), FIOCRUZ, Salvador, Brasil, sob condições climáticas e de nutrição controladas e adequadas. Todos os procedimentos em que foram utilizados animais tiveram aprovação prévia do Comité de Ética local relativo ao bem-estar e utilização de animais de experiência (CEUA-CPqGM/FIOCRUZ). Para o estudo foram usados promastigotas virulentos de *L. chagasi* (MHOM/BR/00/BA262) recolhidos na fase de crescimento estacionária de sub-culturas com menos de quatro passagens (Santos-Gomes & Abranches 1996). Os promastigotas foram mantidos em meio líquido Schneider (LGC Biotecnologia, Brasil) suplementado com 100 U.ml<sup>-1</sup> penicilina, 100 mg.ml<sup>-1</sup> estreptomicina (Invitrogen, USA) e 10% de FBS (Invitrogen).

#### **4.3.2 Preparação de antígeno solúvel de *L. chagasi***

O antígeno (Ag) solúvel foi preparado a partir de culturas de promastigotas de *L. chagasi* com concentração superior a 10<sup>7</sup> parasitas.ml<sup>-1</sup>. Os promastigotas foram lavados duas vezes em tampão PBS 1x (LGC Biotecnologia) a 1800xg, durante 15 min a 4°C. O sedimento foi ressuspenso num ml de PBS 1x. O processo de lise celular foi efectuado através de uma série de 10 ciclos de congelações a -20°C e descongelações à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada (1800xg, 15 min, 4°C) e o sobrenadante com o conteúdo proteico solúvel foi quantificado no espectrofotómetro *NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific). O Ag foi conservado a -20°C até à sua utilização e quando necessário, quantificado e diluído em RPMI (LGC Biotecnologia) 10% FBS para uma concentração de 20µg.ml<sup>-1</sup>.

### **4.3.3 Constituição dos grupos de animais, depleção de PMN, infecção experimental e recolha de órgãos**

Foram definidos três grupos experimentais, o grupo controlo de animais saudáveis (S), o grupo de animais infectados com *L. chagasi* (I) e o grupo de animais depletados com anticorpo RB6-8C5 e infectados com *L. chagasi* (DI). Cada grupo de murganhos foi constituído por quatro animais. Os animais do grupo DI foram injectados intraperitonealmente (i.p.) com 250µg do anticorpo RB6-8C5 diluído em 100µl de solução salina fisiológica (NaCl 0.9%). Este anticorpo, gentilmente cedido pelo Prof. Doutor Jorge Pedrosa (Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde, Universidade do Minho), liga-se a uma proteína da superfície dos granulócitos (Gr1 ou Ly-6G/Ly-6C). Segundo Chen *et al.* (2005), o tratamento com esta dose de anticorpo induz uma acentuada neutropenia em murganhos BALB/c e C3H/HeJ que se mantém durante 5 dias. O grupo I recebeu como controlo uma injeção i.p. de 25µg de imunoglobulina IgG (*purified rat IgG2a, κ isotype control*, Biolegend, USA). Dezoito horas após a depleção, os grupos DI e I foram infectados por via intradérmica na derme de ambas as orelhas com  $5 \times 10^6$  promastigotas de *L. chagasi* na fase estacionária, previamente diluídos em solução salina, num inóculo de 10µl. A infecção intradérmica pretende simular a transmissão natural do parasita, uma vez que nos reservatórios a derme da orelha é frequentemente utilizada pelo flebótomo vector como local de picada (Belkaid *et al.* 2000; Baldwin *et al.* 2007; Quinnell & Courtenay 2009). O grupo controlo foi injectado com 10µl de solução salina.

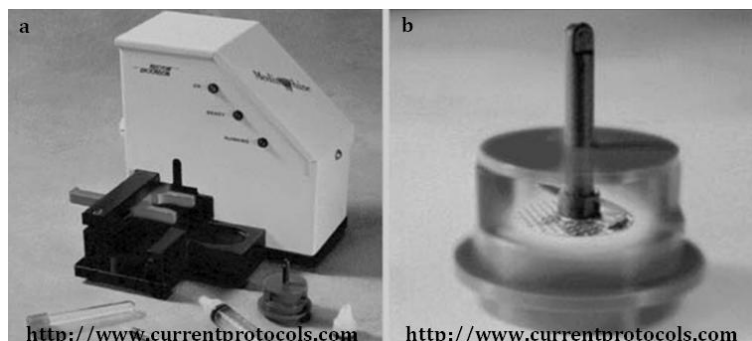


**Figura 4.1.** Infecção intradérmica de parasitas *L. chagasi*. A infecção com  $5 \times 10^6$  promastigotas de *L. chagasi* num inóculo de  $10 \mu\text{l}$  foi efectuada na derme da orelha de murganhos C57BL/6.

Todo o procedimento anterior foi realizado com os animais anestesiados com  $100 \mu\text{l}$  de uma solução anestésica de 2,2,2-tribromoetanol (Sigma) 2.5%, vulgarmente designada de avertina, que corresponde sensivelmente a uma dose de  $100 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Três horas, 24h e 144h após a infecção, os animais foram sacrificados por inalação de  $\text{CO}_2$  e as orelhas e gânglios cervicais superficiais de quatro animais por grupo foram removidos. A orelha direita e os gânglios cervicais foram conservados em RPMI incompleto, enquanto a orelha esquerda foi conservada em 1ml de RNAlater (Applied Biosystems/Ambion, USA) durante 16h a  $4^\circ\text{C}$  e posteriormente mantidas a  $-80^\circ\text{C}$  para preservação das moléculas de RNA. Realizaram-se esfregaços em lâminas de sangue recolhido da cauda dos murganhos que foram posteriormente fixadas e coradas com Diff-Quick (American Scientific Products, USA). O cálculo da percentagem de granulócitos, monócitos e linfócitos presentes nos esfregaços foi obtido a partir da contagem de 100 leucócitos totais em cada amostra.

#### **4.3.4 Imunofenotipagem da população leucocitária no local da infecção**

A caracterização imunofenotípica das populações leucocitárias presentes na pele de animais saudáveis, infectados e depletados e infectados foi avaliada por citometria de fluxo através da expressão dos marcadores celulares. Após a recolha, as orelhas direitas foram colocadas em 10ml de numa solução de álcool etílico a 70% e posteriormente deixadas a secar numa placa de petri durante cerca de 10 min à temperatura ambiente. Os folhetos ventrais e dorsais foram separados e colocados num poço de placas de 24 poços (Thermo Fisher Scientific/Nunc) com 1ml de uma solução de RPMI incompleto contendo  $0.5\mu\text{g.ml}^{-1}$  da enzima DNase I (*Deoxyribonuclease I*, Sigma) e  $0.33\text{mg.ml}^{-1}$  da enzima Liberase CI (Roche). Estas enzimas auxiliam na desintegração dos tecidos para uma melhor recuperação de células individuais (*single-cell suspension*). As placas foram incubadas a  $37^\circ$ , durante 1h em atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$ . De seguida, a suspensão e cada orelha (folheto dorsal e ventral) foram colocadas em homogeneizadores de amostras biológicas (*medicons*, BD Biosciences) (Fig. 4.1b) e foram homogeneizados durante 5 min no aparelho *Medimachine* (BD Biosciences) (Fig. 4.2b) de modo a obter células individualizadas. A suspensão celular foi recuperada com o auxílio de uma seringa e os *medicons* foram lavados com 9ml de RPMI 10% FBS para obter o maior número de células.



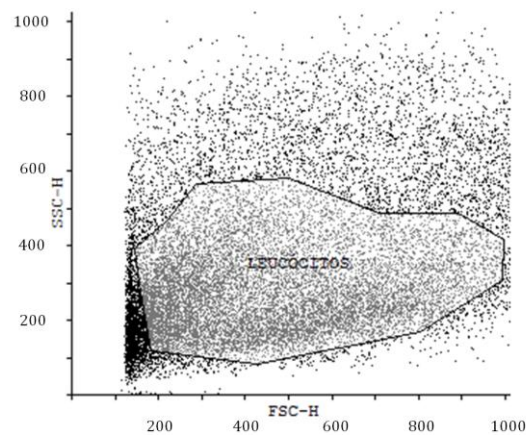
**Figura 4.2.** Sistema de desagregação de amostras biológicas. (a) *Medimachine* (BD Bioscience) e (b) *medicons* (BD Bioscience).

A suspensão celular obtida foi centrifugada (300xg, a 4°C, 10 min) e filtrada três vezes com um filtro de 40µm (BD Bioscience), para remoção de agregados tecidulares presentes na suspensão celular. A contagem de leucócitos foi realizada em solução de Türk's, na câmara de Neubauer, sendo as células posteriormente ressuspensas em RPMI 10% FBS, na concentração de 10<sup>6</sup>ml<sup>-1</sup>. Cem microlitros da suspensão celular (10<sup>5</sup> células) foram colocados numa placa de fundo em V (Thermo Fisher Scientific/Nunc) e novamente centrifugados (1 min, 4°C, 300xg). Para certificarmos que as marcações positivas observadas pela citometria eram devidas unicamente à interação entre a porção do anticorpo específico que se liga ao antígeno na superfície celular, as células foram pré-incubadas 5 min no gelo com um 10µl de um anticorpo monoclonal que bloqueia os receptores Fc, Fcγ II (CD32) e FcγIII (CD16) (*Anti-Mouse CD16/CD32 Purified*, eBioscience, USA) diluído (1:50) em tampão de FACS (PBS 1x 0.5% FBS).

Anticorpo monoclonal (Biolegend)	Especificidade	Concentração final (µg.ml <sup>-1</sup> )	Diluição (v/v)
Anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1)-PerCP	Granulócitos	0.6	1:330
Anti-mouse F4/80-PE	Macrófagos	0.6	1:330
Anti-mouse DC marker (33D1)-FITC	Células dendríticas	1.5	1:330
Anti-mouse CD3-PerCP/Cy5.5	Linfócitos T e células NK	0.6	1:330

**Tabela 4.1.** Anticorpos monoclonais específicos utilizados na imunofenotipagem de leucócitos da pele. Designação, especificidade, concentração e diluição final dos anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos usados na caracterização imunofenotípica da população leucocitária da pele de animais saudáveis, infectados e depletados e infectados com *L. chagasi*.

