



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Atividade oxidativa e não oxidativa de células fagocitárias
expostas a protozoários do género *Leishmania*

Ana Sofia Valério Bolas

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS NA
ESPECIALIDADE DE BIOLOGIA MOLECULAR EM MEDICINA TROPICAL E INTERNACIONAL**

Outubro, 2014



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Atividade oxidativa e não oxidativa de células fagocitárias
expostas a protozoários do género Leishmania**

Autor: Ana Sofia Valério Bolas

Orientadora: Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas

Este estudo foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia com a co-participação do FEDER através do projecto PTDC/CVT/113121/2009 – *Consequences of neutrophil-Leishmania infantum interactions in the establishment of canine leishmaniosis*

Publicações e Comunicações

Publicações: artigos em preparação e submetidos

- Ana Valério-Bolas; Maria Pereira; David Santos-Mateus; Armanda Rodrigues; Mariana Rafael-Fernandes; Mafalda Claro; Gabriela Santos-Gomes. Effect of cutaneous and visceral *Leishmania* parasites in the activation of murine phagocytic cells (artigo em preparação)

- Maria Alexandra Basso; Cátia Marques; Marcos Santos; Ana Duarte; Hugo Pissarra; L. Miguel Carreira; Lídia Gomes; Ana Valério-Bolas; Gabriela Santos-Gomes; Luís Tavares; Isabel Pereira Fonseca. Leishmaniosis: The forgotten disease of cats. A successful case of feline leishmaniosis treatment (artigo em preparação)

- Maria Pereira; Ana Valério-Bolas; Cátia Saraiva-Marques; Armanda Rodrigues; David Santos-Mateus; Graça Alexandre-Pires, Isabel Pereira da Fonseca, Gabriela Santos-Gomes. Development of dog immune system: from in uterus to elderly (artigo submetido - *The Veterinary Journal*)

Comunicações: Comunicações orais em congressos

- Gabriela Santos-Gomes; Olivia Rodrigues; Claudia Marques; David Santos-Mateus; AnaValério-Bolas; Maria Pereira; Armanda Rodrigues;Isabel Pereira da Fonseca. Role of toll-like receptors during *L. infantum* in fection. Fifth world congress on leishmaniasis -worldleish 5. Livro de Abstracts O331

Maria de Aires Pereira, David Santos-Mateus, Ana Valério-Bolas, Armanda Rodrigues, Gabriela Santos-Gomes. Terapêutica e controlo da leishmaniose canina. Congresso da Ordem dos Médicos Veterinários. 30 de Novembro e 1 de Dezembro de 2013, Lisboa

G.Santos-Gomes, D. Santos-Mateus, A. Valério-Bolas, M. Rafael-Fernandes, M. Claro, A. Rodrigues, M. Aires Pereira. Imunidade e resposta imunitária na leishmaniose canina. Congresso da Ordem dos Médicos Veterinários. 30 de Novembro e 1 de Dezembro de 2013, Lisboa

Comunicações sobre leishmaniose: Poster

Rodrigues, A., Alexandre-Pires, G., Santos-Mateus, D., Valério-Bolas, A., Rafael-Fernandes, M., Aires-Pereira, M., Pereira-da-Fonseca, I., Santos-Gomes, G. Impact on Cell Metabolism of Dog Hepatocytes when Exposed to *Leishmania infantum*. Congress of the European Association of Veterinary Anatomists (EAVA), Romania, 23th-26th July 2014.

Valério-Bolas A, Pereira MA, Santos M, Rafael-Fernandes M, Rodrigues A, Santos-Mateus D, Claro M, Pereira da Fonseca I, Santos-Gomes GM. Importance of neutrophils and macrophages in the immune response to *Leishmania sp.* Infection. iMed 5.0 Conference, Lisboa, 11th, 12th and 13th of October 2013.

Mafalda Claro, Armanda Rodrigues, David Santos-Mateus, Ana Valério-Bolas, Catarina Martins, Graça Alexandre-Pires, Gabriela Santos-Gomes. Analysis of cell memory in liver of mice infected with *Leishmania infantum*. Infection. iMed 5.0 Conference, Lisboa, 11th, 12th and 13th of October 2013.

Maria Pereira, David Santos-Mateus, Ana Valério-Bolas, Armanda Rodrigues, Cátia Marques, Isabel Pereira da Fonseca, Gabriela Santos-Gomes. Exocitose enzimática por células polimorfonucleares expostas a *Leishmania infantum*. Jornadas Científicas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Dezembro de 2013

- Ana Valério-Bolas; Maria Armanda Rodrigues; F. Teixeira; David Santos-Mateus; S. Carvalho; Ana Maria Tomás; Gabriela Maria Santos-Gomes. T cells immune response induced by cyclophilin a, superoxide dismutase and aminopeptidase *L. infantum* recombinant proteins. Fifth World Congress on leishmaniasis - Worldleish 5. Livro de Abstracts P185

- Maria Alexandra Basso; Cátia Saraiva Marques; Ana Duarte; Hugo Pissarra; Miguel Carreira; Ana Valério-Bolas; Gabriela Santos-Gomes; Luís Tavares; Isabel Pereira Fonseca. The forgotten disease of cats: a case of feline leishmaniosis. Fifth World Congress on leishmaniasis - Worldleish 5

Agradecimentos

À minha orientadora Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes por me ter acolhido no seu grupo de investigação e por ter sido uma orientadora excecional e incansável. Obrigada por todo o apoio, paciência, ajuda, dedicação e por todos os conhecimentos que me transmitiu. A sua ajuda foi fundamental, sem ela nunca teria chegado onde cheguei. Tenho também que lhe agradecer pela amizade e por tudo o que fez por mim até ao momento. Obrigada por ser como é e por nos transmitir como é ser uma verdadeira cientista. Os seus conselhos são a chave do sucesso do nosso trabalho.

Ao Professor Doutor Celso Cunha por me ter dado a oportunidade de ingressar neste mestrado e por desempenhar com excelência as suas funções como coordenador do mestrado. Pela sua boa disposição e por alegrar os nossos almoços.

À Professora Doutora Graça Pires por se mostrar sempre disponível em ajudar e pelas fotografias maravilhosas que tirou da NET. Sem ela esta parte do meu trabalho não teria sido conseguida, foi sem dúvida uma ajuda fundamental.

À Professora Doutora Isabel Fonseca, ao Marcos Santos e à Cátia Marques por toda a disponibilidade demonstrada e pela realização dos testes parasitológicos aos canídeos que foram utilizados neste estudo.

Ao Grupo de Intervenção Cinotécnico da Guarda Nacional Republicana por nos ter disponibilizado os seus cães para recolhas de sangue semanais. À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa por todos os canídeos que disponibilizou para este estudo. A todos os proprietários privados que nos concederam a utilização dos seus cães para o nosso estudo. Foram sem dúvida imprescindíveis, pois sem o seu contributo este estudo nunca teria sido concluído.

À Doutora Dinora Lopes, ao senhor Victor e à dona Rosário pelo trabalho desempenhado no biotério, por se disponibilizarem sempre, mesmo fora de horas, a colaborar com o meu trabalho.

À Maria de Aires Pereira pela paciência, dedicação, ensinamento, por seres o meu pilar neste ano laboratorial de tese. Foste sem dúvida fundamental para o meu sucesso e realmente palavras não chegam para agradecer tudo o que tens feito. És uma pessoa muito importante para mim. Força para o resto desta etapa. Sei que vais ter muito sucesso, pois excelente Professora já tu és.

À Armanda Rodrigues e ao David Mateus pela orientação que me deram quando cheguei pela primeira vez ao laboratório, pela excelente integração, por toda a ajuda e apoio que me deram até ao momento, pela amizade e por todos os bons momentos que me proporcionaram no laboratório e fora deste. À Mariana Fernandes pelo apoio, pela

partilha de bons e maus momentos durante estes dois anos de mestrado, por toda a ajuda que me deu, pelas gargalhadas, pela boa disposição e pelo companheirismo. À Mafalda Claro pelo apoio, carinho, amizade, preocupação e disponibilidade. De colegas e amigos, isto sim é um bom grupo de trabalho. Vocês são a família IHMT.

Ao Doutor João Tavanez pelas conversas inteligentes, pela partilha de conhecimento e pelos conselhos, pela sua boa disposição e por também ser responsável pelo bom ambiente vivido no laboratório.

Aos meus pais agradeço do fundo do meu coração tudo o que têm feito por mim, por sempre apoiarem as minhas decisões, por me proporcionarem mais esta etapa da minha vida, por fazerem os possíveis e os impossíveis para eu poder chegar sempre mais longe, por toda a dedicação e por serem sem dúvida os melhores pais do mundo. Aos meus avós por todo o apoio e carinho e por tudo aquilo que me proporcionam, o meu muito obrigado. Agradeço também à minha Tia Elisa por fazer parte da minha vida desde que me lembro, pelo apoio e carinho, por tudo o que me ensina e por me incentivar a ser sempre melhor.

À Ana Luisa Pereira, Andreia Casimiro, Sara Moleirinho, Andreia Rosa e André Silva agradeço pela amizade e carinho, pelo apoio incondicional, por me colocarem bem-disposta, por me ouvirem e me darem conselhos, pela paciência e por todos os bons momentos que me proporcionam. São sem dúvida uns amigos exemplares.

À Silvia Pereira pela partilha dos bons e dos maus momentos, pelas conversas, pelo incentivo e apoio, pelo carinho e pela ótima amizade. À Débora Almeida pela sua boa disposição, por me fazer rir, por ser uma querida e pela amizade, por ouvir as minhas lamentações e aturar o meu mau humor quando as coisas não corriam tão bem. À Carla Ferreira por toda a ajuda que me deu nestes dois anos, pelo companheirismo, apoio e amizade. À Joana Monteiro pelo apoio, disponibilidade e carinho demonstrados. Também fazem parte da família IHMT.

Resumo

As leishmanioses, causadas por protozoários do género *Leishmania*, são um problema de saúde pública e veterinária. No homem, a doença classifica-se clinicamente em leishmaniose cutânea, visceral e mucocutânea. A leishmaniose cutânea pode ser produzida por *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis*, entre muitas outras espécies. A leishmaniose visceral zoonótica causada por *L. infantum* apresenta manifestações clínicas graves que podem ser fatais. Neutrófilos ou células polimorfonucleares (PMN) têm função crucial na imunidade inata, sendo as primeiras a ser recrutadas para o local de infeção. Os monócitos/macrófagos (MΦ) desempenham o duplo papel de serem células fagocíticas apresentadoras profissionais de antigénios e as hospedeiras por excelência de *Leishmania*. O presente trabalho teve como objetivo analisar a atividade leishmanicida de neutrófilos de murganhos BALB/c e de MΦ (linha celular P388D1 derivada de murganhos) quando expostos *in vitro* a espécies de *Leishmania* do subgénero *Leishmania* (*L. infantum* e *L. amazonensis*) e *Viannia* (*L. shawi* e *L. guyanensis*) através da avaliação da (i) expressão dos sensores celulares *NOD1*, *NOD2*, *TLR2*, *TLR4* e *TLR9* por real time PCR, (ii) ativação dos mecanismos oxidativos (superóxido nos neutrófilos e óxido nítrico e ureia nos MΦ), (iii) importância dos mecanismos enzimáticos e (iv) produção de NET por neutrófilos. Estudo idêntico foi realizado em neutrófilos e MΦ de cães infetados *in vitro* com *L. infantum*. Neutrófilos de murganhos internalizam parasitas dos subgéneros *Leishmania* e *Viannia*. Os mecanismos oxidativos e enzimáticos são ativados e geradas NET, contribuindo para o controlo da infeção. No entanto, o contato com os parasitas não promove a expressão génica dos sensores celulares. MΦ P388D1 fagocitam as diferentes espécies de *Leishmania*, porém não ocorre ativação da via clássica, mas sim da via alternativa, assegurando a sobrevivência intracelular do parasita. Nestas células, a exposição às diferentes espécies de *Leishmania* conduziu a aumentos pontuais da expressão génica de *NOD1* e *TLR2* e também de *TLR9*, com exceção de *L. shawi*. No entanto, as espécies do subgénero *Viannia* induziram aumento da expressão génica de *NOD2*. Em conjunto, estes resultados sugerem que cada espécie elabora estratégias próprias de ativação dos sensores celulares. Os neutrófilos caninos também internalizaram *L. infantum*, ativaram os mecanismos oxidativos e produziram NET capazes de aprisionar extracelularmente promastigotas. Porém, apenas ocorreu exocitose da elastase neutrofilica sugerindo que este parasita restringe a actividade enzimática de neutrófilos. MΦ caninos infetados por *L. infantum* ativaram a via alternativa e apresentaram unicamente expressão aumentada de *TLR2*, o que desencadeia a ativação dos mecanismos oxidativos e produção de citocinas pró-inflamatórias. Este estudo contribuiu para clarificar o efeito da infeção por espécies cutâneas e viscerais de *Leishmania* na ativação dos mecanismos oxidativos e não oxidativos das células fagocitárias de cães e modelo roedor. Foi demonstrado pela primeira vez que a infeção por *Leishmania spp.* na célula hospedeira está intimamente associada ao aumento da expressão de *TLR2* e, consequentemente, à provável ativação desta via metabólica. A compreensão dos fatores que inibem ou estimulam os sensores celulares de imunidade inata, cruciais no reconhecimento do parasita, pode ser importante no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a leishmaniose.

Palavras-chave: Células fagocitárias, sensores celulares, mecanismos oxidativos e enzimáticos, NET, *Leishmania sp.*

Abstract

Caused by protozoa of the genus *Leishmania*, leishmaniasis, are considered an important public health issue and a veterinary disease. In humans, the disease can be clinically classified into cutaneous, visceral and mucocutaneous leishmaniasis. Cutaneous leishmaniasis can be produced by *L. amazonensis*, *L. shawi* and *L. guyanensis* among many others species. The zoonotic visceral leishmaniasis caused by *L. infantum* presents severe clinical manifestations that can be fatal if left untreated. Neutrophils or polymorphonuclear cells (PMN) play a crucial role in innate immunity, being the first cells to be recruited to the site of infection. Monocytes/macrophages (MΦ) play the dual role of being phagocytic and antigenic presenting cells and the definitive host cells of *Leishmania* parasite. This study was designed to investigate the leishmanicidal activity of neutrophils isolated from BALB/c mice and of MΦ (cell line P388D1 differentiated from mice) exposed *in vitro* to two species of subgenus *Leishmania* (*L. amazonensis* and *L. infantum*) and two species of subgenus *Viannia* (*L. shawi* and *L. guyanensis*) by evaluating (i) gene expression of cell sensors *NOD1*, *NOD2*, *TLR2*, *TLR4* and *TLR9* through real time PCR, (ii) the activation of oxidative mechanisms (superoxide by neutrophils and nitric oxide and urea by MΦ), (iii) the importance of enzymatic mechanisms and (iv) the production of NET by neutrophils. Similar studies were carried out in dog' neutrophils and MΦ infected *in vitro* by *L. infantum*. Murine neutrophils were able to internalize parasites of *Leishmania* and *Viannia* subgenera. Oxidative and enzymatic mechanisms were activated and NET were generated, leading to control of infection. However, the parasite did not induced the gene expression of cell sensors. MΦ P388D1 phagocytosed the different species of *Leishmania* although without activating the macrophage classical pathway. Instead, parasites activated the MΦ alternative pathway, ensuring intracellular survival. In such cells, the exposition to the different species of *Leishmania* led to transient increase *NOD1* and *TLR2* gene expression and, also of *TLR9* with the exception of *L. shawi*. However, only the species of the subgenus *Viannia* caused the increase of *NOD2* gene expression. Taken together, these results suggest that each parasite species develop their own strategy to promote or, by the contrary to avoid the activation of cell sensors. Dog neutrophils also internalized *L. infantum* parasites, activated oxidative mechanisms and generated NET able to ambush extracellular promastigotes. However, only occurs exocytosis of neutrophilic elastase, suggesting that this parasite restricts the enzymatic activity of neutrophils. Dog MΦ *L. infantum*-infected activated the alternative pathway and enhanced the gene expression of *TLR2*, stimulating oxidative mechanisms and the production of pro-inflammatory cytokines. This study sheds light on the effect of cutaneous and visceral *Leishmania* parasites in the activation of oxidative and non-oxidative mechanisms of mice and dog phagocytic cells. It is also demonstrated for the first time that the establishment of infection by *Leishmania* spp. in the definitive host cell is closely associated with the increase of *TLR2* gene expression and likely, by the activation of this metabolic pathway. Understanding the factors that inhibit or, by the contrary, stimulate innate cell sensors, which are crucial for parasite recognition, might be important in the development of new therapeutic strategies for leishmaniasis.

Keywords: Phagocytic cells, cell sensors, oxidative mechanisms, granule exocytosis, NET, *Leishmania* spp.

Índice

Publicações e Comunicações	i
Resumo.....	v
Abstract	vi
Índice.....	vii
Índice de figuras.....	x
Índice de tabelas.....	xi
Lista de Abreviaturas	xii
1.Introdução	1
1.1.Leishmanioses	2
1.1.1.Ciclo de vida	6
1.1.2.Hospedeiro vertebrado	8
1.1.3.Diagnóstico, tratamento e profilaxia	9
1.1.4.Modelo Murino	12
1.2.Resposta imunitária	13
1.2.1.Imunidade inata.....	14
1.2.2.Neutrófilos	16
1.2.3.Macrófagos.....	20
1.2.4.Recetores Toll-like	22
1.2.5.Recetores NOD-like	24
2.Objetivos	27
3.Materiais e Métodos.....	28
3.1.Animais e parasitas.....	29
3.1.1.Canídeos.....	29
3.1.2.Murganhos	29
3.1.3.Parasitas	30
3.2.Neutrófilos de murganho.....	32
3.2.1.Isolamento e purificação	32
3.2.2.Interação neutrófilos - <i>Leishmania</i>	33
3.3.Linha celular macrófagos-like P388D1	34
3.3.1.Interação macrófagos-like P388D1 – <i>Leishmania</i>	34
3.4.Monócitos e neutrófilos de canídeo.....	35
3.4.1.Isolamento e purificação	35
3.4.2.Diferenciação de monócitos em macrófagos	36

3.4.3. Interação macrófagos - <i>Leishmania</i>	37
3.4.4. Interação neutrófilos - <i>Leishmania</i>	37
3.5. NET	38
3.6. Produção de superóxido por neutrófilos.....	39
3.7. Exocitose de elastase neutrofílica e catepsina G	40
3.8. Produção de óxido nítrico por macrófagos-like P388D1	41
3.9. Produção de óxido nítrico por macrófagos de sangue periférico de canídeo	42
3.10. Produção de ureia por macrófagos	42
3.11. Quantificação da expressão génica de <i>NOD</i> e <i>TLR</i>	44
3.11.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA	44
3.11.2. Seleção de genes-alvo e sequências iniciadoras.....	45
3.11.3. PCR convencional, purificação e clonagem do produto amplificado em vetores plasmídicos.....	47
3.11.4. PCR em tempo real e construção de curvas – padrão para quantificação absoluta da expressão génica.	51
3.12. Análise estatística.....	52
3.12.1. Murganhos	52
3.12.2. Canídeos.....	53
4. Resultados	54
4.1. Modelo roedor	55
4.1.1. Neutrófilos e macrófagos-like P388D1 fagocitam promastigotas de <i>L. infantum</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. shawi</i> e <i>L. guyanensis</i> e promovem a sua diferenciação em amastigotas.	55
4.1.2. <i>L. infantum</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. shawi</i> e <i>L. guyanensis</i> induzem a produção do ião superóxido por neutrófilos	58
4.1.3. <i>L. infantum</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. shawi</i> e <i>L. guyanensis</i> estimulam a exocitose de EN e CatG por neutrófilos.....	60
4.1.4. A expressão génica dos recetores <i>NOD-like</i> e <i>Toll-like</i> não sofreu alterações significativas em neutrófilos incubados com <i>Leishmania</i> spp.	63
4.1.5. Formação de NET por neutrófilos de murganho após contato com <i>L. infantum</i> , <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. guyanensis</i>	66
4.1.6. Inibição da produção de óxido nítrico em macrófagos-like P388D1 na presença de <i>L. infantum</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. shawi</i> ou <i>L. guyanensis</i>	67
4.1.7. Aumento da concentração de ureia por macrófagos-like P388D1 infetados com <i>L. infantum</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. shawi</i> ou <i>L. guyanensis</i>	70
4.1.8. <i>L. infantum</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. shawi</i> e <i>L. guyanensis</i> causam alteração na expressão génica dos recetores <i>NOD</i> e <i>Toll</i> em macrófagos-like P388D1.....	73
4.2. Canídeos	79

4.2.1. Neutrófilos e macrófagos fagocitam promastigotas de <i>L. infantum</i> e promovem a sua diferenciação em amastigotas	79
4.2.2. <i>L. infantum</i> induz a produção do ião superóxido em neutrófilos caninos	81
4.2.3. <i>L. infantum</i> induz o aumento da exocitose de EN em neutrófilos caninos.....	82
4.2.4. Formação de NET por neutrófilos caninos após contato com <i>L. infantum</i>	84
4.2.5. <i>L. infantum</i> não induz a produção de óxido nítrico por macrófagos caninos.....	85
4.2.6. Aumento da produção de ureia por macrófagos infectados por <i>L. infantum</i>	86
4.2.7. <i>L. infantum</i> induz aumento da expressão génica de <i>TLR2</i> por macrófagos caninos ..	87
5. Discussão e conclusão.....	89
6. Referências bibliográficas.....	97

Índice de figuras

Figura 1.1. Representação esquemática da estrutura celular de <i>Leishmania</i>	7
Figura 1.3. Representação esquemática das duas vias de ativação de macrófagos.....	21
Figura 1.4. Representação esquemática de TLR e respetivos adaptadores.....	23
Figura 1.5. Representação esquemática da constituição de dois NLR.....	24
Figura 3.1. Isolamento e purificação de neutrófilos.....	33
Figura 3.4. Ensaio colorimétrico para quantificação da produção de ureia.	44
Figura 3.5. Gel de agarose com produtos de PCR de DNA plasmídico dos genes de murganho	50
Figura 3.6. Gel de agarose com produtos de PCR de DNA plasmídico dos genes de cão.....	51
Figura 4.2. Porcentagem de macrófagos- <i>like</i> P388D1infetados ao longo do tempo.....	57
Figura 4.5. Formação de NET por neutrófilos de murganho	66
Figura 4.6. Níveis de produção de NO por macrófagos- <i>like</i> P388D1 infetados.....	69
Figura 4.7. Produção de ureia por macrófagos- <i>like</i> P388D1.	72
Figura 4.8. Expressão génica de <i>NOD1</i> em macrófagos- <i>like</i> P388D1 incubados com <i>L. infantum</i> , <i>L. amazonensis</i> (a e b), <i>L. shawi</i> ou <i>L. guyanensis</i> (c e d)	74
Figura 4.9. Expressão génica de <i>NOD2</i> em macrófagos- <i>like</i> P388D1 incubados com <i>L. infantum</i> , <i>L. amazonensis</i> (a e b), <i>L. shawi</i> ou <i>L. guyanensis</i> (c e d).....	75
Figura4.10. Expressão génica de <i>TLR2</i> em macrófagos- <i>like</i> P388D1 incubados com <i>L. infantum</i> , <i>L. amazonensis</i> (a e b), <i>L. shawi</i> ou <i>L. guyanensis</i> (c e d).	76
Figura 4.11. Expressão génica de <i>TLR4</i> em macrófagos- <i>like</i> P388D1 incubados com <i>L. infantum</i> , <i>L. amazonensis</i> (a e b), <i>L. shawi</i> ou <i>L. guyanensis</i> (c e d).	77
Figura 4.12. Expressão génica de <i>TLR9</i> em macrófagos- <i>like</i> P388D1 incubados com <i>L. infantum</i> , <i>L. amazonensis</i> (a e b), <i>L. shawi</i> ou <i>L. guyanensis</i> (c e d).....	78
Figura 4.19. Produção de ureia pela via alternativa de macrófagos caninos.	86
Figura 4.20. Expressão génica de <i>TLR2</i> por macrófagos incubados com promastigotas de <i>L. infantum</i>	88

Índice de tabelas

Tabela 1.1. Vetores do género <i>Phlebotomus</i> , espécies de <i>Leishmania</i> , patologias e respetiva distribuição geográfica.....	3
Tabela 1.2. Vetores do género <i>Lutzomyia</i> , espécies de <i>Leishmania</i> , patologias e respetiva distribuição geográfica.....	4
Tabela 1.3. Princípios ativos de segunda linha utilizados no tratamento de leishmaniose e respetivos mecanismos de ação.....	11
Tabela 3.1. Primers <i>forward</i> e <i>reverse</i> para amplificação de genes de murganho.	46
Tabela 3.2. Primers <i>forward</i> e <i>reverse</i> para canídeo.....	47
Tabela 3.3. Condições de amplificação dos genes de murganho por PCR convencional..	48
Tabela 3.4. Condições de amplificação dos genes caninos por PCR convencional.....	48
Tabela 4.1. Número de cópias médio dos recetores NOD-like e Toll-like expresso por neutrófilos após estimulação com agonistas	63
Tabela 4.2. Expressão génica de recetores NOD-like e Toll-like em neutrófilos incubados com espécies de <i>Leishmania</i> do subgénero <i>Leishmania</i>	64
Tabela 4.3. Expressão de genes dos recetores NOD-like e Toll-like em neutrófilos incubados com espécies de <i>Leishmania</i> do subgénero <i>Viannia</i>	65
Tabela 4.4. Expressão de genes da família de recetores NOD-like e Toll-like em MΦ caninos incubados com <i>L. infantum</i>	87

Lista de Abreviaturas

- AaMΦ** – macrófagos ativados pela via alternativa
- ADLC** – leishmaniose cutânea anérgica difusa
- ALX** – recetor quimiotático da lipoxantina A4
- APC** – células apresentadoras de antígeno
- ATP** – adenina trifosfato
- CaCl₂** – cloreto de cálcio
- CaMΦ** – macrófagos classicamente ativados
- CARD** – domínio de recrutamento de caspase
- CatG** – catepsina G
- CD** – células dendríticas
- CIE** – contraimuno-electroforese
- Citospin** – citocentrifugação
- CPDA** – citrato, fosfato, dextrose
- CSF** – fator estimulador de colónias
- DNA** – ácido desoxirribonucleico
- dsDNA** – ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla
- dsRNA** – ácido ribonucleico de cadeia dupla
- DNAp** – ácido desoxirribonucleico plasmídico
- Dnase** – desoxirribonucleases
- DAP** – teste de aglutinação direta
- DAPI** – corante nuclear fluorescente 4', 6-diamidino-2-phenylindole
- DAT** – teste de aglutinação direta
- DO** – densidade ótica
- EDTA** – ácido etilenodiamino tetra-acético

- EN** – elastase neutrofílica
- ES** – excretados/segregados
- FBS** – soro fetal bovino
- fMLP** – N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
- FW** – *foward*
- G418** – genéctica
- GFP** – proteína verde fluorescente
- GIPL** – fosfolípido glicoinositol
- GMS-CSF** – fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos
- gp63** – glicoproteína de 63 kilodalton
- GPI** – fosfatidilinositol
- H1** – histona 1
- H3** – histona 3
- HBSS** – *Hank's balanced salt solution*
- HCl** – ácido clorídrico
- HClO** – ácido hipocloroso
- HI** – hospedeiro invertebrado
- HPRT** - *hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*
- H₂O₂** – peróxido de hidrogénio
- HNO₂** – ácido nitroso
- HV** – hospedeiro vertebrado
- IFI** – imunofluorescência indireta
- IFN** – interferão
- IL** – interleucina
- iNOS** – sintetase indutível de óxido nítrico
- IPGT** – *sopropyl – beta – D – thiogalactopyranosid*

- IRFs** – fatores reguladores
- LB** – meio *Luria – Broth*
- LC** – leishmaniose cutânea
- LCD** – leishmaniose cutânea difusa
- LCan** – leishmaniose canina
- LCF** – factor quimiotático de *Leishmania*
- LCL** – leishmaniose cutânea localizada
- LMC** – leishmaniose mucocutânea
- LPG** – lipofosfoglicano
- LPS** – lipopolissacarideo
- LRR** – repetições C-terminais de leucina
- LTB4** – leucotrieno B4
- LV** – leishmaniose visceral
- LVA** – leishmaniose visceral antroponótica
- LVZ** – leishmaniose visceral zoonótica
- m/v** – massa/volume
- MΦ** – macrófagos
- MAPK** – proteína nuclear ativada por mitogénio
- MBL** – lectina de ligação a manose
- MDP** – dipéptido de muramilo
- ME – 2** - mercaptoetanol
- MHC** – complexo major de histocompatibilidade
- MIP** – proteína inflamatória de macrófagos
- MPO** – mieloperoxidase
- MO** – microscopia ótica
- MR** – recetor de manose

- mRNA** – RNA mensageiro
- MVA** – vacina vírus Ankora
- N** – normal
- NACHT** – domínio central de ligação a nucleótidos
- NADPH** – enzima fosfato de dinucleotido de nicotinamida e adenina oxidase
- NaCl** - cloreto de sódio
- NaHCO₃** – bicarbonato de sódio
- NBT** – azul de tetrazólio
- NED** – n – naftil etilenodiamina
- NET** – *Neutrophil extracellular traps*
- NF-κB** – factor nuclear kappa B
- NK** – células natural killer
- NLR** – *nucleotide-binding domain, Leucine-Rich repeat containing*
- NO** – óxido nítrico
- NO₂** – ião nitrito
- NO₃** – ião nitrato
- NO₂** – dióxido de azoto
- NOD** – *nucleotide – binding oligomerization domain*
- NOS** – sintetase do óxido nítrico
- MyD88** – proteína de diferenciação mielóide 88
- O₂⁻** – ião superóxido
- OMS/WHO** - Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)
- ONOO⁻** – peroxinitrito
- OH** – radical livre hidróxilo
- PAD4** – peptidilarginina desaminase 4
- PAF** – factor de ativação de plaquetas

PAMP – padrões moleculares de reconhecimento do agente patogénico

Pb – pares de base

PBS – tampão fosfato salino

PCR – reação em cadeia de polimerase

PGRP – proteína de reconhecimento de peptidoglicano

PMA – acetato de forbol miristato

PMN – células polimorfonucleares

PPG – proteofosfoglicano

PRRs – receptores de padrões de reconhecimento

PR3 – proteinase 3

PS – fosfatidilserina

RC – recetor do complemento

ROS – espécies reativas de oxigénio

RNA – ácido ribonucleico

RV – *reverse*

ssRNA – ácido ribonucleico de cadeia simples

SI – sistema imunitário

SDS – dodecil sulfato de sódio

SOC – *super optimal broth with catabolite repression*

SOD – superóxido dismutase

SYBR – *syber green*

SPSS – *statistical package for social sciences*

TA – temperatura ambiente

T_a – temperatura de *annealing*

TGF – fator de transformação de crescimento

TGP – transaminase glutâmica piruvática

Th – linfócitos T *helper*

TIR – recetor Toll - interleucina

TLR – recetor Toll-*like*

Tm – temperature de *melting*

TNF – fator de necrose tumoral

TRYP – triparadoxina peroxidase

TRIF – domínio TIR que contem o adaptador indutor de interferão- β

TRAM – molécula adaptadora relacionada a TRIF

U – unidades

vs – *versus*

VIH – vírus da imunodeficiência humana

$\times g$ – força centrífuga relativa

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

1. Introdução

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por um protozoário intracelular da família Trypanosomatidae Doflin, 1901 e do género *Leishmania* Ross, 1903, podendo apresentar-se como zoonoses ou antroponoses (João *et al.*, 2000, Croft *et al.*, 2006). O parasita é transmitido pela picada da fêmea de insetos flebótomos (ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae). Dos 13 géneros de vetores conhecidos, dois deles apresentam importância em medicina humana e veterinária, nomeadamente os géneros *Lutzomyia* França, 1924 e *Phlebotomus* Rondani & Berté. Embora tenham sido identificadas aproximadamente 1000 espécies de flebotomíneos, apenas 50 foram reconhecidas como vetores desta doença (Maroli *et al.*, 2013).

No velho mundo (Europa, África, Médio Oriente e Ásia) o género *Phlebotomus* está envolvido na transmissão de diferentes espécies de *Leishmania*, enquanto no novo mundo (Américas) o género *Lutzomyia* é responsável pela transmissão deste parasita (Maroli *et al.*, 2013). Baseado no desenvolvimento do parasita no hospedeiro invertebrado (HI), *Leishmania* é classificada em dois subgéneros: o subgénero *Leishmania* com um desenvolvimento suprapilárico, ou seja, no estômago do vetor e o subgénero *Viannia* onde os parasitas são peripiláricos, ou seja, localizam-se inicialmente no intestino posterior e só depois migram para o proboscis do flebótomo (Saridomichelakis, 2009). Os vetores, espécies de *Leishmania* envolvidas, patologias associadas e a distribuição geográfica das leishmanioses encontram-se resumidos nas Tabelas 1.1 e 1.2.

A doença está geograficamente distribuída por todos os continentes, com exceção da Antártida, sendo endémica em 98 países de África, América do sul e central, Ásia e região Mediterrânica. É uma das doenças mais negligenciadas do mundo, com 350 milhões de pessoas em risco, 20 000 a 30 000 mortes por ano e 1,3 milhões de novos casos anuais, dos quais apenas 600 000 são reportados (WHO, 2014). Atinge as populações mais desfavoráveis e está associada à desnutrição, deslocamento populacional, condições precárias de habitação, sistema imunológico debilitado e falta de recursos (WHO, 2013). O aumento e a dispersão da doença estão relacionados com mudanças ambientais, como a desflorestação, construção de barragens, sistemas de irrigação e urbanização (WHO, 2014).

Tabela 1.1. Vetores do género *Phlebotomus*, espécies de *Leishmania*, patologias e respetiva distribuição geográfica (adaptado de Maroli *et al.*, 2013). LVZ, Leishmaniose visceral zoonótica; LVA - Leishmaniose visceral antroponótica; LCL, Leishmaniose cutânea localizada; LCD, Leishmaniose cutânea difusa.

Vetor	<i>Leishmania spp.</i>	Patologia	Distribuição geográfica
<i>Phlebotomus</i>			
<i>P. chinensis</i> <i>P. ariasi</i> <i>P. perniciosus</i>	<i>L. infantum</i>	LVZ	Região Mediterrânica, Balcãs, Médio Oriente, Ásia central e China
<i>P. argentipes</i> <i>P. martini</i> <i>P. orientalis</i> <i>P. alexandri</i>	<i>L. donovani</i>	LVA	Índia, Paquistão, China, Quênia, Sudão e Etiópia
<i>P. papatasi</i> <i>P. dusoscai</i>	<i>L. major</i>	LCL	Norte, Este e Oeste de África, Médio Oriente e Ásia central
<i>P. sergente</i>	<i>L. tropica</i>	LCL	Médio Oriente. Paquistão, Índia e Região Mediterrânica
<i>P. longipes</i> <i>P. pedifer</i>	<i>L. aethiopica</i>	LCL/LCD	Etiópia e Quênia

Das 30 espécies de *Leishmania* conhecidas, 21 são patogénicas para o homem. As Leishmanioses podem ser classificadas em três tipos, dependendo dos sinais, sintomas e grau de severidade: Leishmaniose cutânea (LC), Leishmaniose cutânea difusa (LCD) Leishmaniose mucocutânea (LMC) e Leishmaniose visceral (LV) zoonótica (LVZ) e antroponótica (LVA) (Neuber, 2008).

A LC apresenta-se sob a forma de lesão cutânea, principalmente nas áreas expostas como a face, braços e pernas, sendo causada por várias espécies no velho mundo, tais como *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*.

Tabela 1.2. Vetores do género *Lutzomyia*, espécies de *Leishmania*, patologias e respetiva distribuição geográfica (adaptado de Maroli *et al.*, 2013). LVZ, Leishmaniose visceral zoonótica; LVA - Leishmaniose visceral antroponótica; LCL, Leishmaniose cutânea localizada; LCD, Leishmaniose cutânea difusa.

