



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Ativação de neutrófilos de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos por promastigotas de *Leishmania* spp.

Autor: Ana Rita da Silva Pedrosa

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas na especialidade de Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional.

Setembro de 2016



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Ativação de neutrófilos de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos por promastigotas de *Leishmania* spp.

Autor: Ana Rita da Silva Pedrosa

Orientador: Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas na especialidade de Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional.

Comunicações

Artigos

Santos-Mateus D., Passero F., Rodrigues M., Valério-Bolas A., **Silva-Pedrosa R**, Pereira M., Laurenti MD. 2016. The battle between *Leishmania* and the host immune system at a glance. *International Trends in Immunity*, 4 (1): 28-34, DOI: 10.18281/iti.2016.1.3

Comunicações Orais

Silva-Pedrosa R., Baptista-Fernandes T., Rodrigues A., Santo-Mateus D., Alexandre-Pires G., Pereira M., Toscano C., Semião-Santos S., Nery Costa C.H., Passero LFD, Santos-Gomes G., 2016. Host immunocompetence influences the activation of neutrophils when exposed to *Leishmania* spp. II Congresso Internacional de Parasitologia, 1-3 Agosto, Manchester, UK.

Santos-Gomes G., Santos-Mateus D., Valério-Bolas A., Rafael-Fernandes M., **Silva-Pedrosa R.**, Pereira M., Rodrigues A., 2014. Leishmaniasis. Emerging infection of migrants & transplanted. IX Congresso de OMV, 29 a 30 Novembro, Lisboa.

Comunicação em painel (*poster*)

Rafael-Fernandes M, Alexandre-Pires G, Rodrigues A, Santos-Mateus D, Valério-Bolas A, **Silva-Pedrosa R**, Passero LF, Santos-Gomes G. Promastigotes of different species of *Leishmania* exhibit distinguishable morphology by scanning electron microscopy. XXIV International Symposium on Morphological Sciences, 2 a 6 de Setembro, 2015, Istambul, Turquia. *Anatomy*, Vol (9), Suppl 2: S132, P10, <http://www.anatomy.org.tr/issue/2015s2/pdf/04.pdf>.

Rodrigues A., Alexandre-Pires M., Santos-Mateus D., Pereira M., Valério-Bolas A., Rafael-Fernandes M., **Silva-Pedrosa R.**, Pereira da Fonseca I., Santos-Gomes G. 2014. Exposure to *Leishmania infantum* causes metabolic changes in canine hepatocytes. 5º Jornadas Científicas no IHMT, 12 de Dezembro, Lisboa. http://www.ihmt.unl.pt/images/uploaded/news/Resumo_MariaArmanda.pdf

Agradecimentos

À minha orientadora, **Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes** que foi um grande apoio, direcionando-me para o caminho a percorrer e ajudando-me a “alargar horizontes”. Agradeço-lhe todas as oportunidades que me proporcionou, os conselhos dados, toda a sua dedicação e empenho. Sempre acreditou em mim, sempre me apoiou e respeitou as minhas decisões, tendo sempre uma palavra amiga para comigo. Mesmo nos meus momentos de desespero consegui fazer uso do seu bom humor para eu poder ver o lado bom e descontraír. O meu real e sincero Muito Obrigado por tudo, pois muito aprendi consigo, quer a nível pessoal quer a nível profissional, ensinamentos que nunca esquecerei.

Ao coordenador de mestrado **Professor Doutor Celso Cunha** por todo o apoio dado e pelo seu sentido de humor. Sempre teve a preocupação de nos oferecer um mestrado de qualidade. Agradeço por me ter proporcionado o ingresso neste mestrado.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, **Débora Almeida, Mariana Rafael-Fernandes, David Santos Mateus, Ana Valério Bolas, Mafalda Claro e João Tavanez** que sempre me motivaram a não desistir, para além de me terem dado alento nos momentos mais críticos. Muito me ensinaram e ajudaram. Um muito obrigada, pois o vosso apoio e ajuda foi fundamental. Nunca vos esquecerei. Um especial agradecimento há **Armanda Rodrigues e Maria Pereira** que tiveram sempre o cuidado de me ajudar, muitas vezes parando o seu próprio trabalho para me dedicarem atenção. Aos novos colegas **Geraldina Manjate, Pedro Ruas** que sempre demonstraram interesse e preocupação com a minha tese o meu muito obrigado. Há minha colega **Áurea Gabriel** que além de amável foi incansável na ajuda para editar as fotografias das NET e ao **David Gabriel**, pela sua paciência, disponibilidade, compreensão e profissionalismo para me explicar como trabalhar com o programa no qual se personalizam fotografias, um grande obrigado pela ajuda, sem vós parte desta tese não teria sido possível realizar.

Um agradecimento aos meus **colegas de mestrado** que me acompanharam nesta etapa da minha vida, que partilharam comigo momentos de alegria, preocupação, tristeza e superação. O especial reconhecimento pela amizade, apoio e ajuda das minhas colegas e amigas **Nicole Lourenço, Cátia Simões, Ana Carolina e Inês Guerra**.

À **Teresa Fernandes** por toda a ajuda prestada, pelo apoio, conselhos e dedicação. À técnica **Ana Dias** e a auxiliar **Andreia Nunes** do Hospital Egas Moniz por toda a ajuda, prestabilidade dedicada e simpatia, fazendo-me sempre sentir bem recebida. A todas vós um muito obrigada.

À **Professora Doutora Graça Alexandre-Pires** por demonstrar uma constante boa vontade, ajuda e empenho para a realização do meu trabalho, manifestando sempre preocupação e cuidado para com as fotografias das minhas NET.

Ao **Professor Saul Semião Santos** agradeço a amabilidade de ter cedido o antigénio utilizado para a realização da DAT.

Ao **Doutor Carlos Nery Costa** o meu muito obrigda pela cedência e envio dos soros utilizados como controlos positivos na realização da DAT.

Ao **Doutor Luiz Felipe Passero** agradeço pela cedência das espécies de *Leishmania* cutâneas usadas neste trabalho.

Um especial agradecimento aos **meus pais**, que são o meu suporte, sempre me apoiaram nos bons e maus momentos, acompanhando as minhas vitórias e derrotas. Sem eles a realização e conclusão deste mestrado não seria possível. Um especial agradecimento á minha irmã **Cátia Pedrosa**, que foi além de irmã, uma amiga e confidente, que sempre esteve presente e me apoiou ao longo da minha vida.

Aos meus amigos que sempre demonstraram preocupação, prestaram apoio e me fizeram ter um sorriso nos momentos mais difíceis. Sem todos vós não teria corrido de uma forma tão harmoniosa o desenvolvimento deste trabalho.