Seguidamente as células foram marcadas individualmente (marcações simples) com anticorpos monoclonais conjugados com um fluorocromo (Biolegend), específicos para determinadas populações leucocitárias. A sua designação, especificidade, concentração final e diluição usada num volume final de 100µl em tampão de FACS estão descritas na tabela 4.1. A marcação celular foi efectuada no escuro, no gelo e durante 30 min e foi seguida por duas lavagens (1 min, 4°C, 300xg). As células foram ressuspendidas em 200µl de tampão de FACS e posteriormente adquiridas num citómetro FACS<sup>®</sup> (BD Biosciences) usando o software CellQuestPro (BD Biosciences). Os gráficos *dot plot* de SSC (do inglês *side scatter*, que indica a granulosidade/complexidade celular) e FSC (do Inglês *forward scatter*, que indica o tamanho das células) (Fig. 4.3) permitiram excluir restos celulares e células mortas, definindo a população de células da orelha a estudar. Células não marcadas foram utilizadas para calibrar o citómetro, compensando a autofluorescência e definindo os limites de cada população. A análise dos dados foi realizada com o programa Cyflogic 1.2.1 (CyFlo Ltd.).



**Figura 4.3.** Gráfico representativo dot plot SSC (*side scatter*)/FCS (*forward scatter*). Exemplo representativo da definição da população de leucócitos de acordo com a granulosidade (SSC) e tamanho (FSC) das células da pele.

#### **4.3.5 Isolamento (*single-cell suspension*) e cultura de células ganglionares**

Os gânglios cervicais foram gentilmente macerados com o auxílio do êmbolo de uma seringa de 10ml (VWR), sobre uma placa de petri com um filtro celular de 40µm (BD Biosciences). A suspensão celular obtida foi centrifugada (300xg, a 4°C, 10 min) e filtrada três vezes com o filtro de 40 µm, para remoção de agregados de tecidos adiposos presentes na suspensão. Após contagem das células viáveis através da coloração com azul de tripan em câmara de Neubauer, as células foram ressuspensas em RPMI, 10% FBS na concentração de 10<sup>6</sup>ml<sup>-1</sup>. Cento e cinquenta microlitros da suspensão (1.5x10<sup>5</sup> células) foram colocados em placas de cultura de fundo plano (Thermo Fisher Scientific/Nunc) com 50µl de Ag solúvel de *L. chagasi* (1µg) ou 50µl de meio RPMI 10% FBS. Após 72h de incubação a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, as células foram recolhidas em tampão de lise (*RNeasy Mini Kit*, Quiagen) para posterior extracção de RNA e síntese de cDNA para quantificação de citocinas por PCR em tempo real. Por último, guardaram-se os sobrenadantes para determinação da produção de granzima B por ELISA.

#### **4.3.6 Quantificação da expressão de citocinas em células ganglionares**

A expressão de mRNA das citocinas IL-1β, IL-6, TNF-α, TGF-β, interferão (IFN)-γ e IL-17 foi quantificada nas células ganglionares de animais saudáveis, animais infectados com *L. chagasi* e animais depletados com RB6-8C5 e infectados com *L. chagasi* estimuladas *in vitro* com Ag de *L. chagasi*. Após extracção de RNA, foi efectuada a síntese de cDNA e a clonagem dos genes em vectores plasmídicos para posterior construção de curvas-padrão e quantificação absoluta da expressão dos respectivos genes por PCR em tempo real. Resumidamente, a extracção de RNA total foi efectuada após a lise das células, de acordo com as instruções do fabricante e protocolo previamente resumidos no ponto 2.3.9.1 do Capítulo 2. Um micrograma de cada amostra de RNA total e 0.5µg de *primer* Oligo (dT)<sub>12-18</sub> (Invitrogen), num volume final de 15µl foram desnaturados a 70°C durante 5 min e colocados imediatamente a 4°C. A síntese de cDNA foi

iniciada com a ligação do *primer* Oligo (dT)<sub>12-18</sub> durante 5 min a 25°C, seguida da reacção de transcrição a 37°C, durante 60 min, na presença de 3µl da enzima ImProm-II™ Reverse Transcriptase (RT), 12µl de ImProm-II™ 5x Reaction Buffer, 3mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega), 0.5mM de desoxirribonucleótidos (dNTPs) (Invitrogen) e 60U da enzima recombinante Ribonuclease inhibitor (RNaseOUT) (Promega) num volume final de 60µl. Por último, as amostras foram aquecidas a 70°C, durante 15 min, para inactivação da enzima RT, arrefecidas a 4°C e conservadas a -20°C até à sua utilização. Em cada reacção foi incluído um controlo negativo (amostra sem RNA). As sequências do *primer forward* e *reverse* para os genes IFN-γ (FW - 5' CAA TGA ACG CTA CAC ACT GCA TC 3'; REV - 5' CGT GGC AGT AAC AGC CAG AA 3') e para IL-17 (FW - 5' GCT CCA GAA GGC CCT CAG A 3'; REV - 5' AGC TTT CCC TCC GCA TTG A 3'), foram seleccionadas na bibliografia existente (Rosa *et al.* 2005; Gonidez *et al.* 2008), tendo em conta os critérios referidos no ponto 2.3.9.2 do Capítulo 2 e segundo as MIQE *guidelines* (Bustin *et al.* 2009, 2010). Para corrigir possíveis ineficiências da reacção de transcrição reversa foi utilizado como controlo endógeno da expressão de genes, HPRT (*housekeeping gene*), tal como descrito no ponto 2.3.9.2 do Capítulo 2. A partir do cDNA, os genes IFN-γ e IL-17 foram amplificados por PCR convencional usando as concentrações dos reagentes enumerados no ponto 2.3.9.3 do Capítulo 2. As condições para o PCR convencional para IFN-γ foram: um ciclo de desnaturação (5 min a 94°C) seguido de 30 ciclos de desnaturação (20 seg a 94°C); 30 seg a 59°C (temperatura de *annealing*); extensão (30 seg a 72°C) e por fim a extensão final (3 min a 72°C). Relativamente a IL-17, as condições de amplificação foram as seguintes: 5 min a 94°C, 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 15 seg a 60°C e 30 seg a 72°C seguida de uma extensão final a 72 °C durante 3 min. Os produtos de PCR obtidos de 72pb para o IFN-γ e 142 pb para a IL-17 foram purificados e inseridos no vector plasmídico pGEM®-T Easy Vector (Promega). A transformação dos fragmentos ligados ocorreu em células competentes. O DNA plasmídico foi extraído, confirmando-se a presença dos genes através de electroforese em gel de agarose após fragmentação do DNA plasmídico recombinante por enzima de restrição. As curvas-padrão dos genes IFN-γ e IL-17 foram construídas após a

realização de diluições seriadas (de 250pg.µl<sup>-1</sup> a 0.01pg.µl<sup>-1</sup>) de DNA plasmídico e reacções independentes de PCR em tempo real. Todo o processo de PCR convencional, purificação e clonagem do produto amplificado em vectores plasmídicos, construção de curvas padrão de IFN-γ e IL-17 e dos outros genes foram realizados de acordo com a descrição exposta nos pontos 2.3.9.3 e 2.3.9.4 do Capítulo 2. O PCR em tempo real para a quantificação absoluta da expressão génica foi realizado no aparelho iCycler iQ™ (Bio-Rad), mantendo-se as condições de amplificação descritas em 2.3.9.4 do Capítulo 2. A solução de amplificação utilizada neste trabalho foi a Maxima™ SYBR Green/Fluorescein qPCR Master mix (2X) (Fermentas) que contém, para além da *Hot Start Taq* DNA Polimerase e SYBR® Green I, os tampões otimizados. Possui também fluoresceína que serve como referência interna para normalizar o sinal fluorescente de SYBR® Green I. Os volumes e concentrações de todos os componentes necessários para o PCR em tempo real foram idênticos aos mencionados no ponto 2.3.9.4.

#### **4.3.7 Quantificação da produção de granzima B por células ganglionares**

Os linfócitos T citotóxicos (Tc) e células NK possuem grânulos que contêm moléculas com capacidade citolítica, importantes na resposta imunológica, como é o caso da proteína perforina e as proteases serínicas, granzima A e granzima B. A granzima B é a principal responsável pela indução da fragmentação do DNA das células alvo nos processos citotóxicos mediados principalmente por células NK e pelos linfócitos Tc (Boivin *et al.* 2009). A produção de granzima B foi quantificada em sobrenadantes de culturas *ex vivo* das células ganglionares estimuladas com Ag de *L. chagasi* de animais saudáveis, animais infectados com *L. chagasi* e animais depletados com RB6-8C5 e infectados com *L. chagasi*. A técnica empregue foi ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) e para tal usou-se o kit comercial *Mouse Granzyme B ELISA Ready-SET-Go!*® (eBioscience). Resumidamente, cada poço de uma placa de alta afinidade proteica (Corning Costar 9018) foi revestido com 100µl do anticorpo de captura (anti-granzima B

purificada) diluído (1:250) em tampão de revestimento. A placa foi selada e incubada 16h a 4°C. Após uma série de lavagens com tampão de lavagem (PBS 1x, Tween-20 a 0.05%), os poços foram bloqueados com 200µl de diluente 1x durante 1h, à temperatura ambiente. De seguida prepararam-se diluições seriadas (1:2) do padrão (proteína recombinante) e após uma nova série de lavagens colocaram-se na placa e em duplicado 100µl de cada diluição do padrão (de 5000pg.ml<sup>-1</sup> a 39.06pg.ml<sup>-1</sup>) e 100µl dos sobrenadantes de cada amostra. A placa foi incubada à temperatura ambiente durante 2h, lavada várias vezes e novamente incubada durante 1h à temperatura ambiente com 100µl do anticorpo de detecção específico (anti-granzima B conjugada com biotina) previamente diluído (1:250) no diluente 1x. Após lavagem da placa foram adicionados a cada poço 100µl da enzima peroxidase avidina-HPR diluída em diluente 1x. Depois de 30 min de incubação foi efectuado mais um conjunto de lavagens e colocados em cada poço 100µl da solução contendo o substrato da enzima (tetrametilbenzidina, TMB). Após 15 min de incubação, a reacção foi terminada com 50µl de uma solução 2N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A absorvância a 450nm foi medida no leitor de placas Anthos 2010 (Biochrom, UK). A concentração da proteína nas amostras foi determinada através da curva-padrão construída a partir dos valores de concentração conhecidos e os valores de absorvância do padrão.