Vetor	<i>Leishmania</i> spp.	Patologia	Distribuição geográfica
<i>Lutzomyia</i>			
<i>L. longipalpis</i> <i>L. evansi</i>	<i>L. infantum</i> (= <i>L. chagasi</i>)	LV	América central e do Sul
<i>L. wellcomei</i>	<i>L. braziliensis</i>	LCL	América central e do Sul
<i>L. umbratillis</i>	<i>L. guyanensis</i>	LCL	América do Sul
<i>L. olmeca olmeca</i>	<i>L. mexicana</i>	LCL	América central e do Sul
<i>L. flaviscutellata</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>L. pifanoi</i>	LCL	América central e do Sul Venezuela
<i>L. panamensis</i> <i>L. prapidoi</i> <i>L. gomezi</i>	<i>L. panamensis</i>	LCL	América central e do Sul
<i>L. peruensis</i> <i>L. verrucarum</i>	<i>L. peruviana</i>	LCL	Perú
<i>L. muneztovari</i> <i>L. anglesi</i>	<i>L. lainsoni</i>	LCL	Bolívia, Brasil e Perú
<i>L. whitmani</i>	<i>L. shawi</i>	LCL	Brasil
<i>L. ayrozai</i>	<i>L. naiffi</i>	LCL	Brasil
<i>L. youngi</i>	<i>L. garnhami</i>	LCL	Venezuela
<i>L. flaviscutellata</i>	<i>L. pifanoi</i>	LCL	Venezuela
<i>L. antunesi</i>	<i>L. lindenbergi</i>	LCL	Brasil
<i>L. olmeca bicolor</i>	<i>L. venezuelensis</i>	LCL	Venezuela
<i>L. hartmani</i> <i>L. panamensis</i>	<i>L. colombiensis</i>	LCL	Colômbia

Inicialmente, a LCD apresenta lesões localizadas e nodulares ou placas infiltrativas que gradualmente se disseminam por todo o corpo. Esta doença pode também atingir os órgãos internos e é provocada por *L. amazonensis* e *L. aethiopica*.

A LMC caracteriza-se pela presença de lesões na mucosa nasal e bucal, garganta e tecidos circundantes e é causada essencialmente por *L. braziliensis* e *L. panamensis*.

Cerca de 90% dos casos de LC ocorrem na América, bacia do Mediterrâneo, Ásia central e Médio Oriente, enquanto 90% dos casos de LMC ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (WHO, 2014).

A LV ou Kala-azar é a forma mais severa da doença afetando os linfonodos, baço, fígado e medula óssea. A doença manifesta-se por febre persistente, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia e anemia. Trata-se de uma doença progressiva, chegando mesmo a ser fatal em alguns casos. É causada essencialmente por *L. donovani* e *L. infantum*. Do ponto de vista epidemiológico, a LV pode ser classificada em LV zoonótica (LVZ) e LV antroponótica (LVA). A LVZ é transmitida do animal para o vetor e deste para outro animal, enquanto a LVA é transmitida do homem para o vetor e deste para o homem. A LVZ é causada por *L. infantum* e o seu principal reservatório é o cão doméstico, sendo as raposas, chacais e lobos reservatórios silváticos. Atinge principalmente populações de zonas rurais e tem uma distribuição geográfica abrangente: bacia do Mediterrâneo, Médio oriente, Noroeste da China e África. A LVA é causada por *L. donovani* e distribui-se pelo Médio oriente, Índia e este da Ásia (Maroli *et al.*, 2013). Cerca de 95% dos casos de LV ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2014).

Em Portugal, a LVZ atinge crianças, pessoas infetadas com o vírus da imunodeficiência humana (VIH), mas sobretudo infeta o cão que é o principal reservatório de *L. infantum* e também o principal hospedeiro. A leishmaniose canina (LCan) está essencialmente localizada na região do Alto-Douro, na região metropolitana de Lisboa e no Algarve (Afonso & Alves Pires, 2008). A LCan é importante do ponto de vista de medicina veterinária, mas também em termos de saúde pública (Reithinger & Davies, 1999).

1.1.1. Ciclo de vida

Durante o ciclo de vida (dimórfico) *Leishmania* apresenta duas formas morfológicas principais: a forma promastigota que se encontra no inseto vetor e a forma amastigota que se encontra no hospedeiro vertebrado (HV). A forma promastigota apresenta uma forma fusiforme, mede cerca de $15 \times 3 \mu\text{m}$ de comprimento e possui na sua região anterior um flagelo livre que pode atingir $20 \mu\text{m}$ de comprimento (Fig. 1.1A). A forma amastigota é intracelular obrigatória, ligeiramente ovoide, mede $2 \times 4 \mu\text{m}$ e o flagelo é intracelular, terminando junto à membrana celular (Fig. 1.1B). Ambas as formas morfológicas apresentam núcleo, uma grande mitocôndria e um cinetoplasto que corresponde ao ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial condensado numa única região perto do corpo basal (Tomás & Romão, 2008).

Quando a fêmea do vetor efetua a refeição sanguínea inocula na derme do HV promastigotas metacíclicos, forma infetante do parasita, que se ligam a recetores de superfície de células fagocitárias. Os neutrófilos ou células polimorfonucleares (PMN) são as primeiras células fagocitárias a serem recrutadas para o local da picada, internalizando parte dos promastigotas inoculados pelo vetor. Os macrófagos (M Φ) são as células hospedeiras definitivas do parasita, atingindo no cão o local de inoculação cerca de 24 h depois da infeção (Santos-Gomes *et al.*, 2000). Após a fagocitose, os promastigotas transformam-se em amastigotas e multiplicam-se por fissão binária longitudinal. Por saturação de amastigotas, os M Φ acabam por lisar e libertar os parasitas, que são fagocitados por outros M Φ promovendo a disseminação de *Leishmania* (Solano-Gallego *et al.*, 2011). O ciclo fica completo quando M Φ infetados são ingeridos pela fêmea do vetor durante a sua refeição sanguínea em HV (reservatório). Os amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicos e fixam-se no intestino do inseto onde se multiplicam por mitose.

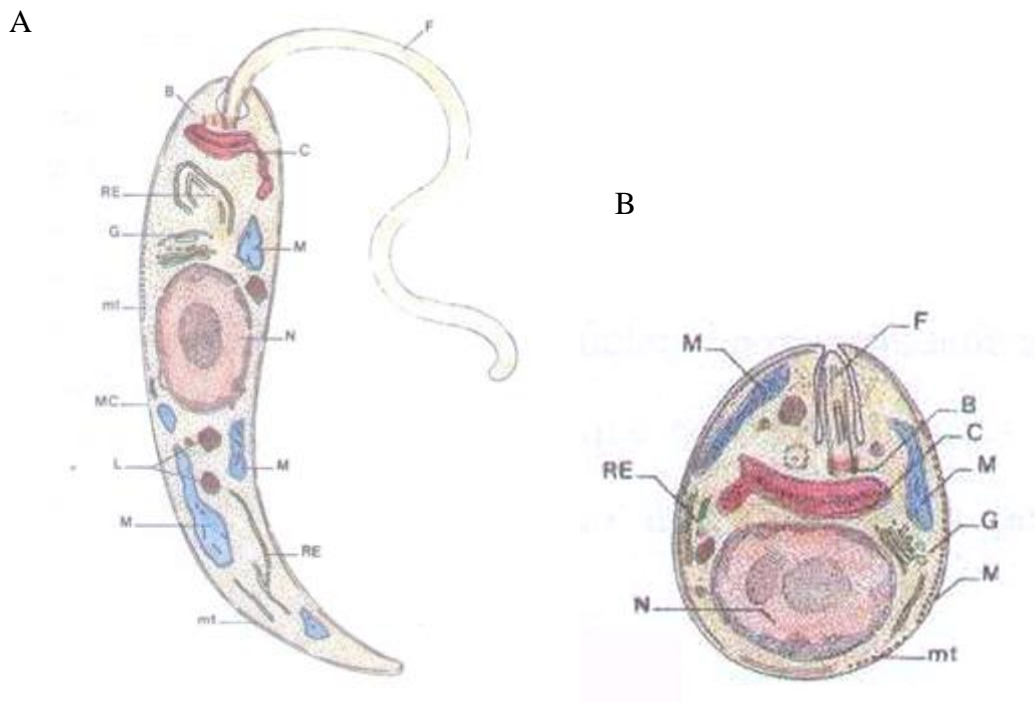


Figura 1.1. Representação esquemática da estrutura celular de *Leishmania*. Forma promastigota (A) e forma amastigota (B). **F**, flagelo; **B**, bolsa flagelar; **C**, cinetoplasto; **RE**, retículo endoplasmático; **M**, mitocôndria; **G**, complexo de golgi; **MT**, microtúbulos subpeliculares; **N**, núcleo; **MC**, corpos multivesiculares; **L**, lisossomas.

Os promastigotas procíclicos não infecciosos transformam-se em promastigotas metacíclicos infecciosos e migram para o esôfago e faringe, estando prontos para serem inoculados através do proboscis (Fig. 1.2), num novo HV (Afonso & Alves Pires, 2008).

A via de disseminação do parasita no HV está relacionada com a espécie de *Leishmania* envolvida. Nas espécies visceralizantes, os MΦ infetados transportam os parasitas para órgãos ricos em células fagocitárias, nomeadamente o baço, fígado, medula óssea e linfonodo. No caso das espécies cutâneas, os parasitas ficam limitados ao local da inoculação ou são disseminados através do sistema linfático para outros locais da derme, mucosas ou cartilagens (Tomás & Romão, 2008).

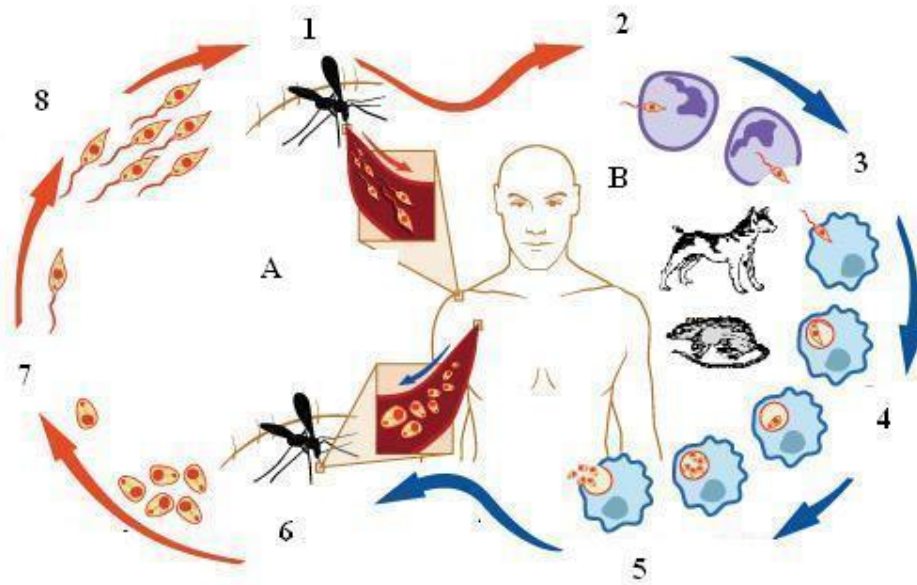


Figura 1.2. Esquema representativo do ciclo de vida de *Leishmania*. As letras A e B representam o estágio no flebotomíneo e no vertebrado, respectivamente. Os promastigotas metacíclicos são introduzidos na derme dos vertebrados (homem, canídeos, roedores, preguiças, etc) por flebotomíneos fêmea durante a refeição sanguínea (1); os promastigotas são fagocitados por neutrófilos que rapidamente chegam ao local da picada (2); os parasitas são internalizados por MΦ (3) transformando-se em amastigotas (4); as amastigotas multiplicam-se dentro do fagolisossoma dos MΦ, causam a ruptura da célula sendo fagocitadas por outros MΦ (5); durante a refeição sanguínea os flebotomíneos fêmea ingerem MΦ infectados com amastigotas (6); no intestino os amastigotas transformam-se novamente em promastigotas (7) que se dividem por mitose e migram para o proboscis (8). Adaptado de <http://www.niaid.nih.gov/topics/leishmaniasis/pages/lifecycle.aspx>

1.1.2. Hospedeiro vertebrado

O cão é o principal reservatório doméstico e peridoméstico de *L. infantum* em países do sul da Europa, Médio Oriente, Ásia, Norte de África, América central e do sul (Solano-Gallego *et al.*, 2011). É considerado um bom reservatório porque para além de coabitar com o homem, mantém a infeção durante bastante tempo antes de desenvolver doença crónica, a qual apresenta envolvimento viscerocutâneo, favorecendo a presença de parasitas na pele e facilitando a sua transmissão (Pereira, 2008).

Existem oito espécies de *Leishmania* que são patogénicas para o cão. *L. infantum* (= *L. chagasi*) é a espécie mais importante, atingindo os cães do novo e velho mundo. Outras espécies que têm sido descritas como agentes etiológicos de LCan são: *L. tropica*, *L. major*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. peruviana* (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Saridomichelakis & Koutinas, 2014).

A LVZ é globalmente a maior zoonose e a mais fatal, tanto para homens como para canídeos (Solano-Gallego *et al.*, 2011). A LCan pode manifestar-se de forma assintomática ou com alterações sistémicas, incluindo perda de peso ou caquexia, hipertrofia dos linfonodos e alterações cutâneas, nomeadamente onicogribose, alopecia localizada ou generalizada, ulceração cutânea e nasal ou dermatite periocular. Podem também surgir alterações clínico-patológicas, como anemia ou insuficiência hepática e renal (Solcà *et al.*, 2014). A doença não afeta os cães de igual forma, enquanto uns podem ser assintomáticos toda a vida, outros desenvolvem e manifestam a doença de forma ligeira, moderada ou severa. A maior ou menor predisposição para a doença pode estar relacionada com vários fatores, tais como a raça, idade, características genéticas e também com o desempenho do sistema imunitário do cão. Cães com um sistema imunitário debilitado estão mais suscetíveis a desenvolver a doença. A LCan tem uma ampla distribuição geográfica, desde a bacia do Mediterrâneo ao Médio oriente e China, e América latina, com casos também notificados nos Estados Unidos da América (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

1.1.3. Diagnóstico, tratamento e profilaxia

O diagnóstico de LVZ e LCan faz-se com recurso a testes parasitológicos, moleculares e imunológicos. Tanto o exame parasitológico direto (observação microscópica das formas amastigotas do parasita a partir de esfregaços ou decalques) como o exame cultural utilizam material biológico obtido de órgãos ricos em células fagocitárias, preferencialmente, medula óssea e linfonodos. A eficiência do exame parasitológico direto depende do desempenho do técnico. A cultura é um método moroso, necessita de observações periódicas e está sujeito a contaminação por outros microrganismos (Neuber, 2008).

O exame molecular, que se baseia na técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR), permite ampliar quantidades ínfimas de DNA do parasita, tanto DNA nuclear como cinetoplastídico. É uma técnica relativamente rápida e permite estudar não só amostras recentes como antigas (Solano-Gallego *et al.*, 2011). A sua elevada especificidade e sensibilidade permite detetar a presença do parasita em casos assintomáticos (Kheirandish *et al.*, 2013). O PCR em tempo real é também muito

utilizado, pois avalia a variação da carga parasitária, assim como monitoriza respostas terapêuticas (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

O diagnóstico imunológico baseia-se na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (LV) através de testes serológicos como a imunofluorescência indireta (IFI), contraimunoelectroforese (CIE), teste de aglutinação direta (DAT) e teste imunocromatográfico rK39 (Otranto & Dantas-Torres, 2013). De um modo geral, estes testes apresentam elevadas especificidades e sensibilidades mas também possuem limitações, nomeadamente reações cruzadas com outros parasitas e a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* anos após a cura parasitológica no caso da leishmaniose humana e, em zonas endémicas, em cães e indivíduos aparentemente saudáveis (WHO 2010).

Existem vários fármacos para a terapêutica da leishmaniose, não só para o tratamento etiológico, mas também sintomático. Os fármacos utilizados como primeira linha de tratamento são os compostos antimoniais, dos quais o antimoniato de meglumina (Glucantime®) é mais utilizado nos países latinos e francófonos e o estibogluconato de sódio (Pentostam®) é mais usado em países anglo-saxónicos (Noli & Auxilia, 2005). Estes compostos atuam no bloqueio da formação de transaminase glutâmica pirúvica (TGP) e adenosina trifosfato (ATP), inibindo a fosfofrutocinase e a piruvato desidrogenase, destruindo o parasita (Meireles, 2008). Estes dois compostos podem não ser totalmente eficazes no combate à leishmaniose, devido ao aparecimento de resistência, toxicidade, efeitos secundários graves e duração inadequada do tratamento. Os fármacos de segunda linha e seu modo de ação encontram-se referidos na Tabela 1.3.

Para além da terapêutica etiológica, pode ser adequado a conjugação com terapêuticas sintomáticas como anti-inflamatórios, antibioterapia de largo espectro, fluidoterapia, transfusão de sangue e dietas hipoproteicas (Meireles, 2008).

Tabela 1.3.Princípios ativos de segunda linha utilizados no tratamento de leishmaniose e respetivos mecanismos de ação (Meireles, 2008).

Nome do composto	Mecanismo de ação
Pentamidina (diamidinas)	Desorganização do metabolismo de proteínas, ácidos nucleicos, alterações mitocondriais, ribossomais, cinetoplastídicas e na bolsa flagelar
Anfotericina B	Alterações na membrana celular (liga-se aos esteróis de <i>Leishmania</i>)
Alopurinol (análogo das purinas)	Inibição das enzimas que interconvertem as purinas, causando diminuição na síntese de ATP e restrição da síntese proteica
Derivados do imidazol (metronidazol, ketoconazol, itraconazol e secnidazol)	Afinidade para os esteróis da membrana celular do parasita (inibição da síntese), alteração da glucogénese (causando a depleção das reservas glucogénicas) e formação de complexos com o DNA impedindo a sua síntese
Miltefosina (fosfolípido)	Inibição da síntese da membrana celular
Trifluralinas	Desorganização dos microtubulos

As estratégias de controlo da propagação da leishmaniose incluem medidas de controlo do vetor e dos hospedeiros. Uma das formas de controlo da transmissão da leishmaniose humana e de LCan consiste em reduzir a taxa de picada dos flebotomíneos através da utilização de repelentes, redes mosquiteiras impregnadas em inseticida, aplicação tópica de inseticidas e as coleiras impregnadas com deltametrina para os canídeos (WHO, 2010; Esch & Petersen, 2013). A profilaxia através de vacinação seria de longe o melhor método para combater esta doença, contudo tem sido uma tarefa difícil.

A primeira geração de vacinas contra a leishmaniose humana foi produzida com parasitas mortos inteiros ou extratos. Foram feitas numerosas tentativas no Brasil, Colômbia, Equador, Venezuela e na República Islâmica do Irão para produzir uma vacina contra a LC e no Sudão contra a LV, mas apenas duas candidatas a vacina foram testadas: uma vacina baseada em *L. amazonensis* (“Vacina Convit”) (Saljoughian *et al.*, 2014). Os resultados destas vacinas foram inconclusivos ou negativos, mas foram indicadas para terapêutica (WHO, 2010). Vacinas de segunda geração consistem na utilização de proteínas recombinantes ou vacinas genéticas (Saljoughian *et al.*, 2014). Até à data, a vacina Leish-111f + MPL-SE, contendo a proteína recombinante trifosina, atingiu a fase de ensaios clínicos (Coler & Reed, 2005; Nascimento *et al.*, 2010).

A pesquisa de vacinas para a LCan é de grande importância, visto ser o cão o reservatório principal para o agente causador da LVZ. A Leishmune® foi a primeira vacina licenciada no Brasil, contendo o antígeno ligante fucose-manose (FML) de *L. donovani*, com uma eficácia relativa de 76-80% (Lemesre *et al.*, 2007). Em 2008 foi licenciada também no Brasil a vacina Leish-Tec® que é composta pelo antígeno recombinante A2 de amastigota de *Leishmania* e saponina como adjuvante (Fernandes *et al.*, 2008). A vacina LiESAP-MDP utiliza uma proteína de 54 kDa excretada por *L. infantum* com dipéptido de muramilo (MDP). Depois de testada em cães no Sul de França revelou uma eficácia de 92% (Holzmuller *et al.*, 2005; Lemesre *et al.*, 2005, 2007; Bourdoiseau *et al.*, 2009). Uma segunda geração desta vacina utiliza um antígeno peptídico excretado/segregado (ES) de sobrenadantes de culturas de *L. infantum*. Mais tarde foi desenvolvida outra formulação da vacina, diferindo unicamente no adjuvante utilizado, o QA21, (CaniLeish®) (Virbac, 2011). Esta vacina é comercializada em Portugal, Espanha, França, Grécia e Itália. A vacina recombinante constituída pelo vírus Ankora (MVA) expressando DNA de *Leishmania* codificante para triparadoxina peroxidase (*TRYP*) mostrou ser segura e imunogénica em cães *outbred* (Ready, 2010).

1.1.4. Modelo Murino

Os modelos animais são utilizados com o intuito de produzir uma infeção semelhante à infeção natural, permitindo efetuar estudos imunológicos, testar novos fármacos e estudar o desenvolvimento de vacinas. O modelo murino é de fácil manipulação,

manutenção e produção, não é tão dispendioso como outros modelos, nomeadamente o cão, e não apresenta tantos constrangimentos éticos. Outra das grandes vantagens é que se trata de uma população imortal e a sua herança genética tem sido conservado, permitindo assim cruzar dados biológicos ao longo do tempo. A grande desvantagem é que não reproduz exatamente a infeção natural, pelo que a extrapolação dos resultados para a infeção natural deve ser realizada com precaução (Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014).

Nos murganhos (*Mus musculus*) a infeção visceral por *Leishmania* é crónica e não fatal, podendo ser utilizados em estudos de auto-cura e infeções subclínicas. Embora não desenvolvam uma “verdadeira” infeção subclínica têm sido muito utilizados para identificar e prever o papel de determinados genes na resposta imune protetora. Estes murganhos são também utilizados para estudos de LC, para elucidar os tipos celulares envolvidos na infeção, citocinas, cascatas de transdução de sinal, mecanismos efetores para princípios ativos leishmanicidas, resistências e desenvolvimento de vacinas (Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014). O facto de haver imunoreagentes de todo o tipo disponíveis, tornam este modelo ideal para o estudo da leishmaniose.

Os hamsters (*Mesocricetus auratus*) são altamente suscetíveis à infeção visceral, pelo que são considerados o melhor modelo experimental para os estudos de LV, reproduzindo as características clinico-patogénicas da doença humana (Amit *et al*, 2004). Devida à falta de reagentes específicos disponíveis (como por exemplo anticorpos, marcadores celulares, citocinas, etc) para o estudo da resposta imune, este modelo acaba por ser de uso limitado (Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014).

1.2. Resposta imunitária

A imunidade refere-se ao conjunto de estratégias do sistema imunitário (SI) que promovem a proteção contra agentes externos. O SI é constituído por células, tecidos e moléculas que funcionam para defender o organismo contra a infeção e modificações estruturais. A reação coordenada do SI é conhecida como resposta imune (Nylén & Gautam, 2010). A defesa contra agentes infecciosos assenta em dois tipos de resposta, a imunidade inata e a imunidade adaptativa.

A resposta imunitária inata representa a primeira linha de defesa do organismo e é constituída por barreiras anatómicas e fisiológicas, células fagocitárias (neutrófilos e monócitos/MΦ), células *Natural Killer* (NK) e mediadores inflamatórios, como o sistema do complemento. A resposta imunitária inata é capaz de prevenir e combater muitas infecções, mas os agentes patogénicos foram evoluindo e adotando estratégias para se evadirem a este tipo de resposta inespecífica, pelo que o organismo teve que se adaptar e desenvolver outras formas de combate, surgindo assim a imunidade adaptativa (Arosa *et al.*, 2008; Nylén & Gautam, 2010).

A imunidade adaptativa assenta em estratégias defensivas específicas para cada agente patogénico, sendo capaz de reconhecer e seletivamente eliminar diversos microrganismos e antigénios, memorizando a ocorrência de infeção. Os componentes do SI adaptativo são os linfócitos B e T, os anticorpos e diversos mediadores solúveis (Santos-Gomes *et al.*, 2008).

As células da imunidade inata e adaptativa são recrutadas para os locais de infeção e lesão e são ativadas para destruírem os agentes infecciosos, processo a que se chama inflamação, na maioria das vezes benéfico para o organismo, mas também pode estar na base de outras doenças (Nylén & Gautam, 2010).

1.2.1. Imunidade inata

Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o local de infeção, fagocitando e destruindo rapidamente o agente invasor (Lopes *et al.*, 2014). Os monócitos/MΦ, células fagocitárias profissionais, chegam posteriormente e ficam por mais tempo no local de infeção que os neutrófilos (Nylén & Gautam, 2010).

Após a deposição de promastigotas pelo vetor na derme do hospedeiro, ocorre de imediato a ativação do sistema do complemento com formação de produtos de clivagem como C3a e C5a, que são agentes quimiotáticos, atraindo neutrófilos e MΦ para a área de infeção e induzindo a expressão dos recetores do complemento (RC). A opsonização do parasita desempenha um papel preponderante na promoção da fagocitose envolvendo a ligação de C3b, resultante da clivagem do fator do complemento C3, e os RC1 e RC3 do MΦ. Em contrapartida, o parasita apresenta uma glicoproteína de superfície, a gp63

(glicoprotease de 63 kDa), que consegue converter o C3b em C3bi (forma inativa). O C3bi liga-se ao RC3 do MΦ promovendo a fagocitose do parasita sem que ocorra a ativação da célula. Desta forma a interação MΦ-*Leishmania* contribui para o estabelecimento da infecção e sobrevivência do parasita no fagolisossoma do MΦ (Liese *et al.*, 2008).

A pele é um órgão imunologicamente complexo, com várias células do sistema imune inato, nomeadamente as células dendríticas (CD) denominadas células de Langerhans. As células de Langerhans têm grande capacidade fagocitária, são eficientes apresentadoras de antígeno e induzem a diferenciação de células T indiferenciadas (*naïve*). A interação de *Leishmania* com estas células tanto pode levar ao controlo da infecção como à progressão da doença. A atuação das CD depende do seu estado de maturação, da espécie/estirpe de *Leishmania* e dos estímulos exógenos fornecidos por outras células. Após o contacto e a internalização do agente patogénico pelas CD ocorre o processamento e apresentação de antígenos parasitários associados às moléculas de classe I (MHCI) e II (MHCII) do complexo major de histocompatibilidade (MHC) na superfície celular. As CD migram até aos gânglios linfáticos onde se encontram os linfócitos T CD4⁺ (reconhecem antígenos apresentados por MHCII) para lhes apresentarem os antígenos (Xin *et al.*, 2008). As CD imaturas da pele estão envolvidas no reconhecimento precoce do parasita e são capazes de capturar antígenos, o que conduz à maturação e mobilização de outras CD, mas não têm capacidade de ativar as células T. No entanto, na presença de CD maduras, as células T CD4⁺ são ativadas e passam a produzir interferão (IFN) - γ (fenótipo Th1) desenvolvendo uma resposta imune protetora. A produção precoce de IL-12 pelas CD induz a diferenciação de células T *naïve* em células Th1, promovendo também o desenvolvimento de uma resposta imune protetora (Lopes *et al.* 2014). No cão, para além das células de Langerhans, os queratinócitos também expressam MHCII após ativação. Depois de ativados e através da libertação de citocinas, os queratinócitos influenciam o processo inflamatório local, podendo levar à destruição do parasita (Papadogiannakis *et al.*, 2005; Santos-Gomes *et al.*, 2008).

Juntamente com as células fagocitárias, as células NK representam a primeira linha de defesa contra agentes patogénicos utilizando dois mecanismos diferentes de ação:

destruição citolítica de células infectadas e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e fator de necrose tumoral (TNF) - α (Nylén & Gautam, 2010). Estudos prévios revelaram que a produção de IFN- γ por estas células é importante para o desenvolvimento de uma resposta imunitária protetora e controle da infecção, podendo atrasar o aparecimento de doença, contudo não são necessárias para que ocorra uma resposta Th1 (Bogdan, 2012). Na fase precoce de infecção, as NK podem controlar a replicação de *Leishmania*, pois têm uma grande capacidade de produzir rapidamente IFN- γ . A ativação das NK promove ainda a maturação das células CD. Estes dois tipos de células interagem no paracortex dos linfonodos, regulando uma resposta localizada de células T CD4⁺. As células NK estão quase sempre associadas à proteção ou cura da doença (Bajenoff *et al.*, 2006; Bogdan, 2012).

1.2.2. Neutrófilos

Os neutrófilos são células fagocitárias profissionais com um tempo de vida curto (24-48 h) (Laskay *et al.*, 2008). Apresentam um núcleo lobulado e evidenciam grânulos citoplasmáticos. O núcleo divide-se em cinco lóbulos unidos por filamentos de heterocromatina densa envolvida por membrana nuclear e tem uma forma mais ou menos circular, uma vez que os lóbulos estão dispostos de forma circular à volta do centróssoma (Arosa *et al.*, 2008). Os grânulos neutrofilicos subdividem-se em dois grupos, peroxidase-positivos e peroxidase negativos, conforme estão ou não associados à presença de mieloperoxidase (MPO). Os grânulos peroxidase-positivos são designados de grânulos primários ou azurófilos, enquanto os grânulos peroxidase-negativos são de dois tipos, secundários ou específicos e grânulos terciários (Borregaard *et al.*, 2007). Os azurófilos são os primeiros grânulos a serem produzidos e são constituídos por MPO e três proteases: catépsina G (CatG), elastase neutrofilica (EN) e proteinase 3 (PR3); os grânulos secundários são constituídos por lactoferrina e os grânulos terciários são ricos em gelatinase. Estes grânulos são produzidos constitutivamente em fases específicas do desenvolvimento dos neutrófilos na medula óssea (Segal, 2007).

Imediatamente a seguir à picada do flebotomo e à introdução de promastigotas metacíclicos na derme do hospedeiro, os leucócitos acumulam-se no local de inflamação,

sendo os neutrófilos os primeiros a serem recrutados (Aga *et al.*, 2002). A migração de neutrófilos é induzida pela expressão de agentes quimiotáticos, tais como produtos do complemento (C3a e C5a), substâncias bacterianas como péptidos formilados (fMLP), quimiocinas [interleucina (IL) -8 / CXCL-8], lípidos como é o caso do fator de ativação de plaquetas (PAF), leucotrieno B4 (LTB4), TNF- α e lipopolissacárido (LPS). Na infecção por *Leishmania* foram identificados como fatores quimiotáticos para neutrófilos, o fator quimiotático de *Leishmania* (LCF) (Forsberg *et al.*, 2001). O LCF pode interagir com o recetor quimiotático da lipoxantina A4 (ALX). Esta interação resulta num aumento silencioso da internalização de *Leishmania* por fagócitos, contribuindo para a sobrevivência intrafagocitária do parasita (Ritter *et al.*, 2009).

O reconhecimento e fagocitose do parasita por neutrófilos pode ser efetuado através de dois mecanismos distintos: dependente da opsonização e independente da opsonização. O mecanismo dependente de opsonização utiliza opsoninas, como imunoglobulinas, o fragmento C3bi e a lectina de ligação, a manose (MBL). A fagocitose induzida por mecanismos independentes da opsonização é mediada pelo reconhecimento direto de padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMP) pela via do recetor de reconhecimento de padrão (PRR) (Laskay *et al.*, 2008). A fagocitose culmina na formação de um fagossoma intra-citoplasmático que contem o parasita.

A fagocitose está associada à descarga de grânulos citoplasmáticos para o vacúolo parasitóforo (fagossoma) e à consequente ativação da enzima fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidase (NADPH). A ativação e associação das diferentes subunidades da enzima NADPH oxidase converte o oxigénio molecular no anião superóxido (O_2^-). A NADPH liga-se ao fagossoma para onde bombeia o O_2^- (Arosa *et al.*, 2008).

Ocorre também a formação de outras espécies reativas de oxigénio (ROS). A superóxido dismutase (SOD) catalisa a formação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) a partir de iões O_2^- disponíveis. A reação de O_2^- e H_2O_2 gera radicais livres de hidróxido (OH). Estes radicais não são encontrados em células viáveis porque a lactoferrina (grânulo não saturado), glicoproteína antioxidante da família dos transportadores de ferro, inibe a acumulação de OH e outros radicais livres através da sua ligação a ferro e cobre (Segal, 2007).

Os grânulos azurófilos também se fundem com o fagossoma ocorrendo a libertação das enzimas. A MPO é uma hemoproteína de 150 kDa que catalisa a reação do cloreto com H₂O₂, produzindo ácido hipocloroso (HOCl), um potente agente oxidante.

Apesar da produção de ROS ser fundamental para a destruição dos agentes patogênicos fagocitados, quando a capacidade antioxidativa da célula é excedida, ocorre a oxidação de estruturas celulares e por stresse oxidativo a célula entra em apoptose (Almeida *et al.*, 2013).

Outro dos mecanismos efetores dos neutrófilos é a formação de *Neutrophil extracellular traps* (NET). As NET são formadas como resposta a várias moléculas, como o LPS, acetato de forbol miristato (PMA), fator estimulador de colónias de granulócitos e MΦ (GMS-CSF), IL-8, glucose oxidase, ionofosforo Ca²⁺, TNF e são constituídas por DNA, histonas e por proteínas, tais como MPO, CatG, lactoferrina, gelatinase, proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos (PGRP), calprotectina e EN (Abdallah & Denkers, 2012). Após estimulação celular, a cromatina sofre descondensação seguindo-se a mistura da eucromatina e heterocromatina. Este processo é mediado por enzimas que estão nos grânulos azurófilos como EN e MPO. Em primeiro lugar a EN degrada a histona 1 (H1), conduzindo à descondensação da cromatina, ação que é reforçada pela MPO. A histona 3 (H3), por sua vez, sofre uma modificação (citrulinização) e converte os resíduos de arginase em citrulina. A citrulinização da H3 é catalisada pela peptidilarginina desaminase 4 (PAD4) que está localizada no núcleo dos neutrófilos. Deste modo, as fibras de DNA passam para o meio extracelular, onde aprisionam os microrganismos (como *Leishmania*) num ambiente com elevada concentração de fatores microbicidas, impedindo a sua propagação e contribuindo para a sua destruição. Proteases associadas às NET, como EN e PR3 podem inativar e matar agentes patogênicos por clivagem dos seus fatores de virulência. O péptido antimicrobiano catelecidina LL37 e as histonas desintegram a membrana dos agentes patogênicos (Brinkmann *et al.*, 2010; Zawrotniak & Rapala-Kozik, 2013).

O processo de formação das NET está associado à perda de viabilidade celular denominado netose (Urban *et al.*, 2009). A netose é um tipo específico de morte celular, diferente da apoptose e da necrose. A netose ocorre como resposta a estímulos associados a agentes patogênicos, inflamação ou ativadores endógenos (Swain *et al.*,

2014). A integrina MAC-1 está provavelmente envolvida no início da alteração do citoesqueleto, facilitando a ruptura da membrana nuclear e plasmática e a formação de NET. O composto mais utilizado para induzir netose é o PMA, um ativador sintético da família da enzima proteína cinase C (PKC). As PKC são responsáveis pela ativação de NADPH oxidase e consequente produção de ROS. Deste modo, ROS contribuem diretamente para a ocorrência da netose.

Embora os neutrófilos tenham um papel importante na defesa contra *Leishmania*, estes parasitas usam estas células como células hospedeiras temporárias até conseguirem ser internalizados por MΦ, a sua célula hospedeira definitiva. O recrutamento de neutrófilos para o local de infecção ocorre sem que haja ativação das suas funções letais efetoras. O recetor ALX (lipoxina A4) recruta neutrófilos para o local de infecção desativando os mecanismos que induzem a produção de ROS. Após a chegada de neutrófilos ao local da infecção, os parasitas induzem a exposição de fosfatidilserina (PS) nos folhetos externos das membranas celulares dos neutrófilos, passando a célula a apresentar um sinal apoptótico. Para além disso, PS induz a produção da citocina anti-inflamatória, fator de transformação do crescimento beta (TGF-β), que identifica células apoptóticas. Deste modo, os neutrófilos passam a ser reconhecidos como células apoptóticas, que não representam perigo, sendo naturalmente fagocitados por células fagocitárias, como os MΦ, sem que haja necessidade de ativarem as suas funções microbicidas efetoras (Ritter *et al.*, 2009).