Resumo

Os neutrófilos são as primeiras células polimorfonucleares do sistema imunitário inato a chegar ao local de infecção, constituindo a primeira linha de defesa contra agentes invasores, como no caso do parasita *Leishmania*. Este parasita é causador da leishmaniose que tem sido reportada em mais de 98 países e que pode afetar animais e seres humanos. As diferentes espécies do parasita podem causar leishmaniose com diferentes apresentações clínicas, das quais salientamos a leishmaniose visceral e a leishmaniose cutânea. O presente trabalho teve como objetivo analisar a resposta imunitária de células polimórficas nucleares (PMN) de indivíduos com diferentes competências imunitárias quando expostas a parasitas de espécies viscerais (*L. infantum*) e cutâneas (*L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis*). A internalização parasitária foi confirmada por microscopia óptica. A ativação celular foi avaliada através de técnicas laboratoriais que permitiram analisar os mecanismos oxidativos, nomeadamente a produção de ião superóxido, a exocitose de grânulos ricos em enzimas proteolíticas, como é o caso específico da elastase neutrofílica (NE) e da catepsina G (CatG) e a libertação de armadilhas extracelulares (NET). Verificou-se que as espécies de *Leishmania* induzem a exocitose de CatG e a libertação de NET, independentemente da competência imunitária dos indivíduos estudados. Contudo, idêntica situação não se verifica no caso do stress oxidativo ou da libertação de NE. *Leishmania* spp. estimulou o stress oxidativo, com produção do ião superóxido, nos PMN de indivíduos saudáveis enquanto os PMN de indivíduos imunocomprometidos apenas parece ficar ativado na presença de *L. infantum* e de *L. amazonensis* apontando para mecanismos de ativação diversos decorrentes quer da espécie do parasita quer do nível imunitário do hospedeiro. Situação similar ocorreu na exocitose de grânulos ricos em NE. *L. infantum* e *L. shawi* estimularam a libertação de NE por PMN de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos. Porém, os PMN de indivíduos com comprometimento da imunidade também responderam aos parasitas da espécie *L. amazonensis* enquanto que *L. guyanensis* unicamente induziu a exocitose de NE nos PMN de indivíduos saudáveis. Estes resultados apontam para a existência de especificidades próprias na ativação destes mecanismos relativamente às espécies de *Leishmania* e ao estado imunitário do hospedeiro. Estudos complementares são necessários para esclarecer o processo de ativação, bem como identificar os eventuais antígenos parasitários (ou até ilhas CpG) que conduzem a ativação de PMN humanos.

Palavras-chave: Competência do sistema imunitário, Neutrófilos, *Leishmania* spp., Via oxidativa, Exocitose, Mecanismos microbicidas extracelulares

Abstract

Neutrophils are the first polymorphonuclear cells of the innate immune system to reach the infection site, providing the first line of defense against invading pathogens, such as the *Leishmania* parasite. This parasite causes leishmaniasis that has been reported over 98 countries, affecting both animals and human beings. Different species of the parasite can cause leishmaniasis with diverse clinical presentations, as is the case of visceral leishmaniasis and cutaneous leishmaniasis. The present study aimed to evaluate the immune response of polymorphonuclear cells (PMN) of individuals with different immune competence when exposed to visceral (*L. infantum*) and cutaneous parasitic species (*L. amazonensis*, *L. guyanensis* and *L. shawi*). Uptake of parasites by PMN was confirmed by optical microscopy. Laboratory techniques were used to evaluate the PMN activation by assessing oxidative mechanisms, namely the production of ion superoxide exocytosis, exocytosis of granules rich in proteolytic enzymes, as is the specific case of neutrophil elastase (NE) and cathepsin G (CatG) and the release of extracellular traps (NET). It was found that the species of *Leishmania* induce CatG exocytosis and NET release, regardless of the immune competence of the studied subjects. On the contrary, in the case of oxidative stress or the release of NE some differences were observed between PMN from healthy and immunocompromised individuals. All species of *Leishmania* induced oxidative stress, with production of superoxide ion in PMN of healthy individuals. However, PMN of immunocompromised individuals just seems to be activated in the presence of *L. infantum* and *L. amazonensis* parasites, pointing to the possible existence of more than one activation mechanism in association with the immune competence of the host that can be specifically primed by a particular parasite species. A similar situation was observed in the exocytosis of granules rich in NE. *L. infantum* and *L. shawi* stimulated the release of NE by PMN isolated from healthy and immunocompromised individuals. However, PMN from individuals with impaired immunity also appeared to respond to *L. amazonensis* parasites while *L. guyanensis* only induced PMN from healthy individuals to exocytosis NE. These findings suggest that the presence of specific features in the activation of these particular mechanisms might be related to the species of *Leishmania* and also to the immune status of the host. Additional studies are needed to clarify the activation process and identify parasitic antigens (or even CpG islands) that direct cell activation.

Keywords: Immune competence, Neutrophils, *Leishmania* spp, Oxidative pathways, Exocytosis, NET

Índice

Comunicações	iii
Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Abreviaturas	xiii
1. Introdução	1
1.1. Leishmaniose – conceitos gerais.....	2
1.1.1. Distribuição geográfica e Epidemiologia.....	2
1.1.2. Manifestações clínicas	4
1.1.3. <i>Leishmania</i> - Ciclo de vida	5
1.2. Flebótomo – Vetor.....	6
1.3. Hospedeiros	7
1.3.1. Hospedeiro vertebrado.....	7
1.3.2. Hospedeiro invertebrado – Vetor.....	9
1.4. Diagnóstico de leishmaniose	9
1.4.1. Diagnóstico parasitológico	9
1.4.2. Teste de hipersensibilidade retardada.....	10
1.4.3. Testes serológicos.....	11
1.4.4. Diagnóstico molecular	12
1.5. Tratamento.....	13
1.5.1. Fármacos.....	13
1.5.1.1. Antimoniais Pentavalentes.....	13
1.5.1.2. Anfotericina B	14
1.5.1.3. Miltefosine.....	14
1.5.1.4. Paromomicina	14
1.5.1.5. Pentamidina	15
1.5.2. Fármacos utilizados em situação de imunossupressão	15
1.6. Prevenção.....	15
1.6.1. Inseticidas	15
1.6.2. Vacinas	16
1.6.2.1. Leishmaniose humana	16
1.6.2.2. Leishmaniose canina.....	17
1.7. Sistema Imunitário.....	18
1.7.1. Sistema Imunitário Inato.....	19

1.7.1.1. Neutrófilos	22
1.8. Hospedeiro imunocomprometido	25
1.8.1. Desnutrição	25
1.8.2. Doença renal crónica	26
1.8.3. Vírus da imunodeficiência humana	29
1.9. Objetivos.....	31
2. Materiais e Métodos.....	32
2.1. Amostras biológicas e Parasitas.....	33
2.1.1. Dadores de amostras biológicas.....	33
2.1.2. Parasitas	34
2.1.2.1. <i>Leishmania infantum</i>	34
2.1.2.2. <i>Leishmania amazonensis</i>	34
2.1.2.3. <i>Leishmania shawi</i>	34
2.1.2.4. <i>Leishmania guyanensis</i>	35
2.1.2.5. Cultura de promastigotas	35
2.1.2.6. Contagem de promastigotas.....	35
2.2. Células polimorfonucleares	36
2.2.1. Isolamento e purificação de PMN humanos	36
2.2.1.1. Viabilidade celular.....	37
2.2.1.2. Contagem das células viáveis	37
2.2.1.3. Pureza neutrófilica.....	37
2.2.1.4. Taxa de infeção dos neutrófilos	38
2.3. Resposta imunitária inata.....	38
2.3.1. Respiração oxidativa.....	39
2.3.1.1. Produção de ião superóxido por neutrófilos	39
2.3.2. Exocitose granular	41
2.3.2.1. Exocitose de elastase neutrofilica e catepsina G	41
2.4. NET.....	42
2.5. Meio condicionado de linfócitos (MCLinf).....	44
2.5.1. Células mononucleares	44
2.5.1.1. Separação e diferenciação de células mononucleares.....	44
2.5.2. Mitogénio.....	46
2.5.2.1. Proliferação linfocitária	46
2.5.3. Teste de algutinação direta	46
2.5.3.1. Antigénio	46
2.5.3.2. Soros	47
2.5.4. Metodologia de execução do DAT	47