#### **4.3.8 Detecção e quantificação do parasita no local de infecção e nos gânglios cervicais**

A detecção do parasita na orelha e nos gânglios cervicais foi realizada através da observação de lâminas de *citospin*. Pretendíamos também quantificar a carga parasitária nos mesmos órgãos após extracção de DNA e quantificação por PCR em tempo-real. Lâminas de *citospin* foram obtidas após centrifugação de 10<sup>6</sup> células ganglionares e 10<sup>5</sup> células da pele (300xg, 4°C, 5min) em 500µl de RPMI, FBS 10%, numa citocentrífuga *CT-2000* (Cientec, Brasil). As lâminas foram posteriormente fixadas e coradas com Diff-Quick (American Scientific Products, USA) e observadas ao microscópio óptico com ampliação de 1000x (Olympus, Germany) para detecção

do parasita. Consideraram-se positivas as lâminas que continham pelo menos 1 parasita na forma promastigota ou amastigota, extra ou intracelular. Células ganglionares ( $10^6$ ) e da pele ( $10^5$ ) foram centrifugadas (300xg, 4°C, 5min), recolhidas em tampão TEN (0.15M NaCl, 50mM EDTA, 0.1M Tris-HCl) e congeladas a -20°C para posterior extracção de DNA e quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real. Infelizmente, não foi possível realizar durante o tempo útil para o desenvolvimento desta dissertação a extracção de DNA e o PCR em tempo real, mas sabendo que o DNA é uma molécula relativamente estável, este estudo poderá eventualmente ser realizado no futuro. Células ganglionares ( $10^6$ ) foram também centrifugadas (300xg, 4°C, durante 10 min), ressuspendidas em 5ml de meio Schneider completo (FBS 10%) e incubadas a 24°C. As culturas foram examinadas semanalmente por microscopia óptica (Olympus) para observação de promastigotas viáveis.

#### **4.3.9 Análise estatística**

Em todo o estudo usaram-se, no mínimo, triplicados (duplicados apenas na caracterização imunofenotípica) de cada amostra e os dados foram representados como médias e erros-padrão de duas experiências independentes. O teste não paramétrico Mann-Whitney U foi utilizado para comparar:

- a frequência de células da pele marcadas com Gr1, F4/80, 33D1 e CD3 de animais saudáveis (S) vs animais infectados (I), animais saudáveis (S) vs animais depletados e infectados (DI) e animais infectados (I) vs animais depletados e infectados (DI); foi também comparada em cada grupo de animais a percentagem de células que expressam cada marcador nos diferentes dias (3h vs 24h; 3h vs 144h; 24h vs 144h).
- o número de cópias de cada gene por cada 1000 cópias do gene de controlo interno HPRT em células ganglionares de animais saudáveis (S) vs animais infectados (I), animais

saudáveis (S) vs animais depletados e infectados (DI) e animais infectados (I) vs animais depletados e infectados (DI) estimuladas com Ag de *L. chagasi*.

- a concentração de granzima B em sobrenadantes de células ganglionares de animais saudáveis (S) vs animais infectados (I), animais saudáveis (S) vs animais depletados e infectados (DI) e animais infectados (I) vs animais depletados e infectados (DI) estimuladas com Ag de *L. chagasi*;

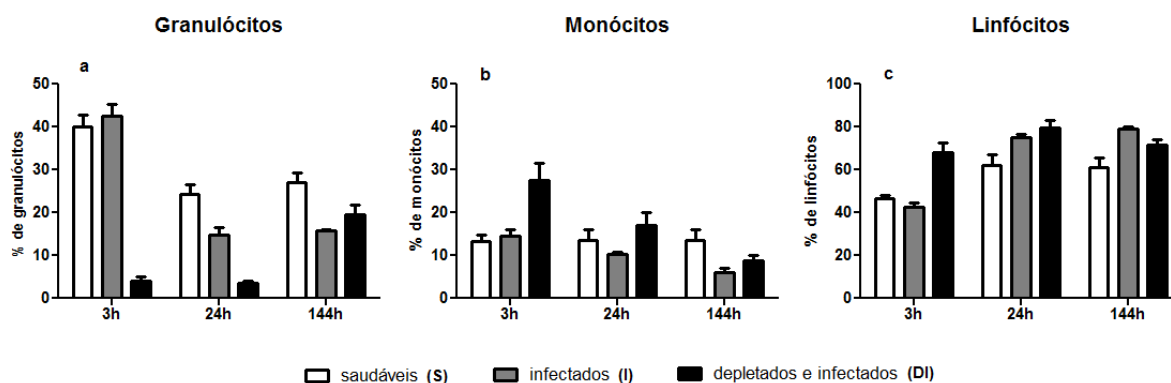
Considerou-se estatisticamente significativo um valor de  $p$  inferior a 0.05 ( $p < 0.05$ ). A análise estatística e os gráficos foram gerados com o programa *Graphpad Prism 5.0* (USA).

## 4.4 Resultados

### 4.4.1 Confirmação da depleção de granulócitos/PMN

Diversos estudos inseridos no projecto *Mouse Phenome* da *Jackson Laboratory* (2011) (<http://phenome.jax.org>) confirmaram que em várias estirpes de murganhos a população de granulócitos do sangue (PMN, eosinófilos e basófilos) é constituída principalmente por PMN. Assim, assumimos que ao injectar murganhos com o anticorpo RB6-8C5 estamos a depletar maioritariamente a população de PMN. No intuito de confirmar este facto, realizaram-se, em todos os animais de cada grupo e após 3h, 24h e 144h de infecção esfregaços de sangue em lâminas e fizeram-se contagens do número de granulócitos relativamente a 100 leucócitos totais presentes no esfregaço. Contaram-se também o número de monócitos e linfócitos. Como podemos verificar no gráfico (Fig. 4.4a) o tratamento com o anticorpo RB6-8C5 ou anti-Gr1 induziu acentuada diminuição de granulócitos em animais depletados às 3h ( $4.11 \pm 0.894\%$ ) e 24h ( $3.513 \pm 0.571\%$ ) quando comparado com animais infectados (3h:  $42.62 \pm 2.653\%$ ; 24h:  $14.86 \pm 1.635\%$ ) e saudáveis (3h:  $40.12 \pm 2.689\%$ ; 24h:  $24.23 \pm 2.388\%$ ). Ainda assim, os valores apresentados pelo grupo S são um pouco superiores (3h) aos registados num estudo de 2011

inserido no projecto *Mouse Phenome* (<http://phenome.jax.org>) com murganhos machos C57BL/6J, saudáveis, com 8 semanas (23.64%) de idade. Verificámos também que, com 6 dias de infecção (144h), os valores da percentagem de granulócitos aumentam nos murganhos depletados (144h: 19.55±2.270%), aproximando-se dos valores verificados para os grupos S (144h: 27.01±2.381%) e I (144h: 15.75±0.396%) (Fig. 4.4a), apontando para a recuperação dos PMN. Relativamente aos monócitos (Fig. 4.4b) e linfócitos (Fig. 4.4c) verificámos que às 3h pós-infecção a percentagem destas populações é superior no grupo DI (monócitos<sub>3h</sub>: 27.44±4.007%; linfócitos<sub>3h</sub>: 68.29±4.127%) do que nos grupos I (monócitos<sub>3h</sub>: 14.56±1.414%; linfócitos<sub>3h</sub>: 42.82±1.952%) e S (monócitos<sub>3h</sub>: 13.23±1.660%; linfócitos<sub>3h</sub>: 46.65±1.348%), provavelmente para compensar a ausência de granulócitos provocada pela depleção. Ainda em relação a estas duas populações celulares, parece não haver grande variação percentual entre os três grupos com 24h e 144h após a infecção (Fig. 4.4b,c).



**Figura 4.4.** Percentagem de leucócitos no sangue. A percentagem (%) de granulócitos (a), monócitos (b) e linfócitos (c) foi calculada a partir da observação e contagem de células ao microscópio óptico de esfregaços de sangue da cauda de murganhos saudáveis (S), de animais infectados (I) e depletados e infectados (DI) com 3h, 24h e 144h de infecção por *L. chagasi*. Os gráficos representam médias da contagem de 100 células totais por cada esfregaço/animal de duas experiências independentes.

#### **4.4.2 O parasita é detectado na orelha e nos gânglios cervicais de murganhos depletados de PMN**

Para detectar o parasita foram observadas culturas de células ganglionares colocadas a 24°C em meio de Schneider completo. Após 7 dias de incubação, as culturas de células de ambos os grupos I e DI apresentavam promastigotas móveis. No entanto, a observação de lâminas de *citospin* ao microscópio óptico não permitiu a observação de parasitas na forma promastigota, amastigota, intra ou extracelular. Foram também analisadas lâminas de *citospin* de células da orelha dos grupos DI e I. Três horas após a infecção, ambos os grupos de animais apresentaram lâminas positivas. No grupo depletado, a positividade das lâminas manteve-se durante 24h após a infecção, uma vez que às 144h não foram observados parasitas. No grupo infectado, as lâminas foram positivas às 3h, negativas às 24h, voltando a apresentar parasitas 144h após a infecção.