Outra estratégia possível está relacionada com o fato dos neutrófilos entrarem efetivamente em apoptose e recrutarem em simultâneo MΦ. Os neutrófilos apoptóticos segregam a quimiocina proteína inflamatória de MΦ (MIP-1β). O tempo necessário para os neutrófilos ficarem apoptóticos e libertarem MIP-1β coincide com o pico de migração de MΦ para o local da infecção. Deste modo, os MΦ fagocitam os neutrófilos apoptóticos com parasitas intracelulares, internalizando assim silenciosamente *Leishmania* (Laskay *et al.*, 2003). Outra possibilidade centra-se na indução da apoptose dos neutrófilos infetados após a chegada de MΦ. Os neutrófilos infetados apoptóticos são fagocitados pelos MΦ assegurando a internalização e sobrevivência de *Leishmania* nos MΦ (Ritter *et al.*, 2009).

1.2.3. Macrófagos

Os monócitos circulam temporariamente no sangue, evoluindo para MΦ quando migram para os tecidos. Quando os monócitos evoluem para MΦ ocorre um aumento da sua capacidade fagocitária e do número de lisossomas portadores de enzimas hidrolíticas (Arosa *et al.*, 2008). Os MΦ são células fagocitárias e têm a função de apresentarem antígenos estranhos ao organismo, ou seja são células apresentadoras profissionais de antígeno (APC) (Santos-Gomes *et al.*, 2008).

Após a inoculação de promastigotas na derme do hospedeiro, os MΦ são a segunda linha de defesa a ser recrutada para o local. As proteínas de superfície dos promastigotas [lipofosfoglicano (LPG), gp63 e proteofosfoglicano (PPG)] são determinantes na fagocitose e na subsequente sobrevivência intracelular do parasita (Liu & Uzonna, 2012). *Leishmania* liga-se a moléculas de superfície dos MΦ, tais como os RC1 e RC3 (MAC-1), recetores de fibrinectina e de manose (MR), ocorrendo de seguida a fagocitose do parasita. Os parasitas necessitam de adaptar-se à temperatura do mamífero (37°C) e, depois de internalizados pelo MΦ, ao ambiente ácido e rico em enzimas do fagolisossoma, adquirindo a forma de amastigota de modo a conseguirem sobreviver e multiplicar-se (Lamour *et al.*, 2012). Na presença do parasita, os MΦ podem ser ativados, desencadeando mecanismos leishmanicidas, ou podem não ser ativados, permitindo a sobrevivência do parasita, que se multiplica e dissemina para outras células e tecidos. MΦ classicamente ativados (CaMΦ) por estimulação das citocinas do tipo Th1, como TNF- α , IL-12 e IFN- γ geram espécies reativas de nitrogénio e ROS, incluindo óxido nítrico (NO), seus derivados como dióxido de nitrogénio (NO₂), ácido nitroso (HNO₂) e peroxinitrito (ONOO⁻) através da ação da sintetase indutível de NO (iNOS) (Fig 1.3a). As ROS, como o H₂O₂ e O₂⁻, são formados a partir de L-arginina e do oxigénio pela ação da NADPH oxidase, durante uma reação catalisada pela sintetase do NO (NOS) (Liese *et al.*, 2008). Neste caso, os MΦ infetados conseguem controlar o parasita (Horta *et al.*, 2012). Em contraste, MΦ expostos a IL-4, IL-13 e IL-21, representantes de citocinas do tipo Th2, estimulam a transcrição da arginase e subsequentemente a geração de poliaminas pela via da L-ornitina, que suportam o crescimento e a replicação do parasita. Estes MΦ consideram-se ativados pela via alternativa (AaMØ) (Lamour *et al.*, 2012) (Fig. 1.3b).

iNOS utiliza o substrato L-arginina para produzir NO, o mesmo substrato utilizado por arginase para produzir ornitina e ureia (Wanasen & Soong, 2009). A ornitina por sua vez é o precursor imediato da síntese de poliaminas essenciais para o crescimento de *Leishmania*. Assim, o equilíbrio entre a atividade de iNOS e da arginase determina se o meio intracelular é microbicida ou se é propício à sobrevivência e multiplicação do parasita (Gaur *et al.*, 2007).

A enzima iNOS é regulada positivamente por citocinas do tipo Th1, IFN- γ e TNF- α , pelos TLR e por ligantes como o LPS.

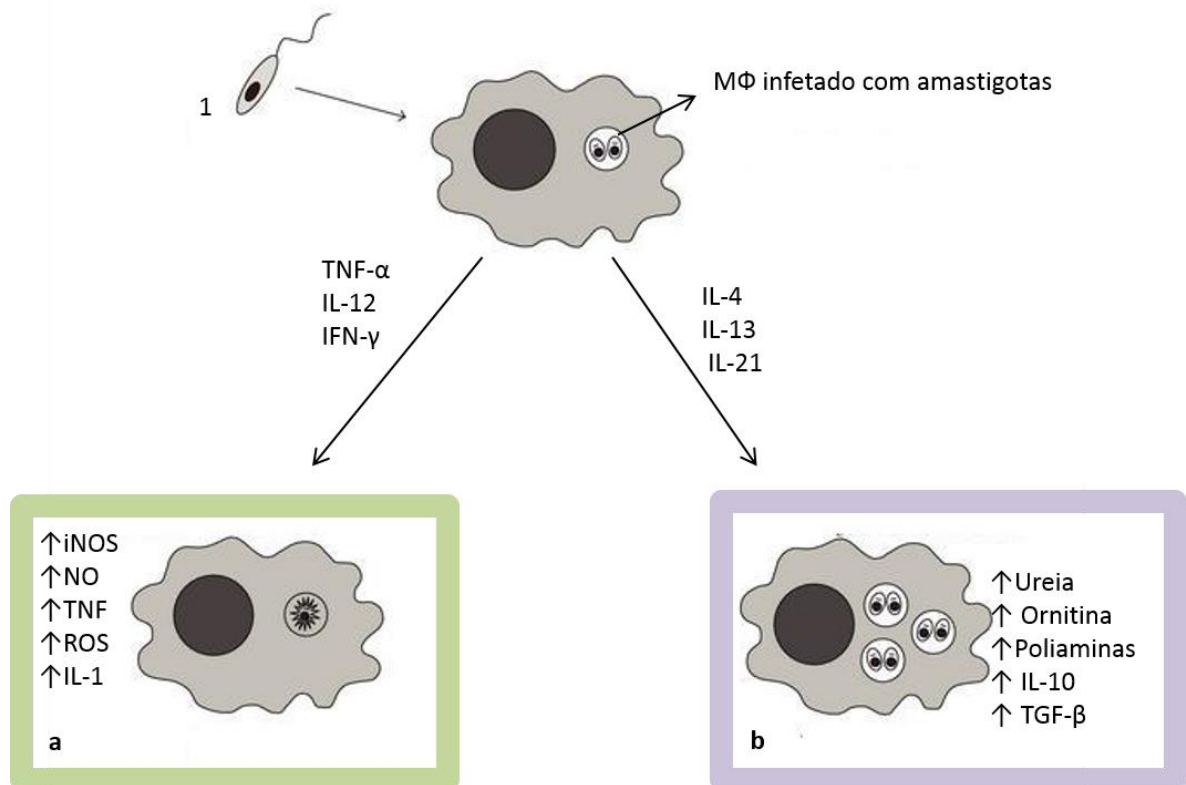


Figura 1.3. Representação esquemática das duas vias de ativação de macrófagos. As letras a e b representam a via clássica (CaMΦ) e a via alternativa de ativação de MΦ (Aa MΦ), respectivamente. CaMΦ promove a destruição intracelular do parasita enquanto AaMΦ é permissiva à sobrevivência e multiplicação dos amastigotas. Adaptado de: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/828951/fig3/>

1.2.4. Receptores Toll-like

A família de recetores Toll-like (TLR) reconhece uma variedade de moléculas específicas de agentes patogénicos, incluindo componentes do compartimento endossomal e de superfície como LPS, peptidoglicanos e ácidos nucleicos (dinucleótidos CpG não metilados). Possuem uma porção extracelular com repetições ricas em leucina e uma porção intracelular com um domínio recetor Toll-Interleucina 1 (TIR) que representa um modelo conservado de sinalização intracelular. Os microrganismos são transportados para os fagossomas que contém TLR (Arosa *et al.*, 2008).

Os TLR são moléculas transmembranares que reconhecem antígenos comuns a agentes patogénicos (PAMP) e participam na resposta imune inata, conduzindo à produção de citocinas pro-inflamatórias por MΦ. Os neutrófilos também expressam TLR, estando a ativação destes sensores celulares relacionado com a produção de ROS e de citocinas, aumentando o tempo de semivida da célula e promovendo a fagocitose (Parker *et al.* 2005).

Atualmente estão descritos dez TLR para humanos e doze para murgânho. Os TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 e TLR11 estão associados à membrana celular, enquanto os TLR3, TLR7 e TLR 9 estão associados às membranas dos compartimentos endocíticos, como o endossoma, lisossoma e retículo endoplasmático (Tuon *et al.*, 2008). Para além de MΦ e neutrófilos, estes recetores também se encontram em CD, células NK e podem ser expressos por linfócitos B (Faria *et al.*, 2012). Os TLR1, TLR2 e TLR6 reconhecem lipo-, glico- e acil- péptidos. O TLR4 reconhece LPS e também ligandos endógenos, tais como proteínas de choque térmico, componentes da matriz extracelular, incluindo fibronectina, ácido hialurónico e heparina sulfatada, como resposta a tecidos lesados. A subfamília de sensores de ácidos nucleicos TLR3, TLR7 e TLR9 reconhecem material nuclear, como por ex. RNA de cadeia simples (ssRNA) e dupla (dsRNA) e DNA de cadeia dupla (dsDNA). As moléculas adaptadoras de TLR são a proteína de diferenciação mieloide 88 (MyD88), TIR (domínio que contém a proteína adaptadora TIRAP, também conhecida como MAL), TIRAP induzida por IFN-β (TRIF) e moléculas relacionadas com o adaptador TRIF (TRAM) (Smith, 2014) (Fig. 1.4). Estes

adaptadores são utilizados em várias combinações de TLRs, mas as vias de sinalização podem ser dependentes ou independentes de MyD88 (Faria *et al.*, 2012).

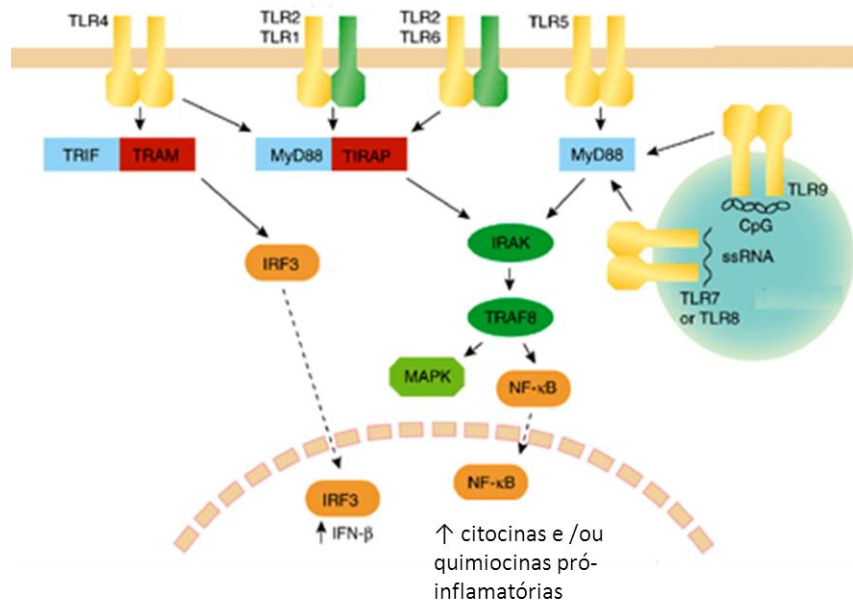


Figura 1.4. Representação esquemática de TLR e respectivos adaptadores. Estão indicados os TLR de membranas citoplasmáticas e endocíticas bem como as vias de ativação independentes ou dependentes de MyD88. Adaptado de: http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Receptores+Toll-Like&lang=2

A membrana celular de *Leishmania* é revestida por glicoproteínas, incluindo fosfolípidos glicoinositol (GIPL), LPG e gp63. O GIPL e o LPG são constituídos por unidades repetidas de dissacáridos de fósforo que estão ligados à superfície externa da membrana plasmática pela âncora GP. A gp63 é uma metaloprotease dependente de zinco, fundamental na sobrevivência dos amastigotas. Algumas destas moléculas ativam TLR, estando a maioria dos estudos focados na ativação de TLR2, TLR4 e TLR9.

Após o reconhecimento de LPG, TLR2 ativa o fator nuclear de transcrição (NF) -κB que tem um papel essencial na produção de citocinas, induzindo uma resposta pró-inflamatória rápida (Faria *et al.*, 2012). Este sensor também se liga a âncoras de fosfatidilinositol (GPI) induzindo a produção de NO por MΦ e da citocina pró-inflamatória IL-12 (Arosa *et al.*, 2007).

A EN produzida por neutrófilos induz a atividade leishmanicida de MΦ através da ativação do TLR4. Estudos demonstraram que este recetor é necessário para que ocorra

um controlo eficiente do parasita, provavelmente pela atividade de iNOS. Assim sendo, o TLR4 exerce uma função benéfica, contribuindo para o controlo da infeção por *Leishmania* (Tuon *et al.*, 2008).

Uma resposta imunitária do tipo Th1 está associada à produção da citocina IL-12. Na LV as células NK estão associados a um bom prognóstico e o recetor TLR9 é importante na sua ativação, sendo essencial para a produção de IL-12 (Srivastava *et al.*, 2013).

1.2.5. Receptores NOD-like

Os NLR (*nucleotide-binding leucine-rich repeat-containing proteins*) são um dos componentes cruciais da imunidade inata, reconhecendo sinais citoplasmáticos endógenos e exógenos. Apresentam um domínio efetor N-terminal necessário para a transdução de sinal, um domínio de ligação central a nucleótidos (NACHT) envolvido na oligomerização de proteínas e um domínio rico em repetições C-terminais de leucina (LRR), essenciais para a deteção do ligando e estimulação de recetores (Moreira & Zamboni, 2012) (Fig. 1.5).

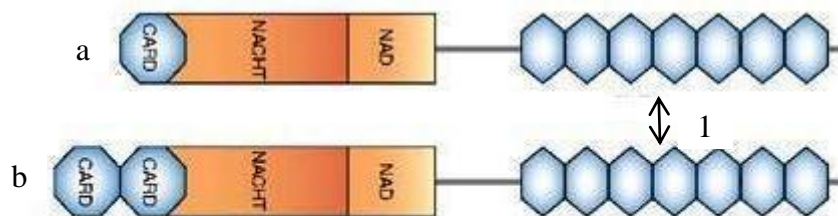


Figura 1.5. Representação esquemática da constituição de dois NLR. As letras **a** e **b** são indicativas do gene *NOD1* e *NOD2*, respetivamente. O número 1 indica o domínio rico em repetições C-terminais de leucina (LRR). Estes sensores possuem o domínio central NACHT, o domínio NAD e ainda um ou dois domínios CARD. Adaptado de: http://www.nature.com/nrrheum/journal/v4/n1/fig_tab/ncprheum0681_F1.html

A família NLR é subdividida em três subfamílias: a subfamília NOD que inclui NOD1, NOD2, NOD3 (NLRC3), NOD4 (NLRC4), NOD5 (NLRX1) e CIITA; a subfamília NALP e a subfamília IPMF (Castaño-Rodríguez *et al.*, 2014). Os NLR recrutam e ativam a protease inflamatória caspase 1 necessária ao processo de maturação das

citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-18 e intervém na cascata da apoptose. Outros NLR, como NOD1 e NOD2 não se envolvem diretamente com as caspases inflamatórias, em vez disso ativam NF- κ B, as proteínas nucleares quinase ativadas por mitogénio (MAPKS), IFN e os fatores reguladores (IRFs) estimulando a imunidade inata. NOD1 e NOD2 são codificados no domínio de recrutamento da caspase (CARD) 4 e 15, respetivamente, e como os NLR ambos têm NOD e partilham os domínios LRR para além do aminoácido CARD terminal (Zhong *et al.*, 2013). Existe uma grande similaridade entre estes dois NODs, com exceção que NOD1 apresenta um CARD e o NOD2 dois CARD e a expressão de NOD1 é detetada numa variedade de células enquanto NOD2 tem expressão em monócitos, granulócitos e CD (Gutierrez *et al.*, 2002). A ativação de NOD1 e NOD2 segue o reconhecimento citosólico de ligandos de peptidoglicano que desencadeiam a oligomerização dos recetores através do domínio NOD (Zhong *et al.*, 2013). Para haver ativação adequada, na via de sinalização destes dois recetores têm que ocorrer modificações pós-transducionais como fosforilação e ubiquitinização (Antosz & Osiak, 2013). Estes recetores estão também associados à indução de apoptose. O NOD1 está associado às caspases 8 e 9 e à proteína RIP2. A ativação via NOD1 e NOD2 induz o aumento da expressão do MHCII na superfície de APC (Antosz & Osiak, 2013). Estudos recentes demonstraram que estes NOD também respondem a proteínas de protozoários (Sakhon *et al.*, 2013).

2. Objetivos

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal estudar o efeito do protozoário do género *Leishmania* na ativação dos mecanismos oxidativos e não oxidativos de células fagocitárias, macrófagos e neutrófilos, que constituem a primeira linha de defesa imunológica, tanto no modelo roedor como em canídeos saudáveis.

Os objectivos específicos deste estudo foram os seguintes:

1. **Analisar a atividade leishmanicida de neutrófilos de murganho e canídeo quando expostos *in vitro* a espécies de *Leishmania* spp.**

O estudo dos mecanismos oxidativos e não oxidativos desencadeados por neutrófilos de murganho expostos a promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* e neutrófilos caninos expostos a promastigotas de *L. infantum* foi feito através da avaliação da expressão de receptores Toll-like e NOD-like, da atividade fagocítica das células, respiração oxidativa, exocitose de elastase neutrofilica e Catepsina G e pela formação extracelular de NET.

2. **Analisar a atividade leishmanicida de MΦ P388D1 (linha celular derivada de murganho) e de MΦ diferenciados de monócitos de sangue periférico de canídeos quando expostos *in vitro* a espécies de *Leishmania* spp.**

A expressão de recetores Toll-like e NOD-like, a atividade fagocítica, a produção de metabolitos de óxido nítrico e a produção de ureia foram analisadas em MΦ P388D1 expostos às espécies *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* e em MΦ de canídeo infetados por *L. infantum*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais e parasitas

Neste estudo foram utilizados canídeos (*Canis lupus familiaris*) e murganhos (*Mus musculus*).

3.1.1. Canídeos

Foram utilizados 10 canídeos com mais de 20 kg de peso e idades compreendidas entre 1,5 e 5 anos, residentes na região de Lisboa e cedidos por proprietários privados, pelo Grupo de Intervenção Cinotécnico da Guarda Nacional Republicana e pela Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa. Os animais foram sujeitos a um exame físico completo e foi recolhido sangue para tubo seco e tubo com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Foram efetuados hemograma, perfil bioquímico geral, ionograma e proteinograma de forma a avaliar o estado de saúde dos animais. A infeção por *Leishmania* foi excluída através da deteção de anticorpos anti-*Leishmania* pelo teste de imunofluorescência indireta (Kit *Leishmania* Spot IF[®], BioMerieux, França) com *cut off* de 1:80 e através da quantificação de DNA de *Leishmania* no sangue periférico e linfonodo por PCR em tempo real. A ausência de infeção por *Dirofilaria immitis* foi confirmada pelo teste Knott. Os hemoparasitas *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Rickettsia* spp. foram pesquisados em esfregaços de sangue e também por real-time PCR. *Mycoplasma haemocanis* foi pesquisado em esfregaços de sangue. Apenas animais clinicamente e analiticamente saudáveis, com exames microbiológicos e parasitológicos negativos, foram incluídos neste estudo. Os proprietários dos animais foram informados acerca da natureza das intervenções a realizar e do objetivo do estudo e assinaram um consentimento informado.

3.1.2. Murganhos

Foram utilizados um total de 27 murganhos machos, pertencentes à estirpe BALB/c, com idades compreendidas entre as cinco e as nove semanas, em três experiências independentes. Os animais foram adquiridos na Harlan laboratórios (Horst, Holanda) e foram 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, do conselho de 24 de novembro de 1986) reconhecidos pela lei nacional (DR DL129/92 e Portaria 1005/92).

3.1.3. Parasitas

Neste estudo foram utilizados promastigotas virulentos de *L. infantum* (MCAN/2012/IHMT0003SG) com menos de cinco passagens (Santos-Gomes & Abranches, 1996) na fase estacionária da curva de crescimento. Os amastigotas que deram origem aos promastigotas utilizados foram recolhidos por citologia aspirativa com agulha fina do linfonodo de um canídeo residente num Canil Municipal da região de Lisboa, Portugal.

Até ser utilizada, a estirpe foi mantida por passagens sucessivas em murganhos BALB/c para manter a virulência. Os animais foram inoculados por via intraperitoneal com inoculo de 1×10^7 promastigotas num volume final de 100 μ L. Um mês após a infeção, os animais foram sacrificados e o baço e fígado extraídos e homogeneizados num desagregador celular com um separador de 50 μ m (Medicons, Syntec International, Irlanda) para células infetadas. Para a transformação *in vitro* dos parasitas foi utilizado o meio líquido Schneider's Drosophila (Sigma-Aldrich, Alemanha) contendo L-glutamina e suplementado com 0,4 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃, Sigma-Aldrich,), 10% de soro fetal bovino (FBS, Sigma-Aldrich) inativado, cloreto de cálcio (CaCl₂, Sigma-Aldrich) 1,2% (m/v) e 5mM de HEPES (Sigma-Aldrich) a pH 7.2 (meio de Schneider completo).

Foram também utilizados promastigostas de *L. infantum* que expressam “*Green Fluorescent Protein*” (GFP)¹. 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) através da electroporação da membrana do plasmídeo. Posteriormente o vetor com *GFP* foi colocado em promastigotas de *L. infantum*. Os parasitas mutantes foram seleccionados em placas de agar com 25 μ g.mL⁻¹ de Geneticina (G418) (Sigma-Aldrich) e as colónias individuais positivas foram cultivadas em meio de cultura com a mesma condição de seleção e analisadas por *southern blotting* para

¹ A estirpe de *Leishmania*-GFP foi gentilmente cedida pela Prof.^a Ana Tomás do Instituto de Biologia Molecular e Celular, Porto.

confirmar que a construção estava estruturalmente intacta e por microscopia de fluorescência para garantir a expressão de GFP. Estes parasitas foram mantidos em meio de Schneider completo ao qual foi adicionado G418, composto similar a um antibiótico aminoglicosídeo, que permite que estes parasitas preservem o plasmídeo GFP.

Para além de *L. infantum*, foram também utilizadas três espécies cutâneas: *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis*²

L. amazonensis (MHOM/BR/1973/M2269) foi isolada de um paciente com leishmaniose cutânea anérgica difusa (ADCL) proveniente do estado do Pará, no Norte do Brasil. Os parasitas foram identificados utilizando-se anticorpos monoclonais e por eletroforese enzimática multilocus no Instituto Evandro Chagas (Belém, Estado do Pará, Brasil). Estes parasitas foram mantidos em murganhos BALB/c através de inoculação subcutânea nas patas traseiras dos animais e posteriormente isolados e mantidos em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de FBS inativado, 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de gentamicina e 1000 U.mL^{-1} penicilina a 25°C (Carvalho *et al*, 2012).

L. shawi (MHOM/BR/96/M15789) foi isolada de um paciente com leishmaniose tegumentar americana em Briticupu, estado do Maranhão no norte do Brasil. Os parasitas foram identificados através de anticorpos monoclonais e por eletroforese enzimática multilocus no Instituto Evandro Chagas. Os parasitas foram inoculados por via subcutânea nas patas traseiras de murganhos BALB/c, isolados e mantidos em meio RPMI completo-1640, suplementado com 10% de FBS inativado, 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de gentamicina e 100 U.mL^{-1} penicilina (Passero *et al*, 2012).

L. guyanensis (M19663) foi isolada de um paciente com leishmaniose cutânea localizada (LCL), no município de Santarém, no estado do Pará, Brasil. Os parasitas foram identificados através de imunoenzimas no Instituto Evandro Chagas e conservados no criobanco deste mesmo instituto.

² As estirpes cutâneas de *Leishmania* foram gentilmente cedidas pelo Professor Doutor Luiz Felipe Passero da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil.

3.2. Neutrófilos de murganho

3.2.1. Isolamento e purificação

Foram realizadas três experiências independentes e para cada experiência foram utilizados três murganhos. Os murganhos foram injetados intraperitonealmente com 800 μ L de tioglicolato 10% (Sigma-Aldrich). Este composto é um estimulante inflamatório que induz o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Dezoito horas após a injeção, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as células foram recolhidas por lavagem peritoneal em 10 mL de tampão fosfato (PBS) (Lonza, Bélgica) frio 1 \times , (Fig. 2.1a). A suspensão celular foi lavada uma vez com PBS 1 \times a 300 \times g, durante 10 min, à temperatura ambiente (TA) e ressuspendida em 2 mL de Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (Sigma-Aldrich). Paralelamente foi preparado um duplo gradiente de Hystopaque®. Num tubo de 15 mL foi colocado 2 mL de Hystopaque® 1119 (Sigma-Aldrich) e adicionado cuidadosamente 2 mL de Hystopaque® 1077 (Sigma-Aldrich). A suspensão celular foi colocada no topo do duplo gradiente e centrifugada a 340 \times g, durante 30 min à TA e sem travão, numa centrífuga com rotor basculante. Após centrifugação, foi cuidadosamente recolhido o anel rico em neutrófilos situados na interface entre o Hystopaque® 1119 e 1077 (Fig. 2.1.b). Foi efetuada uma lavagem com solução salina de cloreto de sódio (NaCl) (Sigma-Aldrich) a 0,9% (m/v), a 300 \times g, 10 min, à TA e os neutrófilos foram ressuspendidos em 1 mL de HBSS.

O rendimento e a viabilidade celular foram estimados por contagem em câmara de Neubauer após coloração com azul de tripano. O azul de tripano é um corante vital que permite avaliar a viabilidade celular. As células viáveis com a membrana celular integra têm a capacidade de excluir o corante, enquanto as células não viáveis ficam coradas de azul. A pureza foi determinada morfológicamente após citocentrifugação (*citospin*) em lâminas de vidro de 100 μ L da suspensão celular, a 55 \times g durante 4 min (StatSpin® Cytofuge 2, EUA) e observação por microscopia optica (MO) das lâminas após fixação com metanol (VWR International, EUA) e coloração com Giemsa (1:10) (Sigma-Aldrich). A metodologia empregue para isolar e purificar neutrófilos de murganho

permitiu obter uma pureza celular de 95% e viabilidade de 97%. O rendimento celular médio obtido foi de 10^4 células/mL.

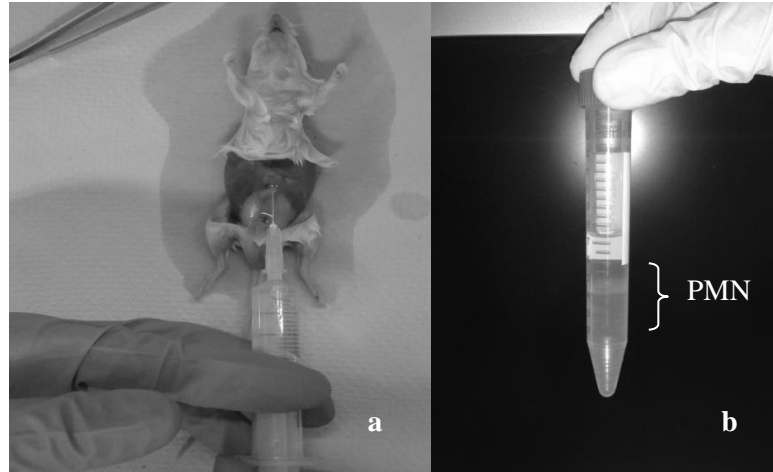


Figura 3.1. Isolamento e purificação de neutrófilos. (a) Lavagem da cavidade peritoneal de um murgancho BALB/c, (b) visualização do anel de neutrófilos após centrifugação do lavado peritoneal num duplo gradiente de hystopaque®.

3.2.2. Interação neutrófilo - *Leishmania*

Em placas de 96 poços de fundo redondo (Nunc, Thermo Fisher Cientific, Dinamarca), 1×10^5 neutrófilos foram colocados em contato com promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis*, num volume final de 300 μ L. A proporção utilizada de neutrófilos : parasita foi de 1:5. As placas foram incubadas durante 1,5 h e 3 h em atmosfera húmida, a 37°C, com 5% de CO₂. neutrófilos não infectados mantidos em idênticas condições foram usados como controlo. Terminado o período de incubação, as células e respetivos sobrenadantes foram recolhidos e utilizados posteriormente em diferentes ensaios.

Foram realizados *citospins* de neutrófilos-*Leishmania* spp. (conforme descrito em 3.2.1.) que depois de fixados com paraformaldeído 2% em PBS durante 20 min foram corados com Giemsa. Os *citospins* realizados com culturas de neutrófilos após fixação foram tratados com o corante nuclear fluorescente 4',6-diamidino-2-phenylindole

(DAPI) presente no meio de montagem (VECTASHIELD®, Vetor Laboratories, EUA) e observado no microscópio de fluorescência (Olympus 5X, Japão).

A percentagem de infecção foi determinada por MO das lâminas de neutrófilos-*Leishmania* spp. com 1,5 e 3 h de incubação, através da contagem do número de neutrófilos contendo pelo menos um parasita num total de 100 células observadas.

3.3.Linha celular macrófagos-like P388D1

A linha celular de macrófagos-like P388D1 (ATCC, EUA) isolada de linfoma de murganho é constituída por células do tipo monócito/MΦ, com aparência de linfoblasto e em cultura permanecem em suspensão.

As células P388D1 foram mantidas em suspensão em meio de cultura RPMI 1640 (Lonza) suplementado com 10% FBS, 2 mM L-glutamina (VWR International) e 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich) pH 7.2 (meio RPMI completo), numa atmosfera húmida, a 37°C, com 5% de CO₂. Foi adicionado meio novo a cada dois a três dias, de modo a manter uma concentração celular de cerca de 2×10⁶ células.mL⁻¹.

A viabilidade e a concentração celular foram determinadas por contagem em câmara de Neubauer através da coloração com azul tripano (como descrito em 3.2.1). A suspensão celular utilizada nos diferentes ensaios apresentou uma viabilidade superior a 98%.

3.3.1.Interação macrófagos-like P388D1 – *Leishmania*

Os MΦ foram incubados em placas com promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* nas proporções de 1:3 e 1:5 células:parasitas, por períodos de tempo variáveis (5, 18, 24 e 48 h), em atmosfera húmida a 37°C, com 5% de CO₂. Culturas paralelas de MΦ foram mantidas como controlo.

Terminado o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 300×g, 10 min, à TA. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e conservados a -20°C. Em cada poço das placas foram colocados 350 µL de RLT (RNeasy Mini Kit, Quiagen, Alemanha), por cada mL de RTL adicionaram-se 0,1 µL de 2-mercaptoetanol (Sigma-

Aldrich) (RLT-ME). As amostras foram conservadas a -80°C para posterior extração de ácido ribonucleico (RNA).

A percentagem de células infetadas foi determinada por MO em *citospins* de 100 μL das co-culturas, como descrito em 3.2.1.

3.4.Monócitos e Neutrófilos de canídeo

3.4.1.Isolamento e purificação

Dos 10 canídeos selecionados para o estudo (ver 3.1.1.) foram recolhidos 20 a 30 mL de sangue periférico para tubo com o anticoagulante CPDA (citrato, fosfato, dextrose) por venopunção da veia cefálica, após tricotomia e desinfecção da região. Para isolamento simultâneo de neutrófilos e monócitos a partir de sangue periférico foi utilizado o protocolo descrito por Strasser *et al.* (1998) com algumas alterações. Após preparação do duplo gradiente de Hystopaque® (descrito em 3.2.1.), 2 mL de sangue foram cuidadosamente colocados em cada tubo. Os tubos foram centrifugados a $340\times g$ durante 30 min à TA, sem travão, em centrífuga com rotor basculante. Os anéis de PMN e de células mononucleares que se encontram na interface entre o Hystopaque® 1119 e 1077 e sob o Hystopaque® 1077, respetivamente (Fig. 2.2.), foram cuidadosamente recolhidos para novos tubos e lavados com NaCl 0,9% (m/v) a $300\times g$ durante 10 min à TA. De seguida foi efetuada a lise osmótica dos eritrócitos contaminantes pela adição de 4 mL de água destilada estéril com agitação ligeira durante 1 min, ao fim do qual foi adicionado NaCl 1,8% (m/v) para equilibrar a osmolaridade. As células foram centrifugadas a $300\times g$ durante 10 min, à TA e posteriormente lavadas uma última vez com NaCl 0,9% (m/v). A suspensão celular de neutrófilos foi ressuspensa em 1 mL de HBSS e a suspensão de células mononucleares em 12 mL de RPMI 1640 completo) e 10% de fator estimulador de colónias (CSF).

A pureza, o rendimento e a viabilidade dos neutrófilos foram determinados através de contagem em câmara de Neubauer após coloração com azul tripano (conforme descrito em 3.2.1.). A metodologia empregue permitiu obter uma suspensão celular de

viabilidade e pureza superiores a 95%. O rendimento celular médio obtido foi de $1,5 \times 10^6$ células/mL.

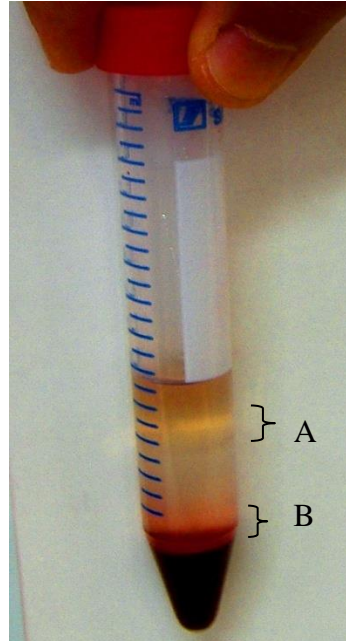


Figura 3.2. Isolamento e purificação de células mononucleares e PMN a partir de sangue periférico de canídeo. A centrifugação do sangue total usando um duplo gradiente de Hystopaque® permite obter um anel superior rico em células mononucleares (A) e um anel inferior rico em PMN (B).

3.4.2. Diferenciação de monócitos em macrófagos

O CSF, na concentração utilizada (10%), induz a maturação dos monócitos em MΦ. O CSF foi obtido a partir da linha celular L929 que apresenta características de fibroblasto (Campos-Neto *et al.*, 1995). As células L929 foram cultivadas em meio RPMI completo na concentração de 10^6 células.mL⁻¹, numa atmosfera húmida, a 37°C e com 5% de CO₂. A aderência celular foi confirmada em microscópio invertido (Olympus, Japão). Ao fim de três dias de incubação as células foram descoladas através de choque térmico e centrifugadas a 370×g, 5 min, a 4°C e o sobrenadante recolhido filtrado por um filtro celular de 70 μm (BD Biosciences, USA) e conservado a -20°C até à sua utilização.