2.6. Análise estatística	49
3. Resultados	51
3.1. DAT	52
3.1.1. Os participantes do estudo não evidenciaram contacto anterior com <i>L. infantum</i>	52
3.2. Pureza e infeção dos neutrófilos	52
3.2.1. A metodologia aplicada permitiu obter suspensões de neutrófilos com elevado nível de pureza	52
3.2.2. Promastigotas de <i>Leishmania</i> spp. são fagocitados por PMN de indivíduos saudáveis e de indivíduos imunocomprometidos.....	53
3.3.1. PMA e MCLinf foram selecionados como controlos positivos.....	54
3.4. Distribuição da amostra	55
3.5. Respiração oxidativa e exocitose granular.....	56
3.5.1. Ião Superóxido.....	56
3.5.1.1. <i>Leishmania</i> spp. induz PMN de indivíduos saudáveis a produzir ião superóxido.....	56
3.5.1.2. <i>L. infantum</i> e <i>L. amazonensis</i> induzem a produção do ião superóxido por PMN de indivíduos imunocomprometidos.....	57
3.5.1.3. PMN de indivíduos saudáveis evidenciam maior capacidade de produção de ião superóxido quando incubados na presença de <i>L. infantum</i>	59
3.5.2. Exocitose de CatG e NE	60
3.5.2.1. <i>Leishmania</i> spp. induz a exocitose de CatG por PMN de indivíduos saudáveis	60
3.5.2.2. <i>Leishmania</i> spp. induz a exocitose da CatG por PMN de indivíduos imunocomprometidos.....	64
3.5.2.3. <i>L. guyanensis</i> é a espécie de <i>Leishmania</i> que induz maior exocitose de CatG.....	67
3.5.2.4. PMN de indivíduos saudáveis exocitam mais CatG quando expostos a promastigotas de <i>L. infantum</i> e de <i>L. amazonensis</i>	67
3.5.2.5. <i>L. infantum</i> , <i>L. shawi</i> e <i>L. guyanensis</i> induzem a exocitose de NE por PMN de indivíduos saudáveis	68
3.5.2.6. <i>L. infantum</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. shawi</i> induzem a exocitose de NE em indivíduos imunocomprometidos.....	71
3.5.3. <i>Leishmania</i> spp. induz a libertação de NET	74
3.5.3.1. <i>L. shawi</i> e <i>L. amazonensis</i> libertam maior quantidades de NET	76
4. Discussão e Conclusões	77
5. Bibliografia	86

Índice de figuras

Figura 1: Imagem ilustrativa da estrutura celular da forma amastigota (A) e promastigota (B) de <i>Leishmania</i>	6
Figura 2: Ciclo de transmissão antroponótica e zoonótica de <i>Leishmania</i>	8
Figura 3: Esquematização do processo de liberação de NET.	25
Figura 4: Modelo de leishmaniose em indivíduos transplantados.	28
Figura 5: Isolamento e purificação de PMN.	37
Figura 6: Esquema ilustrativo do ensaio colorimétrico de NBT para quantificação do ião superóxido.....	41
Figura 7: Isolamento de células mononucleares a partir de sangue periférico de humano.	45
Figura 8: Imagem ilustrativa da interação anticorpo-antígeno.....	47
Figura 9: DAT.....	49
Figura 10: Morfologia de neutrófilos humanos.....	52
Figura 11: Indutores da atividade de PMN.	54
Figura 12: Respiração oxidativa de PMN de indivíduos saudáveis quando expostos a parasitas de <i>Leishmania</i> spp.....	57
Figura 13: Respiração oxidativa em PMN de indivíduos imunocomprometidos expostos a promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	58
Figura 14: Comparação da respiração oxidativa em PMN de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos expostos a promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.....	60
Figura 15: Exocitose de CatG por PMN de indivíduos saudáveis expostos a promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	63
Figura 16: Exocitose de Cat G por PMN de indivíduos imunocomprometidos expostos a promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	66
Figura 17: Comparação dos níveis de atividade enzimática da CatG libertada por PMN de indivíduos imunocomprometidos expostos a promastigotas de <i>Leishmania</i> spp. ao fim de 30 min de incubação com o substrato.	67
Figura 18: Comparação dos níveis de atividade de CatG libertada por PMN de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos expostos a promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	68
Figura 19: Exocitose de elastase neutrofílica por PMN de indivíduos saudáveis quando expostos a promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.....	70
Figura 20: Exocitose de elastase neutrofílica por PMN de indivíduos imunocomprometidos expostos a promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.....	73
Figura 21: Liberação de NET por PMN humanos na presença de <i>Leishmania</i> spp.....	75
Figura 22: Formação de armadilhas extracelulares neutrofílicas por PMN de indivíduos imunocomprometidos.....	76

Índice de tabelas

Tabela 1: Taxa de infecção de neutrófilos humanos com espécies diferentes de <i>Leishmania</i> .	53
Tabela 2: Resultado estatístico da normalidade da amostra.....	55

Lista de Abreviaturas

- APC** - Células apresentadoras de antígeno, do inglês *antigen-presenting cells*
- CatG** – Catepsina G, do inglês *cathepsin G*
- CCR5** - Recetor da quimiocina C-C do tipo 5, do inglês *chemokine receptor type 5*
- CKD** - Doença renal crónica, do inglês *chronic kidney disease*
- Cl⁻** - Anião de cloreto
- CL** - Leishmaniose cutânea, do inglês *cutaneous leishmaniasis*
- ConA** - Concanavalina A, do inglês *concanavalin A*
- CPDA** – Citrato, fosfato, dextrose, adenina, do inglês *citrate phosphate dextrose adenine*
- CSF** - Fator estimulador de colónias, do inglês *colony stimulating factor*
- DAT** - Teste de aglutinação direta, do inglês *direct agglutination test*
- DC** - Células dendríticas, do inglês *dendritic cells*
- DCL** - Leishmaniose cutânea difusa, do inglês *diffuse cutaneous leishmaniasis*
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico, do inglês *desoxyribonucleic acid*
- DRT** - Estágio final da doença renal, do inglês *end-stage renal disease*
- ELISA** - Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- FBS** – Soro fetal bovino, do inglês *bovine fetal serum*
- H⁺** - Radicais livres de hidrogénio
- HAART** - Terapia anti-retroviral altamente ativa, do inglês *highly active antiretroviral therapy*
- HBSS** - Solução salina equilibrada de Hank, do inglês *Hank's balanced salt solution*
- HCl** – Ácido clorídrico
- HIV** – Vírus da imunodeficiência adquirida, do inglês *“human immunodeficiency virus”*
- H₂O₂** - Peróxido de hidrogénio
- HOCL** - Ácido hipocloroso