<b>Detecção de parasitas de <i>L. chagasi</i></b>				
		<b>3h</b>	<b>24h</b>	<b>144h</b>
<b>orelha</b> (lâminas citospin)	Infectados (I)	+	-	+
	depletados e infectados (DI)	+	+	-
<b>gânglios cervicais</b> (lâminas citospin)	Infectados (I)	-	-	-
	depletados e infectados (DI)	-	-	-
<b>gânglios cervicais</b> (culturas em meio líquido Schneider)	Infectados (I)	+	+	+
	depletados e infectados (DI)	+	+	+

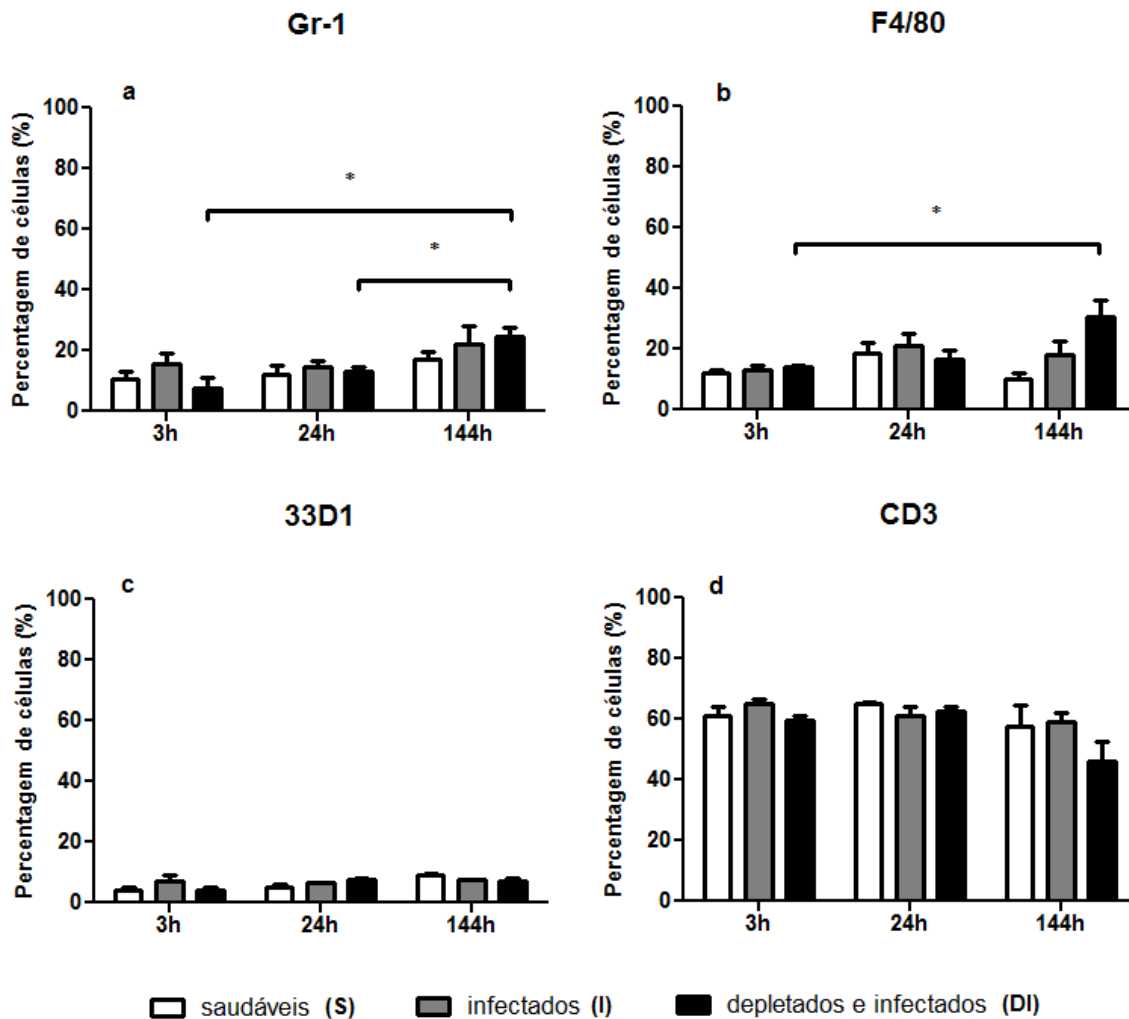
**Tabela 4.2.** *Detecção de parasitas de L. chagasi.* A presença do parasita foi assinalada a partir da observação ao microscópio óptico (1000x) de lâminas de *citospin* de células da orelha e dos gânglios cervicais de animais DI e I, após 3h, 24h e 144h de infecção com *L. chagasi*. Culturas em meio de Schneider de células ganglionares foram também monitorizadas para detecção de promastigotas viáveis. As observações registadas na tabela são representativas de duas experiências independentes. +, positivo; -, negativo.

caso, apenas a forma amastigota do parasita é observada. Os resultados destas observações estão resumidas no quadro 4.2. Não foi possível realizar a quantificação do parasita na pele e nos gânglios cervicais por PCR em tempo real, a tempo dos resultados serem apresentados neste estudo, mas já que as amostras foram preservadas, esse trabalho irá ser efectuado futuramente, para completar os resultados expostos aqui.

#### **4.4.3 A dinâmica da população leucocitária parece não ser alterada devida à presença do parasita ou pela depleção de PMN**

Para caracterizar a população leucocitária e a influência da depleção na dinâmica leucocitária na pele da orelha, as células foram marcadas individualmente com anticorpos específicos de antígenos celulares de diferentes tipos de leucócitos. O anticorpo monoclonal anti-Gr1 marca essencialmente granulócitos, o anti-F4/80 é normalmente usado como marcador de MΦ murinos, o anti-33D1 liga-se a moléculas de antígeno 33D1 de células dendríticas e por último, o CD3 é altamente expresso em linfócitos T e células NK. Os resultados mostraram que em todos os grupos de animais e em todos os tempos pós-infecção, as células CD3<sup>+</sup> encontravam-se em maior percentagem (Fig. 4.5d). O marcador que apresentou menor número de células positivas foi o 33D1 (Fig. 4.5c) havendo, portanto, um número relativamente baixo de células dendríticas na pele de animais dos grupos DI, I e S. (Fig. 4.5b). Para todos os marcadores, não houve diferenças significativas entre as células positivas dos três grupos de animais DI, I e S. Ainda assim, com 3h de infecção e como seria de esperar, a percentagem de células Gr1<sup>+</sup> é inferior no grupo DI, comparativamente ao grupo I e S, devido ao processo de depleção dos granulócitos com o anticorpo anti-Gr1 que decorreu antes da infecção. A percentagem de células Gr1<sup>+</sup> neste grupo (DI) vai aumentando com o tempo de infecção, sendo significativamente superior 144h após a infecção (3h vs 144h:  $p=0.0286$ ; 24h vs 144h:  $p=0.0286$ ) (Fig. 4.5a). O mesmo padrão também foi observado para células F4/80<sup>+</sup> no grupo DI, em que 144h após a infecção, o número

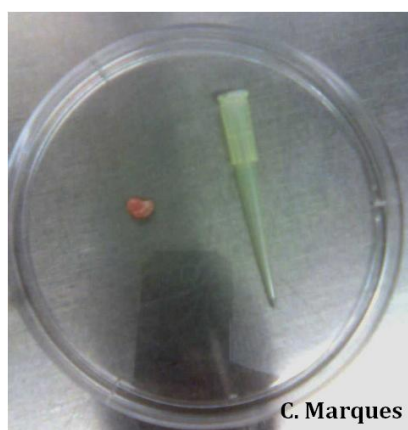
de células positivas aumenta significativamente em relação à observação inicial (3h vs 144h:  $p=0.0286$ ) (Fig. 4.5b).



**Figura 4.5.** Caracterização imunofenotípica da população leucocitária no local de infecção. A imunofenotipagem das células da derme da orelha foi realizada por citometria após marcação simples com anticorpos anti-Gr1 (a), anti-F4/80 (b), anti-33D1 (c) e anti-CD3 (d). Os gráficos representam médias e erros-padrão de duplicados de cada amostra de duas experiências independentes. O teste não paramétrico Mann-Whitney U foi usado para comparar em cada grupo de animais a evolução da porcentagem de células que expressam cada marcador (3h vs 24h; 3h vs 144h; 24h vs 144h). \* ( $p < 0.05$ ) indicam diferenças estatisticamente significativas.

#### **4.4.4 A ausência inicial de PMN e a presença de *L. chagasi* afectam a expressão de citocinas nos gânglios cervicais superficiais**

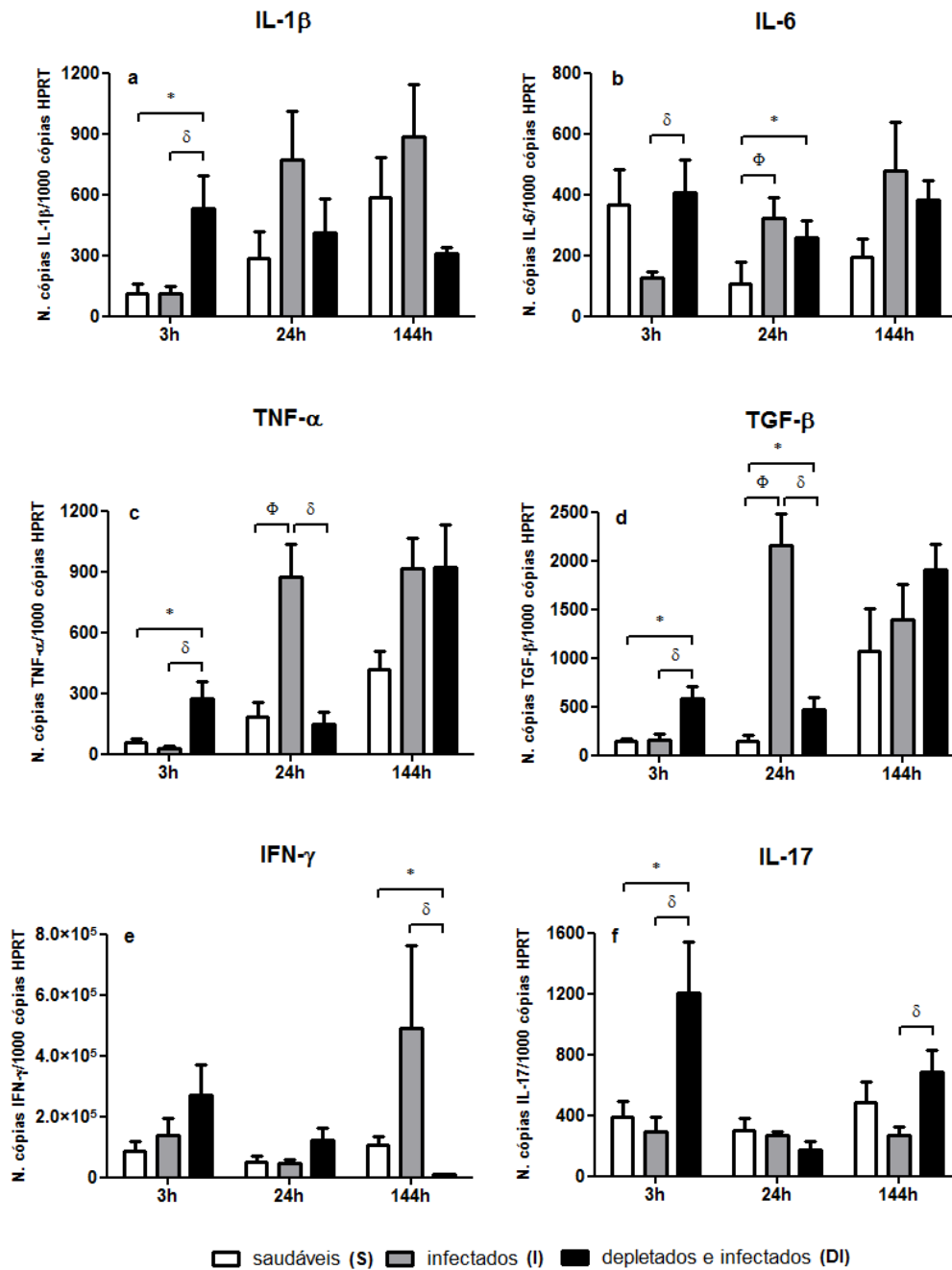
Após a recolha dos gânglios cervicais verificámos que alguns dos animais dos grupos I e DI apresentavam linfadenopatia (aumento do volume do órgão) acentuada (Fig. 4.6). Este incremento pode estar associada a uma resposta celular local, pelo que é importante analisar a expressão das citocinas nas células deste órgão. A expressão de mRNA de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 foi quantificada por PCR em tempo real após extracção de RNA e síntese de cDNA de células ganglionares de animais saudáveis, infectados e depletados e infectados com *L. chagasi*, cultivadas *in vitro* durante 72h, na presença de Ag solúvel do parasita.