As células mononucleares ressuspendidas em meio RPMI completo, suplementado com 10% de CFS, foram cultivadas em placas de seis poços (3 mL de suspensão celular por

poço), durante quatro dias. O meio foi substituído às 24 e 72 h por meio novo previamente aquecido a 37°C, de forma a manter as condições a que as células estavam sujeitas. Os MΦ obtidos a partir do sangue periférico de cão aderem fortemente à superfície da placa. A substituição do meio permite eliminar as células mononucleares não aderentes (linfócitos) e outras células contaminantes.

3.4.3. Interação macrófagos - *Leishmania*

Os monócitos foram plaqueados e após 4 dias de diferenciação (confirmado por citometria de fluxo) a concentração de MΦ foi estimada por MO de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{N. médio de células em três campos} \times 961,6 \text{ (diâmetro do poço)} mm^2}{0,24 \text{ (área)} mm^2}$$

De uma forma geral obteve-se um rendimento celular de $2,6 \times 10^4$ células/mL.

Aos poços das placas onde ocorreu a diferenciação de MΦ foram adicionados promastigotas de *L. infantum* na proporção de MΦ:parasita de 1:5 ou 1 µg/mL de LPS de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) como controlo positivo. Ao fim de 1,5 e 3 h de incubação os sobrenadantes foram recolhidos, centrifugados a 350×g, durante 10 min à TA, transferidos para novos tubos e conservados a -20°C até serem utilizados. A cada poço foi adicionado 350 µL de RLT-ME e o conteúdo recolhido e conservado a -80°C para posterior extração de RNA.

3.4.4. Interação neutrófilos - *Leishmania*

Em placas de 96 poços de fundo redondo, 5×10^5 neutrófilos foram colocados em contato com promastigotas de *L. infantum* e *L. infantum*-GFP, num volume final de 300 µL. A proporção utilizada de neutrófilos:parasita foi de 1:5. neutrófilos não infectados foram mantidos como controlo. As placas foram incubadas durante 1,5 e 3 h em atmosfera húmida a 37°C com 5% de CO₂.

Terminado o período de incubação, as células e os sobrenadantes foram utilizados na determinação de superóxido e na análise da exocitose de EN e CatG.

A percentagem de neutrófilos infetados foi determinada para os 10 animais (conforme descrito em 3.2.1.).

3.5. NET

A capacidade de *Leishmania* induzir a formação de NET foi avaliada por microscopia eletrónica de varrimento (MEV) em neutrófilos isolados de murganho e incubados durante 1,5 e 3 h com *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* e em neutrófilos isolados de sangue periférico de cão e incubados com *L. infantum* durante 1,5 e 3 h.

As preparações para MEV foram realizadas de acordo com o protocolo estabelecido por Brinkmann *et al.* (2010). Nos poços de uma placa de 24 poços foram colocadas lamelas redondas de vidro de 22 mm, devidamente esterilizadas. Foram plaqueados 2×10^5 neutrófilos por poço e incubados com *Leishmania* na proporção de 1 neutrófilos:5 promastigotas durante 1,5 e 3 h em atmosfera húmida, a 37°C com 5 % de CO₂.

Terminado o período de incubação, as lamelas foram fixadas no poço com paraformaldeído a 4% em água durante 8h e de seguida cuidadosamente transferidas para nova placa e pós-fixadas com solução de 2,5% glutaraldeído (Sigma-Aldrich) em água durante 30 min. Após lavagem, as lamelas foram incubadas com uma solução de 0,5% de tetróxido de ósmio (Sigma-Aldrich) em água durante 30 min e novamente lavadas antes de nova incubação com uma solução de 1% ácido tânico (Sigma-Aldrich) em água durante 30 min. As lamelas foram submetidas a nova lavagem e incubadas com a solução de tetróxido de ósmio durante 30 min e novamente lavadas. Por último, foram desidratadas por sucessivas passagens em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 80% e 90%) e conservadas a 4°C em placas de 24 poços com etanol a 100%, antes de passarem pelo ponto crítico e serem metalizadas para observação em MEV (JEOL 5200-LV, Japão).

Fez-se uma contagem de neutrófilos formadores de NET num total de 100 células, através da visualização das fotografias de MEV.

3.6. Produção de superóxido por neutrófilos

ROS são produzidas por NADPH que envia elétrons através da membrana para dentro do fagossoma dando origem ao O_2^- (Segal, 2005).

A produção de O_2^- foi avaliada usando o ensaio colorimétrico de azul de tetrazólio (NBT) adaptado de Choi *et al.* (2006) e Sukhumavasi *et al.* (2007). O NBT absorvido pelas células é reduzido pelo O_2^- intracelular com formação de partículas insolúveis de formazan.

Culturas de 1×10^5 neutrófilos isolados de murganho e co-culturas de neutrófilos-*L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* foram incubadas numa placa de 96 poços de fundo redondo durante 1,5 h, a 37°C, numa atmosfera húmida com 5% de CO_2 , em 300 μ l de HBSS contendo 0,4% de NBT (Sigma-Aldrich) e na ausência ou na presença de 0,2 μ g.mL⁻¹ de PMA (Sigma-Aldrich), um ativador da respiração oxidativa. Após incubação, as culturas foram centrifugadas a 300×g, 10 min e lavadas duas vezes com PBS 1× morno para retirar os grânulos extracelulares de formazan. De seguida, as células foram tratadas com 100 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma-Aldrich) 10% e os cristais intracelulares solubilizados com 100 μ L de ácido clorídrico (HCl) 0,1N (Fig. 3.3.). A absorvância foi lida a 550 nm num leitor de placas (Anthos 2010, Áustria). Poços com HBSS foram usados como brancos.

A produção de O_2^- foi também avaliada em culturas de 5×10^5 neutrófilos isolados de sangue periférico de cão e incubadas durante 1,5 e 3 h com *L. infantum*.

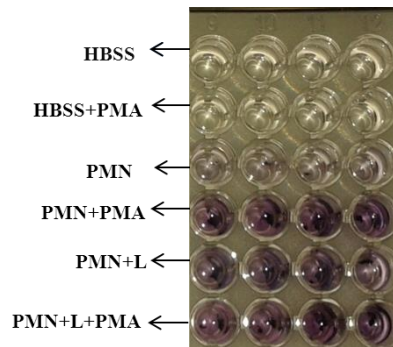


Figura 3.3. Ensaio colorimétrico de NBT para detecção do íon superóxido. Exemplo do resultado final do ensaio que permite visualizar a dissolução dos grânulos de formazan intracelulares, depois da adição de HCl 0,1 N. Na placa podem ser observados poços contendo apenas meio HBSS, poços com HBSS e PMA, poços com neutrófilos, com neutrófilos-*Leishmania* (PMN+L) e com PMN- *Leishmania* e PMA (PMN+L+PMA).

3.7.Exocitose de elastase neutrofílica e catepsina G

Um dos mecanismos utilizados pelos neutrófilos no combate aos agentes patogênicos é a sua destruição por hidrólise enzimática. Os grânulos citoplasmáticos primários também designados de azurófilos contêm péptidos antimicrobianos e enzimas proteolíticas, nomeadamente a EN e CatG, que podem ser segregados no fagossoma (Mydel *et al.*, 2008) ou libertados no meio extracelular como parte da NET (Abdallah & Denkers, 2012).

A exocitose de EN e CatG foi analisada através dos níveis de atividade enzimática respetivos em sobrenadantes de culturas de 1×10^5 neutrófilos incubados com *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis*. Foram também efetuadas culturas paralelas de neutrófilos como controlo negativo e de neutrófilos estimulados com LPS como controlo positivo. As culturas foram incubadas durante 1,5 e 3 h.

Ensaio idêntico foi realizado usando neutrófilos de canídeo e *L. infantum*.

A atividade enzimática da EN e da CatG foi medida utilizando os substratos sintéticos colorimétricos *N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-pNA* (Sigma-Aldrich) na concentração de 1 mM e *N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA* (Sigma-Aldrich) na concentração de 25 mM, respetivamente (adaptado de Morohoshi *et al.*, 2006 e de Mydel *et al.*, 2008). Cada um destes substratos foi diluído em 25 mM de tampão de reação (Tris-HCl pH 7.5). Numa placa de 96 poços de fundo redondo foi colocado 100

μL dos sobrenadantes e adicionado 100 μL do substrato apropriado. Imediatamente após a adição do substrato (~ 0 min), aos 15 min e 30 min a absorvância foi lida a 405 nm num leitor de placas (TRIADTM 1065, DYNEX Technologies, EUA). Como brancos foram lidos as absorvâncias de poços contendo meio HBSS com substrato de EN ou HBSS com substrato de CatG. Para todos os ensaios foi assumido que a intensidade da reação colorimétrica é proporcional à atividade da enzima.

3.8. Produção de óxido nítrico por macrófagos-like P388D1

Durante a infecção por *Leishmania*, os M Φ tendem a libertar NO (Naderer & Mcconville, 2008). Na célula, após uma série de reações o NO é metabolizado em iões nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-).

Neste estudo, a produção de NO foi estimada através do método de Griess [0,2% de n-naftil etilendiamina (NED) e 2% de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico]. Esta metodologia tem como princípio a metabolização de NO_2^- , que é convertido pelo composto NED numa substância de cor rosa/roxa (cromóforo azo).

Os sobrenadantes de 6×10^6 M Φ , de M Φ incubados com promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* e de M Φ estimulados por PMA durante 5, 18, 24 e 48 h foram utilizados para medir a produção de NO.

Em cada poço de uma placa de 96 poços foi colocado 50 μL das diluições seriadas (1:2) do padrão com várias concentrações conhecidas de nitrito de sódio (de 250 μM a 3,9 μM) para estabelecer a reta padrão. Foi colocado 50 μL de sobrenadante das amostras por poço ou 50 μL de RPMI completo (meio de cultura de M Φ) utilizado como branco. Às amostras, às diluições padrão e ao branco foram adicionados 50 μL do reagente de Griess (Sigma-Aldrich,) seguindo-se uma incubação de 10 min à TA na ausência de luz.

A densidade ótica (DO) foi lida a 550 nm num leitor de placas (Anthos 2010, Áustria). A concentração de nitrito das amostras foi determinada a partir da reta padrão construída através dos valores de absorvância das diluições padrão. Tanto as amostras como as diferentes concentrações do padrão foram realizadas em triplicado.

3.9. Produção de óxido nítrico por macrófagos de sangue periférico de canídeo

O NO foi estimado em sobrenadantes de culturas de MΦ, MΦ incubados com *L. infantum* e MΦ estimulados com LPS durante 1,5 h e 3 h de incubação usando o kit Nitrite/Nitrate colorimetric assay (ABNOVA, Taiwan).

Este método consiste na conversão do íon NO_3^- presente nos sobrenadantes, em íon NO_2^- através da enzima nitrato redutase. A posterior adição do reagente de Griess converte NO_2^- num composto de cor rosa/roxa (cromóforo azo). Para estimar a concentração dos dois metabolitos nas amostras, foi construída uma curva-padrão através da leitura da absorvância de quantidades conhecidas de NO_3^- . Para fazer a curva-padrão foram efetuadas diluições seriadas de uma solução de NO_3^- a 200 μM de modo a obter concentrações finais entre 35 μM e 5 μM .

Numa placa de 96 poços foi colocado 80 μL das amostras e 200 μL de tampão de ensaio (branco) em duplicado. O cofator e a enzima nitrato reductase (10 μL) previamente reconstituída em tampão de ensaio foram adicionados a cada amostra, incluindo o padrão. A placa foi incubada durante 1h, depois foi adicionado 50 μL do reagente de Griess R1, seguido de 50 μL do reagente de Griess R2. Dez minutos depois, a absorvância foi lida a 550 nm num leitor de placas (Anthos 2010). A curva-padrão foi construída e os valores da concentração conjunta de NO_2^- e NO_3^- foram extrapolados a partir da seguinte fórmula:

$$[\text{Nitrato} + \text{Nitrito}](\mu\text{M}) = (\text{DO}_{550\text{nm}} - \text{Declive reta padrão}) \times \text{Vol final amostra} (\mu\text{L}) \times (\text{Fator diluição})$$

3.10. Produção de ureia por macrófagos

Um dos mecanismos leishmanicidas mais importantes dos MΦ é a produção de NO pela iNOS. Esta enzima requer L-arginina como substrato, o mesmo aminoácido utilizado pela arginase para produzir ornitina e ureia (Wu & Morris, 1998). Deste modo a arginase pode contribuir para a sobrevivência de *Leishmania* no hospedeiro, competindo com a iNOS e reduzindo a produção de NO.

Foi utilizado o *QuantiChrom™ Urea Assay Kit* (BioAssay Systems, EUA) para quantificar a produção de ureia em sobrenadantes de culturas de 6×10^6 MΦ incubados com promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* durante 5, 18, 24 e 48 h e em sobrenadantes de 2×10^5 MΦ diferenciados a partir de monócitos isolados de sangue periférico de canídeo e incubados com promastigotas de *L. infantum* durante 1,5 e 3 h. Sobrenadantes de culturas de MΦ (P388D1 e de canídeo) e MΦ incubados com $0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de PMA foram usados como controlo negativo e positivo, respetivamente. O *kit* utiliza um reagente cromogénico que forma um complexo colorimétrico específico com a ureia. A intensidade da cor (absorvância lida a 450 nm) é diretamente proporcional à concentração de ureia na amostra (Fig. 3.4.).

Numa placa de 96 poços de fundo plano foram depositados em triplicado 50 μL de sobrenadante, 50 μL da solução padrão (5 mg ureia.dL⁻¹) e 50 μL de água, utilizada como branco. Um volume de 200 μL de tampão de ensaio constituído equitativamente pelo reagente A (<0,40% de ácido sulfúrico; <0,04% de *Brij* 35 e 10,00% de o-ftalaldeído) e pelo reagente B (<0,08% de difosfato de primaquina; <0,80% de ácido bórico; 22,00% de ácido sulfúrico e <0,04% de *Brij* 35) foi adicionado às amostras, ao padrão e ao branco. A placa foi incubada durante 50 min à TA protegida da luz e a DO foi lida a 450 nm num leitor de placas (TRIAD™ 1065, DYNEX Technologies, EUA). A concentração de ureia foi posteriormente calculada através da seguinte fórmula:

$$[\text{Ureia}] = \frac{(\text{DO amostra} - \text{DO branco})}{(\text{DO padrão} - \text{DO branco})} \times n \times (\text{padrão}) (\text{mg/dL})$$

Em que n é o fator de diluição das amostras. Neste caso o $n=1$ porque as amostras não foram diluídas e o padrão é igual a 5 porque tem uma concentração de ureia de 5 mg.dL¹.

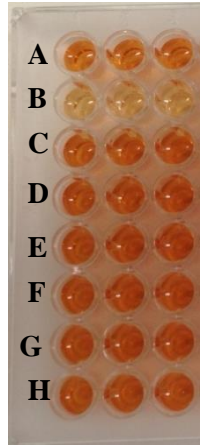


Figura 3.4. Ensaio colorimétrico para quantificação da produção de ureia. Exemplo do resultado final do ensaio em sobrenadantes de MΦ P388D1 incubados com promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* e MΦ de cães incubados com promastigotas de *L. infantum*. Na placa podem-se ver poços com a solução padrão (A), poços com água (branco) (B) e poços com amostras (C - H).

3.11. Quantificação da expressão de NOD e TLR

3.11.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA

MΦ de cão (2×10^5) incubados durante 1,5 e 3 h com *L. infantum*, neutrófilos (1×10^5) de murganho e MΦ P388D1 (1×10^6) incubados durante 1,5, 3 h e 5, 18, 24 e 48 h com *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensi*, respetivamente, foram utilizados para a extração de RNA. Como controlos negativos foram utilizadas somente células (MΦ de cão, neutrófilos de murganho e MΦ P388D1). Como controlos positivos foram utilizados neutrófilos estimulados com fMLP (N- formil-metionil-leucil-fenilalanina) durante 1,5 h e PMA durante 3 h, MΦ de cão estimuladas por LPS e MΦ P388D1 estimulados por PMA. Neutrófilos de murganhos também foram incubados com agonistas dos genes *TLR9*, *NOD1* e *NOD2*, nomeadamente ODN, D-SLO1 e M-Tri_{DAP} (InvivoGen, França), respetivamente.

As células foram conservadas a -80°C em RLT-ME. O RNA foi extraído com o *Kit* comercial *RNeasy Mini Kit* (Quiagen, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Após adição de etanol a 70% (v/v), as amostras foram transferidas para uma coluna que possui uma resina que permite fixar o RNA. Após eluição do tampão as colunas foram lavadas e o RNA eluído em 20 μL de água ultra pura. Este protocolo

inclui um passo com desoxiribonuclease (DNase) para remover o DNA contaminante (RNase Free-DNase set; Quiagen).

Após extração do RNA total, foi efetuada a síntese da cadeia complementar de DNA (cDNA), utilizando o kit de cDNA da NZYTech (NZYTech, Lda. - Genes and Enzymes, Portugal). Inicialmente foi preparada uma *master mix* contendo para cada amostra 10 µL de NZYRT 2×Master Mix (NZY *Reverse Transcriptase* e NZY *Ribonuclease Inhibitor*) que protege o RNA da degradação por ribonucleases e 2 µL de NZYRT *Enzyme Mix* [oligo (dT) 18, *random hexamers*, MgCl₂ e dNTPs] à qual foi adicionado 8 µL de RNA total. A reação de transcrição reversa foi realizada submetendo as amostras a 25°C durante 10 min seguido de 50°C durante 30 min e inativação a 85°C durante 5 min. A cada reação foi adicionado 1 µL de NZY RNase H (*E. coli*) com o objetivo de degradar o RNA existente. As amostras foram incubadas a 37°C durante 20 min e para finalizar 5 min a 85°C.

Terminada a transcrição reversa foi adicionado a cada amostra 40 µL de água livre de RNA. As amostras foram conservadas a -20°C até serem utilizadas.

Para cada um dos ensaios foram efetuadas três experiências independentes, tendo sido extraídas um total de 180 amostras.

3.11.2. Seleção de genes-alvo e sequências iniciadoras

A expressão génica dos *TLR* que codificam recetores de superfície e intracelulares de PAMP e *NOD* que também codificam sensores intracelulares de PAMP foi analisada.

As sequências iniciadoras (*primers*) 5'-3' (*forward*) e 3'-5' (*reverse*) de *NOD1*, *NOD2* e *TLR9* de murganho e de *NOD1*, *NOD2*, *TLR4* e *TLR9* de cão foram desenhadas usando o *software primer-Blast* (Ye *et al.*, 2012).

Os *primers* utilizados para amplificar *HPRT* (Rodrigues *et al.*, 2006), *TLR2* (Sutmuller *et al.*, 2006), *TLR4* (Huang *et al.*, 2006) de murganho (Tabela 3.1) e, *β-actina* (Sauter *et al.*, 2005) e *TLR2* (Ishii *et al.*, 2006) para canídeo (Tabela 3.2) já se encontravam descritos por diversos autores.

Tabela 3.1. Primers *forward* e reverse para amplificação de genes de murganho. Genes-alvo, sequência dos *primers*, tamanho do produto obtido em pares de bases (pb) e temperaturas de *annealing*.

Genes Alvo	Sequências <i>forward</i> (FW) e <i>reverse</i> (RV)	Produto de amplificação (pb)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)
<i>HPRT</i>	FW– 5’GCT CGA GAT GTC ATG AAG GAG AT3’ RV– 5’CCA GCA GGT CAG CAA AGA ACT3’	91	60,5
<i>NOD1</i>	FW– 5’TCAGCGTCAACCAGATCACC3’ RV– 5’AACCCAGGAACGTCACGATC3’	84	54,5
<i>NOD2</i>	FW– 5’GTCAGCGCTCCTCAGGAAG3’ RV– 5’GGTACAGTTGGATGCCCTCT3’	77	56
<i>TLR2</i>	FW– 5’AAC CTC AGA CAA AGC GTC AAA TC3’ RV– 5’ACC AAG ATC CAG AAG AGC CAA A3’	65	64
<i>TLR4</i>	FW– 5’CGC TTT CAC CTC TGC CTT CAC TAC AG3’ RV– 5’ACA CTA CCA CAA TAA CCT TCC GGC TC3’	109	61,5
<i>TLR9</i>	FW–5’ACTTCGTCCACCTGTCCAAC3’ RV–5’TCATGTGGCAAGAGAAGTGC3’	93	53

Os *primers* (Stabvida, Portugal) foram otimizados por PCR convencional, para que apenas o gene em causa fosse amplificado. A temperatura de *annealing* (T_a) inicial foi calculada através da subtração de 5°C à temperatura de *melting* (T_m) recomendada pelo fornecedor. A T_a foi gradualmente aumentada em 0,5°C até obtenção do produto de amplificação pretendido

Para se corrigirem possíveis falhas na reação de transcrição reversa, a quantificação da expressão génica foi regulada por um gene de expressão constitutiva (*housekeeping gene*) que deverá ser expresso ao mesmo nível em diferentes tecidos e em diferentes fases do desenvolvimento de um organismo. Como controlos endógenos foram utilizados os genes *HPRT* (*hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*) para murganho e β -*actina* para cão.

Tabela 3.2. Primers *forward* e *reverse* para canídeo. Genes-alvo, sequência dos *primers*, tamanho do produto obtido em pares de bases (pb) e temperaturas de *annealing*.

Genes Alvo	Sequências <i>forward</i> (FW) e <i>reverse</i> (RV)	Produto de amplificação (pb)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)
<i>β-actina</i>	FW– 5`ACG GAG CGT GGC TAC AGC3` RV– 5`TCC TTG ATG TCA CGC ACG A3`	61	61
<i>NOD1</i>	FW– 5`CTTGGCTGTCGGAGATTGGCT3` RV– 5`ACCTGCTTACTGGGTTCGGTGT3`	82	63
<i>NOD2</i>	FW– 5`TGGCGTGGGAGCAGGGTTTC3` RV– 5`CGCTGGGAGGATGTGAAGATGG3`	76	68,5
<i>TLR2</i>	FW– 5`AATCCCCCGTTCAAGTTGTG3` RV– 5`ATGGTTTTGCGGCTCTTCTC3`	101	61
<i>TLR4</i>	FW– 5`CCCCACATCAACCGAGAAACTGGA3` RV– 5`GCAGTTTTGGGAAGTTGGAGAAGCA3`	86	64
<i>TLR9</i>	FW– 5`ACCACATCATCACCTGGCACCT3` RV– 5`CGGCGACAGTCCCACCCAC3`	82	67

3.11.3. PCR convencional, purificação e clonagem do produto amplificado em vetores plasmídicos

A amplificação do produto gerado pelos pares de *primers* foi realizada por PCR convencional (tabelas 3.3 e 3.4). A mix foi preparada com 2 µL de 10× NH₄ tampão de reação (Bioline, RU); 0,8 µL da solução de MgCl₂ 50 mM (Bioline); 0,5 µL da solução de dNTPs 100 mM (Bioline); 0,2 µL de 20 pmol.µL⁻¹ de *primer forward* e de *primer reverse*; 0,2 µL de 5 U.µL⁻¹ BIOTAQ da solução de DNA polimerase (Bioline.); 14,1 µL de água bidestilada e por último 2 µL da amostra.

Tabela 3.3. Condições de amplificação dos genes de murganho por PCR convencional. Foram realizados 30 ciclos entre a desnaturação e a extensão em todos os genes, excepto para a amplificação de TLR4 onde foram realizados 40 ciclos.

Gene	<i>HPRT</i>	<i>NOD1</i>	<i>NOD2</i>	<i>TLR2</i>	<i>TLR4</i>	<i>TLR9</i>
<i>Desnaturação</i>	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C
	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min
	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C
	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s
<i>Annealing</i>	60,5°C	54,5°C	56°C	64°C	61,5°C	53°C
	15 s	15 s	15 s	15 s	15 s	15 s
<i>Extensão</i>	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C
	30 s	10 s	10 s	30 s	30 s	10 s
	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C
	3 min	3 min	3 min	3 min	3 min	3 min

Tabela 3.4. Condições de amplificação dos genes caninos por PCR convencional. Realizaram-se 30 ciclos entre a desnaturação e a extensão para todos os genes.

Gene	<i>β-actina</i>	<i>NOD1</i>	<i>NOD2</i>	<i>TLR2</i>	<i>TLR4</i>	<i>TLR9</i>
<i>Desnaturação</i>	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C
	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min
	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C
	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s
<i>Annealing</i>	61°C	63°C	68,5°C	61°C	64°C	67°C
	15 s	15 s	15 s	15 s	15 s	15 s
<i>Extensão</i>	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C
	10 s	15 s	10 s.	15 s	10 s	10 s
	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C
	3 min	3 min	3 min	3 min	3 min	3 min

O produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v) (Sigma-Aldrich) ao qual foi adicionado 6 μ L de GelRed (0.1 μ L.mL⁻¹ de 10000 \times GelRed Nucleic Acid Stainm Biotium, EUA) em tampão TAE 1 \times (0,04M Tris-HCl pH 8,0; 0,02M acetato de sódio; 0,002M EDTA) durante cerca de 120 min a 80V. A presença do produto de PCR foi confirmada no gel através da visualização da emissão de fluorescência do GelRed intercalado com o DNA, observado em transiluminador sob luz ultravioleta .

Os produtos obtidos foram purificados utilizando-se um *kit* comercial, innuPREP DOUBLEpure Kit (Analytik Jena AG, Alemanha) seguindo-se as instruções do fabricante. Resumidamente, depois da adição do tampão de ligação, a amostra foi colocada na coluna e centrifugada. Por fim, o produto purificado foi eluído em 20 µL de tampão de eluição e testado por eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v).

O produto purificado foi inserido num vetor plasmídico, pGEM®-T Easy Vector (Promega, USA) que apresenta terminais T nas suas extremidades. A BIOTAQ DNA polimerase utilizada tem atividade *proofreading*, ou seja, adiciona caudas poli A ao produto amplificado, o que permite a sua ligação ao plasmídeo.

Para cada reação de ligação foi utilizado 5 µL de 2× tampão de ligação, 1 µL da enzima T4 ligase, 1 µL do vetor e a quantidade adequada de inserto (DNA purificado) num volume final de 10 µL. As reações foram incubadas durante 1 h à TA e a 4°C durante 8 h.

A quantidade de inserto utilizado na reação de ligação foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{inserto (ng)} = \frac{[\text{vetor (ng)} \times \text{tamanho inserto 0,5 (kb)} \times \text{proporção (inserto:vetor)}]}{\text{tamanho vetor (kb)}}$$

A proporção de inserto: vetor foi otimizada para 9:1; a quantidade de vetor foi de 50 ng e o tamanho do vetor em kb era de 3,015.

O plasmídeo foi utilizado na transformação de bactérias competentes de *E. coli JM 109* (Promega). Em tubos de 2 mL foram colocados 50 µL de células competentes e 2 µL da suspensão de plasmídeo. A mistura foi incubada durante 30 min em gelo, submetida a um choque térmico a 42°C durante 60 s e colocada novamente em gelo, 2 min. A cada tubo de reação foram adicionados 500 µL de meio *super optimal broth with catabolite repression* (SOC, Invitrogen, EUA), seguindo por uma incubação a 37°C, com agitação a 250 rpm durante 3 h. Foi colocado 250 µL da cultura em placas contendo meio *Luria-Broth* (LB, Sigma-Aldrich) com 1,5% (p/v) de agar (Sigma-Aldrich) suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina (Sigma-Aldrich), 80 µg.mL⁻¹ de X-Gal (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside*) (Sigma-Aldrich) e 0,5 mM de IPTG (*sopropyl-beta-D-*

thiogalactopyranosid) (Sigma-Aldrich), para permitir a identificação dos recombinantes através da diferenciação de colónias brancas e azuis. As placas foram incubadas a 37°C durante 18 h. As colónias de cor branca [resultando da interrupção da sequência do gene que codifica a β -galactosidase (*lacZ*) devido à presença do plasmídeo recombinante com o inserto clonado] foram repicadas e colocadas em 5 mL de meio LB suplementado com 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina e incubadas a 37°C com agitação a 250 rpm, durante 18 h.

O DNA plasmídico (DNAP) foi extraído usando-se o Kit innuPREP Plasmid Mini Kit (Analytik Jena AG, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente foi realizada a lise alcalina da suspensão bacteriana e o sobrenadante resultante foi centrifugado de modo a eliminar as impurezas. Estabeleceu-se a ligação do DNAP à coluna, seguido de lavagem e eluição. O DNAP foi analisado através de PCR convencional e eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v) (Fig. 3.5 e 3.6) de forma a confirmar a presença do inserto no plasmídeo.

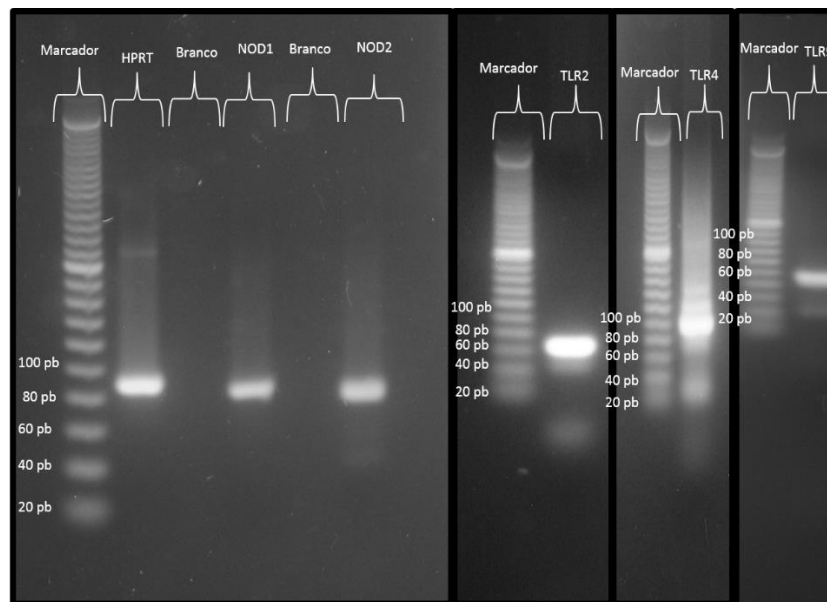


Figura 3.5. Gel de agarose com produtos de PCR de DNA plasmídico dos genes de murganho. Gel de agarose 3% do produto de PCR dos genes *HPRT* (91 pb), *NOD1* (84 pb), *NOD2* (77 pb), *TLR2* (85 pb), *TLR4* (109 pb) e *TLR9* (93 pb) após clonagem em pGEM®-T Easy Vector.

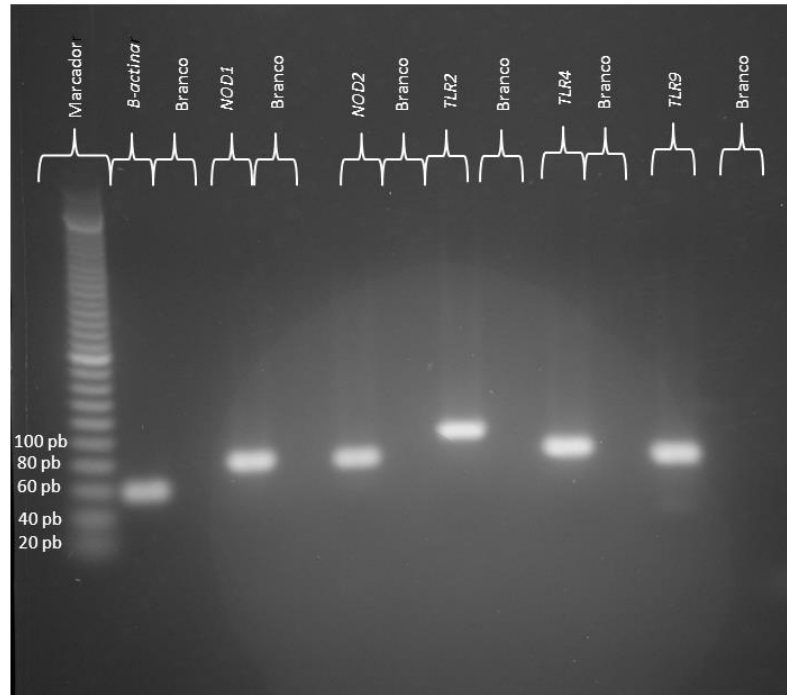


Figura 3.6. Gel de agarose com produtos de PCR de DNA plasmídico dos genes de cão. Gel de agarose 3 % do produto de PCR dos genes *β-actina* (61 pb), *NOD1* (82 pb), *NOD2* (76 pb), *TLR2* (101 pb), *TLR4* (86 pb) e *TLR9* (82 pb) após clonagem em pGEM®-T Easy Vector.

3.11.4. PCR em tempo real e construção de curvas – padrão para quantificação absoluta da expressão gênica

Após a quantificação do DNAp recombinante (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, EUA) foram construídas curvas-padrão para cada gene. As curvas foram criadas através de diluições seriadas de 1:5 do DNAp ($250 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ a $0,016 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). A partir das curvas-padrão foi calculada a eficiência de amplificação ($E = 10^{1/(-\text{DECLIVE} - 1)}$) para cada gene. Foram considerados aceitáveis os ensaios com percentagens de eficiência superiores a 90%.

O PCR em tempo real foi realizado num aparelho Applied Biosystems® 7500 fast (Applied Biosystems, EUA) num volume total de 20 μL contendo 2 μL de cDNA de cada diluição do DNAp (padrão) e de cada amostra, 300 nM dos *primers forward* e *reverse* específicos de cada gene e 10 μL de SYBR Green (SYBR) PCR *Master Mix* (Applied Biosystems) que contém SYBR Green I Dye, DNA Polimerase AmpliTaq Gold, dNTPs e tampões otimizados.

Foram utilizadas as seguintes condições de corrida: 5 min a 95°C para a desnaturação da cadeia, 40 ciclos durante 30 s a 95°C e 30 s à T_a específica, para cada gene (Tabelas 3.3 e 3.4), para hibridação e extensão 90 ciclos de 10 s com uma temperatura inicial de 50°C e incrementos de 0,5°C por cada ciclo. A quantidade de DNA amplificado foi calculado em comparação com as curvas-padrão para cada gene.

O número de cópias foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Número de cópias de gene} = \frac{9,1 \times 10^{11} \times \text{quantidade } (\mu\text{g})}{3015 + \text{tamanho do inserto (pb)}}$$

Em que $9,1 \times 10^{11}$ representa a quantidade de pares de bases de DNA existentes em 1 μg de DNA e 3015 indica o tamanho em pb do plasmídeo utilizado

Os resultados de cada amostra para cada gene foram divididos pelo número de cópias de *HPRT* no caso das células de murganho ou *β -actina* no caso de células provenientes de cão, para a mesma amostra, a fim de se normalizar os resultados.

3.12. Análise estatística

Para todos os ensaios com células de murganho ou com a linha celular foram utilizados, no mínimo, triplicados de cada amostra de pelo menos três experiências independentes. Foram utilizadas células de dez cães e triplicados de cada amostra para cada ensaio. Nos gráficos de barras os resultados foram apresentados como médias e erros padrão assim como nas tabelas. Nos diagramas de caixa encontram-se representados o quartil superior, a mediana e o quartil inferior e nas barras exteriores o intervalo entre quartis.