IC- imunocromatografia, do inglês *Immunochromatographic assay*

IFA – Ensaio de imunofluorescência indireta, do inglês *Indirect fluorescent antibody assay*

IFN- γ - Interferão gama, do inglês “*interferon gamma*”

IL – Interleucina, do inglês *interleukin*

IP-10 - Interferão gama-indutível proteína 10, do inglês “*gamma interferon-inducible protein*”

kDNA - DNA do cinetoplasto, do inglês “*kinetoplast DNA*”

KMP-11 - Proteína 11 da membrana do cinetoplasto, do inglês “*kinetoplastid membrane protein-11*”

LPG – Lipofosfoglicano, do inglês *lipophosphoglycan*

LPS - Lipopolissacarídeo, do inglês *lipopolysaccharide*

LTF - Lactotransferrina, do inglês *lactotransferrin*

MBL - Lectina de ligação à manose, do inglês *mannan-binding lectin*

MCL - Leishmaniose mucocutânea, do inglês *mucocutaneous leishmaniasis*

MCLinf - Meio condicionante de linfócitos

medRNA - RNA derivado de mini exão de, do inglês *miniexon-derived RNA*

MHC - Complexo major de histocompatibilidade, do inglês *major histocompatibility complex*”

MO – Microscopia óptica

MPO – Mieloperoxidase, do inglês *myeloperoxidase*

NaCl - Cloreto de sódio

NBT – Azul de tetrazólio, do inglês *nitroblue tetrazolium*

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida, do inglês *reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NE – Elastase neutrófilica, do inglês *neutrophil elastase*

NET – Armadilhas extracelulares de neutrófilos, do inglês *neutrophil extracellular traps*

NF-kB - Fator nuclear kB, do inglês *nuclear factor kappa B*

NK - do inglês *natural killer*

O₂⁻ - Ião superóxido

OH - Hidróxido

OMS/WHO - Organização Mundial de Saúde, do inglês *World Health Organization*

OsO₄ - Tetróxido de ósmio, do inglês *osmium tetroxide*

PAD4 - Peptidilarginina deiminase 4, do inglês *peptidylarginine deiminase 4*

PAMP - Oadrões moleculares comuns a agentes patogénicos, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*

PBS - Tampão fosfato salino, do inglês *phosphate buffered saline*

PCR - Reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*

PHA - Fitohemaglutinina, do inglês *phytohemagglutinin*

PKDL - Leishmaniose cutânea pós-kala-azar, do inglês *post-kala-azar dermal leishmaniasis*

PMA - Acetato de forbol miristato, do inglês *phorbol myristate acetate*

PMN - Leucócitos polimorfonucleares, do inglês *polymorphonuclear leukocytes*

RNA - Ácido ribonucleico, do inglês *ribonucleic acid*

ROS – Espécies reativas de oxigénio, do inglês *reactive oxygen species*

RPMI - do inglês *Roswell Park Memorial Institute culture médium*

SCHN - Meio de Schneider do inglês *Schneider's Insect Medium*

SDS - Dodecil sulfato de sódio, do inglês *sodium dodecyl sulfate*

SIDA - Síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês *acquired immune deficiency syndrome*

SOD - Superóxido dismutase, do inglês *superoxide dismutase*

TA- Temperatura ambiente

Tc - Linfócitos T citotóxicos, do inglês *T-cytotoxic*

Th – Linfócitos T auxiliares, do inglês *T-helper*

TLR - Recetores *Toll-like*

TNF- Fator de necrose tumoral, do inglês *tumoral necrosis factor*

Ts - Linfócitos T reguladores/supressor, do inglês *T-suppressor*

VL – Leishmaniose visceral, do inglês *visceral leishmaniasis*

1. Introdução

1.1. Leishmaniose – conceitos gerais

A leishmaniose é uma doença negligenciada associada a regiões socioeconômicas mais desfavorecidas e a climas tropicais e subtropicais. Esta doença é causada pelo protozoário pertencente à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Bates *et al.*, 2015)

Leishmania é classificada em dois subgêneros (Lainson *et al.*, 1987), o subgênero *Leishmania* encontrado no Novo Mundo (América) e no Velho Mundo (Europa, Ásia e África) e o subgênero *Viannia* que apenas existe no Novo Mundo. Esta classificação em dois subgêneros tem por base as diferenças anatômicas associadas ao desenvolvimento do parasita no intestino do flebótomo (WHO, 2010). No subgênero *Leishmania*, o desenvolvimento do parasita ocorre ao nível do intestino médio (suprapilário) do flebótomo e no subgênero *Viannia* verifica-se ao nível do intestino posterior (peripilário) (Pace, 2014).

A transmissão mais usual do parasita ocorre pela picada do inseto fêmea do gênero *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1843 no Velho Mundo e *Lutzomyia* França, 1924, no Novo Mundo. Ambos os gêneros incluem-se na família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*. Apesar de ser menos comum, *Leishmania* também pode ser transmitida por via endovenosa, através da partilha de seringas e agulhas, por transfusão sanguínea ou por via congênita, de mãe para filho, durante o período de gestação (WHO, 2010).

A leishmaniose pode apresentar três formas clínicas principais, leishmaniose visceral (VL, do inglês *visceral leishmaniasis*), leishmaniose cutânea (CL, do inglês *cutaneous leishmaniasis*) e leishmaniose mucocutânea (MCL, do inglês *mucocutaneous leishmaniasis*) (Elmahallawy *et al.*, 2014).

1.1.1. Distribuição geográfica e Epidemiologia

A incidência dos casos de leishmaniose tem aumentado nos últimos anos a nível mundial, sendo uma doença emergente e re-emergente, endêmica em regiões tropicais e subtropicais, reportada em 98 países, presente em todos os continentes, exceto Antártida (Alvar *et al.*, 2012). As condições climáticas, como temperaturas amenas a elevadas e altos níveis de humidade são fatores ambientais que influenciam o ciclo de vida do vetor responsável pela transmissão de *Leishmania*, podendo alterar a sua distribuição, a densidade populacional, assim como, favorecer a probabilidade de infeção de

hospedeiros vertebrados (reservatórios) (WHO, 2010). O risco de infecção por *Leishmania* está também associado a fatores extrínsecos como a migração humana (imigrantes não imunes), má nutrição, imunossupressão, urbanização de regiões silváticas, tipo de estrutura habitacional, alterações climáticas, sistemas de irrigação ou a fatores intrínsecos como a espécie de parasita ou a capacidade de adaptação do parasita a diferentes hospedeiros vertebrados (WHO, 2010; Kumar & Engward, 2014).

Indivíduos imunodeprimidos, infetados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*) ou com o síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, do inglês *acquired immune deficiency syndrome*) (número de células $CD4^+ < 200$ células. μL^{-1}) apresentam risco aumentado de desenvolver doenças oportunistas, devido à fragilidade imunitária existente. Uma das doenças associadas à infecção viral pode ser leishmaniose, dado que *Leishmania* é um parasita oportunista, especialmente para indivíduos imunodeprimidos residentes em áreas endêmicas.