**Figura 4.6.** *Gânglio cervical aumentado.* Exemplo de um gânglio cervical superficial retirado de um animal depletado com 144h de infecção por *L. chagasi*.

Após 3h de infecção foi verificado que as células ganglionares dos animais do grupo DI estimuladas com o Ag solúvel de *L. chagasi* apresentaram um aumento da expressão de todas as citocinas, sendo este aumento significativo para IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-17 quando comparado com os animais saudáveis (IL-1 $\beta$   $p=0.0127$ , TNF- $\alpha$   $p=0.0022$ , TGF- $\beta$   $p=0.0002$ , IL-17  $p=0.0302$ ) e infectados (IL-1 $\beta$   $p=0.0075$ , IL-6  $p=0.0074$ , TNF- $\alpha$   $p=0.0002$ , TGF- $\beta$   $p=0.0044$ , IL-17  $p=0.0099$ ) (Fig. 4.7a,b,c,d,f). Não se verificou qualquer alteração significativa da expressão de citocinas entre os grupos I e S após 3h de infecção (Fig. 4.7). O perfil de expressão de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  foi, ao

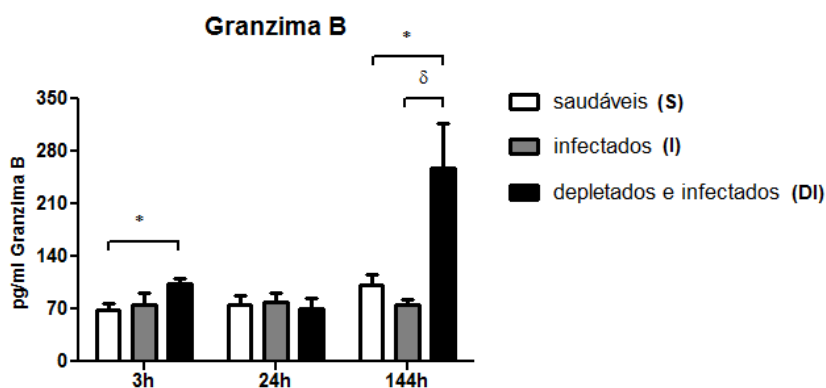
longo do período experimental, muito semelhante e decorridas 24h verificou-se um acréscimo notório do número de cópias destas citocinas em células estimuladas de animais infectados com *L. chagasi*, comparativamente aos animais saudáveis (TNF- $\alpha$   $p=0.0011$ , TGF- $\beta$   $p=0.0002$ ) ou depletados (TNF- $\alpha$   $p=0.0004$ , TGF- $\beta$   $p=0.0004$ ) (Fig. 4.7c,d). O grupo DI apresentou valores superiores de mRNA de TGF- $\beta$  quando comparado com os valores do grupo S ( $p=0.0434$ ), apesar de, como já foi referido, a expressão ser significativamente inferior ao grupo I (Fig. 4.7d). Na mesma altura, a expressão de IL-6 nas células ganglionares de ambos os grupos infectados (I e DI) foi estatisticamente superior do que nas células de animais saudáveis (S vs I  $p=0.0110$ ; S vs DI  $p=0.0387$ ) (Fig. 4.7b). Decorridos 6 dias (144h) da infecção, apenas as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-17 apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Fig. 4.7e,f). As células do grupo DI expressaram um reduzido número de moléculas de mRNA de IFN- $\gamma$  do que as dos grupos I ( $p=0.0019$ ) e S ( $p=0.0044$ ) (Fig. 4.7e). No entanto, o grupo DI apresentou um número de cópias de IL-17 substancialmente superior ao grupo I ( $p=0.0122$ ) (Fig. 4.7f).



**Figura 4.7.** Expressão de citocinas. A expressão dos genes IL-1 $\beta$  (a), IL-6 (b), TNF- $\alpha$  (c) e TGF- $\beta$  (d), IFN- $\gamma$  e IL-17 foi quantificada por PCR em tempo real em células ganglionares de animais saudáveis, animais infectados e animais depletados com RB6-8C5 e infectados com *L. chagasi* estimuladas com Ag solúvel de *L. chagasi*. Usaram-se *primers* específicos, SYBR® Green I e padrões externos de cDNA plasmídico para cada gene. Os dados são apresentados como médias e erros-padrão de duas experiências independentes com três réplicas por amostra. Os valores foram expressos como o número de cópias do gene por cada 1000 cópias do gene de controlo interno, HPRT. O teste não-paramétrico Mann-Whitney U foi usado para comparar o número de cópias dos genes de animais saudáveis (S) vs animais infectados (I), animais saudáveis (S) vs animais depletados e infectados (DI) e animais infectados (I) vs animais depletados e infectados (DI). Os símbolos \*,  $\delta$ ,  $\Phi$  ( $p < 0.05$ ) indicam diferenças estatisticamente significativas.

#### **4.4.5 A produção de granzima B por linfócitos ganglionares durante a infecção por *L. chagasi* é afectada pela depleção de PMN**

A produção de granzima B medida em sobrenadantes de culturas de células ganglionares de animais saudáveis, infectados, e depletados e infectados com *L. chagasi* estimuladas com Ag solúvel do parasita, encontra-se representada na Fig. 4.8. Com 3h de infecção verificou-se aumento significativo da libertação desta enzima em células do grupo DI ( $103.6 \pm 6.971 \text{ pg.ml}^{-1}$ ) em relação ao grupo S ( $p=0.0247$ ) que apresentou uma concentração média de  $69.28 \pm 8.887 \text{ pg.ml}^{-1}$ . Após 24h, a produção de granzima B foi similar entre todos os grupos analisados. No entanto, após 6 dias (144h) de infecção verificou-se um acréscimo substancial desta protease serínica no grupo DI ( $258.3 \pm 58.38 \text{ pg.ml}^{-1}$ ) em comparação aos sobrenadantes dos grupos I ( $p=0.0022$ ) () e S ( $p=0.0304$ ) que apresentaram, respectivamente, concentrações de  $75.86 \pm 7.264 \text{ pg.ml}^{-1}$  e  $101.6 \pm \text{pg.ml}^{-1}$ .



**Figura 4.8.** Produção de granzima B. A libertação de granzima B foi quantificada em sobrenadantes de culturas de células ganglionares de animais saudáveis (S), animais infectados (I) e animais depletados com RB6-8C5 e infectados com *L. chagasi* (DI) estimuladas com Ag de *L. chagasi*. O ensaio foi realizado pela técnica de ELISA, segundo as instruções fornecidas pelo kit comercial *Mouse Granzyme B ELISA Ready-SET-Go!*<sup>®</sup> (eBioscience). Os dados estão representados como médias e erros-padrão de duas experiências com três réplicas por amostra. O teste não-paramétrico Mann-Whitney U foi usado para comparar a concentração de granzima B em células de animais saudáveis (S) vs animais infectados (I), animais saudáveis (S) vs animais depletados e infectados (DI) e animais infectados (I) vs animais depletados e infectados (DI). Os símbolos \*,  $\delta$  ( $p < 0.05$ ) indicam diferenças estatisticamente significativas.

## 4.5 Discussão

Após o contacto com agentes externos patogénicos, os PMN para além de iniciarem a resposta inflamatória local contra os microrganismos, interagem com as restantes populações leucocitárias (macrófagos, células dendríticas, linfócitos) através do contacto directo ou da secreção de mediadores, orquestrando a resposta imunológica inata e adquirida (Kumar & Sharma 2010). A depleção dos PMN é uma das principais estratégias para analisar o papel destas células na defesa do hospedeiro e tem sido usada com alguma frequência, sobretudo em modelos experimentais de leishmaniose cutânea (Lima *et al.* 1998; Tacchini-Cottier *et al.* 2000; Ribeiro-Gomes *et al.* 2004; Chen *et al.* 2005; Peters *et al.* 2008, 2009; Novais *et al.* 2009). No capítulo 2 e 3, a função dos PMN durante a infecção por *L. infantum* foi caracterizada *in vitro*. No presente capítulo pretendemos avaliar o papel destas células nas fases iniciais da infecção por *L. chagasi*, no modelo experimental murino, através da caracterização da dinâmica e do estado de activação imunológica no local da infecção e em órgãos internos.