3.12.1. Murganhos

O teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para comparar:

- a produção do ião O_2^- em culturas de neutrófilos (neutrófilos vs neutrófilos +*L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis*, neutrófilos -PMA vs neutrófilos -PMA+ *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis*);

- os valores de absorvância da atividade enzimática de EN e CatG nos sobrenadantes de neutrófilos (neutrófilos vs neutrófilos +*L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis*, neutrófilos – LPS vs neutrófilos +*L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis*);
- a produção de nitritos em sobrenadantes de culturas de MΦ P388D1 (MΦ vs MΦ+*L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis*);
- a produção de ureia nos sobrenadantes de MΦ P388D1 (MΦ vs MΦ-PMA; MΦ vs MΦ + *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis*; MΦ-PMA vs MΦ+*L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis*);
- o número de cópias de cada gene por cada 1000 cópias do gene de controlo interno *HPRT* em neutrófilos (neutrófilos vs neutrófilos +*L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis*) e em MΦ P388D1 (MΦ vs MΦ+*L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis*);

3.12.2. Canídeos

O teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para comparar:

- a produção do O₂⁻ em culturas de neutrófilos (neutrófilos vs neutrófilos +*L. infantum*, neutrófilos -PMA vs neutrófilos -PMA+ *L. infantum*);
- os valores de absorvância da atividade enzimática de EN e CatG nos sobrenadantes de neutrófilos (neutrófilos vs neutrófilos +*L. infantum*);
- a produção de nitritos e nitratos em sobrenadantes de culturas de MΦ (MΦ vs MΦ+*L. infantum*);
- a produção de ureia nos sobrenadantes de MΦ (MΦ vs MΦ+*L. infantum*; MΦ-PMA vs MΦ+*L. infantum*);
- o número de cópias de cada gene por cada 1000 cópias do gene de controlo interno *β-actina* em MΦ (MΦ vs MΦ+*L. infantum*, MΦ–LPS vs MΦ+*L. infantum*).

Consideraram-se estatisticamente significativos os valores de *p* inferiores a 0,05 (*p* <0,05). A análise estatística foi realizada no Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 1.6 (Inc., EUA) e os gráficos foram gerados com o *Microsoft Excel* 2010 e o *Graphpad Prism 5.0* (EUA).

4. Resultados

4.1. Modelo roedor

4.1.1. Neutrófilos e macrófagos-like P388D1 fagocitam promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis* e promovem a sua diferenciação em amastigotas

Neutrófilos (Fig. 4.1) e MΦ P388D1 (Fig. 4.2.) incubados com promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* durante 1,5, 3, 5, 18, 24 e 48 h foram coradas com Giemsa e observadas ao MO. Foi observada a internalização de promastigotas por neutrófilos (Fig. 4.1.e) de *L. infantum* (Fig. 4.1.a), *L. amazonensis* (Fig. 4.1.b), *L. shawi* (Fig. 4.1.c) ou *L. guyanensis* e a diferenciação em amastigotas, ovóides e sem flagelo livre. Os parasitas intracelulares apresentaram aspeto normal, com núcleo e cinetoplasma bem definidos, porém algumas formas revelaram alterações morfológicas. Alguns promastigotas não fagocitados mantiveram a sua forma alongada com flagelo livre na parte anterior e a integridade estrutural, enquanto outros aparentaram aspeto irregular.

Após 1,5 h de incubação, *L. guyanensis* e *L. shawi* foram responsáveis pela maior percentagem de infeção de neutrófilos (11%) seguida de *L. infantum* (5%). A infeção por *L. amazonensis* revelou-se mais exigente tendo atingido 3,5%. A duplicação do tempo de incubação (3h) induziu um ligeiro aumento nas taxas de infeção de *L. guyanensis* (13,3%) e *L. infantum* (7,7%). O aumento do tempo de incubação foi benéfica para *L. amazonensis* que quase duplicou a taxa de infeção (6%) mas não teve grandes consequências para *L. shawi* que infetou 10,5% de neutrófilos (Fig. 4.1.f).

A incubação de MΦ com parasitas na proporção de 1:3 permitiu observar ao longo do tempo que as espécies mais infetantes foram *L. amazonensis* (Fig. 4.2.b) (12%, 7%, 8% e 1%), *L. infantum* (Fig. 4.2.a) (5%, 5% e 1%), seguida por *L. shawi* (Fig. 4.2.c) (2%, 1% e 2%) e *L. guyanensis* (Fig. 4.2.d) (1%, 3% e 3%) (Fig. 4.2.e). O aumento do número de parasitas por MΦ não se traduziu em aumentos importantes na percentagem de células infetadas (Fig. 4.2.).

4. Resultados

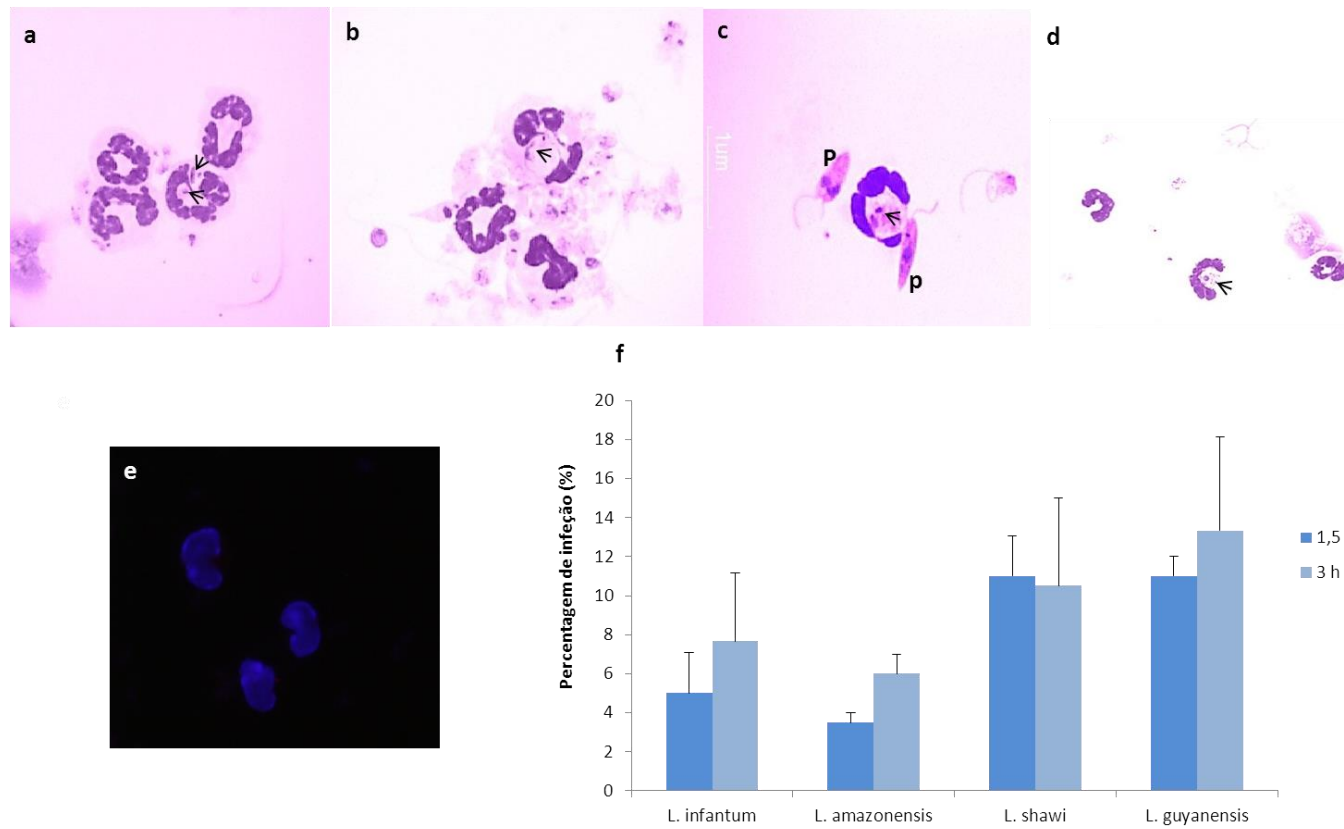


Figura 4.1. Percentagem de infecção de neutrófilos de murganhos BALB/c. Lâminas de *citospin* de neutrófilos incubados com promastigotas de (a) *L. infantum*, (b) *L. amazonensis*, (c) *L. shawi* e (d) *L. guyanensis* foram observadas por MO (ampliação 1000×). Os promastigotas internalizados por neutrófilos adquiriram a forma amastigota (indicado por setas em a, b, c, d). Alguns parasitas não fagocitados mantiveram a forma alongada típica de promastigota (c). A percentagem de neutrófilos contendo pelo menos um parasita intracelular foi calculada e no gráfico (f) encontram-se representadas as médias e erros-padrão de pelo menos três experiências independentes. Foram observadas por microscopia de fluorescência (ampliação 1000×) lâminas de *citospin* de neutrófilos corados com DAPI (e). P assinala formas promastigota morfologicamente normais.

4. Resultados

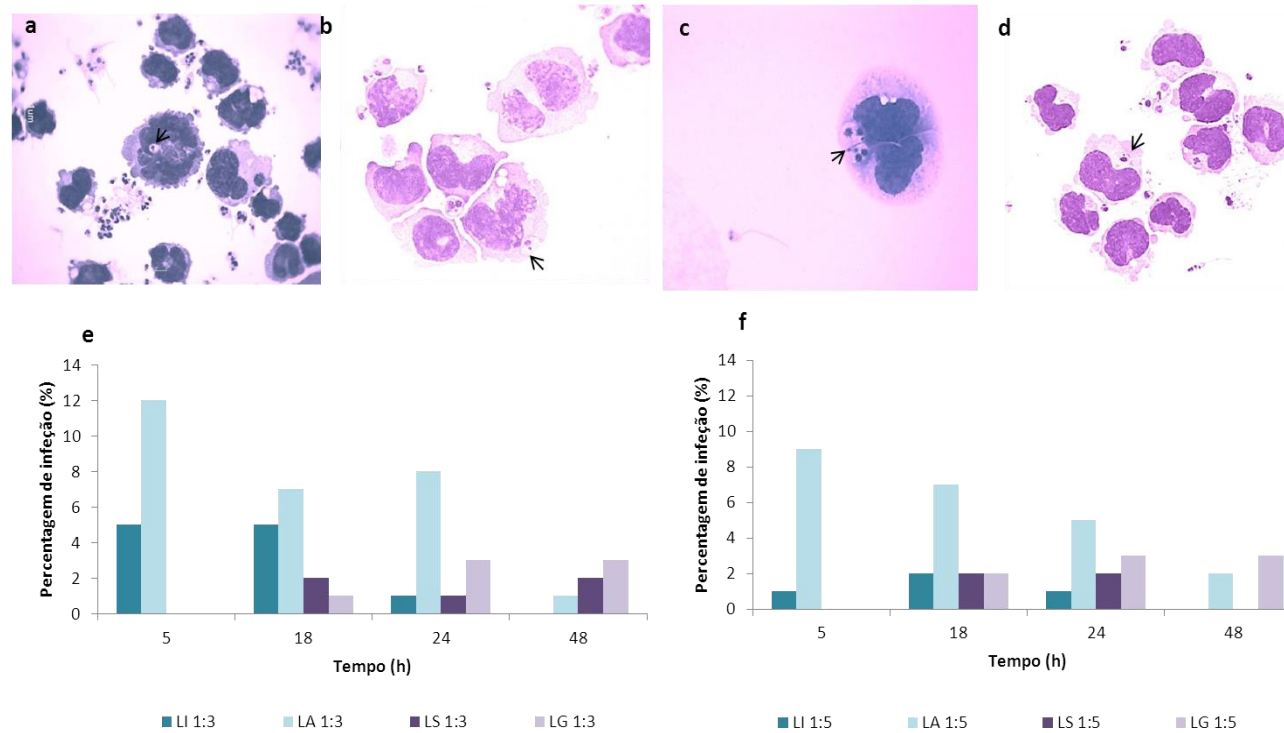


Figura 4.2. Percentagem de MΦ-like P388D1 infectados ao longo do tempo. Lâminas de citospin de MΦ incubados com promastigotes de (a) *L. infantum* (LI), (b) *L. amazonensis* (LA), (c) *L. shawi* (LS) e (d) *L. guyanensis* (LG). foram observadas por MO (ampliação 1000×). Os promastigotas internalizados por MΦ adquiriram a forma amastigota (indicados com setas em a, b, c e d). A percentagem de MΦ com pelo menos um parasita intracelular foi estimada e encontra-se representada nos gráficos para uma proporção de infecção 1 MΦ:3 parasitas (e) e para uma proporção de infecção 1 MΦ:5 parasitas (f).

4.1.2. *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis* induzem a produção do íão superóxido por Neutrófilos

A produção de O_2^- por neutrófilos expostos durante 1,5 h às espécies *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* foi quantificado de forma indireta através da redução de NBT. Os cristais intracelulares de *formazan* foram também visualizados por MO (Fig.4.3.a). Paralelamente, a produção de O_2^- foi quantificada em neutrófilos e em neutrófilos incubados com PMA.

Na presença de PMA, um indutor da respiração oxidativa, os neutrófilos aumentaram significativamente a produção de O_2^- , quando comparado com neutrófilos ($p=0,006$), constituindo o controlo positivo. Observaram-se diferenças significativas em neutrófilos incubados com *L. infantum* ($p=0,008$), *L. amazonensis* (Fig. 4.3.b).

Quando comparadas entre si, verificaram-se aumentos significativos de O_2^- em neutrófilos incubados com *L. shawi* ($p=0,041$) comparativamente a neutrófilos incubados com *L. infantum* e em neutrófilos incubados com *L. shawi* ($p=0,008$) ou *L. guyanensis* ($p=0,029$) em relação a neutrófilos incubados com *L. amazonensis*.

Verificou-se uma diminuição significativa do O_2^- em neutrófilos incubados com *L. amazonensis* e estimulados com PMA quando comparado com neutrófilos estimulados com PMA ($p=0,041$).

4. Resultados

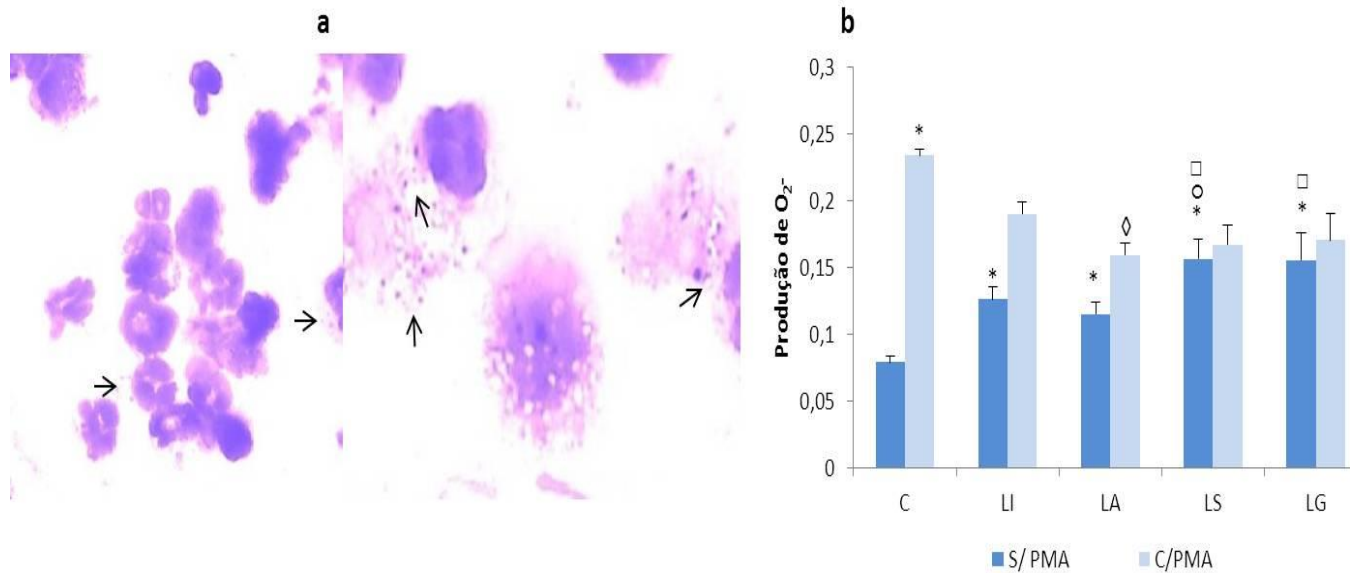


Figura 4.3. Produção de superóxido por neutrófilos expostos a diferentes espécies de *Leishmania*. Culturas de neutrófilos (controle negativo, C – S/PMA), neutrófilos estimulados por PMA (controle positivo, C – C/PMA) e neutrófilos infectados por *L.infantum* (LI), *L. amazonensis* (LA), *L. shawi* (LS) ou *L. guyanensis* (LG) com ou sem PMA foram incubados com NBT. Após 1,5 h de incubação os cristais de formazan formados pela redução de NBT, foram solubilizados e a absorvância lida a 550 nm. Na imagem a, as setas indicam os cristais de formazan intracelulares gerados pela redução de O_2^- observados ao MO (ampliação de 1000 \times). Na imagem b, os resultados representam médias de produção de O_2^- e erros-padrão de três experiências independentes e de três réplicas por amostra. O teste não paramétrico Wilcoxon foi utilizado para comparar as amostras. * (p < 0,05) indica diferenças estatísticas entre o C negativo e as outras condições. \diamond (p < 0,05) indica diferenças estatísticas entre o C positivo e neutrófilos incubados com LA e estimulados com PMA. \circ (p < 0,05) indica diferenças estatísticas entre neutrófilos incubados com *L.infantum* e neutrófilos incubados com *L.shawi*. \square (p < 0,05) indica diferenças estatísticas entre neutrófilos incubados com LA e neutrófilos incubados com LS ou neutrófilos incubados com LG.

4.1.3. *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis* estimulam a exocitose de EN e CatG por neutrófilos.

Em sobrenadantes de co-culturas de neutrófilos - *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* incubadas durante 1,5 e 3 h foi quantificada a atividade de EN e CatG imediatamente após a adição de substratos colorimétricos específicos para cada enzima (0 min), 15 min e 30 min depois.

A exocitose de EN por neutrófilos estimulados com LPS (controlo positivo) foi sempre superior à exocitose de EN por células não estimuladas (controlo negativo) tanto para a 1,5 h como para as 3 h de incubação, tendo sido obtidos valores estatisticamente significativos para os 0 min ($p_{1,5\text{ h}} = 0,028$, $p_{3\text{ h}} = 0,018$), 15 min ($p_{1,5\text{ h}} = 0,028$, $p_{3\text{ h}} = 0,018$) e 30 min ($p_{1,5\text{ h}} = 0,027$, $p_{3\text{ h}} = 0,018$) (Fig. 4.4. a, b).

Foram observados aumentos significativos na exocitose de EN à 1,5 h de incubação por neutrófilos expostos a promastigotas de *L. infantum* ($p_{30\text{ min}} = 0,027$), *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis* ($p_{30\text{ min}} = 0,008$) relativamente ao controlo negativo (Fig. 4.4.a).

Neutrófilos expostos durante 1,5 h a espécies cutâneas [*L. amazonensis* ($p = 0,008$), *L. shawi* ($p = 0,008$) ou *L. guyanensis* ($p_{0\text{ min}} = 0,011$, $p_{15\text{ min}} = 0,015$)] revelaram aumentos significativos da exocitose de EN quando comparados com *L. infantum*. Porém, com o aumento do tempo de exposição apenas neutrófilos expostos a promastigotes de *L. infantum* ($p_{0\text{ e }30\text{ min}} = 0,036$) ou de *L. amazonensis* ($p_{0, 15\text{ e }30\text{ min}} = 0,017$) apresentaram níveis de exocitose de EN significativamente elevados em comparação com o controlo negativo (Fig. 4.4.b). De facto, neutrófilos expostos a promastigotes de *L. shawi* durante 3 h mostraram diminuição significativa da exocitose de EN ($p_{0\text{ min}} = 0,015$, $p_{5\text{ min}} = 0,038$, $p_{0\text{ min}} = 0,008$) relativamente aos níveis de exocitose determinados à 1,5 h de incubação.

A exocitose de CatG por neutrófilos estimulados com LPS só foi superior à exocitose de CatG em células não estimuladas (controlo negativo) às 3h, observando-se valores estatisticamente significativos para os 0 min ($p = 0,028$), 15 min ($p = 0,028$) e 30 min ($p = 0,027$) (Fig. 4.4.c e d)

Aumentos significativo da exocitose de CatG foram observados em neutrófilos expostos a *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ($p=0,008$) ou *L. guyanensis* ($p_{0\text{min}}=0,008$, $p_{15\text{min}}=0,012$ e $p_{30\text{min}}=0,011$) durante 1,5 h comparativamente ao controlo negativo (Fig. 4.4.c).

Quando comparamos a exocitose de CatG em neutrófilos incubados durante 1,5 h com diferentes espécies de *Leishmania* verificaram-se aumentos significativos em neutrófilos expostos a promastigotas de *L. guyanensis* ($p_{0\text{min}}=0,021$) em comparação com *L. shawi* e em neutrófilos incubados com *L. shawi* ($p_{15\text{min}}=0,028$) ou *L. guyanensis* ($p_{15\text{min}}=0,028$ e $p_{30\text{min}}=0,021$) em comparação com *L. amazonensis* (Fig. 4.4.c).

Com o prolongamento do tempo de incubação foi observado o aumento significativo da exocitose de CatG em neutrófilos expostos a promastigotes de *L. amazonensis* ($p_{0\text{min}}=0,012$, $p_{15\text{min}}=0,025$) ou *L. shawi* (p_0 e $p_{15\text{min}}=0,012$ e $p_{30\text{min}}=0,035$) comparativamente aos controlos negativos (Fig. 4.4.d).

4. Resultados

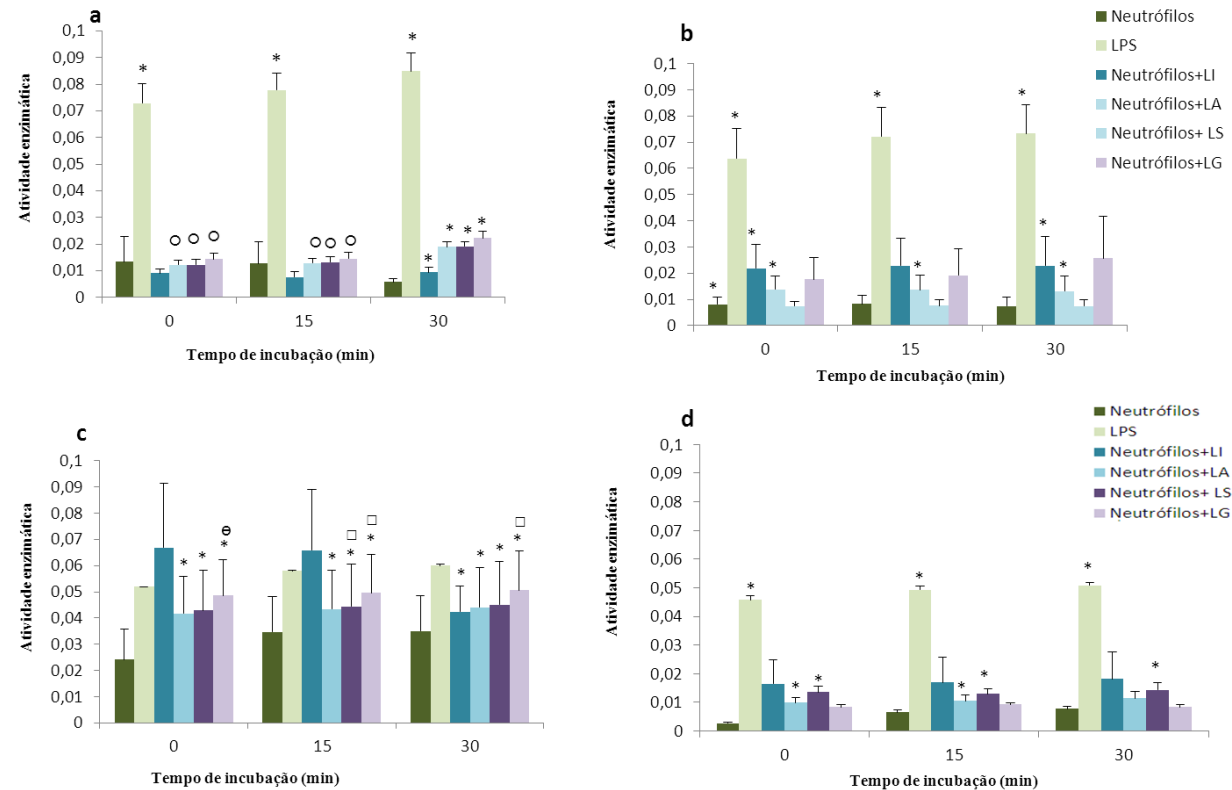


Figura 4.4. Exocitose de Elastase neutrófilica (EN) e Catepsina G (CatG). A atividade enzimática de EN (a, b) e CatG (c, d) foi quantificada em sobrenadantes de neutrófilos (controle negativo), neutrófilos incubados com *L. infantum* (LI), *L. amazonenses* (LA), *L. shawi* (LS) ou *L. guyanensis* (LG) e neutrófilos estimulados com LPS (controle positivo) após 1,5 (a, c) e 3 h (b, d) de incubação, através de uma reação colorimétrica enzima-substrato. A reação foi lida imediatamente a seguir à adição do substrato (~ 0 min) e depois de 15 e 30 min. Os resultados são expressos por médias e erros-padrão de pelo menos três experiências independentes e três réplicas por amostra. O teste não paramétrico Wilcoxon foi utilizado para comparar estatisticamente os valores de absorvância dos sobrenadantes. * ($p < 0,05$) indica diferenças estatísticas entre o CN e as outras condições. o ($p < 0,005$) indica diferenças estatísticas entre neutrófilos -*L. infantum* e as outras espécies de *Leishmania* (0 min e 15 min). □ ($p < 0,005$) indica diferenças estatísticas entre neutrófilos -*L. amazonenses* e *L. shawi* (15 min) ou *L. guyanensis* (15 min e 30 min). θ ($p < 0,005$) indica diferenças estatísticas entre neutrófilos -*L. shawi* e *L. guyanensis* (0 min).

4.1.4.A expressão génica dos recetores *NOD-like* e *Toll-like* não sofreu alterações significativas em neutrófilos incubados com *Leishmania* spp.

A expressão génica dos recetores celulares *NOD1*, *NOD2*, *TLR2*, *TLR4* e *TLR9* foi quantificado por real time PCR em co-culturas de neutrófilos incubados com *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* durante 1,5 e 3 h e em células não estimuladas (controlo negativo). Neutrófilos estimulados com PMA ou com fMLP foram utilizados como controlos positivos.

Os agonistas ODN-D-SL01 e M-TriDAP de *TLR9*, *NOD1* e *NOD2*, respetivamente, induziram expressão génica similar aos controlos negativos (Tabela 4.1) pelo que não foram considerados controlos positivos.

Tabela 4.1. Número de cópias médio dos recetores NOD-like e Toll-like exposto por neutrófilos após estimulação com agonistas. A expressão génica foi quantificada por real-time PCR em neutrófilos estimulados com ODN, D-SL01 ou M-TriDAP durante 1, 5 e 3 h usando-se primers específicos para cada gene. Os resultados expressam a média do número de cópias de cada gene por mil cópias de controlo interno HPRT.

Tempo de incubação	Gene	Nº de cópias médio
1,5 h	<i>NOD1</i>	258,1986583
	<i>NOD2</i>	2856,262208
	<i>TLR9</i>	154,6954613
3 h	<i>NOD1</i>	5,689283228
	<i>NOD2</i>	17,27632768
	<i>TLR9</i>	4,370221703

De um modo geral observou-se uma tendência para o aumento na expressão génica de *NOD1* e *NOD2* em neutrófilos incubados com *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* sem que se tenha verificado diferenças estatisticamente significativas (Tabelas 4.1. e 4.2.).

Em neutrófilos incubados com *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* durante 1,5 h observou-se uma tendência para a acumulação de mRNA de *TLR2* e de *TLR4*. Com o aumento do tempo de incubação (3 h) verificou-se uma diminuição no

número de cópias destes genes em neutrófilos expostos a *L. amazonensis* ou *L. guyanensis* (Tabelas 4.2 e 4.3) sem que se tenham encontrado diferenças significativas.

Tabela 4.2. Expressão gênica de recetores NOD-like e Toll-like em neutrófilos incubados com espécies de *Leishmania* do subgênero *Leishmania*. A expressão gênica foi quantificada por real-time PCR em neutrófilos infectados com *L. infantum* ou *L. amazonensis* durante 1, 5 e 3 h de incubação tendo sido usados *primers* específicos para cada gene. Os resultados expressam a média do número de cópias de cada gene por mil cópias de controle interno *HPRT* e erros-padrão de três experiências independentes e de pelo menos três réplicas por amostra.

Subgênero <i>Leishmania</i>	Tempo de incubação	Gene	Nº de cópias médio	Erro padrão
<i>L. infantum</i>	1,5 h	<i>NOD1</i>	369,43	153,59
		<i>NOD2</i>	5166,72	2455,09
		<i>TLR2</i>	1599,45	918,14
		<i>TLR4</i>	633,32	586,98
	3 h	<i>TLR9</i>	1163,42	265,73
		<i>NOD1</i>	597,52	103,11
		<i>NOD2</i>	8048,79	1378,08
		<i>TLR2</i>	1419,55	552,46
		<i>TLR4</i>	1425,93	383,80
		<i>TLR9</i>	1202,43	337,40
<i>L. amazonensis</i>	1,5 h	<i>NOD1</i>	494,38	129,07
		<i>NOD2</i>	4009,35	2069,82
		<i>TLR2</i>	282,87	104,62
		<i>TLR4</i>	710,58	251,78
	3 h	<i>TLR9</i>	844,72	231,40
		<i>NOD1</i>	579,79	180,50
		<i>NOD2</i>	2638,61	1263,56
		<i>TLR2</i>	298,69	47,28
		<i>TLR4</i>	251,38	95,14
		<i>TLR9</i>	1114,74	386,21

Tabela 4.3. Expressão de genes dos recetores NOD-like e Toll-like em neutrófilos incubados com espécies de *Leishmania* do subgénero *Viannia*. A expressão génica foi quantificada por real-time PCR em culturas de neutrófilos infectados com *L. shawi* ou *L. guyanensis* após 1,5 e 3 h de incubação tendo sido usados -se *primers* específicos para cada gene. Os resultados expressam a média do número de cópias de cada gene por mil cópias de controlo interno *HPRT* e erros-padrão de três experiências independentes e de pelo menos três réplicas por amostra.

Subgénero <i>Viannia</i>	Tempo de incubação	Gene	Nº de cópias médias	Erro padrão
<i>L. shawi</i>	1,5 h	<i>NOD1</i>	714,09	51,28
		<i>NOD2</i>	4646,77	1160,58
		<i>TLR2</i>	494,10	26,00
		<i>TLR4</i>	499,22	103,17
		<i>TLR9</i>	1647,21	91,78
	3 h	<i>NOD1</i>	568,32	186,40
		<i>NOD2</i>	19646,81	4788,45
		<i>TLR2</i>	1944,08	631,24
		<i>TLR4</i>	2056,53	798,21
<i>L. guyanensis</i>	1,5 h	<i>TLR9</i>	1410,37	452,56
		<i>NOD1</i>	372,33	143,15
		<i>NOD2</i>	4979,31	1055,12
		<i>TLR2</i>	2312,74	433,55
		<i>TLR4</i>	990,62	245,19
	3 h	<i>TLR9</i>	847,21	288,81
		<i>NOD1</i>	994,00	322,79
		<i>NOD2</i>	670,72	377,26
		<i>TLR2</i>	128,08	48,93
		<i>TLR4</i>	80,51	45,63
		<i>TLR9</i>	2913,83	409,30

4.1.5. Formação de NET por neutrófilos de murganho após contato com *L. infantum*, *L. amazonensis* ou *L. guyanensis*

A formação de NET foi avaliada por MEV em neutrófilos isolados de murganho e incubados durante 1,5 e 3 h com *L. infantum*, *L. amazonensis* ou *L. guyanensis*.

Através da observação de fotografias de MEV podemos verificar que tanto a espécie visceral como as espécies cutâneas de *Leishmania* induziram a formação de NET em neutrófilos (Fig. 4.5). Visualizam-se promastigotas em contato com as fibras libertadas pelos neutrófilos (Fig. 4.5.b, c, d, e), sugerindo a ocorrência de forte interação NET-parasita.

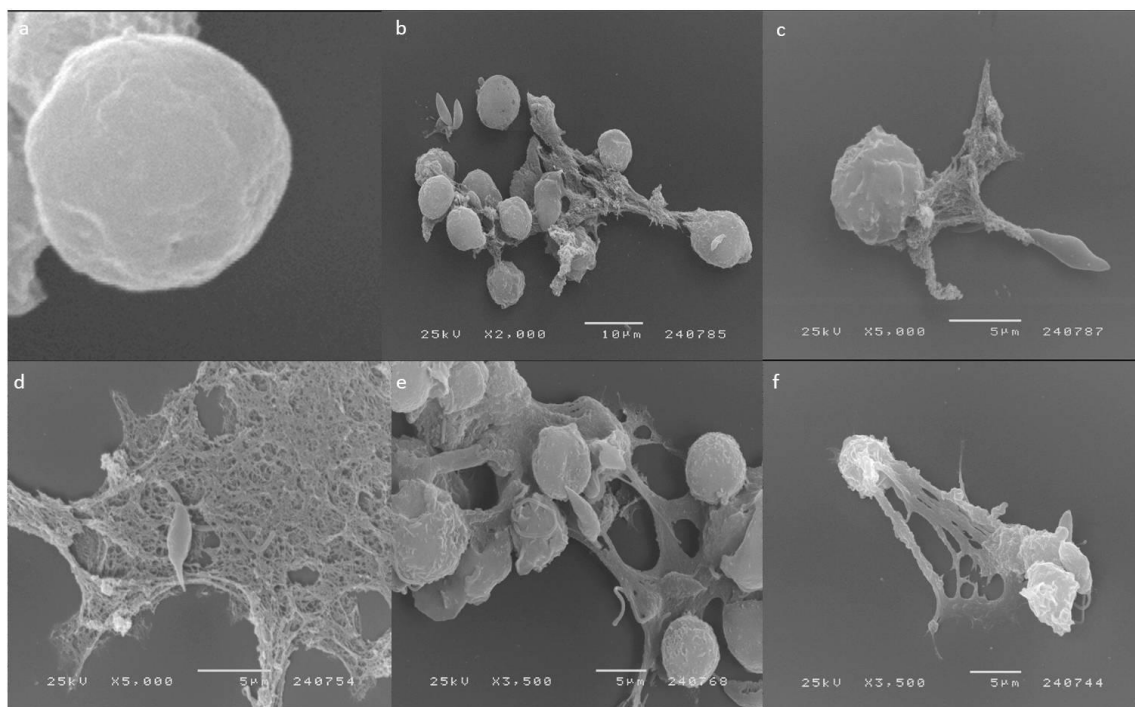


Figura 4.5. Formação de NET por neutrófilos de murganho. Neutrófilos (a); conjunto de neutrófilos formando NET e interagindo com promastigotas de *L. infantum* (b), pormenor da interação entre neutrófilos formador de NET e promastigotas de *L. infantum* (c), pormenor da ligação de promastigotas de *L. infantum* às fibras da NET (d), conjunto de neutrófilos formando NET e interagindo com promastigotas de *L. amazonensis* (e) e interação de promastigotas de *L. guyanensis* com neutrófilos e NET (f). Fotografias de microscopia de varrimento com ampliações de 2000, 3500 e 5000×.

Fez-se uma contagem de neutrófilos que formaram NET, através da visualização das fotografias de microscopia. Contaram-se 11 neutrófilos formando NET em contato com

L. infantum. A contagem de neutrófilos associados a NET nas espécies cutâneas parece ser maior, na medida em que 35 neutrófilos em contato com *L. amazonensis* e 22 neutrófilos em contato com *L. guyanensis* deram origem a NET. Provavelmente, as espécies cutâneas em contato com neutrófilos induzem mais facilmente a produção de NET.

4.1.6. Inibição da produção de óxido nítrico em macrófagos-like P388D1 na presença de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis*

Os sobrenadantes de MΦ incubados com *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* na proporção de 1 MΦ:3 parasitas ou de 1 MΦ:5 parasitas durante 5, 18 e 24 h foram utilizados para analisar a produção de NO. A quantificação do ião nitrito, resultante da metabolização do NO foi efetuada através do método de Griess.