Usualmente, indivíduos com co-infecção $HIV^+/Leishmania$ possuem cargas parasitárias muito elevadas, contribuindo para o aumento da disseminação da infecção, reduzindo a probabilidade de uma resposta terapêutica eficaz, agravando a evolução do quadro clínico (Alvar *et al.*, 2008; WHO, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*) estima-se que existam 1.3 milhões de novos casos de leishmaniose todos os anos, sendo 1 milhão de CL e MCL e 300.000 de VL, estando em risco de infecção 200 milhões de pessoas (WHO, 2015). Cerca de 90% dos casos de VL ocorre no Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia e Sudão, enquanto a maioria dos casos de CL ocorre no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irão, Paquistão, Perú, Arábia Saudita e Síria. Os casos de MCL ocorrem maioritariamente (90%) na Bolívia, Brasil e Perú, sendo as pessoas infetadas, usualmente, residentes em áreas longínquas do meio urbano e com pouco acesso a cuidados de saúde (WHO, 2013).

Na Europa, *L. infantum* é a espécie de *Leishmania* com maior presença na região do mediterrâneo, causando leishmaniose visceral zoonótica em cães (reservatório) e em humanos. Devido à mobilização dos animais de estimação, como o cão, subsiste o risco de se introduzir *L. infantum* no norte da Europa. Porém, com a reduzida presença do vetor nesta região da Europa associado a baixas temperaturas, a transmissão teria de ser maioritariamente não vetorial, ou seja, através de contato entre os próprios canídeos (Ready, 2014).

A VL causada por *L. infantum* tem uma maior ocorrência numa faixa etária infantil, normalmente, inferior aos cinco anos de idade (WHO, 2010). A imunossupressão, quer causada por HIV⁺ quer por outros fatores e/ou doenças, é cada vez mais um fator de risco para o desenvolvimento de leishmaniose a nível mundial, podendo modificar a apresentação clínica da doença e a diminuição da capacidade de uma resposta terapêutica eficaz (Alvar *et al.*, 2008; Van Griensven *et al.*, 2014).

Em Portugal, a partir dos anos 80 verificou-se um crescimento do número de casos de VL em pacientes com HIV⁺/SIDA (Campino & Maia, 2010). No Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Lisboa, Portugal) foram diagnosticados, entre 2005 e 2014, 16 casos de CL e 119 casos de VL, dos quais 66 casos eram indivíduos imunocomprometidos, 17 em adultos imunocompetentes e 36 em crianças (Maia *et al.*, 2015). *L. infantum* zimodeme MON-1 é a estirpe infetante predominante em casos de leishmaniose humana e canina, em Portugal (Campino *et al.*, 2006).

Com base em dados recolhidos em estudos de seroprevalência, estima-se que existam 2,5 milhões de cães infetados com *L. infantum* em Espanha, França, Itália e Portugal. Em Portugal Continental, Trás-os-Montes e Alto Douro, a região de Lisboa e Vale do Tejo e o concelho de Évora e Algarve são consideradas regiões endémicas (Schallig *et al.*, 2014; ONLEISH, 2015)

1.1.2. Manifestações clínicas

No velho mundo, CL pode ser causada por *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* ou *L. infantum* (syn *L. chagasi*; esta espécie descrita na América Latina parece ser indistinta de *L. infantum* molecular e geneticamente, sendo por isso consideradas espécies sinónimas) e no novo mundo pode ser causada por *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. guayanensis* ou *L. shawi*. CL é a forma clínica mais comum, representado 50% a 75% dos casos de leishmaniose existentes. As manifestações clínicas ocorrem com eritema e lesões cutâneas, como úlceras, sendo encontrado nas lesões parasitas na forma amastigota, tendo assim os flebótomos fêmeas acesso a amastigotas infecciosos, reproduzindo-se o ciclo de infeção. Uma variante desta forma clínica é a leishmaniose cutânea difusa (DCL, do inglês *diffuse cutaneous leishmaniasis*), causada por *L. amazonensis* e *L. aethiopica*, presente na América e África, respetivamente. Esta variante clínica, caracterizada pelo desenvolvimento de

lesões nodulares e inexistência de úlceras é uma forma rara e grave, em que o indivíduo infectado não consegue gerar uma resposta imunitária adequada à eliminação do parasita (WHO, 2010; Ameen, 2010).

MCL, espúndia ou leishmaniose mucocutânea mais comum no hemisfério ocidental, é causada por parasitas do complexo *L. braziliensis* (Novo Mundo), que inclui *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. colombiensis* e *L. peruviana*. Após infecção, o parasita dispersa-se por via linfática e/ou sanguínea, atingindo as mucosas bucais e nasais, originando uma resposta inflamatória exacerbada, com consequente destruição de cartilagens. Por regra, existe uma resposta imunitária débil do indivíduo ao tratamento (Ameen, 2010; WHO, 2010).

VL, causada por espécies do complexo *L. donovani*, que inclui *L. infantum* e *L. donovani*, também é conhecida por kala-azar ou febre dumdum. Esta forma clínica, caracterizada por anemia, esplenomegalia, hepatomegalia e febre, é a mais severa e fatal das leishmanioses, levando à morte se não for tratada. Leishmaniose cutânea pós-kala-azar (PKDL, do inglês *post-kala-azar dermal leishmaniasis*) ocorre após o tratamento e cura clínica de VL. PKDL é caracterizada por erupções, nódulos ou pápulas parasitadas que podem cobrir todo o corpo. Esta forma clínica predomina na região do leste de África e no subcontinente indiano (Ameen, 2010; Elmahallawy *et al.*, 2014; Pace, 2014).

1.1.3. *Leishmania* - Ciclo de vida

Leishmania é um parasita protozoário com ciclo de vida heteroxénico, ou seja, desenvolve-se em dois hospedeiros diferentes (invertebrado e vertebrado). Para completar o seu ciclo de vida necessita de uma transmissão eficaz entre o hospedeiro vertebrado e o vetor. Possui duas formas morfológicas no seu ciclo de vida, a forma amastigota intracelular e sem flagelo nos hospedeiros vertebrados e a forma promastigota, extracelular e flagelada no tubo digestivo dos flebótomos (hospedeiro invertebrado).

A forma amastigota tem cerca de 3-5 μm de diâmetro, apresenta forma arredondada ou ovoide, núcleo central, cinetoplasto e flagelo que termina junto do folheto interno da membrana celular (Fig. 1 A). A forma promastigota (Fig. 1 B) tem cerca 15-20 μm de comprimento e 1,5-3 μm de largura, possui formato fusiforme, núcleo central,

cinetoplasto situado na extremidade anterior do parasita e flagelo livre (Rey, 2002; Pace, 2014).