A depleção dos PMN foi certificada pela análise de esfregaços de sangue, o que permitiu confirmar que a população de monócitos e linfócitos não diminui com o tratamento com o anticorpo RB6-8C5, já que estas populações e, também as células dendríticas podem, ainda que em menor extensão, expressar Gr1 (Daley *et al.* 2008). A injeção única e de dose baixa do anticorpo monoclonal RB6-8C5 depleta a população de granulócitos (nos quais a maioria são PMN) durante 3-5 dias, deixando intactas outras populações celulares (Chen *et al.* 2005; Thalhafer *et al.* 2011). Apesar de não se terem observado diferenças significativas entre os grupos de murganhos (DI, I e S), a população Gr1<sup>+</sup> está diminuída nas células da pele do grupo DI, comparativamente aos grupos I e S, no início da infecção (3h), observando-se um aumento gradual e significativo deste marcador. Esta observação confirma a depleção inicial e restabelecimento posterior dos PMN (6 dias). O facto de as frequências celulares Gr1<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup>, 33D1<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup> em todos os tempos pós-infecção, no grupo S, apresentarem valores similares aos

outros 2 grupos (DI e I) pode estar relacionado com o desencadear de uma reacção inflamatória com recrutamento celular induzida pelo processo mecânico de injectar. De facto, Peters *et al.* (2008, 2009) observaram que a picada do flebótomo e a injeção intradérmica com agulha causaram a acumulação de PMN no local da picada (orelha), independentemente da presença de parasitas de *L. major*. Esta infiltração sugere que factores endógenos libertados durante o trauma tecidual induzem, só por si, o recrutamento de PMN. Assim, no nosso estudo teria sido importante imunofenotipar a população leucocitária da pele de murganhos que não tivessem sido sujeitos a qualquer tipo de picada. Por outro lado, seria também interessante analisar a expressão de quimiocinas, normalmente associadas ao recrutamento e imunidade celular, e de citocinas no local da infecção já que, segundo os nossos resultados, as células que apresentaram maior frequência celular foram as CD3<sup>+</sup>, que englobam maioritariamente as células NK e linfócitos T. No entanto, é nossa intenção vir a realizar este estudo, uma vez que as orelhas esquerdas de todos os animais foram recolhidas e os órgãos foram preservados em RNAlater. Ainda em relação à imunofenotipagem das células da orelha verificámos, inesperadamente, que havia uma baixa frequência de células positivas para o marcador de células dendríticas (33D1). Na infecção por *L. major*, os parasitas são observados na pele de murganhos C57BL/6 sobretudo no interior de células dendríticas (de Trez *et al.* 2009). Porém, esta é uma população bastante heterogénea de células apresentadoras de antígeno que podem não expressar o antígeno 33D1. De qualquer forma, parece que a dinâmica da infecção por *L. infantum/chagasi* é bastante díspar dos modelos de infecções cutâneas e um estudo recente (Thalhofer *et al.* 2011) vem provar esta afirmação. Nesse estudo, os autores observaram por citometria de fluxo que após 6h de infecção, os PMN Ly6G<sup>+</sup> de murganhos BALB/c são as principais células com parasitas intracelulares de *L. infantum/chagasi* transfectados com o marcador fluorescente mCherry, e são substituídos 2 dias após a infecção por MΦ (F4/80<sup>+</sup> CD11<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup>). Durante o período de execução desta tese não foi possível quantificar a carga parasitária no local da infecção, porém, essa análise será feita brevemente por PCR em tempo real, uma vez que as células foram conservadas. Ainda assim, as

lâminas de *citospin* das células da orelha analisadas neste estudo permitiram observar parasitas 3h após a infecção em ambos os grupos DI e I, 24h pós-infecção no grupo DI e 144h pós-infecção no grupo I. Devido ao reduzido número de células infectadas, como consequência provável dos tratamentos enzimáticos (DNase e Liberase CI) a que estas células foram sujeitas, não foi possível determinar a carga parasitária e fazer um estudo que permitisse quantificar as principais células hospedeiras em cada grupo (DI e I) e em cada período (3h, 24h e 144h). Porém, constatámos que após 3h de infecção o promastigota continua no local de inoculação em ambos os grupos, não tendo ocorrido a fagocitose de todas as formas parasitárias inoculadas. Por outro lado, o reduzido número de parasitas extracelulares observados pode ser resultante das centrifugações relativamente baixas a que a suspensão de células foi sujeita, e que impedem que parasitas extracelulares sejam depositados no sedimento juntamente com as células. Às 24h pi, o parasita deixa de ser detectado nas células dérmicas do grupo I, mas está presente no local da infecção em murganhos DI. A diminuição de PMN Gr1<sup>+</sup>, que estão por um lado envolvidos no processo de internalização do parasita e por outro no recrutamento de células fagocitárias profissionais, como macrófagos e células dendríticas, tem como consequência a diminuição do processo de fagocitose e de remoção do parasita. Foi registado recentemente que o atraso na remoção de promastigotas do local de infecção de murganhos BALB/c durante as primeiras 24h de infecção e após depleção neutrofílica decorre da participação de PMN na eliminação inicial do parasita (Thalhofer *et al.* 2011). No nosso estudo, 6 dias após a infecção verificou-se a situação inversa, ou seja, o parasita ressurgiu no local de infecção do grupo I mas deixou de ser detectado no grupo DI. Esta ausência do parasita no local de infecção dos animais depletados pode estar relacionada com o aumento significativo de leucócitos Gr1<sup>+</sup> e F480<sup>+</sup>. Esta subpopulação pode englobar células fagocitárias que efectuaram a remoção do parasita. Ainda que a detecção do parasita nas células da orelha tenha sido diferente às 24h e 144h entre os grupos DI e I, verificámos que culturas de células ganglionares de ambos os grupos e ao longo do todo o tempo experimental apresentaram promastigotas viáveis, apontando para a migração de

leucócitos parasitados, para estes órgãos. No entanto, a carga parasitária deverá ser extremamente reduzida, uma vez que o parasita não foi detectado por microscopia óptica nas lâminas de *citospin*.

O aumento substancial no volume dos gânglios cervicais (linfadenopatia) de alguns animais dos grupos DI e I aponta para a existência de elevada actividade imunitária celular. Assim, foi analisada a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 e TNF- $\alpha$ ) e, anti-inflamatória e reguladora (TGF- $\beta$ ) nas células ganglionares reestimuladas com Ag solúvel de *L. chagasi*, sendo este trabalho o primeiro que analisa estas citocinas em gânglios cervicais, nas primeiras horas de infecção intradérmica e neste modelo experimental, durante a depleção de PMN. Foi também quantificada a granzima B nos sobrenadantes das células ganglionares. Esta protease serínica é um marcador da citotoxicidade mediada por células e é libertada predominantemente por linfócitos Tc (CD8<sup>+</sup>), mas também por células NK. Na realidade os grupos DI e I apresentam padrões de expressão de citocinas e produção de granzima B bastante distintos entre si. Nas primeiras horas de infecção (3h), a ausência de PMN leva ao aumento significativo da expressão de citocinas pró-inflamatórias mas também de TGF- $\beta$ . Esta resposta celular inicial no grupo depletado sugere que o atraso de uma resposta imunológica inicial dos PMN propicia a activação de outras células. É provável que os parasitas sejam maioritariamente fagocitados por outras células apresentadoras de Ag, como as células dendríticas e M $\Phi$ , que rapidamente migram para os gânglios cervicais levando à activação de outras células mononucleares, com expressão e produção de citocinas ou outros mediadores imunológicos. Um estudo *in vitro* que conjugou o uso da tecnologia de *microarrays* e a bioinformática (Ettinger & Wilson 2008) mostrou que em co-culturas com 4h de M $\Phi$  infectados e linfócitos T *naive* (não activados) humanos houve uma regulação positiva de genes e vias de sinalização que se iniciam com citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, mas também com a citocina reguladora anti-inflamatória TGF- $\beta$ . No nosso estudo, a exocitose dos grânulos com libertação significativa de granzima B foi observada no grupo DI, indicando a activação de funções efectoras das células NK

ou linfócitos CD8<sup>+</sup>. No entanto, não podemos eliminar a hipótese desta enzima poder estar a ser produzida por outras células, tais como os próprios PMN, MΦ ativados, células dendríticas e linfócitos T CD4<sup>+</sup>, como já foi anteriormente descrito (Grossman *et al.* 2004; Wagner *et al.* 2008; Boivin *et al.* 2009). No grupo I, a activação celular parece ser mais tardia (24h), com sobreexpressão de TNF-α acompanhada por níveis elevados de TGF-β. Independentemente da depleção, parece haver sempre uma resposta mista em termos de expressão de citocinas. Este facto já foi anteriormente observado em infecções com *L. infantum*, em trabalhos publicados pela UEI de Leishmanioses (Rosa *et al.* 2006; Rolão *et al.* 2007), mas também de outros autores (Peruhype-Magalhães *et al.* 2006; Ettinger & Wilson 2008) e que pode estar relacionado com a regulação da resposta imunitária do hospedeiro, evitando uma resposta inflamatória exagerada que provoque danos tecidulares. Mesmo com o restabelecimento da população neutrofílica (144h), o perfil de citocinas nas células ganglionares reestimuladas com Ag de *L. chagasi* é diferente entre o grupo DI e I. No grupo I, a elevada expressão de IFN-γ leva a supor que há expansão de células Th1/Tc1 que pode ser útil no controlo da doença, uma vez que o controlo da leishmaniose visceral é dependente da produção desta citocina por linfócitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e NK cells (Liese *et al.* 2008; Goto & Prianti 2009). No grupo DI, esta citocina está diminuída, mas surpreendentemente, há aumento da exocitose de granzima B e da expressão de IL-17. Esta citocina, é produzida por linfócitos Th17, que inclui as células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e γδ, e por células CD14<sup>+</sup> (sobretudo monócitos/macrófagos, mas também por granulócitos e células dendríticas) (Lopez Kostka *et al.* 2009; Boaventura *et al.* 2010), estando envolvida no recrutamento de PMN e na sua regulação homeostática (Xu & Cao 2010). No modelo experimental de leishmaniose cutânea, a IL-17 promove a infiltração de PMN mas está associada à exacerbação da doença (Lopez Kostka *et al.* 2009). A co-existência das células Th17 e PMN nas lesões de leishmaniose mucocutânea causadas por *L. braziliensis* parece também ser favorável à patogénese da doença (Boaventura *et al.* 2010). Por outro lado, na leishmaniose visceral humana causada por *L. donovani*, a IL-17 juntamente com a IL-22 contribuem para uma resposta imunológica

protectora (Pitta *et al.* 2009). No presente trabalho, apesar da população de PMN já ter recuperado, a sua ausência no início da infecção pode ter induzido a expressão de IL-17 nas células ganglionares do grupo depletado no intuito de recrutar PMN. Mas como esta expressão vem associada à diminuição de IFN- $\gamma$ , podemos assumir que talvez torne o hospedeiro mais susceptível, favorecendo o desenvolvimento da infecção. No entanto, estas conjecturas só poderão ser comprovadas quando realizarmos a quantificação do parasita e compararmos a carga parasitária na pele e gânglios cervicais nos grupos DI e I. Por outro lado, é bastante difícil relacionar este trabalho com outros estudos de depleção em infecções com espécies viscerais, já que estes foram levados a cabo em animais BALB/c com mais de 14 dias de infecção e os órgãos estudados foram o baço, fígado e medula (Rousseau *et al.* 2001; McFarlane *et al.* 2008). No nosso estudo pretendíamos analisar o papel dos PMN na fase inicial da infecção, uma vez que o contacto inicial dos PMN com o parasita influencia o decurso da resposta imunitária durante a infecção e conseqüente a ligação entre a resposta inata e a adaptativa.