Os resultados obtidos mostraram que *Leishmania* inibe a produção de NO. A incubação de MΦ durante 5 h com *L. infantum* ($p_{1:5}=0,038$) e durante 18 h ($p_{1:3}$ e $1:5=0,008$) causou redução significativa na produção de NO quando comparados com o controlo negativo (MΦ não infetados, CN) (Fig. 4.6.a).

MΦ expostos a promastigotas de *L. amazonensis* nas proporções de 1:3 ($p=0,021$) e 1:5 e durante 5 h e 18 h também apresentaram diminuição significativa ($p=0,008$) da produção de NO. Após 24 h de incubação com *L. amazonensis* na proporção de 1:3 ($p=0,008$) verificou-se igualmente inibição significativa da produção de NO (Fig. 4.6.b).

A incubação de MΦ com *L. shawi* durante 5 h nas proporções de 1:3 e 1:5 e durante 18 h na proporção 1:3 causou redução significativa ($p=0,008$) na produção de NO (Fig. 4.6. c). *L. guyanensis* (1:3) causou igualmente inibição da produção de NO após 5 h de incubação ($p=0,008$) (Fig. 4.6. d).

A produção de NO por MΦ parasitados diminuiu ao longo do período de incubação. A redução da produção de NO é significativa entre as 5 h e 18 h ($p=0,008$). De forma idêntica, as células incubadas com *L. infantum* nas proporções de 1:3 e 1:5 também revelaram menor produção de NO às 18 h e 24h comparativamente com as 5 h de

incubação ($p=0,008$) (Fig. 4.6.a). MΦ incubados com *L. amazonensis* evidenciaram igualmente menor produção de NO às 18 h ($p=0,008$) e 24 h ($p_{1:3}=0,008$, $p_{1:5}=0,011$) comparativamente com a produção às 5 h de incubação (Fig. 3.6.b). Na presença de *L. shawi* (1:3) também se verificou menor produção de NO às 18 h ($p=0,008$) e 24 h ($p=0,015$) comparativamente com a produção determinada às 5 h de incubação (Fig. 4.6.c). Células incubadas com *L. guyanensis* (1:5) revelaram menor produção de NO às 18 h ($p=0,021$) relativamente às 5 h (Fig. 4.6.d).

A produção de NO por MΦ incubados com diferentes espécies de *Leishmania* foi comparada. Verificou-se que a produção de NO por co-culturas MΦ-*L. infantum* incubadas durante 5 h foi significativamente superior a MΦ-*L. amazonensis* ($p_{1:3}=0,038$; $p_{1:5}=0,011$), *L. shawi* ($p=0,008$) e *L. guyanensis* ($p=0,008$) na proporção de 1:3 e 1:5. Observou-se um aumento significativo em MΦ-*L. amazonensis* em relação a células incubadas com *L. shawi* ($p=0,008$) na proporção de 1:3 e 1:5 e de *L. guyanensis* ($p=0,008$) na proporção de 1:3. Ainda às 5 h de incubação observaram-se diferenças estatisticamente significativas, sendo a produção de NO superior em MΦ-*L. shawi* comparativamente a células incubadas com *L. guyanensis* na proporção de 1:3 ($p=0,015$).

4. Resultados

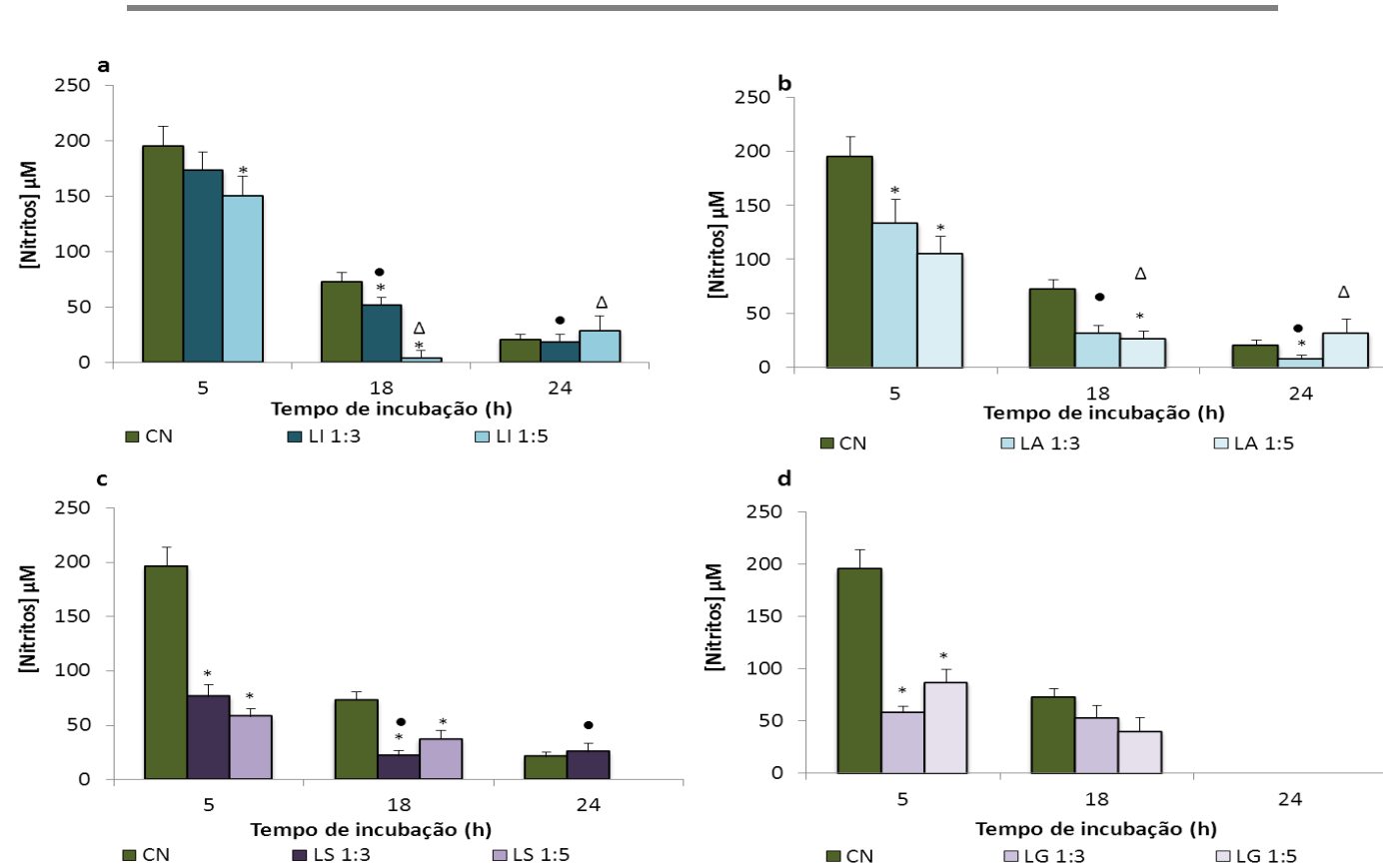


Figura 4.6. Níveis de produção de NO por macrófagos-like P388D1 infectados. A produção de NO foi quantificada em sobrenadantes de célula macrófágica incubadas com *L. infantum* (a), *L. amazonensis* (b), *L. shawi* (c) ou *L. guyanensis* (d) durante 5, 18, e 24 h. A quantificação do íão nitrato, resultante da metabolização de NO foi efetuada através do método de Griess. Os resultados expressam médias e erros padrão de pelo menos três experiências independentes e três réplicas por amostra. O teste não paramétrico Wilcoxon foi utilizado para comparar os valores de absorvância dos sobrenadantes. * ($p < 0,05$) indica diferenças significativas entre MΦ não infectados (controlo negativo – CN) e as outras condições. • ($p < 0,05$) indica diferenças significativas entre as 5 e as 18 h. Δ ($p < 0,05$) indica diferenças significativas entre as 5 e as 24 h.

4.1.7. Aumento da produção de ureia por macrófagos-like P388D1 infetados com *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis*

Os sobrenadantes de MΦ P388D1 incubados com *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* foram utilizados para quantificar a produção de ureia. A produção de ureia por MΦ estimulados com PMA foi sempre superior à produção de ureia por células não estimuladas, embora apenas tenham sido obtidos valores significativamente superiores às 24 h de incubação ($p=0,043$). MΦ não infetados foram utilizados como controlo negativo.

A produção de ureia por MΦ incubados com *L. infantum* superou a produção do controlo negativo, tendo sido obtidos aumentos significativos em sobrenadantes de culturas com uma proporção de parasitas de 1:3 às 18 ($p=0,043$) e 24 h ($p=0,046$) de incubação quando comparadas com os controlos negativos. Às 18 h a produção de ureia foi significativamente maior do que a observada às 5h ($p=0,011$). Porém, às 24 h de incubação a produção de ureia diminuiu, mantendo-se no entanto superior quando comparada com a produção obtida às 5 h de incubação ($p=0,008$) (Fig. 4.7.a).

A presença de *L. amazonensis* estimulou a produção de ureia por MΦ. Quando comparados com os controlos negativos, os sobrenadantes das culturas incubadas durante 18 h e em que se utilizou uma proporção de parasitas de 1:5 revelaram um aumento significativo de ureia ($p=0,043$). A produção de ureia apresentou variações com o tempo de incubação. Porém, a produção aumentada de ureia foi detetada às 18 h ($p=0,038$) e às 48 h ($p=0,008$) comparativamente com a produção verificada às 5 h na proporção de MΦ:parasita de 1:5. Entre as 24 h e as 48 h ocorreu também um significativo aumento da produção de ureia ($p=0,008$) (Fig. 4.7.b).

A produção de ureia em MΦ incubados com *L. shawi* ou *L. guyanensis* foi superior aos controlos negativos, embora não se tenham observado diferenças estatísticas, exceto para *L. shawi* na proporção de 1:3 às 5 h ($p=0,008$). Aumentos significativos na produção de ureia ($p=0,028$) foram observados às 48 h em comparação com as 5, 18 e 24 h de incubação de MΦ com *L. guyanensis* na proporção de 1:3, indicando que o incremento do período de contato MΦ-parasita estimula a produção de ureia (Fig.

4.7.c). Também foi observado um aumento na produção de ureia às 18 h ($p=0,008$) e 48 h ($p=0,028$) por MΦ incubados com *L. shawi* na proporção de 1:5 relativamente às 5 h, indicando um aumento da produção de ureia com o incremento do período de incubação (Fig. 4.7.d).

Quando a produção de ureia foi comparada entre MΦ incubados durante 5 h com diferentes espécies de *Leishmania*, verificou-se um aumento da produção de ureia na presença de *L. shawi* ($p_{1:3}=0,021$) e de *L. guyanensis* ($p_{1:3}=0,011$) em comparação com *L. infantum*. A exposição de MΦ a *L. amazonensis* durante 18 h resultou numa maior produção de ureia ($p_{1:5}=0,008$) em comparação com *L. infantum*. *L. amazonensis* também induziu MΦ a produzirem maior quantidade de ureia ($p_{1:5}=0,015$) do que *L. guyanensis*. Porém, às 48 h de incubação a situação inverteu-se e *L. guyanensis* passou a produzir maior quantidade de ureia ($p_{1:3}=0,028$).

4. Resultados

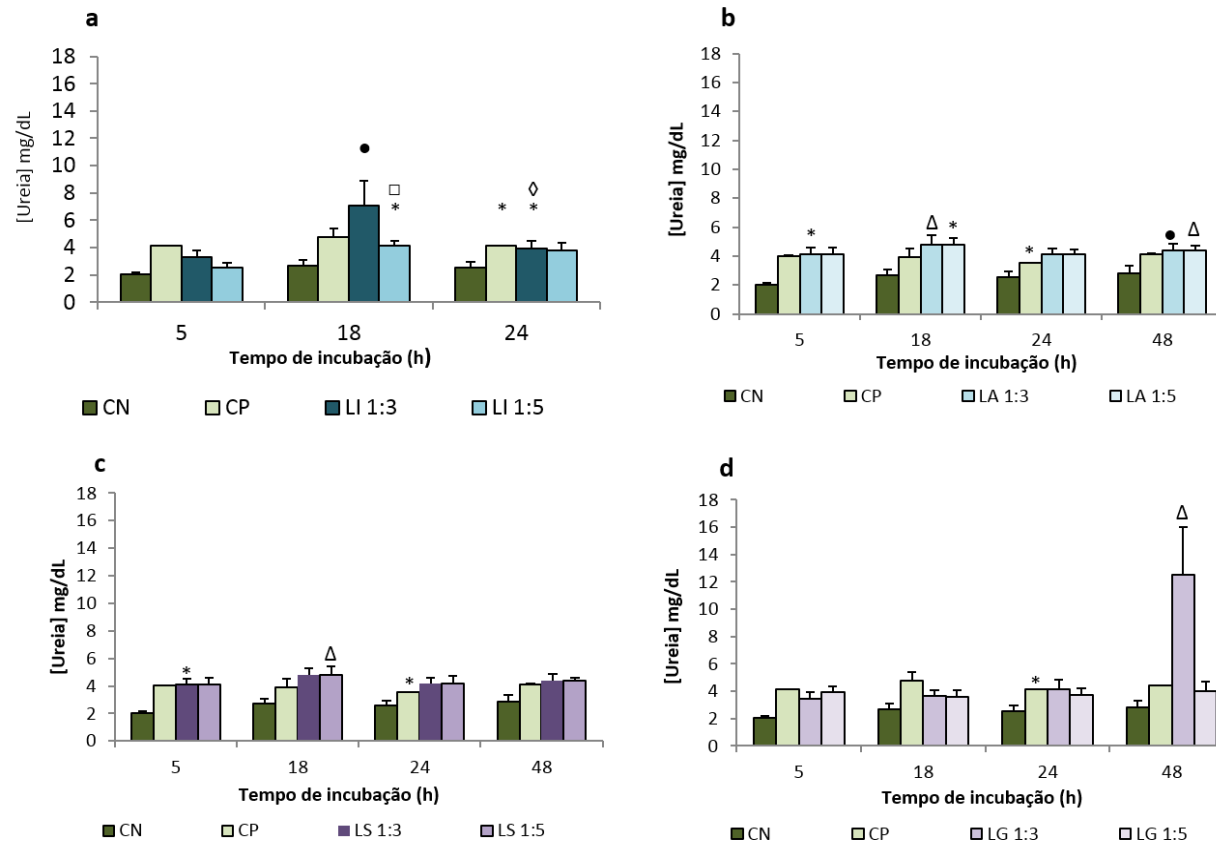


Figura 4.7. Produção de ureia por macrófagos-like P388D1. A produção de ureia foi quantificada em culturas de MΦ não infectados (controlo negativo, CN), MΦ estimulados com PMA (controlo positivo, CP) e MΦ incubados com *L. infantum* (a), *L. amazonensis* (b), *L. shawi* (c) ou *L. guyanensis* (d) após 5, 18, 24 e 48 h de incubação. Os resultados encontram-se expressos por médias e erro-padrão dos valores de absorvância de três experiências independentes e de triplicados por amostra. O teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para comparar variáveis dependentes. * ($p < 0,05$) indica diferenças estatísticas entre CN e as outras condições. • e Δ ($p < 0,05$) indicam diferenças estatísticas entre os diversos tempos quando comparado com as 5h na proporção MΦ: parasita de 1:3 e de 1:5, respetivamente.

4.1.8. *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis* causam alteração na expressão génica dos recetores *NOD* e *Toll* em macrófagos-like P388D1

A expressão génica dos recetores celulares *NOD1*, *NOD2*, *TLR2*, *TLR4* e *TLR9* foi quantificado por real time PCR em MΦ não infetados (controlo) e em MΦ expostos a *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* durante 5, 18, 24 e 48 h. Entre as 5 e as 48h de incubação os MΦ não infetados apresentaram níveis reduzidos de acumulação de mRNA de *NOD1* (1200 cópias por 1000 cópias de *HPRT*), *NOD2* (4500 cópias por 1000 cópias de *HPRT*) e *TLR9* (300 cópias por 1000 cópias de *HPRT*). Porém, os valores *TLR2* (30000 cópias por 1000 cópias de *HPRT*) e *TLR4* (8×10^{15} cópias por 1000 cópias de *HPRT*) revelaram-se mais elevados.

MΦ-*L. amazonensis* ($p_{18h}=0,028$), MΦ-*L. shawi* ($p_{18h}=0,046$, $p_{24h}=0,043$) e MΦ-*L. guyanensis* ($p_{24h}=0,043$) na proporção de 1 MΦ:3 parasitas apresentaram acumulação significativa de mRNA de *NOD1* comparativamente ao controlo (Fig. 4.8.a, c). Na proporção de 1MΦ:5 parasitas, verificou-se aumento significativo do número de cópias de *NOD1* em MΦ-*L. shawi* ($p_{5h}=0,028$ e $p_{24h}=0,046$) MΦ-*L. amazonensis* (p_{18} e $p_{24h}=0,028$) MΦ-*L. infantum* ($p_{24h}=0,028$) e em MΦ-*L. guyanensis* ($p_{48h}=0,046$) quando comparado com o controlo (Fig. 4.8.b, d).

4. Resultados

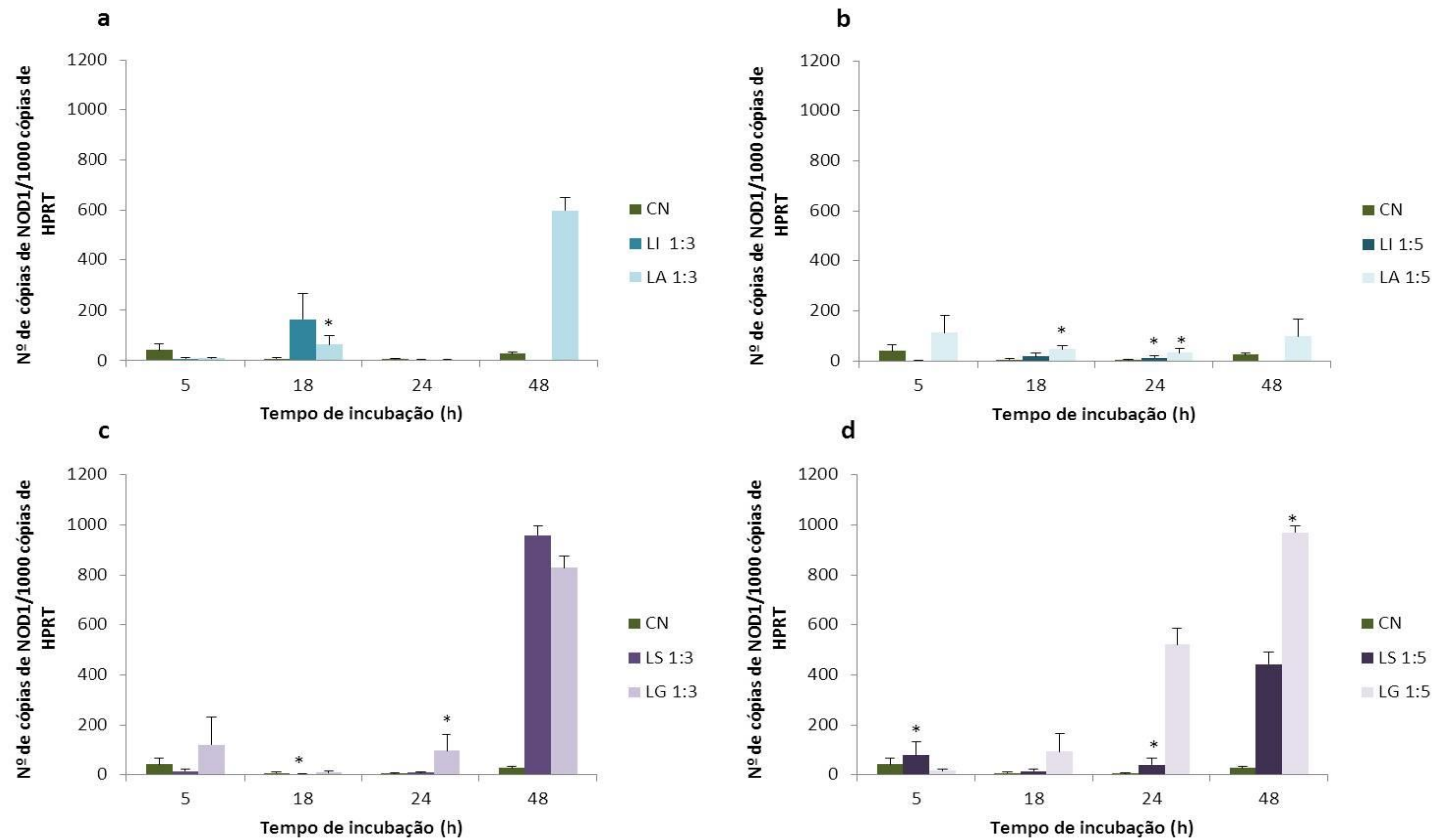


Figura 4.8. Expressão gênica de *NOD1* em macrófagos-like P388D1 incubados com *L. infantum*, *L. amazonensis* (a, b), *L. shawi* ou *L. guyanensis* (c, d). O número de cópias de *NOD1* por mil cópias de controlo interno *HPRT* foi determinado por real-time PCR nas proporções de 1 MΦ:3 parasitas (a, c) ou 1 MΦ:5 parasitas (b, d), após 5, 18, 24 e 48 h de incubação usando-se primers específicos para cada gene. Os resultados encontram-se expressos por médias e erros-padrão de três experiências independentes e de pelo menos três réplicas por amostra. O teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para comparar variáveis dependentes. * ($p < 0,05$) indica diferenças estatísticas entre CN e as outras condições.

Aumento significativo da expressão génica de *NOD2* foi observado em MΦ incubados com *L. shawi* durante 5 h ($p=0,043$), *L. guyanensis* durante 18 h ($p=0,028$) na proporção de 1:3 comparativamente ao controlo (Fig. 4.9.c). Porém, em MΦ-*L. infantum* ($p_{24h}=0,028$) e em MΦ-*L. amazonensis* ($p_{24h}=0,046$) ocorreu uma redução significativa na expressão de *NOD2* (Fig. 4.9.a). Na proporção de 1MΦ:5 parasitas verificou-se um aumento no número de cópias de *NOD2* em MΦ-*L. guyanensis* ($p_{18h}=0,028$) (Fig. 4.9.d) e diminuição em MΦ-*L. infantum* ($p_{5h}=0,043$) (Fig. 4.9.b)

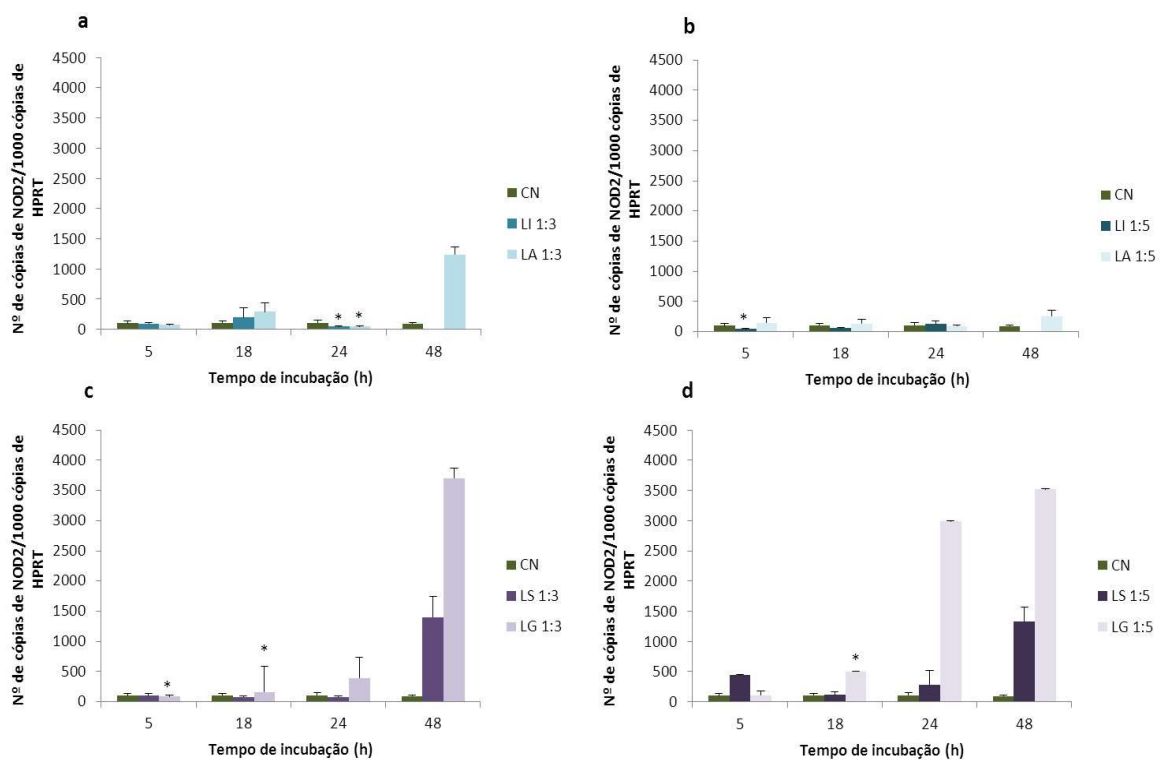


Figura 4.9. Expressão génica de *NOD2* em macrófagos-like P388D1 incubados com *L. infantum*, *L. amazonensis* (a, b), *L. shawi* ou *L. guyanensis* (c, d). O número de cópias de *NOD2* por mil cópias de controlo interno *HPRT* foi determinado por real-time PCR nas proporções de 1 MΦ:3 parasitas (a, c) ou 1 MΦ:5 parasitas (b, d), após 5, 18, 24 e 48 h de incubação usando-se primers específicos para cada gene. Os resultados encontram-se expressos por médias e erros-padrão de três experiências independentes e de pelo menos três réplicas por amostra. O teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para comparar variáveis dependentes. * ($p < 0,05$) indica diferenças estatísticas entre CN e as outras condições.

Na proporção de 1 MΦ:3 parasitas aumento significativo na expressão génica de *TLR2* foi observado em MΦ-*L. guyanensis* ($p_{5h}=0,046$) comparativamente ao controlo (Fig.

4.10.c). O aumento da proporção MΦ:parasitas causou uma acumulação significativa de mRNA de *TLR2* em MΦ-*L. infantum* incubados durante 5 h e 18 h ($p=0,028$) e em MΦ-*L. amazonensis* incubados durante 5 h ($p=0,046$) (Fig. 4.10.b).

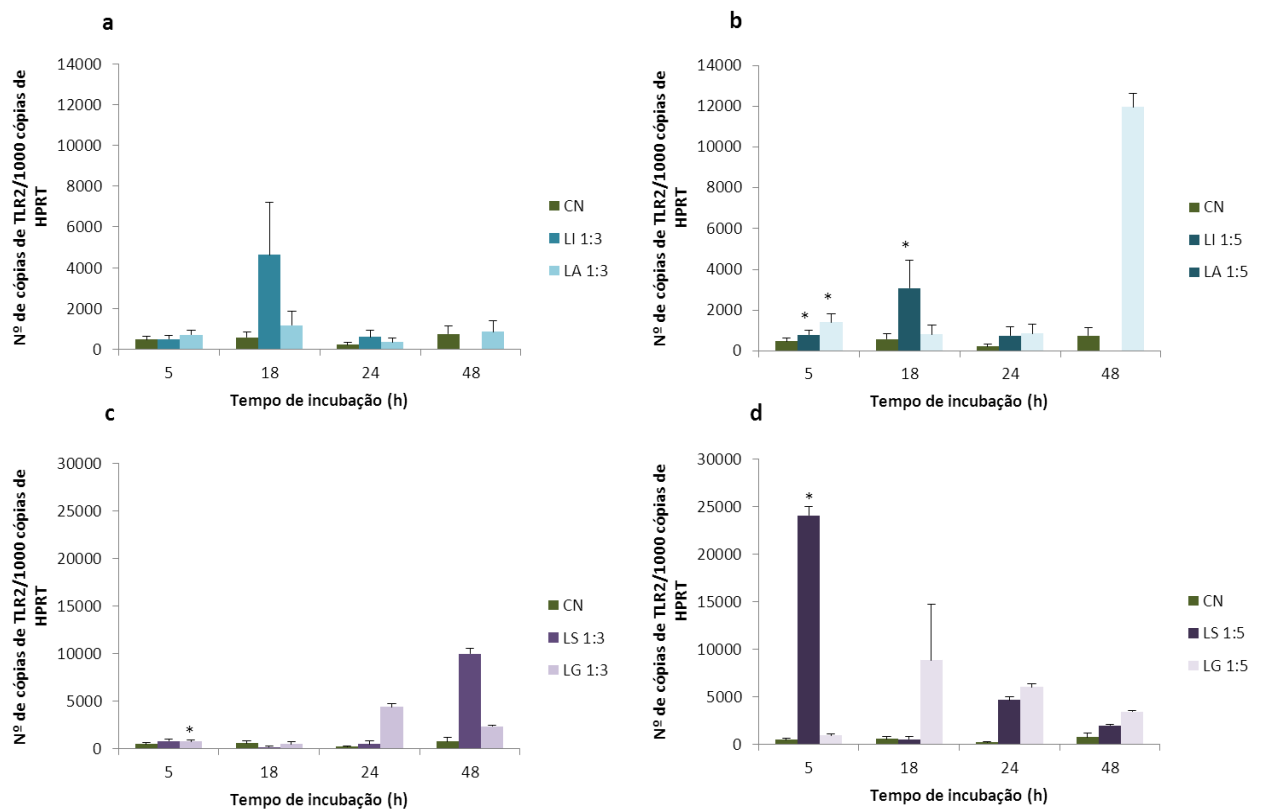


Figura 4.10. Expressão gênica de *TLR2* em macrófagos-like P388D1 incubados com *L. infantum*, *L. amazonensis* (a, b), *L. shawi* ou *L. guyanensis* (c, d). O número de cópias de *TLR2* por mil cópias de controle interno *HPRT* foi determinado por real-time PCR nas proporções de 1MΦ:3 parasitas (a, c) ou 1 MΦ:5 parasitas (b, d), após 5, 18, 24 e 48 h de incubação usando-se primers específicos para cada gene. Os resultados são expressos por médias e erros-padrão de três experiências independentes e de pelo menos três réplicas por amostra. O teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para comparar variáveis dependentes. * ($p < 0,05$) indica diferenças estatísticas entre CN e as outras condições.

Na proporção de 1MΦ:5 parasitas verificou-se uma diminuição significativa na expressão gênica de *TLR4* em MΦ-*L. amazonensis* ($p_{5h}=0,028$) (Fig. 4.11.b) e em MΦ-*L. guyanensis* ($p_{48h}=0,028$) comparativamente ao controle (Fig. 4.11.d).

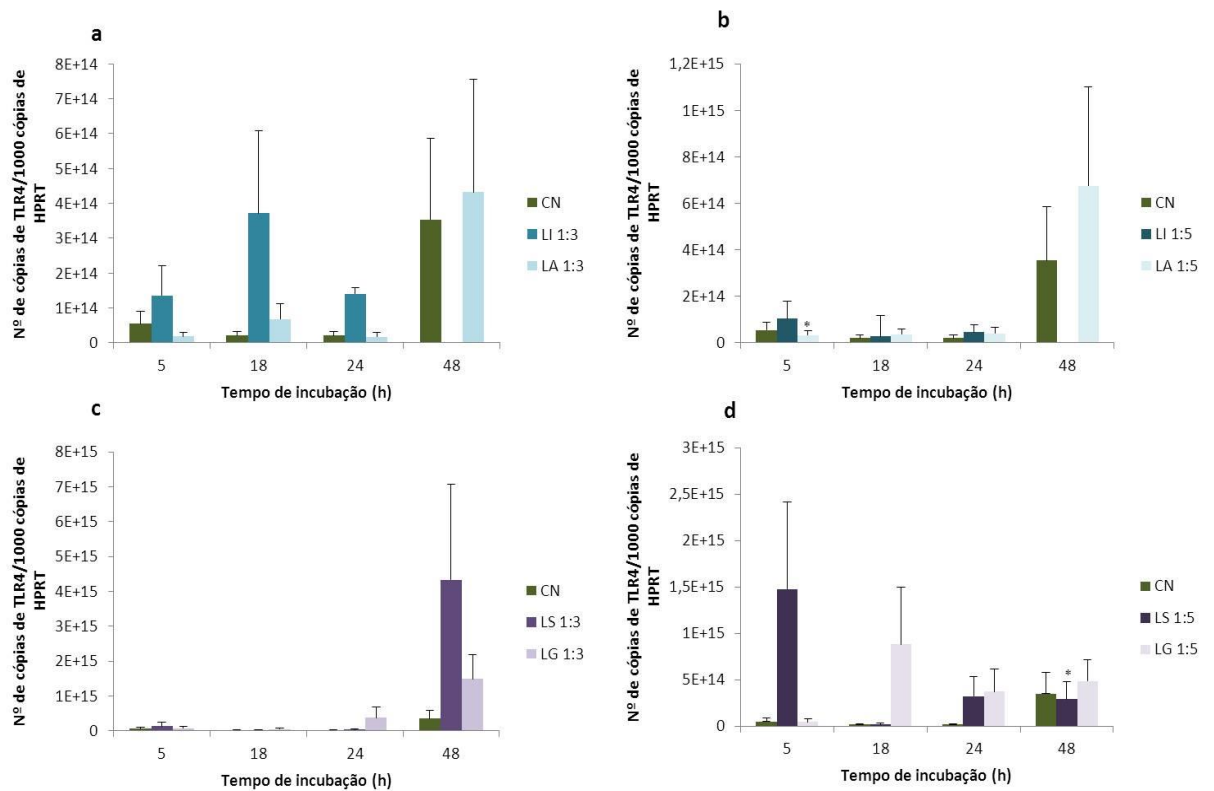


Figura 4.11. Expressão gênica de *TLR4* em macrófagos-like P388D1 incubados com *L. infantum*, *L. amazonensis* (a, b), *L. shawi* ou *L. guyanensis* (c, d). O número de cópias de *TLR4* por mil cópias de controlo interno *HPRT* foi determinado por real-time PCR nas proporções de 1 MΦ:3 parasitas (a, c) ou 1: MΦ 5 parasitas (b, d), após 5, 18, 24 e 48 h de incubação usando-se primers específicos para cada gene. Os resultados encontram-se expressos por médias e erros-padrão de três experiências independentes e de pelo menos três réplicas por amostra. O teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para comparar variáveis dependentes. * ($p < 0,05$) indica diferenças estatísticas entre CN e as outras condições.

Na proporção de 1 MΦ:3 parasitas e após 5 h de incubação observou-se diminuição significativa da acumulação do mRNA de *TLR9* em MΦ - *L. guyanensis* ($p=0,028$) comparativamente ao controlo. Porém, após 18 h de incubação, verificou-se aumento significativo do número de cópias em MΦ-*L. amazonensis* e em MΦ-*L. guyanensis* ($p=0,043$). Às 24 h, MΦ-*L. infantum* ($p=0,043$) e MΦ-*L. amazonensis* ($p=0,043$) também revelaram um aumento significativo na expressão deste gene (Fig. 4.12.a, c). Na proporção de 1 MΦ:5 parasitas e após 18 h de incubação foi observado um aumento significativo da expressão de *TLR9* em MΦ-*L. amazonensis* ($p=0,043$) (Fig. 4.12,b).