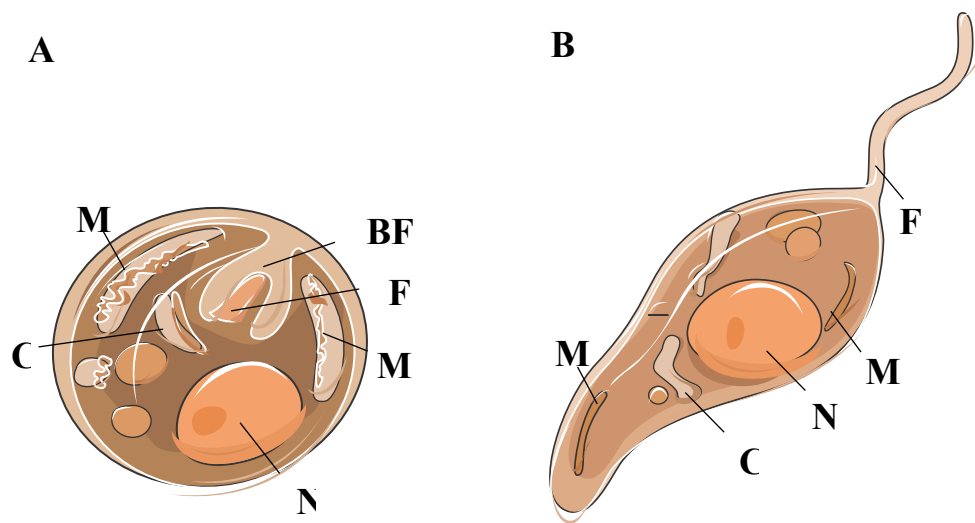


Figura 1: Imagem ilustrativa da estrutura celular da forma amastigota (A) e promastigota (B) de *Leishmania*.

F-flagelo; BF- bolsa flagelar; C-cinetoplasto; M-mitocôndria; N-núcleo (Adaptado de Servier Medical Art).

1.2. Flebótomo – Vetor

O flebótomo é um inseto artrópode, pertencente à Ordem *Diptera*, à Família *Psychodidae* e à SubFamília *Phlebotominae*. Unicamente as fêmeas deste inseto têm capacidade vetorial para a transmissão de *Leishmania*, pois são hematófagas, ou seja, necessitam de fazer uma refeição sanguínea para assegurar a maturação dos ovos (Cook, 1996; WHO, 2010). A classificação de flebótomos nunca foi consensual, existindo alguns gêneros aceites, contudo apenas dois incluem todos os vetores de transmissão de *Leishmania*, *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Alexander & Young, 1992; WHO, 2010).

As características morfológicas continuam a ser as mais comumente usadas para distinguir espécies de flebótomos, apesar de terem estado a ser desenvolvidos critérios de identificação dos flebótomos com base em técnicas de biologia molecular (WHO, 2010). Os flebótomos não possuem mais de 3 mm de comprimento, apresentam coloração que varia de preto ao branco e posicionam as suas asas em forma de V sobre o abdómen (Killick-Kendrick, 1999).

Possuem atividade crepuscular, apesar de se terem encontrado espécies com atividade diurna. Após a refeição sanguínea, para maturação dos ovos, as fêmeas podem repousar num ambiente intra-domiciliário (endófilo) ou extra domiciliário (exófilo). Tendencialmente, os flebótomos não voam mais do que distâncias de 1 m de altura e 200 m de distância, contudo estas características são dependentes da espécie. Dado que a distância que os flebótomos voam é geralmente curta, existe uma propensão para picar o mesmo hospedeiro (Killick-Kendrick, 1999).

1.3. Hospedeiros

1.3.1. Hospedeiro vertebrado

A infecção por *Leishmania* afeta seres humanos, animais domésticos e silváticos. De acordo com os ciclos de transmissão, a leishmaniose pode ser agrupada em antroponótica ou zoonótica tendo em consideração a fonte da infecção humana. Na transmissão antroponótica, o reservatório é o Homem, sendo transmitida de pessoa a pessoa através do vetor (WHO, 2010) (Fig. 2 A). A transmissão zoonótica ocorre em ciclos domésticos ou silváticos, envolvendo mais do que um hospedeiro vertebrado na transmissão do parasita ao Homem (Fig. 2 B). Os hospedeiros envolvidos podem ser roedores e cães (reservatórios mais comuns), entre outros, podendo desempenhar funções de reservatórios (mantêm o parasita e está envolvido na sua transmissão) ou de hospedeiros acidentais. O tipo de reservatório ou hospedeiro depende da espécie de *Leishmania* (Andrade *et al.*, 2015).

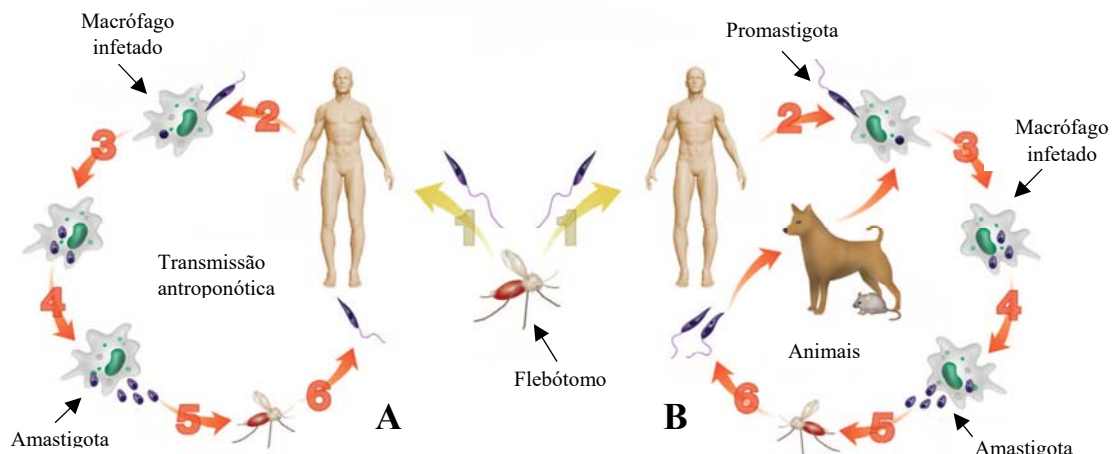


Figura 2: Ciclo de transmissão antroponótica e zoonótica de *Leishmania*.

O flebótomo fêmea inocula a forma promastigota de *Leishmania* na pele do hospedeiro, aquando da refeição sanguínea (1), sendo os parasitas fagocitados por macrófagos (2) convertendo-se na forma amastigota (3). Dentro dos fagolisossomas dos macrófagos, os amastigotas multiplicam-se por divisão binária (4). Os macrófagos infectados podem ser sugados durante a refeição sanguínea do flebotomíneo fêmea (5). Ao nível do intestino médio do flebotomíneo, a forma amastigota é convertida na forma promastigota (6), podendo voltar a ser transmitido a outro hospedeiro humano (transmissão antroponótica, A) ou animal que atua como reservatório (transmissão zoonótica, B) (adaptada de Kumar & Engwerda, 2014).

Após a inoculação pelo vetor de promastigotas no hospedeiro, aquando da refeição sanguínea, a glicoproteína de 63 kDa (gp63) dos promastigotas é reconhecida pelos recetores de lectina presentes na superfície de membrana dos macrófagos e neutrófilos, facilitando a internalização do parasita (Lieke *et al.*, 2008). Nos macrófagos, após a fagocitose do parasita, os fagossomas fundem-se com os lisossomas, originando os fagolisossomas que têm um ambiente ácido (pH ~5.0) e rico em enzimas proteolíticas. É neste ambiente, pouco propício à persistência de microrganismos, que ocorre a multiplicação dos amastigotas. Quando atingem um elevado número, a célula não consegue comportar mais parasitas, ocorrendo a lise celular e a consequente libertação de amastigotas. Após a libertação de quimiocinas, IL-1 e TNF por macrófagos que recrutam outros monócitos/macrófagos circulantes, estes amastigotas são novamente internalizados por outros macrófagos, as células hospedeiras por excelência deste parasita, repetindo-se o ciclo de fagocitose e infeção. Numa nova refeição sanguínea do vetor, este ingere macrófagos parasitadas por amastigotas, ocorrendo posteriormente, no

interior do intestino do hospedeiro invertebrado, durante o processo de digestão sanguínea, a lise celular e a diferenciação dos amastigotas em promastigotas (Cook, 1996; Van Zandbergen *et al.*, 2002; Pace, 2014).