Os nossos resultados permitiram verificar que a ausência de PMN, apesar de não influenciar o fenótipo leucocitário no local de infecção, retarda a remoção dos parasitas e a possível migração de leucócitos parasitados para os órgãos internos, nomeadamente para os gânglios cervicais. Nos gânglios, a depleção teve conseqüências notórias no perfil de citocinas no início da infecção com o aumento da expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias que resultou numa resposta imunológica mista, normalmente associada à imunidade de *L. infantum* no modelo experimental, e ainda na possível activação de linfócitos Tc ou NK. A activação destas células volta a ser notada numa fase mais adiantada da infecção. No entanto, mesmo quando a população de PMN já está restabelecida, a depleção inicial parece não ser favorável ao hospedeiro, já que apesar da expressão da citocina regulatória de PMN, IL-17, ter um aumento significativo juntamente com a produção do marcador citotóxico, granzima B, a expressão de IFN- $\gamma$ , citocina que está normalmente associada ao controlo da leishmaniose visceral, é bastante reduzida. Embora os dados presentes neste trabalho sejam limitativos, podemos concluir que os PMN têm de facto

um papel na imunidade celular nas fases iniciais na infecção por *L. chagasi*, influenciando o perfil de citocinas expressas nos principais órgãos ocupados pelo parasita no início da infecção.

## 4.6 Referências bibliográficas

**Baldwin T**, Sakthianandeswaren A, Curtis JM, Kumar B, Smyth GK, Foote SJ, Handman E. 2007. Wound healing response is a major contributor to the severity of cutaneous leishmaniasis in the ear model of infection. *Parasite Immunol.* 29: 501-513.

**Belkaid Y**, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. 2000. 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.* 165: 969-977.

**Boaventura VS**, Santos CS, Cardoso CR, de Andrade J, Dos Santos WL, Clarêncio J, Silva JS, Borges VM, Barral-Netto M, Brodskyn CI, Barral A. 2010. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol.* 40: 2830-2836.

**Boivin WA**, Cooper DM, Hiebert PR, Granville DJ. 2009. Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma. *Lab Invest.* 89: 1195-1220.

**Bustin SA**, Beaulieu JF, Huggett J, Jaggi R, Kibenge FS, Olsvik PA, Penning LC, Toegel S. 2010. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol Biol.* 11:74.

**Bustin SA**, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 55: 611-622.

**Chen L**, Zhang ZH, Watanabe T, Yamashita T, Kobayakawa T, Kaneko A, Fujiwara H, Sendo F. 2005. The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. *Parasitol Int.* 54: 109-118.

**Coelho-Finamore JM**, Freitas VC, Assis RR, Melo MN, Novozhilova N, Secundino NF, Pimenta PF, Turco SJ, Soares RP. 2011. *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. *Int J Parasitol.* 41: 333-342.

**Daley JM**, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE. 2008. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol.* 83: 64-70.

**de Trez C**, Magez S, Akira S, Ryffel B, Carlier Y, Muraille E. 2009. iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania major* infection phase of C57BL/6 resistant mice.. PLoS Pathog. 5: e1000494.

**Ettinger NA**, Wilson ME. 2008. Macrophage and T-cell gene expression in a model of early infection with the protozoan *Leishmania chagasi*. PLoS Negl Trop Dis. 2: e252.

**Gonidez I**, Haneda T, Raffatellu M, George MD, Paixão TA, Rolán HG, Santos RL, Dandekar S, Tsolis RM, Bäumlér AJ. 2008. T cells help to amplify inflammatory responses induced by *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* in the intestinal mucosa. Infect Immun 76: 2008-2017.

**Goto H**, Prianti MG. 2009. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 51: 241-246.

**Grossman WJ**, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ. 2004. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. Blood. 104: 2840-2848.

**Kumar V**, Sharma A. 2010. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. Int Immunopharmacol. 10: 1325-1334.

**Liese J**, Schleicher U, Bogdan C. 2008. The innate immune response against *Leishmania* parasites. Immunobiology. 213: 377-387.

**Lima GM**, Vallochi AL, Silva UR, Bevilacqua EM, Kiffer MM, Abrahamsohn IA. 1998. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous leishmaniasis. Immunol Lett. 64: 145-151.

**Lopez Kostka S**, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. 2009. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. J Immunol. 182: 3039-3046.

**Maurício IL**, Stothard JR, Miles MA. 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitol Today. 16: 188-189.

**McFarlane E**, Perez C, Charmoy M, Allenbach C, Carter KC, Alexander J, Tacchini-Cottier F. 2008. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. Infect Immun. 76: 532-541.

**Novais FO**, Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A, de Oliveira CI. 2009. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. J Immunol. 183: 8088-8098.

**Peruhype-Magalhães V**, Martins-Filho OA, Prata A, Silva Lde A, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, Figueiredo RM, Guimarães-Carvalho SF, Ferrari TC, Van Weyenbergh J, Correa-Oliveira R. 2006. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol.* 146: 124-132.

**Peters NC**, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. 2008. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. 321: 970-974.

**Peters NC**, Kimblin N, Secundino N, Kamhawi S, Lawyer P, Sacks DL. 2009. Vector transmission of *Leishmania* abrogates vaccine-induced protective immunity. *PLoS Pathog.* 5: e1000484.

**Pitta MG**, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, Argiro L, el Kheir M, Bucheton B, Mary C, El-Safi SH, Dessein A. 2009. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest.* 119: 2379-2387.

**Quinnell RJ**, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. 2009. *Parasitology.* 136: 1915-1934.

**Ribeiro-Gomes FL**, Otero AC, Gomes NA, Moniz-De-Souza MC, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, Calich VL, Coutinho SG, Lopes MF, DosReis GA. 2004. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol.* 172: 4454-4462.

**Rolão N**, Cortes S, Gomes-Pereira S, Campino L. 2007. *Leishmania infantum*: mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. *Exp Parasitol.* 115: 270-276.

**Rosa R**, Marques C, Rodrigues OR, Santos-Gomes GM. 2006. *Leishmania infantum* released proteins specifically regulate cytokine expression and production patterns by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *Acta Trop.* 97: 309-317.

**Rosa R**, Rodrigues OR, Marques C, Santos-Gomes GM. 2005. *Leishmania infantum*: soluble proteins released by the parasite exert differential effects on host immune response. *Exp Parasitol.* 109: 106-114.

**Rousseau D**, Demartino S, Ferrua B, Michiels JF, Anjuère F, Fragaki K, Le Fichoux Y, Kubar J. 2001. *In vivo* involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. *BMC Microbiol.* 1:17.

**Santos-Gomes GM**, Abranches P. 1996. Comparative study of infectivity caused by promastigotes of *Leishmania infantum* MON-1, *L. infantum* MON-24 and *L. donovani* MON-18. *Folia Parasitol.* 43: 7-12.

**Tacchini-Cottier F**, Zweifel C, Belkaid Y, Mukankundiye C, Vasei M, Launois P, Milon G, Louis JA. 2000. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. J Immunol. 165: 2628-2636.

**Thalhofer CJ**, Chen Y, Sudan B, Love-Homan L, Wilson ME. 2011. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum chagasi*. Infect Immun. 79: 108-17.

**The Jackson Laboratory**. 2011. Hematological survey of 11 inbred strains of mice. MPD: Jaxpheno4. The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine USA. <http://phenome.jax.org>

**Wagner C**, Stegmaier S, Hänsch GM. 2008. Expression of granzyme B in peripheral blood polymorphonuclear neutrophils (PMN), myeloid cell lines and in PMN derived from haematopoietic stem cells in vitro. Mol Immunol. 45: 1761-1766

**Xu S**, Cao X. 2010. Interleukin-17 and its expanding biological functions. Cell Mol Immunol. 7: 164-174.

---

## CONCLUSÕES FINAIS

O objectivo desta dissertação de doutoramento foi aprofundar o papel desempenhado pelos neutrófilos no início da infecção por *L. infantum*, esclarecendo a sua função no desenvolvimento da imunidade inata e adaptativa para melhor compreender a patogénese da doença. Os principais resultados obtidos com os estudos *in vitro* e *in vivo* realizados encontram-se resumidos nas Figuras A e B e permitiram-nos comprovar que:

- Os PMN são capazes de internalizar promastigotas de *L. infantum* e inibir, de forma selectiva, a capacidade de multiplicação parasitária; parte dos promastigotas, provavelmente os mais virulentos, possuem a capacidade de se diferenciar na forma intracelular obrigatória, o amastigota, mantendo-se viáveis;
- Os parasitas intracelulares (provavelmente os mais virulentos) dos PMN são transferidos para os MΦ exibindo morfologia normal;
- A regulação negativa da função quimiotática dos PMN aponta para a retenção destas células no local da infecção;
- A diminuição da população de PMN necróticas secundárias e o aumento de PMN viáveis incrementa as probabilidades de sobrevivência e multiplicação das formas intracelulares do parasita, ao mesmo tempo que as funções imunitárias dos PMN continuam activas;
- A indução da expressão de quimiocinas pelos PMN no início da infecção contribui para o recrutamento e activação de novos PMN, de células dendríticas e monócitos/macrófagos para o local de infecção;
- Os PMN poderão ter um papel importante na remoção inicial do parasita e no recrutamento de células fagocitárias profissionais, como macrófagos e células dendríticas para o local de infecção;

- 
- No início da infecção, os mecanismos não oxidativos da imunidade inata dos PMN são activados, produzindo e libertando  $O_2^-$  e efectuando a exocitose de MPO activa e das proteases serínicas NE e CatG, contribuindo para a destruição dos parasitas que permanecem no ambiente extracelular;
  - Independentemente da quantidade inicial de PMN recrutados para o local de infecção, ocorre migração de leucócitos parasitados da pele para órgãos internos, nomeadamente para os gânglios cervicais. Porém, a rápida activação de outras células mononucleares, com expressão e produção de citocinas pró e anti-inflamatórias e outros mediadores imunitários, como a granzima B é dependente dos PMN;
  - A carga parasitária e a indução da expressão da citocina anti-inflamatória TGF- $\beta$  por M $\Phi$ , na fase inicial da infecção, são independentes da presença de PMN; porém, a TGF- $\beta$  está associada à diminuição da produção de NO;
  - Na fase mais tardia da infecção, a inibição da expressão da quimiocina CCL3/MIP-1 $\alpha$  leva à redução da migração de PMN em resposta ao estímulo inflamatório/infeccioso, privilegiando a necessidade de maximizar outras funções anti-microbidas, tais como a libertação do conteúdo dos grânulos;
  - A redução da expressão de quimiocinas, na fase mais tardia da infecção, está relacionada sinergeticamente com a regulação negativa da expressão de citocinas pró-inflamatórias e de TLR-2;
  - O contacto prolongado com o parasita internalizado por PMN inibe a expressão de IL-1 $\beta$  e de MCP-1 em M $\Phi$  e reduz a produção de NO, potenciando o desenvolvimento de uma resposta anti-inflamatória;
  - Na ausência de PMN, os parasitas são fagocitados por outras células apresentadoras de Ag, como as células dendríticas e M $\Phi$  que migram para os gânglios cervicais;

- Na ausência de PMN, e com o decorrer da infecção a expressão da citocina IL-17 e a libertação da protease serínica granzima B, associadas à diminuição da expressão da citocina IFN- $\gamma$  nos gânglios cervicais, influenciam o recrutamento e a regulação homeostática dos PMN;

Para além disso também constatámos que:

- O papel relevante que o receptor TLR-4 desempenha no reconhecimento do parasita pelos M $\Phi$ , é potenciado pela interacção com PMN;

- Em murganhos, o anticorpo monoclonal RB6-8C5 depleta especificamente os PMN, mantendo intactas outras populações leucocitárias, salientando o elevado nível de eficácia deste anticorpo.

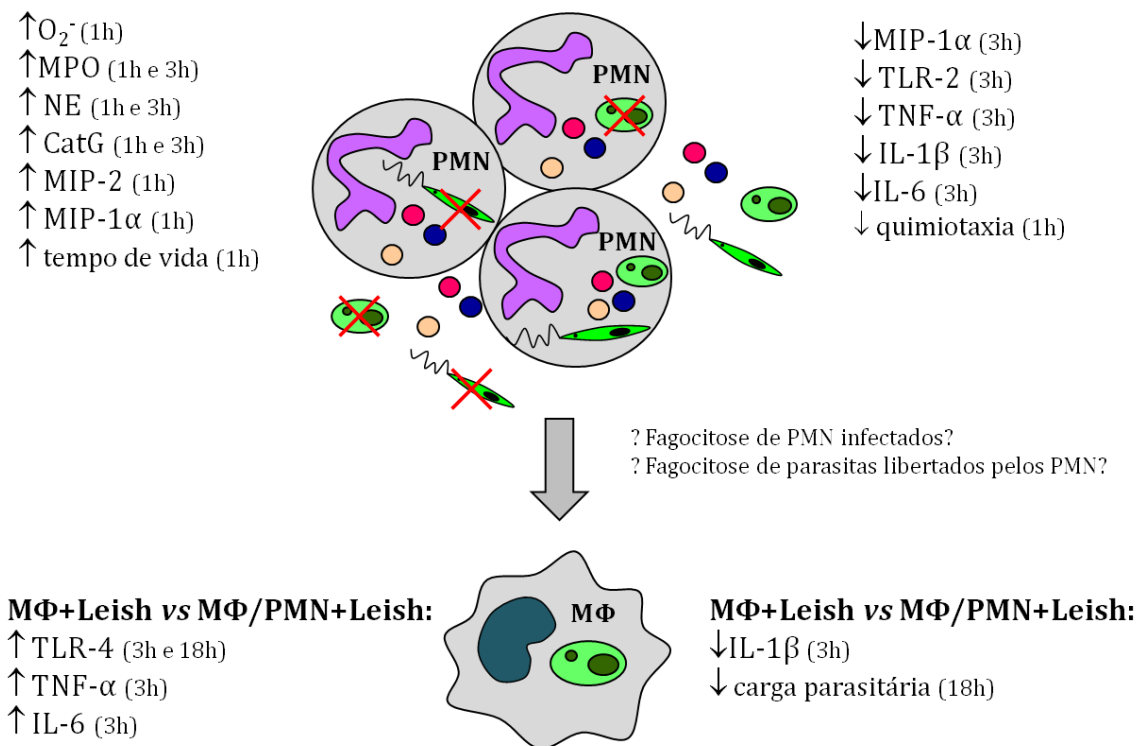
Concluindo, os PMN têm uma posição crucial durante a infecção com *L. infantum*, desempenhando um papel fundamental na resposta inflamatória aguda e na regulação da infecção crónica, estabelecendo ligação entre a resposta imunológica inata e adaptativa.

Este trabalho contribui para a clarificação dos mecanismos utilizados por *L. infantum* para subverter a acção da resposta imunológica no hospedeiro vertebrado e estabelecer a infecção. Face aos escassos estudos que relacionam PMN e o agente da LVZ, *L. infantum*, este trabalho poderá ser mais um contributo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, mais eficientes no tratamento da leishmaniose canina e visceral.

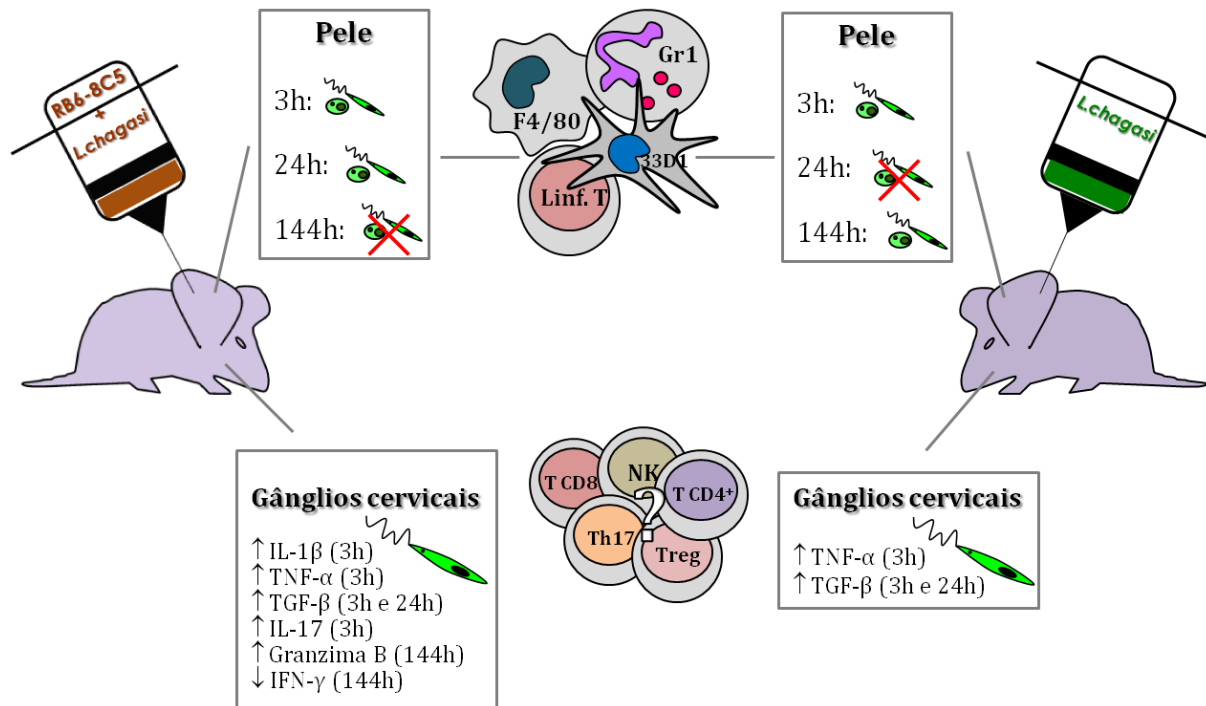
Todavia é imperativo que nos próximos estudos sejam abordados outras matérias relacionadas com a actividade dos PMN, tais como os factores de virulência do parasita e a interacção dos PMN com outras células envolvidas na resposta imunitária inicial como é o caso das células dendríticas, NK e Th17. O modo como estes factores podem influenciar ou regular os

mecanismos imunológicos dos PMN é um novo e fascinante campo de investigação que é importante explorar.

O recurso a novas tecnologias, como a marcação das células com fluorocromos fluorescentes para observação de imagens da interação destas células em tempo real e o uso de ferramentas de imagem intravital que permite seguir a infecção *in vivo* e evita o sacrifício de animais, é crucial para abranger completamente a versatilidade e especificidade dos PMN na infecção por *L. infantum*.



**Figura A.** Esquema representativo dos principais resultados obtidos nos estudos *in vitro*.



**Figura B.** Esquema representativo dos principais resultados obtidos nos estudos *in vivo*.