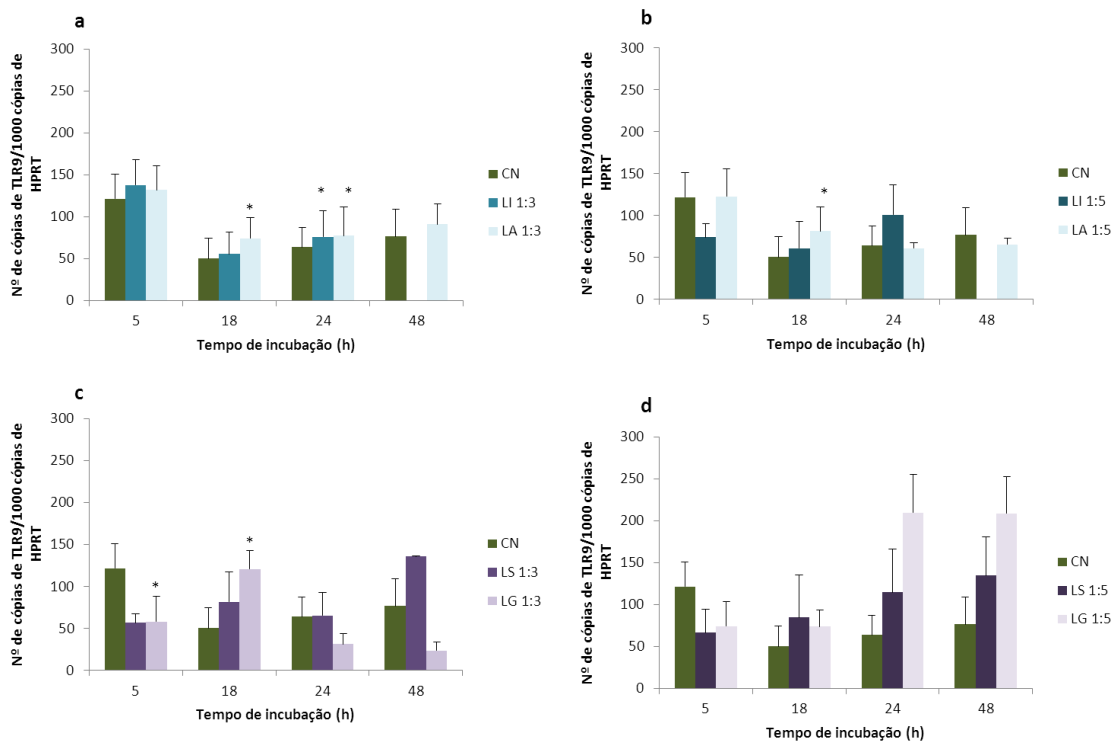


Figura 4.12. Expressão gênica de *TLR9* em macrófagos-like P388D1 incubados com *L. infantum*, *L. amazonensis* (a, b), *L. shawi* ou *L. guyanensis* (c, d). O número de cópias de *TLR9* por mil cópias de controlo interno *HPRT* foi determinado por real-time PCR nas proporções de 1MΦ:3 parasitas (a, c) ou 1MΦ:5 parasitas (b, d), após 5, 18, 24 e 48 h de incubação usando-se primers específicos para cada gene. Os resultados são expressos por médias e erros-padrão de três experiências independentes e de pelo menos três réplicas por amostra. O teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para comparar variáveis dependentes. * ($p < 0,05$) indica diferenças estatísticas entre CN e as outras condições.

4.2. Canídeos

4.2.1. Neutrófilos e macrófagos fagocitam promastigotas de *L. infantum* e promovem a sua diferenciação em amastigotas

Lâminas de *citospins* de neutrófilos (Fig. 4.13.a) e de MΦ diferenciados a partir de monócitos isolados do sangue periférico e incubados com promastigotes de *L. infantum* durante 1,5 e 3 h foram coradas com Giemsa e observadas ao MO. Foram observados parasitas internalizados por neutrófilos e MΦ. Os parasitas intracelulares encontraram-se diferenciados em amastigotas, com forma ovóide e sem flagelo livre (Fig 4.13. b). Alguns parasitas intracelulares apresentaram morfologia normal, com núcleo e cinetoplasta bem definidos, enquanto outros revelaram alterações morfológicas. Alguns promastigotas não fagocitados mantiveram a forma alongada com flagelo livre na parte anterior e a integridade estrutural (Fig 4.12.b), enquanto outros aparentaram morfologia irregular.

A microscopia de fluorescência permitiu quantificar a infecção de neutrófilos (Fig. 4.13.c) e de MΦ (4.14.a) causada por promastigotas que expressam GFP e observar amastigotas intracelulares. Após 1,5 h de incubação com promastigotas-GFP de *L. infantum* a taxa de infecção em neutrófilos foi de 4%, tendo aumentado para 11% com a duplicação do tempo de incubação (3 h) (Fig. 4.13.D). Nos MΦ, a infecção mostrou-se aumentada comparativamente a neutrófilos. Após 1,5 h de incubação a taxa de infecção foi de 5,4% enquanto às 3 h aumentou para 13% (Fig. 4.13.B).

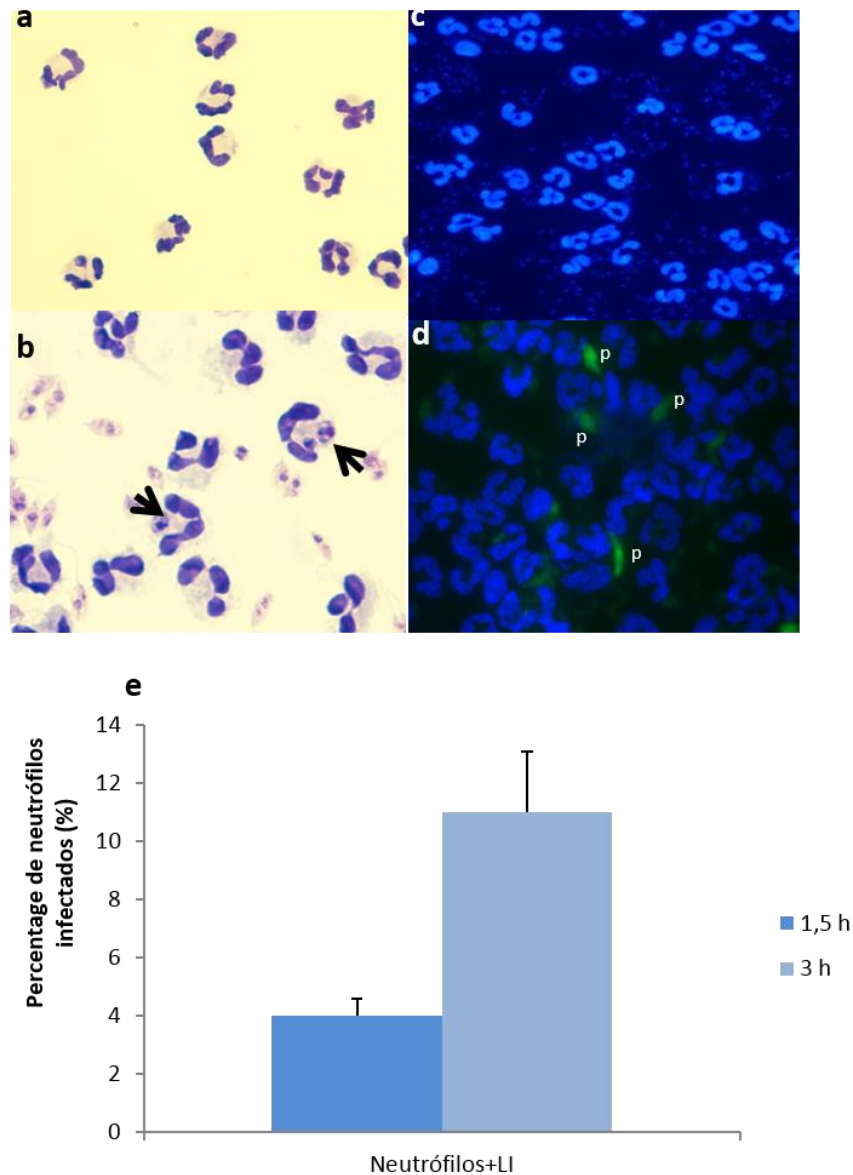


Figura 4.13 Percentagem de infecção de neutrófilos exposto a promastigotes de *L. infantum*. Lâminas de *citospin* de neutrófilos (não infectados) (a) e neutrófilos incubados com promastigotas durante 3 h, coradas com Giemsa (b) foram observadas por MO (ampliação 1000×). Lâminas de *citospin* de neutrófilos incubados com promastigotes-GFP durante 3 h e coradas com DAPI foram observadas por microscopia de fluorescência (ampliação 1000×) (d). Os promastigotas foram fagocitados pelos neutrófilos, transformando-se na forma amastigota (b, d). Alguns parasitas não fagocitados mantiveram a sua forma alongada característica de promastigotas (b, d). A percentagem de neutrófilos contendo pelo menos um parasita intracelular foi calculada (e) e os resultados encontram-se representadas por médias e erros-padrão de 10 cães. As setas indicam as formas amastigotas intracelulares. Nas imagens de fluorescência os núcleos dos neutrófilos e de *Leishmania* encontram-se a azul (c) e os parasitas extra e intracelulares a verde (d).

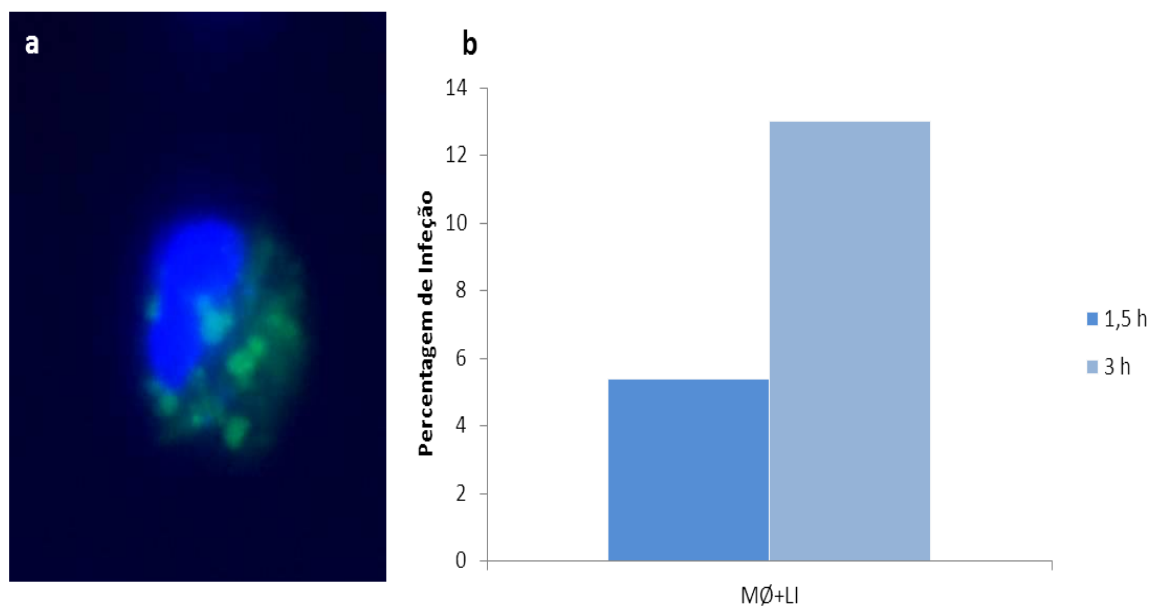


Figura 4.14. Porcentagem de MΦ infectados com *L. infantum*-GFP. Lâminas de *citospin* de MΦ incubados com promastigotes-GFP corados com DAPI foram observadas por microscopia de fluorescência (ampliação 1000×). Na imagem de fluorescência (a) o núcleo do MΦ encontra-se a azul e os parasitas intracelulares a verde. A porcentagem de MΦ contendo pelo menos um parasita intracelular foi calculada às 1,5 e 3 h de incubação (b). No gráfico encontram-se representadas as médias de 10 cães.

4.2.2. *L. infantum* induz a produção do ião superóxido em neutrófilos caninos

Após 1,5 e 3 h de incubação de neutrófilos não infectados (controlo negativo), de neutrófilos expostos a promastigotas de *L. infantum* e de neutrófilos estimulados por PMA (controlo positivo) a produção de O_2^- foi quantificada indiretamente pela redução de NBT pelos neutrófilos (Fig. 4.15.c).

A adição de PMA a neutrófilos caninos conduziu a um aumento significativo da produção de O_2^- ($p < 0,000$) quando comparado com o controlo negativo, independentemente do tempo de incubação (1,5 h ou 3 h). Neutrófilos incubados com *L. infantum* na presença ($p = 0,013$) ou ausência de PMA ($p < 0,000$) produziram significativamente mais O_2^- do que os controlos negativos em ambos os tempos analisados. Neutrófilos incubados com *L. infantum* e estimulados com PMA também produziram mais O_2^- ($p < 0,000$) às 1,5 h (Fig. 4.15.a) e 3 h (Fig. 4.15.b) do que os controlos positivos.

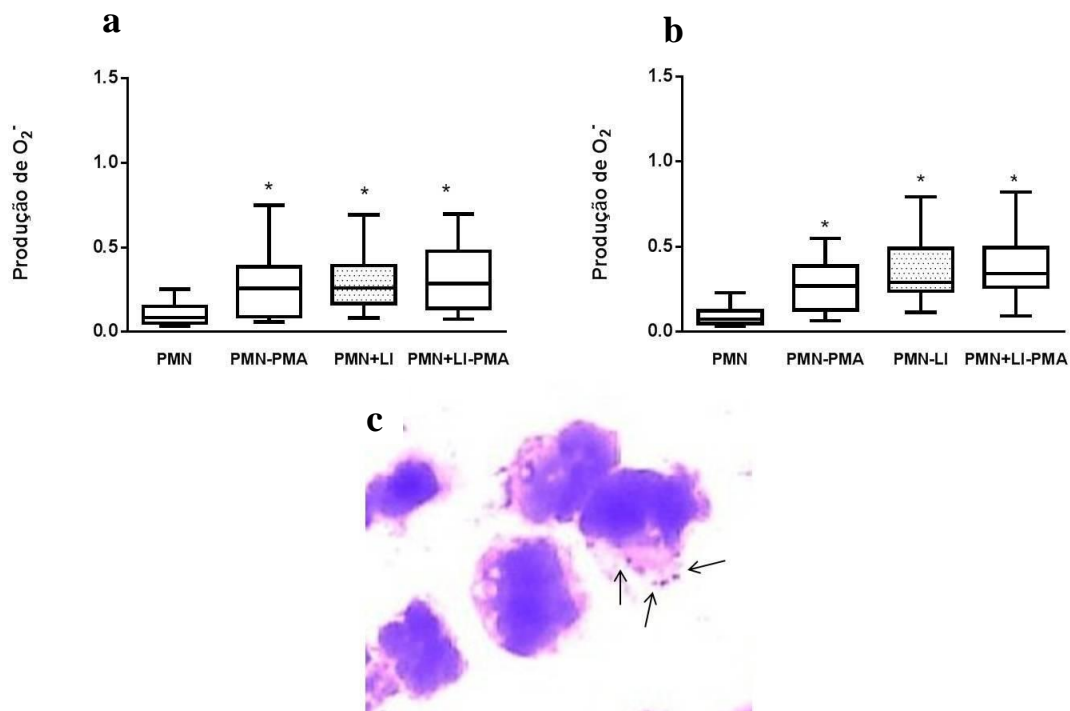


Figura 4.15. Produção de superóxido por neutrófilos incubados com *L. infantum*. Culturas de neutrófilos não infetados (CN, neutrófilos), neutrófilos estimulados com PMA (CP, neutrófilos -PMA), neutrófilos incubados com *L. infantum* (neutrófilos +L) e neutrófilos incubados com *L. infantum* e estimulados com PMA (neutrófilos +L-PMA) foram incubadas durante 1,5 h (a) e 3 h (b) em HBSS com NBT. As partículas intracelulares de *formazan* foram observadas por MO (1000×) (c). Os cristais de *formazan* foram solubilizados e a absorvância lida a 550 nm. O teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para comparar todos os parâmetros.* ($p < 0,05$) indica diferenças estatísticas entre neutrófilos e as outras condições.

4.2.3. *L. infantum* induz o aumento da exocitose de EN em neutrófilos caninos

A atividade de EN e CatG foi determinada espectrofotometricamente em sobrenadantes de culturas de neutrófilos expostas a promastigotes de *L. infantum* durante 1,5 e 3 h, em neutrófilos não infetados (controlo negativo) e em neutrófilos estimulados com LPS.

neutrófilos estimulados com LPS revelaram maior exocitose de EN quando comparado com os controlos negativos. Porém, as diferenças só foram significativas às 1,5h de

incubação ($p_{0\text{min}}=0,012$, $p_{15\text{min}}=0,012$ e $p_{30\text{min}}=0,025$) pelo que só neste caso foi considerado como controlo positivo.

Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas na exocitose de EN á 1,5 h e às 3 h (0 min, 15 min e 30 min de contato com o substrato) em neutrófilos incubados com *L. infantum* ($p<0,000$) comparativamente aos controlos negativos (Fig. 4.15.a e b). Quando comparámos a atividade de EN nos sobrenadantes de neutrófilos -*L.infantum* nos dois tempos de incubação verificou-se uma diminuição acentuada da exocitose de EN às 1,5 h ($p_{0\text{min}} = 0,025$).

A exposição de neutrófilos a promastigotas de *L. infantum* não conduziu a aumentos significativos da exocitose da CatG independentemente do tempo de incubação ou da adição de LPS (Fig. 4.15.c, d)

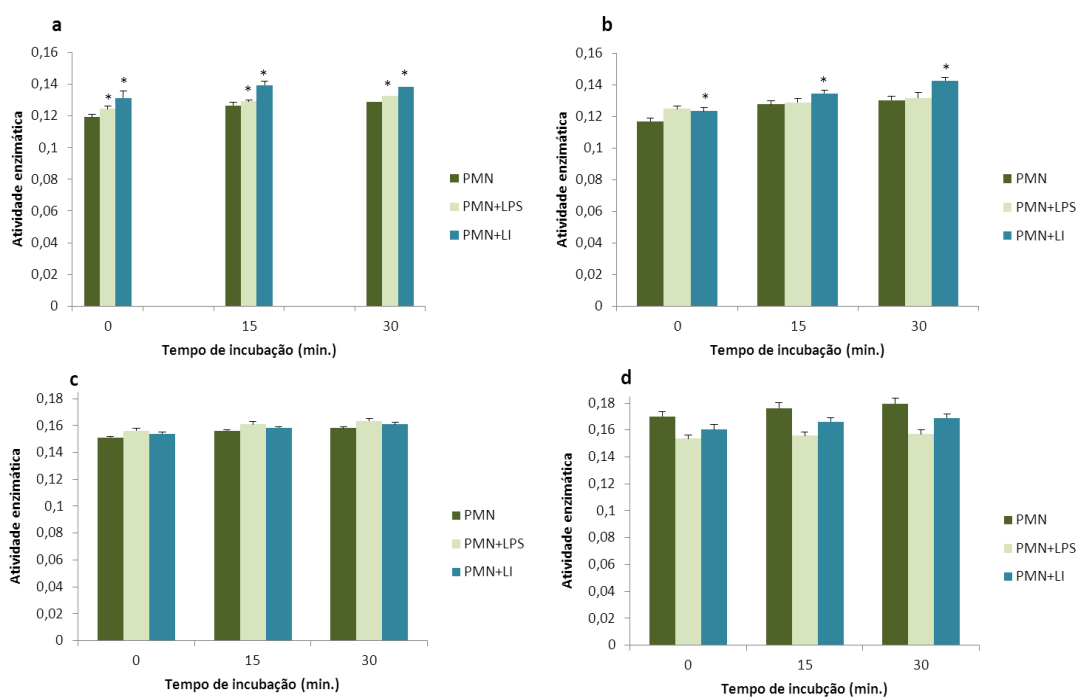


Figura 4.16. Exocitose de elastase neutrófilica (EN) e catepsina G (CatG) por neutrófilos (Neut) caninos expostos a promastigotes de *L. infantum*. A atividade enzimática de EN e CatG foi quantificada em sobrenadantes de neutrófilos não infetados (CN), neutrófilos incubados com *L. infantum* e neutrófilos ativados por LPS após 1,5 h e 3 h de incubação, através de uma reação colorimétrica enzima-substrato. A atividade enzimática de EN e CatG foi determinada utilizando-se péptidos específicos que são clivados pelas respetivas enzimas. A quantificação da reação foi lida imediatamente a seguir à adição do substrato (~ 0 min) e depois de 15 e 30 min. Os resultados encontram-se expressos em médias e erros-padrão de pelo menos três experiências independentes e triplicados por amostra. O teste não paramétrico Wilcoxon foi utilizado para comparar estatisticamente os valores de absorvância dos sobrenadantes. * ($p < 0,005$) indica diferenças estatísticas entre o controlo negativo (neutrófilos) e as outras condições.

4.2.4. Formação de NET por neutrófilos caninos após contato com *L. infantum*

A formação de NET foi avaliada por MEV em neutrófilos caninos e incubados com promastigotas de *L. infantum* durante 1,5 h e 3 h.

neutrófilos caninos (Fig. 4.16.a) expostos a promastigotes de *L. infantum* (Fig.4.16.b) formaram NET, observando-se a interação do parasita com as fibras libertadas pelos neutrófilos (Fig. 4.16.c).

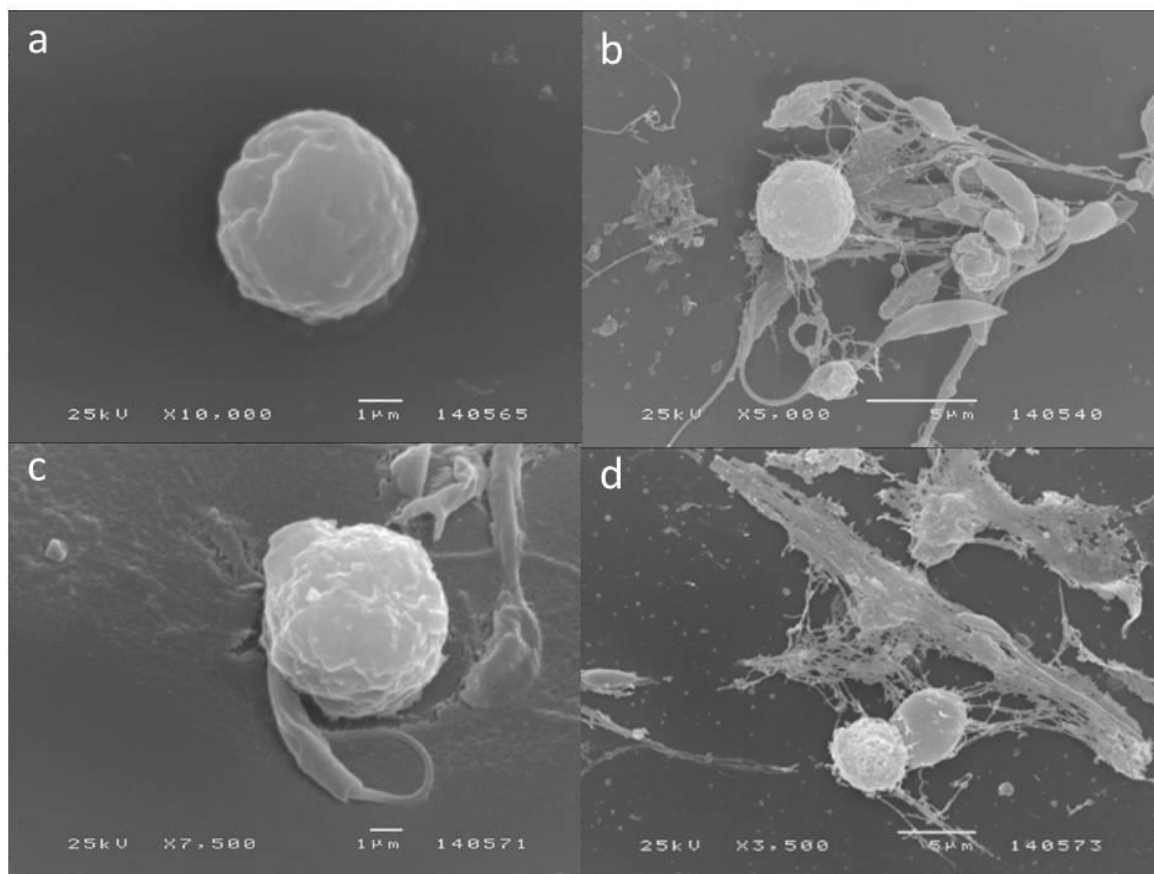


Figura 4.17. Formação de NET por neutrófilos caninos expostos a promastigotas de *L. infantum*. neutrófilos (a) foram incubados durante 1,5 h com promastigotas (b). Visualiza-se neutrófilos formando NET e interagindo com promastigotas de *L. infantum* (c, d). Pormenor da interação de promastigotas de *L. infantum* com as fibras da NET (d). Fotografias de microscopia de varrimento com ampliações de 10000, 7500, 5000 e 3500x.

4.2.5. *L. infantum* não induz a produção de óxido nítrico por macrófagos caninos

A produção de NO foi analisada em co-culturas de MΦ incubados com *L. infantum* durante 1,5 h e 3 h. MΦ não infectados foram utilizados como controlo. A quantificação de iões NO_3^- e NO_2^- foi efetuada através da adaptação do método de Griess.

Às 1,5 h observou-se um ligeiro aumento na produção de NO em MΦ infectados em comparação com o controlo. Em contraste, às 3 h ocorreu um ligeiro decréscimo da produção de NO (Fig. 4.18). Porém, estas alterações não se revelaram estatisticamente significativas.

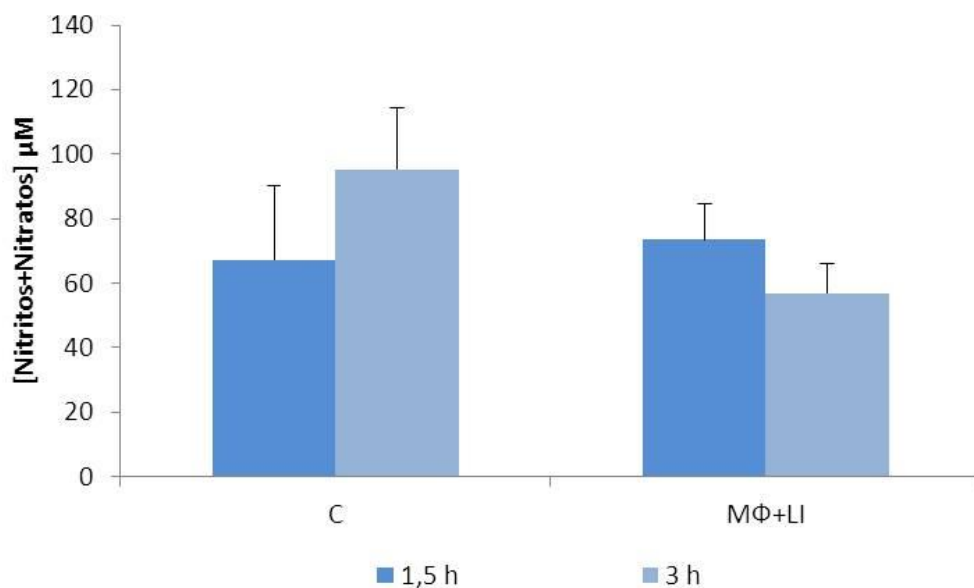


Figura 4.18. Produção de NO pela via clássica de ativação de MΦ caninos. A libertação de iões NO_2^- e NO_3^- foi quantificada pelo kit Nitrite/Nitrate colorimetric assay em sobrenadantes de culturas de MΦ não infectados e de MΦ incubados com *L. infantum*. Os resultados encontram-se representados por médias e erros-padrão de 10 cães e triplicados por amostra. O teste não paramétrico Wilcoxon foi usado para comparar a concentração de NO em MΦ nas diferentes condições. C (controlo, MΦ não infectados); MΦ+LI (MΦ incubados com *L. infantum*).

4.2.6. Aumento da produção de ureia por macrófagos infectados por *L.infantum*

A concentração de ureia produzida por MΦ não infectados (controlo negativo), MΦ estimulados com PMA (controlo positivo) e MΦ incubados com *L. infantum*, durante 1,5 e 3 h foi determinada pelo método de *QuantiChrom™ Urea Assay Kit*.

O controlo positivo apresentou aumento significativo da produção de ureia às 1,5 h ($p=0,008$) em comparação com o controlo negativo, porém com o aumento do período de incubação esta diferença deixou de se verificar.

MΦ incubados com *L. infantum* durante 1,5 h apresentaram elevada produção de ureia quando comparado com o controlo negativo ($p=0,043$). No entanto, com o aumento do período de incubação (3 h) verificou-se uma redução na produção de ureia (Fig. 4.19.).

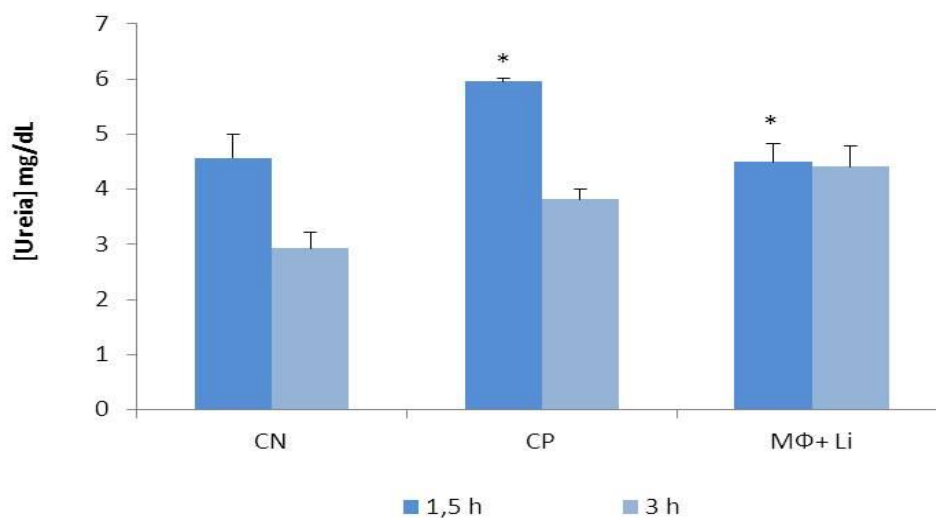


Figura 4.19. Produção de ureia pela via alternativa de macrófagos caninos. A produção de ureia foi quantificada em sobrenadantes de MΦ não infectados (CN, controlo negativo), MΦ estimulados com PMA (CP, controlo positivo) e em MΦ incubados com *L. infantum* (MΦ + LI). Os resultados encontram-se representados por médias e erros-padrão de 10 cães e triplicados por amostra. O teste não paramétrico Wilcoxon foi usado para comparar a concentração de ureia em MΦ nas diferentes condições. * ($p < 0,05$) indica diferenças significativas entre o CN e as outras condições.

4.2.7.L. *infantum* induz aumento da expressão génica de *TLR2* por macrófagos caninos

A acumulação de mRNA dos recetores celulares *NOD1*, *NOD2*, *TLR2*, *TLR 4* e *TLR9* foi quantificado por real time PCR em MΦ incubados com promastigotas de *L. infantum*, MΦ não infetados (controlo negativo) e MΦ incubados com fMLP ou PMA (controlo positivo) durante 1,5 h e 3 h. Nos casos de *NOD1*, *NOD2* e *TLR9* os compostos utilizados como agonistas não induziram o aumento da expressão génica pelo que não foram considerados.

MΦ parasitados apresentaram um ligeiro aumento da expressão dos genes *NOD1*, *NOD2* e *TLR9* comparativamente ao controlo negativo nos dois tempos de incubação, porém não significativas. Após 1,5 h de incubação, os MΦ infetados apresentaram um ténue aumento da acumulação de mRNA de *TLR4* seguido por diminuição às 3 h sem que mais uma vez se verificassem diferenças significativas (Tabela 4.4.). Apenas se verificou um aumento significativo ($p_{1,5h}=0,037$) no número de cópias de *TLR2* em comparação com o controlo negativo (Fig. 4.20.)

Tabela 4.4. Expressão de genes da família de recetores *NOD-like* e *Toll-like* em MΦ caninos incubados com *L. infantum*. O número de cópias de *NOD1*, *NOD2*, *TLR4* e *TLR9* por mil cópias de controlo interno β -actina foi quantificado por real-time PCR em MΦ após 1,5 h e 3 h de incubação usando primers específicos para cada gene. Os resultados encontram-se expressos por médias e erros-padrão de 10 cães de três réplicas por amostra

Subgénero <i>Leishmania</i>	Tempo de incubação	Gene	Nº de cópias médias	Erro padrão
<i>L. infantum</i>	1,5 h	<i>NOD1</i>	216,56	81,14
		<i>NOD2</i>	56,14	27,23
		<i>TLR4</i>	2586,35	676,84
		<i>TLR9</i>	671,31	199,94
	3 h	<i>NOD1</i>	182,89	96,74
		<i>NOD2</i>	82,35	29,72
		<i>TLR4</i>	193,63	116,24
		<i>TLR9</i>	1518,59	324,15

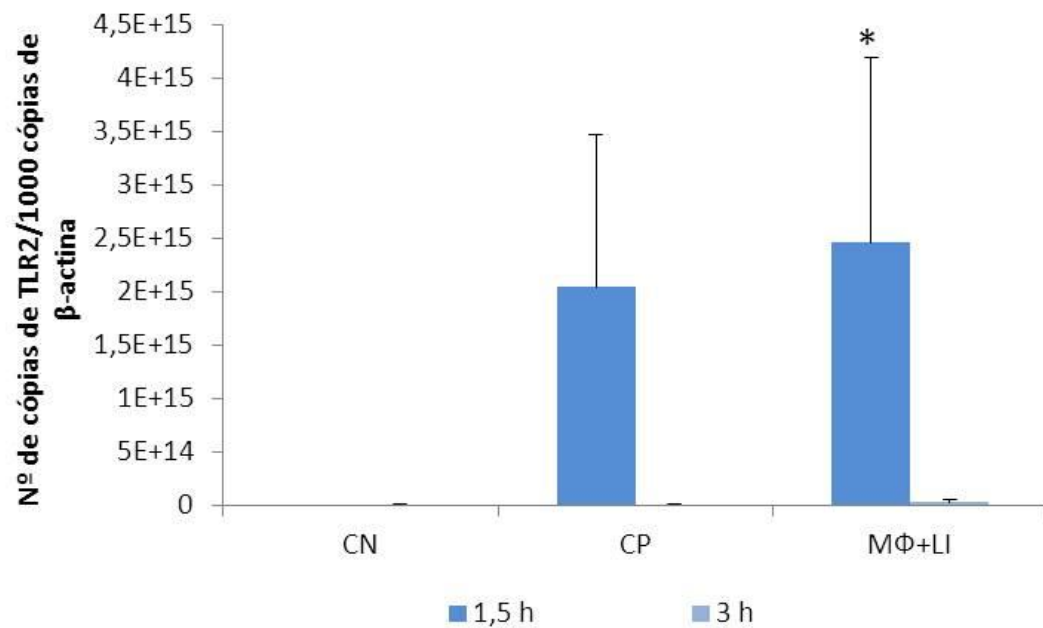


Figura 4.20. Expressão génica de *TLR2* por macrófagos incubados com promastigotes de *L. infantum*. O número de cópias de *TLR2* por mil cópias de controlo interno *β-actina* foi determinado por real-time PCR após 1,5 e 3 h de incubação, usando primers específicos. Os resultados encontram-se expressos por médias e erros-padrão de 10 cães e de pelo menos três réplicas por amostra. O teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para comparar variáveis dependentes. * ($p < 0,05$) indica diferenças estatísticas entre CN e as outras condições.

5. Discussão e conclusão

5. Discussão e conclusão

As manifestações clínicas da infecção por *Leishmania* dependem da espécie de parasita envolvida e da resposta imune do hospedeiro. *L. infantum* produz leishmaniose visceral no homem e é uma doença com envolvimento viscerocutâneo em canídeos. Várias espécies têm tropismo para a pele e mucosas, causando leishmaniose cutânea e mucocutânea no homem.

O murganho constitui o modelo animal mais utilizado para o estudo desta parasitose. A infecção por espécies visceralizantes produz uma doença crônica não fatal, enquanto as espécies cutâneas produzem lesões cutâneas, o que justificou a sua escolha para este estudo.