1.3.2. Hospedeiro invertebrado – Vetor

No hospedeiro invertebrado, o ciclo de vida de *Leishmania* ocorre no intestino médio. Durante a refeição sanguínea do vetor em hospedeiros infetados, ocorre a ingestão de sangue ou de linfa intersticial onde se encontram macrófagos infetados com amastigotas, passando o flebótomo a ser um vetor infetado. No intestino do flebótomo, os parasitas ingeridos na forma amastigota sofrem alterações morfológicas e fisiológicas decorrentes da diminuição de temperatura e aumento do pH, bem como, alterações bioquímicas e moleculares, diferenciando-se na forma promastigota, que podem originar promastigotas procíclicos (replicativos) e promastigotas metacíclicos (Rey, 2002; Dostalova & Volf, 2012)

A forma procíclica é a fase replicativa primária, não infecciosa, originada após a ingestão sanguínea. Apresenta um flagelo curto e multiplica-se intensamente por fissão binária longitudinal. Após 48 h - 72 h, diferencia-se a forma promastigota metacíclica, caracterizada por um flagelo longo e extremamente móvel que se desloca para a porção anterior do estômago (válvula estomodeal) do flebótomo. A acumulação de parasitas junto da válvula dificulta a sucção aspirativa de sangue, obrigando o vetor a efetuar picadas sucessivas no hospedeiro vertebrado de modo a conseguir ingerir o sangue necessário. Em cada picada, com a contração e relaxamento do aparelho muscular de sucção, mais parasitas se deslocam para o proboscis, sendo inoculados na derme do hospedeiro vertebrado (Rey, 2002, Dostalova & Volf, 2012).

1.4. Diagnóstico de leishmaniose

1.4.1. Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico parasitológico padrão e de confirmação de leishmaniose cutânea e visceral é a observação direta de amastigotas por microscopia ótica, a partir de uma amostra de material biológico, como sangue (amostra não invasiva) ou aspirado da medula óssea, esplênico ou de gânglios linfáticos, obtido através de métodos invasivos (punção) (Srivastava *et al.*, 2011; Adams *et al.*, 2012). O diagnóstico definitivo de VL é

efetuado por observação microscópica de amastigotas nas amostras biológicas, tendo uma sensibilidade de 60% a 80% (Elmahallawy *et al.*, 2014; Pace, 2014).

A sensibilidade da técnica depende do tipo de material biológico utilizado, do nível de carga parasitária, da qualidade da preparação das lâminas de microscopia e da experiência do técnico de diagnóstico. Para aumentar a sensibilidade do diagnóstico, pode ser desenvolvido em paralelo o isolamento do parasita em meio de cultura.

Para o diagnóstico da leishmaniose cutânea ou mucocutânea, a técnica de observação microscópica não é mais indicada, tendo uma sensibilidade variável, dependendo da lesão do paciente e da espécie de *Leishmania*. Além do mais, nas lesões mucosas a presença de parasitas é baixa, devido à resposta imunitária que se faz sentir no local da infecção. A amostra recolhida no interior das lesões influencia a sensibilidade do diagnóstico parasitológico. Para uma sensibilidade elevada deve ser recolhido material biológico do bordo lateral da úlcera. A utilização da técnica de cultura do parasita, desenvolvida em paralelo, eleva a sensibilidade do diagnóstico para 85% (Elmahallawy *et al.*, 2014; Pace, 2014).

1.4.2. Teste de hipersensibilidade retardada

O teste de Montenegro avalia a hipersensibilidade retardada a um extrato parasitário, funcionando como um indicador de imunidade mediada por células contra *Leishmania*. A reação ao inóculo, que se pode traduzir por inflamação ou erupção cutânea e endurecimento do local é avaliado 48 h após uma injeção intradérmica de antígenos de *Leishmania*. Em pacientes não infetados, ocorre uma reação inflamatória mínima, sendo considerado negativo se a área sensibilizada for inferior a 5 mm. O teste é considerado positivo quando ocorre uma reação inflamatória intensa, podendo ocorrer pequenas ulcerações na pele. Em indivíduos imunodeprimidos (estado imunitário debilitado) ou numa infecção primordial, poderá ocorrer um falso negativo. Este teste pode inclusive revelar-se positivo após tratamento bem-sucedido. Não permite distinguir infecções atuais de infecções passadas, contudo é útil para estudos epidemiológicos e monitorização da proteção imunitária contra a leishmaniose. Além do mais, não existe um antígeno padronizado, sendo muitas vezes oriundos de diferentes espécies, levando a resultados discordantes (Gidwani *et al.*, 2009).

1.4.3. Testes serológicos

Dependendo do tipo, os testes serológicos de diagnóstico podem ser uma boa opção para aplicar no terreno, nos países de baixa renda e/ou em áreas endêmicas, não carecendo, por regra, de muitos recursos económicos e laboratoriais. Contudo, estes devem ser sempre acompanhados de testes parasitológicos de confirmação (Chappuis *et al.*, 2007).

Testes serológicos de diagnóstico têm sido desenvolvidos ao longo dos anos para VL, tais como, o teste de aglutinação direta (DAT, do inglês “*Direct Agglutination Test*”), o de imunofluorescência indireta (IFA, do inglês “*Indirect immunofluorescence assay*”), ELISA (do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*), *Western blotting* e imunocromatografia (IC, do inglês *Immunochromatographic assay*), tendo todos eles por base a deteção de anticorpos anti *Leishmania* (Elmahallawy *et al.*, 2014).

Atualmente são utilizados testes serológicos rápidos, como IC ou ELISA, utilizando a proteína recombinante rK39 e rK8, derivada do complexo *L. donovani*, revelando elevados níveis de sensibilidade e especificidade para deteção de anticorpos, tendo uma excelente aplicabilidade para diagnóstico precoce de VL (Pattabhi *et al.*, 2010; Vaish *et al.*, 2011; Elmahallawy *et al.*, 2014).

É possível determinar níveis de reatividade dos testes associados a doença. A partir de um valor de *cut off* de títulos de anticorpos poder-se-á considerar positivo para doença. Abaixo desse título podemos estar perante uma infeção recente, reações cruzadas ou poeira de anticorpos. Em áreas endêmicas é usual encontrar indivíduos sem história clínica de leishmaniose mas com um baixo título de anticorpos anti-*Leishmania*. A especificidade destes testes depende do antigénio utilizado e da metodologia aplicada (Elmahallawy *et al.*, 2014; Pace, 2014).