Os neutrófilos e MΦ são células fagocitárias que participam ativamente na resposta à infecção por *Leishmania*. Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o local de inoculação (Santo-Gomes *et al*, 2000), funcionando como células hospedeiras provisórias ou intermediárias do parasita. Neste estudo avaliaram-se alguns aspectos da resposta imunitária inata desenvolvida por neutrófilos de canídeo, isolados a partir de sangue periférico e incubados com *L. infantum*, e neutrófilos de murganho obtidos por lavagem peritoneal e incubados com *L. infantum* e as espécies cutâneas *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis*.

Neutrófilos de murganho (BALB/c) fagocitaram promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis* e neutrófilos de canídeo fagocitaram promastigotas de *L. infantum* que rapidamente se diferenciaram na forma amastigota. Foi suficiente uma breve exposição aos promastigotes das espécies do subgênero *Vianna*, *L. guyanensis* e *L. shawi* (90 min) para que as taxas de infecção de neutrófilos atingissem valores superiores a 10%. No entanto, estas células parecem ser menos permissivas às espécies do subgênero *Leishmania*, *L. infantum* e *L. amazonensis*, que no mesmo período de tempo atingiram valores máximos de 5%. Por outro lado, a duplicação do tempo de contato com o parasita levou a aumentos moderados e não proporcionais nas taxas de infecção para todas as espécies estudadas, exceto para *L. shawi*, sugerindo maior sensibilidade aos mecanismos leishmanicidas dos neutrófilos. Neutrófilos de canídeo apresentaram taxas de infecção para *L. infantum* similares às

percentagens de infecção de neutrófilos de murganho. Porém, com o aumento do tempo de infecção estes valores mais do que duplicaram, sugerindo que o parasita estimula a sua internalização pelos neutrófilos caninos e que, com o tempo esta célula fica mais permissiva à infecção, apontando para a existência de um longo processo adaptativo entre o parasita e o neutrófilos, uma vez que o cão é o reservatório, por excelência de *L. infantum*. Em murganhos C57BL/6, Carlsen *et al.* (2013) obtiveram 7,9% de infecção em neutrófilos incubados durante 4 h com *L. amazonensis*. Em estudos similares efetuados pelo nosso grupo foram obtidos 15 e 30% de neutrófilos de murganhos C57BL/6 infetados por *L. infantum*, respetivamente após 1 e 3 h de exposição ao parasita.

Após a fagocitose alguns parasitas (amastigotas) perderam a sua integridade estrutural, indicando que provavelmente são destruídos por mecanismos oxidativos e não oxidativos dos neutrófilos, enquanto outros permaneceram morfológicamente normais, provavelmente os mais virulentos. A sobrevivência de *Leishmania* em neutrófilos pode estar associada ao direcionamento do parasita para fagossomas não degradativos dependentes do retículo endoplasmático (Gueirard *et al.* 2008), à inibição do stresse oxidativo ou à inibição da fusão dos grânulos específicos e terciários com o fagossoma (Mollinedo *et al.*, 2010).

Segundo Van Assche *et al.* (2011), *Leishmania* adotou vários mecanismos de defesa para lidar com o stresse oxidativo celular, um deles envolvendo o LPG da membrana do parasita que diminui a produção do radical O_2^- por inibição da montagem de NADPH oxidase. Outra estratégia está relacionada com a produção de enzimas e proteínas antioxidantes pelo parasita. No local da infecção os parasitas podem sofrer degradação extracelular induzida por neutrófilos através da geração de NET.

O reconhecimento do parasita pelos neutrófilos pode ser feito através de PRR (Sharma & Singh, 2009) que são constituintes fundamentais da imunidade inata. No presente estudo, a expressão génica dos recetores NOD e Toll de neutrófilos de murganho não sofreu alterações importantes quando em contato com as diferentes espécies de *Leishmania*, indicando que no modelo roedor (BALB/c) estes sensores não parecem ser ativados pelo parasita. Em estudos anteriores efetuados pelo nosso grupo, *L. infantum* inibiu a expressão génica de *TLR2* de neutrófilos de murganhos C57BL/6. Estes resultados sustentam a hipótese da internalização silenciosa do parasita (Santos-Gomes

et al., 2003), isto é sem que induza a ativação das vias da imunidade inata que levam ao estabelecimento da imunidade celular protetora (Diaz *et al.*, 2012) ou à indução da apoptose.

As células fagocitárias entram em stresse oxidativo como resposta a vários estímulos, resultando na produção de O_2^- e H_2O_2 . Os ROS são mediadores inflamatórios e desempenham um papel importante na defesa e eliminação de agentes patogênicos (Hyung, 2007). Após a fagocitose, os grânulos primários fundem-se com a membrana do fagossoma libertando as enzimas. Para além disso, ocorre ainda a exocitose do conteúdo destes grânulos para o meio extracelular (Wartha *et al.*, 2007; Kaplan & Radic, 2012). Os grânulos primários contêm para além da MPO, proteases serínicas (EN e CatG) que apresentam atividade proteolítica (Owen & Campbell, 1999). No presente estudo a exposição de neutrófilos de murganho a promastigotes de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* conduziu à produção de O_2^- e à exocitose de EN e CatG. Porém, *L. infantum* não induziu a exocitose de CatG em neutrófilos caninos, favorecendo a sobrevivência do parasita. Em concordância com os nossos resultados, estudos realizados *in vitro* mostraram que neutrófilos de murganhos em contato com promastigotas de *L. amazonensis* tendem a produzir níveis elevados de ROS (Carlsen *et al.*, 2013). Em estudos anteriores com neutrófilos de murganhos C57BL/6 expostos a promastigotes de *L. infantum* efetuados pelo nosso grupo também se verificou importante exocitose dos grânulos e produção de O_2^- . Segundo Ribeiro-Gomes *et al.* (2007) a EN libertada por neutrófilos induz a actividade microbicida de $M\Phi$ através da ativação do recetor TLR4.

A formação de NET é outro mecanismo efetor despoletado por neutrófilos ativados que visa conter e eliminar os agentes patogênicos extracelulares. As NET são constituídas por fibras de DNA, histonas e EN (Brinkman *et al.*, 2004). Todas as espécies de *Leishmania* analisadas no presente estudo induziram a formação de NET por neutrófilos de murganho e de cão que provavelmente aprisionaram os promastigotas nas suas fibras. Estudos relativamente recentes também demonstraram que promastigotas de *L. amazonensis*, *L. major* e *L. chagasi* induzem a formação de NET (Abdallah & Denkers, 2012). As estruturas extracelulares conseguem por si só eliminar o parasita, pois quando são danificadas ocorre um aumento da sobrevivência de *Leishmania* (Guimarães-Costa

et al., 2009). Os neutrófilos dispõem de um conjunto de mecanismos, oxidativos e não oxidativos que cooperam com o objetivo de destruir o parasita tanto intra como extracelularmente.

Os MΦ são as células hospedeiras definitivas de *Leishmania*, sustentando a sua sobrevivência, replicação e disseminação ou contribuindo para o controlo da infeção através da ativação dos seus processos leishmanicidas. Os MΦ podem fagocitar parasitas livres, neutrófilos apoptóticos ou fagocitar parasitas que abandonaram os neutrófilos. Na presença do parasita, os MΦ podem seguir duas vias de ativação distintas, a que leva à estimulação dos seus mecanismos leishmanicidas ou a via que permite a sobrevivência intracelular de *Leishmania*. As duas vias de ativação dependem do perfil de citocinas. Perfis de citocinas do tipo Th1 (pró-inflamatória), com produção de IFN- γ e IL-12, privilegiam a ativação dos MΦ pela via clássica, ocorrendo a produção de ROS e consequente produção de NO. Por outro lado, se o perfil de citocinas corresponder a uma resposta Th2 (anti-inflamatória) ocorre a transcrição da arginase e subsequente geração de poliaminas pela via da ornitina e ureia, que toleram o crescimento e a replicação do parasita (Lamour *et al.*, 2012).

As espécies do subgénero *Viannia* foram mais infetantes para os MΦ da linha celular P388D1. As espécies do subgénero *Leishmania* não conseguiram atingir mais de 5% de infeção num período de 48 h. Apesar do grande tropismo de *Leishmania* por MΦ, no geral a taxa de infeção não se revelou consideravelmente superior à registada em neutrófilos, indicando que esta linha celular embora sensível apresenta maior resistência à infeção, sobretudo por *L. shawi* e *L. guyanensis*. O nível de infeção da linha celular por *L. infantum* não diferiu, nas presentes condições, da infeção de MΦ caninos, sugerindo que a capacidade de infeção desta espécie de *Leishmania* é independente da proveniência da célula macrofágica.

Todas as espécies de *Leishmania* analisadas estimularam a expressão génica de *NOD1* em MΦ P388D1, mas apenas as espécies do subgénero *Viannia* induziram a expressão de *NOD2*, enquanto as espécies do subgénero *Leishmania* inibiram a expressão deste gene. Em MΦ caninos, *L. infantum* não induziu alterações importantes na expressão destes dois genes. A expressão aumentada destes genes pode influenciar os mecanismos leishmanicidas desencadeados pela célula para controlar a infeção. A ativação de NK-

κB e MAPK mediada por *NOD1* e *NOD2* induz a transcrição e produção de citocinas pró-inflamatórias e a apoptose (Ogura *et al.*, 2001, Antosz & Osiak, 2013). Devido à falta de estudos sobre a interação entre estes receptores e *Leishmania*, ainda não foi identificado o PAMP de *Leishmania* que é reconhecido por estes receptores, pelo que é importante desenvolverem-se trabalhos focados nestes sensores celulares. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que, dependendo da espécie de parasita em causa e da proveniência da célula, pode ocorrer reconhecimento do parasita por estes receptores.

Alguns estudos demonstraram que membros da família dos TLR reconhecem moléculas derivadas de *Leishmania* (Osanya *et al.*, 2011), nomeadamente o TLR4 reconhece GPL e GPIL (Debus *et al.*, 2003; Veer *et al.*, 2003) e o TLR2 reconhece GPL (Kavoosi *et al.*, 2010). A ativação das células fagocitárias através dos TLR está associada à fagocitose, produção de ROS e de citocinas pró-inflamatórias (Carrera *et al.*, 1996; Onishi *et al.*, 2009). No presente estudo, tanto MΦ caninos infetados por *L. infantum* como MΦ P388D1 que contataram com *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. infantum* evidenciaram acentuado aumento do número de cópias de *TLR2*. A ligação de LPG da superfície de *Leishmania* a *TLR2* desencadeia a ativação de mecanismos oxidativos intracelulares e conduz à produção de citocinas (Osanya *et al.*, 2011). Por outro lado, no presente estudo, a expressão génica de *TLR4* em MΦ P388D1 não sofreu alterações ou ficou inibida na presença de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. A infeção por *L. infantum* também não teve efeito na expressão génica de *TLR4* por MΦ de canídeos. Estudos anteriores demonstraram que *Leishmania* pode causar inibição enzimática de TLR alterando a respetiva cascata de ativação (Weinheber *et al.*, 1998). Para além disso, a forma amastigota apresenta enzimas com ação proteolítica contra o NF-κB que podem bloquear a última reação da cascata de ativação de TLR (Cameron *et al.*, 2004). Segundo Kropf *et al.* (2004), o TLR4 é necessário para o controlo do parasita, provavelmente devido à ativação de iNOS. Um estudo realizado por Antonizi *et al.* (2004) mostrou que em murganhos *knock out* para TLR4 há maior atividade da arginase induzindo a formação de ureia e reduzindo a produção de NO. Deste modo, a ativação do TLR4 é fundamental para a célula produzir NO e eliminar o parasita. De facto, no presente estudo *L. infantum* direcionou a ativação dos MΦ caninos para a via alternativa, isto é para a produção de ureia. De igual modo, as diferentes espécies de *Leishmania* inibiram a produção de NO e aumentaram a produção de ureia, garantindo a

ativação preferencial da via alternativa dos MΦ P388D1. Em conjunto, estes resultados apontam para uma relação direta entre a produção de ureia e ausência de estimulação da expressão génica de *TLR4*. Na competição com a célula, *Leishmania* dirige a conversão de L-arginina em ornitina e ureia e, conseqüentemente para a produção de poliaminas indispensáveis à sua própria sobrevivência. A ativação da via da L-arginina por *Leishmania* representa uma estratégia competitiva por um nutriente limitante da célula hospedeira, subvertendo a atividade leishmanicida da célula e escapando à resposta imune do hospedeiro (Wanassen & Soong, 2009).

O sensor TLR9 reconhece sequências não metiladas CpG em moléculas de DNA e induz o estabelecimento de atividade pró-inflamatória, resultando na produção de citocinas, como IL-12 e IFN. O reconhecimento por TLR9 de sequências nucleotídicas conduz à ativação de células NK e MΦ através da produção de IL-12. Após a fagocitose pelos MΦ, o parasita pode ser degradado com libertação de fragmentos de ácidos nucleicos que podem ser reconhecidos por TLR9. Como *Leishmania* permanece e se multiplica dentro de um compartimento endocítico do MΦ seria de esperar a estimulação contínua deste sensor (Srivastava *et al.*, 2013). No presente trabalho, o aumento transitória do número de cópias de *TLR9* ocorreu unicamente em MΦ P388D1 expostos a promastigotas de *L. amazonensis*, *L. infantum* ou *L. guyanensis*, sugerindo uma possível ativação da via do TLR9. MΦ caninos infetados por *L. infantum* não revelaram alterações importantes na expressão deste gene, o que sugere que os amastigotas intrafagossomais regulam a possível libertação de ácidos nucleicos.

Os nossos estudos incidiram sobre os mecanismos oxidativos e não oxidativos desencadeados por neutrófilos e MΦ, avaliando a sua interação com o parasita. A seleção de células provenientes de modelo roedor e de canídeo está relacionado com o facto de o murganho ser o animal mais utilizado em laboratório para estudar esta parasitose e o canídeo ser o hospedeiro natural de *L. infantum*. Em células fagocitárias provenientes de modelo roedor foi analisado o comportamento infeccioso de quatro espécies de *Leishmania*, duas pertencentes ao subgénero *Leishmania*, *L. infantum* e *L. amazonensis* e duas pertencentes ao subgénero *Viannia*, *L. shawi* e *L. guyanensis*, sendo *L. infantum* responsável pela LV e *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis* causadoras de LC. Na interação com neutrófilos e MΦ estas quatro espécies comportaram-se de um

modo semelhante com exceção da capacidade de causar infecção. As espécies do subgénero *Viannia* apresentaram maior infeciosidade

Neutrófilos de murganho em contato com *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* e neutrófilos de canídeo expostos a promastigotes de *L. infantum* apresentaram aumento na produção do O_2^- , assim como da exocitose da EN, indicativo de que estas células ativam os seus mecanismos oxidativos e enzimáticos para tentar controlar a infecção por *Leishmania*. O contato de neutrófilos com *Leishmania* spp. induziu a formação de NET, indicando que também são ativados mecanismos extracelulares para controlar a infecção.

MΦ-like P388D1 em contato com *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* apresentam inibição da produção de NO em contraste com um aumento significativo na produção de ureia. A ativação da via alternativa do MΦ pelo parasita está associada ao aumento significativo da expressão génica de *TLR2*. Deste modo o parasita consegue controlar os mecanismos microbicidas da célula, revertendo-os a seu favor e induzindo um ambiente propício para a sua sobrevivência e multiplicação.

Este trabalho contribuiu para esclarecer os mecanismos utilizados por neutrófilos e MΦ para tentarem controlar a infecção por *Leishmania*, podendo ajudar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a LCan e LC, nomeadamente através da compreensão dos fatores que inibem ou estimulam os recetores celulares que são cruciais no reconhecimento do parasita.

Futuramente é fundamental continuar o estudo dos recetores celulares tanto em neutrófilos como em MΦ. A interação entre neutrófilos e outras células envolvidas na imunidade inata, como é o caso de células NK e CD, também deve ser aprofundada, pois estes dois tipos celulares desempenham funções importantes na resposta inicial à infecção por *Leishmania*.

6. Referências bibliográficas

6.Referências bibliográficas

- Abdallah A. D.S.,Denkers E.Y., 2012. Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. *Frontiers in Immunology*, 3: 382.
- Afonso O., Alves-Pires C., 2008. Bioecologia dos vectores. In *Leishmaniose canina*. Ed. Chaves Ferreira Publicações. 1ª. Edição. Lisboa. Portugal. pg 27-40.
- Aga E., Katschinski D.M., van Zandbergen G., Laufs H., Hansen B., Müller K., Solbach W., Laskay T., 2002. *The Journal of Immunology*, 169:898-905
- Almeida B.F., Narciso L.G., Melo L.M., Preve P.P., Bosco A.M., Lima V.M., Ciarlini P.C., 2013. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 198: 599-605.
- Antoniazzi S., Price P.H., Kropf P., Freudenberg A.M., Galanos C., Smith F.D., Muller I., 2004. Chemokine gene expression in Toll-like receptor-competent and deficient mice infected with *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, 72: 5168–5174
- Antosz H., Osiak M., 2013. NOD1 and NOD2 receptors: integral members of the innate and adaptive immunity system. *Acta Biochimica Polonica*, 60: 351–360.
- Arosa A.F., Cardoso M.E., Pacheco C.F. 2007. *Fundamentos de imunologia*. Lidel-edições técnicas, Lda. Lisboa. Portugal. pg 22-40.
- Awasthi A., Mathur R.K., Saha B., 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian Journal of Medical Research*, 119: 238-258.
- Basu N.K., Kole L., Ghosh A., Das P.K., 1997. Isolation of a nitric oxide synthase from the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *FEMS Microbiology Letters*, 156: 43–47.
- Bajenoff M., Breart B., Huang A.Y., Qi H., Cazareth J., Braud V.M., Germain R.N., Glaichenhaus N., 2006. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *The Journal of Experimental Medicine*. 203: 619–631.

-
- Bogdan, C., 2012. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2: 69,
- Borregaard N., Sørensen O.E., Theilgaard-Mönch K., 2007. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in immunology*, 28: 340–345.
- Bourdoiseau G., Bonnefont C., Magnol J.P., Saint-André I., Chabanne L., 1997. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 56: 345–351
- Bourdoiseau G., Hugnet C., Gonçalves R.B., Vézilier F., Petit-Didier E., Papierok G., Lemesre J.L., 2009. Effective humoral and cellular immunoprotective responses in Li ESAP-MDP vaccinated protected dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128:71-8
- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A., 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303: 1532–1535.
- Brinkmann V., Laube B., Abed Abu U., Goosmann C., Zychlinsky A., 2010. Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *Journal of Visualized Experiments*, 36: 3–5.
- Cameron P., McGachy A., Anderson M., Paul A., Coombs G.H., Mottram J.C., Alexander J., Plevin R., 2004. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. *The Journal of Immunology*, 173: 3297-3304.
- Campos-Neto A., Soong L., Cordova J.L., Sant'Angelo D., Skeiky Y.A., Ruddle N.H., Reed S.G., Janeway C.Jr., McMahon-Pratt D., 1995. Cloning and expression of a *Leishmania donovani* gene instructed by a peptide isolated from major histocompatibility complex class II molecules of infected macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, 182: 1423-1433.

-
- Carrera L., Gazzinelli R.T., Badolato R., Hieny S., Muller W., Kuhn R., Sacks D.L., 1996. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *Journal of Experimental Medicine*, 183: 515–526.
- Carvalho A.K., Silveira T.F., Passero L.F. D., Gomes C.M.C., Corbett P.E.C., Laurenti D.M., 2012. *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. *Parasite immunology*, 34: 395–403.
- Castaño-Rodríguez N., Kaakoush N.O., Mitchell H.M., 2014. Pattern-recognition receptors and gastric cancer. *Frontiers in Immunology*, 5: 36.
- Carlsen D.E., Hay C., Henard A.C., Popov S., Garg J.N., Soong L., 2013. *Leishmania amazonensis* amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. *Infection and Immunity*, 81: 3966-3974.
- Coler R.N., Reed S.G., 2005. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends in Parasitology*. 21: 244–249.
- Corridoni D., Kristen A.O., Cifonea M.G., Cominelli F., 2014. The dual role of NOD-like receptors in mucosal innate immunity and chronic intestinal inflammation. *Frontiers in Immunology*, 5: 317.
- Choi H.S., Kim J.W., Cha Y.N., Kim C., 2006. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 27: 31-44.
- Croft S.L., Sundar S., Fairlamb H.A., 2006. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 111–126.
- Debus A., Gläsner J., Röllinghoff M., Gessner A., 2003. High levels of susceptibility and T helper 2 response in MyD88-deficient mice infected with *Leishmania major* are interleukin-4 dependent. *Infection and Immunity*, 71: 7215-7218.

-
- Diaz S., da Fonseca I.P., Rodrigues A., Martins C., Cartaxeiro C., Silva M.J., de Brito T.V., Alexandre-Pires G., Santos-Gomes G.M., 2012. Canine leishmaniosis. Modulation of macrophage/lymphocyte interactions by *L. infantum*. *Veterinary Parasitology*, 145: 336-344.
- Esch K.J., Petersen C.A., 2013. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 26: 58–85.
- Eresso A., Katschinski M.D., Zandbergen G., Laufs H., Hansen B., Müller K., Solbach W., Laskay J.T., 2002. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, 169: 898–905.
- Faria R.S.M., Lima C.G.F., Ana Paula C.A., 2012. Toll-like receptors in *Leishmania* infections: guardians or promoters? *Journal of Parasitology Research* 2012:930257.
- Fernandes A.P., Costa M.M., Coelho E.A., Michalick M.S., de Freitas E., Melo M.N., Tafuri W.L., deResende D.M., Hermont V.A.C.F., Gazzinelli R.T., 2008. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, 26: 5888–5895.
- Forsberg M., Löfgren R., Zheng L., Stendahl O., 2001. Tumour necrosis factor-alpha potentiates CR3-induced respiratory burst by activating p38 MAP kinase in human neutrophils. *Immunology*, 103: 465–472.
- Gaur U., Roberts C.S., Rahul P.D., Corraliza I., Ullman B., Wilson E.M., 2007. An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous Leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, 179: 8446–8453.
- Gupta, S. & Nishi. 2011. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. *Indian Journal of Medical Research*, 133: 7-39.
- Gutierrez O., Pipaon C., Inohara N., Fontalba A., Ogura Y., Prosper F., Nuñez G., Fernandez-Luna J.L., 2002). Induction of NOD2 in myelomonocytic and intestinal

-
- epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 41701–41705.
- 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. *Cellular Microbiology*, 10:100-111.
- Guimarães-Costa A.B., Nascimento M.T., Froment G.S., Soares R.P., Morgado F.N., Conceição-Silva F., Saraiva E.M., 2009. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106:6748-6753.
- Holzmuller P., Cavaleyra M., Moreaux J., Kovacic R., Vincendeau P., Papierok G., Lemesre J.L., 2005. Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 106, 247–257.
- Horta M.F., Mendes P.B., Roma E.H., Noronha F. S., Macêdo J.P., Oliveira L.S., Vieira L.Q., 2012. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *Journal of Parasitology Research*, 2012: 203-818.
- Huang X., Du W., Barrett R.P., Hazlett L.D., 2007. ST2 is essential for Th2 responsiveness and resistance to *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48:4626-4633.
- Inohara N., Ogura Y., Chen F.F., Muto A., Nuñez G., 2001. Human NOD1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *The Journal of Biological Chemistry*, 276:2551-2554.
- Ishii M., Hashimoto M., Oguma K., Kano R., Moritomo T., Hasegawa A., 2006. Molecular cloning and tissue expression of canine Toll-like receptor 2 (TLR2), *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 110:87–95.

-
- Itou T., Collins L.V., Thore B.F., Dahlgren C., Karlsson A., 2006. Changes in activation states of murine polymorphonuclear leukocytes (neutrófilos) during inflammation: a comparison of bone marrow and peritoneal exudate neutrófilos. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13:575–583.
- João A., Pereira A.M., Cortes S., Santos-Gomes M.G., 2006. Canine leishmaniasis chemotherapy: dog's clinical condition and risk of *Leishmania* transmission. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 53:540–545.
- Kavoosi G., Ardestani K.S., Kariminia A., Alimohammadian H.M., 2010. *Leishmania major* lipophosphoglycan: discrepancy in toll-like receptor signaling. *Experimental Parasitology*, 124:214–218,
- Kaplan J.M. Radic M., 2013. Neutrophil extracellular traps (NETs): Double-edged swords of innate immunity. *The Journal of Immunology*, 189: 2689–2695.
- Kelly J.M., Ward, H.M., Miles M.A., Kendall G., 1992. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Research*, 20: 3963–3969.
- Kheirandish F., Chegeni S.A., Kazemi B., Mohebbali M., Sarlak A.T., Mohamad J., Holakouee K., Hajaran H., 2013. Identification of *Leishmania* species using PCR assay on giemsa-stained slides prepared from cutaneous leishmaniasis patients. *Iranian Journal of Parasitology*, 8: 382–288.
- Kropf P., Freudenberg N., Kalis C., Modolell M., Herath S., Galanos C., Freudenberg M., Müller I., 2004. 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. *Journal of Leukocyte Biology*, 76: 48-57.
- Lamour S.D., Choi Beak-San, Keun H.C, Müller I., Saric J., 2012. Metabolic characterization of *Leishmania major* infection in activated and non activated macrophages. *Journal of Proteome Research*, 11: 4211–4222.

-
- Laskay T., van Zandbergen G., Solbach W., 2003. Neutrophil granulocytes – trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in Microbiology*, 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.
- Lemesre J.L., Holzmuller P., Cava-Leyra M., Gonçalves R.B., Hottin G., Papierok G., 2005. Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. *Vaccine*, 23: 2825–2840.
- Lemesre J.L., Holzmuller P., Gonçalves R.B., 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.
- Liese J., Schleicher U., Bogdan C., 2008. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology*, 213: 377–387.
- Liu D., Uzonna J.E., 2012. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2: 83.
- Lopes M.F., Costa-da-Silva A.C., DosReis G.A., 2014. Innate Immunity to *Leishmania* Infection: Within Phagocytes. *Mediators of Inflammation*, 2014: 754-965.
- Loría-Cervera E.N., Andrade-Narváez F.J., 2014. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56: 1– 11.
- Maroli M., Feliciangeli M.D., Bichaud L., Charrel R.N., Gradoni L., 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27: 123– 147.

-
- Meireles J. 2008. Terapêutica e Profilaxia da Leishmaniose canina. *In* Leishmaniose canina. Ed. Chaves Ferreira Publicações. 1ª. Edição Lisboa Portugal. pg 93-103.
- Mollinedo F., Janssen H., de la Iglesia-Vicente J., Villa-Pulgarin J.A., Calafat J., 2010. Selective fusion of azurophilic granules with *Leishmania*-containing phagosomes in human neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 34528-34536.
- Moreira L.O., Zamboni D.S., 2012. NOD1 and NOD2 signaling in infection and inflammation. *Frontiers in Immunology*, 3: 328.
- 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. *Journal of Gastroenterology*, 41: 318-324.
- Mydel P., Shipley J.M., Adair-Kirk T.L., Kelley D.G., Broekelmann T.J., Mecham R.P., Senior R.M., 2008. Neutrophil elastase cleaves laminin-332 (laminin-5) generating peptides that are chemotactic for neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, 283:9513-9522.
- Naderer T., Mcconville M.J., 2008. Microreview the *Leishmania* – macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cellular Microbiology*, 10:301–308.
- Nascimento E., Fernandes D.F.,Vieira E.P., Campos-Neto A., Ashman J. A., Alves F.P., Coler R.N., Bogatzki L.Y., Kahn S.J., Beckmann A.M., Pine S.O., Cowgill K.D., Reed S.G., Piazza F.M., 2010. A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine when used in combination with meglumine antimoniate for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, 28:6581-6587.
- Nylen S., Gautam S., 2010. Immunological perspectives of leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2:135–146.
- Neuber H., 2008. Leishmaniasis. *Journal of the German Society of Dermatology*, 6:754–765.

-
- Noli C., Auxilia S.T., 2005. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Veterinary Dermatology*, 16:213–232.
- Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G., 2001. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *The Journal of Biological Chemistry*, 276:4812-8
- Osanya A., Song E.H., Metz K., Shimak R.M., Boggiatto P.M., Huffman E., Johnson C., Hostetter J.M., Pohl N.L., Petersen C.A., 2011. Pathogen-derived oligosaccharides improve innate immune response to intracellular parasite infection. *American Journal of Pathology*, 179:1329-1337.
- Ohnishi H., Tochio H., Kato Z., Orii K.E., Li A., Kimura T., Hiroaki H., Kondo N., Shirakawa M., 2009. Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106:10260-10265
- Otranto D., Dantas-Torres F., 2013. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends in parasitology*, 29:339–345.
- Owen A.C., Campbell J.E., 1999. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *Journal of Leukocyte Biology*, 65:137–65150.
- Papadogiannakis E.I., Koutinas A.F., Saridomichelakis M.N., Vlemmas J., Lekkas S., Karameris A., Fytianou A., 2005. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 104:227– 237.
- Passero L.F.D., Carvalho A.K., Bordon M.L.C., Toyama M.H., Corbett C.E., Laurenti M.D., 2012. *Leishmania (Viannia) shawi* purified antigens confer protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Inflammation Research*, 61:255–63.
- Perira M.A.M., 2008. Epidemiologia da leishmaniose canina. Ed. Chaves Ferreira Publicações. 1ª. Edição. Lisboa. Portugal. 41-51.

-
- Parker C.L., Whyte K.B.M., Dower K.S., Sabroe I., 2005. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *Journal of Leukocyte Biology*, 77:886-892.
- Ready P.D., 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *European communicable disease bulletin*, 15:1-11.
- Reithinger R., Davies C.R., 1999. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61:530-541.
- Ribeiro-Gomes F.L., Moniz-de-Souza M.C, Alexandre-Moreira M.S., Dias W.B., Lopes M.F., Nunes M.P., Lungarella G., DosReis G.A., 2007. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *The Journal of Immunology*, 179:3988-94
- Ritter U., Frischknecht F., van Zandbergen G., 2009. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends in parasitology*, 25:505-510.
- Rodrigues OR, Moura RA, Gomes-Pereira S, Santos-Gomes GM., 2006. H-2 complex influences cytokine gene expression in *Leishmania infantum*-infected macrophages. *Cellular Immunology*, 243:118-26
- Rodrigues O.R., Marques C., Soares-Clemente M., Ferronha M.H., Santos-Gomes G.M., 2009. Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. *Immunobiology*, 214:101-111.
- Sakhon S.O., Severo S. M., Kotsyfakis M., Pedra H.F.J., 2013. A NOD to disease vectors: mitigation of pathogen sensing by arthropod saliva. *Frontiers in Microbiology*, 4:308.
- Santos-Gomes G.M., 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 Parasitologica*, 43:7-12

-
- Santos-Gomes G.M., Campino L., Abranches P., 2000. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95:193–198.
- Santos-Gomes M.G., Capela.J., Ramada J., Campino L., 2003. Experimental canine leishmaniasis: evolution of infection following re-challenge with *Leishmania infantum*. *Acta Tropica*, 87: 235-244.
- Santos-Gomes G.M., Roos R.O., Marques C. 2008. Resposta imunológica. In *Leishmaniose canina*. Ed. Chaves Ferreira Publicações, 1ª. Edição. Lisboa. Portugal. pg 69-83.
- Saljoughian N., Taheri T., Rafati S., 2014. Live vaccination tactics: possible approaches for controlling visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 5: 134.
- Saridomichelakis M.N., 2009. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology*, 20: 471–489.
- Saridomichelakis M.N., Koutinas A.F., 2014. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Veterinary Dermatology*, 25: 61–71.
- Sauter S.N., Allenspach K., Gaschen F., Grone A., Ontsouka E., Blum J.W., 2005. Cytokine expression in an *ex-vivo* culture system of duodenal samples from dogs with chronic enteropathies: modulation by probiotic bacteria. *Domestic Animal Endocrinology*, 29: 605–622.
- Segal A.W., 2007. How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology*, 23: 197-223.
- Sharma U., Singh S., 2009. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian Journal of Experimental biology*, 47: 412–423.
- Smith S.M., 2014. Role of Toll-like receptors in *Helicobacter pylori* infection and immunity. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 5: 133–146.

-
- Solano-Gallego L., Miró G., Koutinas A., Cardoso L., Pennisi M.G., Ferrer L., Bourdeau P., Oliva G., Baneth G., 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 4: 86.
- Solcà M.S., Bastos L.A., Guedes C.E., Bordoni M., Borja L.S., Larangeira D.F., Silva Estrela Tuy P.G., Amorim L.D., Nascimento E.G., de Sá Oliveira G.G., Santos W.L., Fraga D.B., Veras P.S., 2014. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. *Public Library of Science*, 9: 103-635.
- Srivastava S., Pandey S.P., Jha M.K., Chandel H.S., Saha B., 2013. *Leishmania* expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. *Clinical and Experimental Immunology*, 172: 403–409.
- Strasser A., Kalmar E., Niedermüller H., 1998. A simple method for the simultaneous separation of peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells in the dog. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 62: 29–35.
- Swain D.K., Kushwah M.S., Kaur M., Patbandha T.K., Mohanty A.K., Dang A.K., 2014. Formation of NET, phagocytic activity, surface architecture, apoptosis and expression of Toll like receptors 2 and 4 (TLR2 and TLR4) in neutrophils of mastitic cows. *Veterinary Research Communications*, 38: 209-219.
- Sutmuller R.P., den Brok M.H., Kramer M., Bennink E.J., Toonen L.W., Kullberg B.J., Joosten L.A., Akira S., Netea M.G., Adema G.J., 2006. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *Journal of Clinical Investigation*, 116: 485-494.
- Sukhumavasi W., Charlotte E.E., Eric Y.D., 2007. Mouse neutrophils require JNK2 MAPK for *Toxoplasma gondii*-induced IL-12p40 and CCL2/MCP-1 release. *Journal of Immunology*, 179: 3570-3577.
- Tomás A, Romão S. 2008. Biologia do parasita. In Leishmaniose canina. Ed. Chaves Ferreira Publicações, 1ª. Edição. Lisboa. Portugal. pg 7-26.

-
- Tuon F.F., Amato V.S., Bacha H., Almusawi T., Duarte M., Amato N.V., 2008. Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 76: 866–872.
- Underhill D.M., Gantner B., 2004. Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and Infection*, 6: 1368-1373.
- Urban C.F., Ermert D., Schmid M., Abu-Abed U., Goosmann C., Nacken W., Brinkmann V., Jungblut P.R., Zychlinsky A., 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *Public Library of Science Pathogens*, 5: 100-639.
- Van Assche T., Deschacht M., da Luz R.A., Maes L., Cos P., 2011. *Leishmania* macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radical Biology & Medicine*, 51: 337-351.
- Veer M.J., Curtis J.M., Baldwin T.M., DiDonato J.A., Sexton A., McConville M.J., Handman E., Schofield L., 2003. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: Possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *European Journal of Immunology*, 33: 2822-2831.
- Virbac, 2011. CaniLeish (R): a primeira vacina na Europa contra a leishmaniose. *Noticias Leishmaniose*, 1º edição, Portugal.
- Xin L., Li K., Soong L., 2009. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Molecular Immunology*, 45: 3371-3382.
- Wanasen N., Soong L., 2009. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Journal of Immunology Research*, 41: 15–25.
- Weinheber N., Wolfram M., Harbecke D., Aebischer T., 1998. Phagocytosis of *Leishmania mexicana* amastigotes by macrophages leads to a sustained suppression of IL-12 production. *European Journal of Immunology*, 28: 2467-2477.

- Wartha F., Beiter K., Normark S., Henriques-Normark B., 2007. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 10: 52–56.
- W.H.O. E Committee., 2010. Control of the leishmaniasis. *World Health Organization Technical Report Series*, 949: 186pp.
- World Health Organization 2013
- WHO, 2014. <http://www.who.int/en/>
- Wu G, Morris SM Jr., 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*, 336 :1-17.
- Ye J., Coulouris G., Zaretskava I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L., 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13: 134.
- Zawrotniak M., Rapala-Kozik M., 2013. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta Biochimica Polonica*, 60: 277–284.
- Zhong Y., Kinio A., Saleh M., 2013. Functions of NOD-Like receptors in Human diseases. *Frontiers in Immunology*, 4: 333.