Testes de diagnóstico rápido com base na deteção de antigénios de *Leishmania* presentes na urina dos indivíduos, como o teste de aglutinação em látex, revelam-se úteis para o diagnóstico de VL em indivíduos com uma produção deficitária de anticorpos, revelando uma elevada percentagem de sensibilidade e especificidade em indivíduos imunocomprometidos (Vilaplana *et al.*, 2004).

1.4.4. Diagnóstico molecular

Ensaio moleculares baseados em técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) são dirigidos a alvos moleculares, como o ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto (kDNA, do inglês *kinetoplast deoxyribonucleic acid*), ácido ribonucleico (RNA, do inglês *ribonucleic acid*) ribossomal, gene β -*tubulina* ou derivados de mini exões de RNA (medRNA, do inglês *miniexon-derived RNA*) de *Leishmania*, utilizando como material biológico sangue periférico ou aspirados, que são ótimos para diagnóstico. Esta técnica apresenta elevados níveis de sensibilidade e de especificidade, superiores à observação microscópica, sendo muito eficiente mesmo na presença de pequenas quantidades de material biológico ou de baixas cargas parasitárias. Permite ainda fazer a identificação de espécies de *Leishmania*, bem como identificar uma recaída ou reinfeção por *Leishmania*. A utilização de PCR é muito útil quando a carga parasitária é baixa ou a quantidade de amostra é muito reduzida. Esta técnica apresenta níveis elevados de sensibilidade, com uso de sequências iniciadoras adequadas, especialmente para a MCL, permitindo ainda a identificação da espécie de *Leishmania* presente na amostra. A sensibilidade do ensaio de PCR depende da amostra usada, como sangue periférico (sensibilidade de 70% a 100%), aspirados de baço ou de medula óssea (sensibilidade mais elevada, perto dos 100%). A amostra biológica ideal é o sangue periférico dado que pode ser obtido de forma não-invasiva. Para o diagnóstico de CL ou MCL deve utilizar-se amostras de tecidos ou aspirados (Ameen, 2010; WHO, 2010; Elmahallawy *et al.*, 2014; Pace, 2014).

O PCR Multiplex é utilizado para o diagnóstico de leishmaniose, bem como, para a determinação das espécies infetantes. Contudo, é economicamente e logisticamente difícil aplicar em países com poucos recursos laboratoriais, apesar de oferecer um diagnóstico rápido e eficaz para determinar o tratamento a aplicar (WHO, 2010).

Real Time PCR e sequenciamento do gene *citocromo b* são as técnicas moleculares usuais no diagnóstico clínico. *Real Time* PCR permite uma maior sensibilidade no diagnóstico de leishmaniose, detetando todas as espécies de *Leishmania* mesmo na presença de uma baixa carga parasitária, bem como o conhecimento quantitativo da carga parasitária presente na amostra. O sequenciamento do gene *citocromo b* possibilita a determinação da espécie infecciosa presente na amostra. Esta técnica facilita o diagnóstico e identificação da espécie de *Leishmania* com um elevado grau de

sensibilidade e especificidade, diminuindo o risco de contaminação em comparação ao PCR convencional (Foulet *et al.*, 2007).

1.5. Tratamento

1.5.1. Fármacos

O tratamento farmacológico de leishmaniose apenas deve ser iniciado após confirmação de doença. Por outro lado, *Leishmania* spp. difere na sua patogenicidade e suscetibilidade aos fármacos (Downing *et al.*, 2011), sendo a identificação das espécies de *Leishmania* importante para determinar o prognóstico clínico do doente e adequar o regime terapêutico a aplicar (Foulet *et al.*, 2007).

Na terapêutica a aplicar, para além de se ter em consideração a espécie de *Leishmania* deve-se também ter em conta a endemicidade da área geográfica, a eficácia do fármaco, a dosagem, a toxicidade, o estado imunitário do paciente de modo a avaliar o risco-benefício para o doente, incrementando o sucesso do tratamento. A disponibilidade da terapêutica leishmanicida e a prevenção à resistência aos medicamentos deve também ser tido em consideração de modo a reduzir a progressão da doença e, no caso de CL, limitar a probabilidade de formação de cicatrizes incluindo a redução do tamanho, do número e do potencial de disseminação das lesões (Ameen, 2010; WHO, 2010).

1.5.1.1. Antimoniais Pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes, antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio, são os fármacos mais utilizados. Estes fármacos variam na concentração de antimónio, influenciando, conseqüentemente, a toxicidade e eficácia. A administração pode ser intramuscular, endovenosa ou caso de CL, por via intradérmica no local das lesões (WHO, 2010). A partir dos anos 40 foi utilizado como fármaco de primeira linha no tratamento de VL, CL ou MCL (Croft, 2006), contudo são tóxicos, originando efeitos secundários adversos. Foi também verificado que dependendo da espécie de *Leishmania* que causa CL, a eficácia dos antimoniais pentavalentes tem-se revelado inconsistente. Contudo, continuam a ser os fármacos de primeira linha para o tratamento de leishmaniose (Ameen, 2010; Croft & Olliaro, 2011; Dorlo *et al.*, 2012; Sundar *et al.*, 2012).

1.5.1.2. Anfotericina B

A anfotericina B lipossomal (AmBisome®) veio substituir a anfotericina convencional (antifúngico) no tratamento de VL, especialmente na Europa (Bern *et al.*, 2006), sendo utilizada como fármaco de primeira linha em vários países (Croft & Olliaro, 2011; Murray, 2001). A sua toxicidade é mais baixa comparativamente à Anfotericina B convencional e possui uma elevada eficácia, dado a sua agregação com o ergosterol presente na superfície de *Leishmania*. Contudo devido ao elevado custo, a utilização é limitada em países de baixa renda (Dorlo *et al.*, 2012). O tratamento é realizado em ambiente hospitalar, pois é de administração endovenosa (WHO, 2010). A utilidade da anfotericina B lipossomal no tratamento de CL tem sido reconhecida enquanto que a anfotericina B convencional só tem efeito sobre alguns tipos específicos de CL (Wortmann *et al.*, 2010).

Alguns antifúngicos orais, tais como o fluconazol ou o itraconazol, também têm revelado eficácia, ainda que variável, no tratamento de leishmaniose (WHO, 2010; Croft & Olliaro, 2011).

1.5.1.3. Miltefosine

Desde o seu registo no ano de 2002, Miltefosine é o único fármaco de toma oral para o tratamento de leishmaniose, podendo ser usado para todos os tipos de leishmaniose, não carecendo de internamento do doente (Dorlo *et al.*, 2012). O seu mecanismo de ação ainda não é conhecido na totalidade, tendo estudos laboratoriais experimentais sugerido que induz a alteração do metabolismo fosfolipídico, provocando a apoptose dos agentes patogénicos (Dorlo *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2015).

1.5.1.4. Paromomicina

Paromomicina é um aminoglicosídeo de administração intramuscular usado em monoterapia ou em combinação com estibogluconato de sódio (Davidson *et al.*, 2009). Devido à sua eficácia, baixa toxicidade (WHO, 2010) e reduzidos efeitos secundários tem-se revelado promissor no tratamento de VL e CL, tendo sido licenciado para este fim em 2006 (Hendrickx *et al.*, 2015). Contudo a sua utilização não é muito usual, necessitando de monitorização para verificar e controlar mecanismos de resistência. Ainda não foi verificadas resistências *in vivo*, mas estas já foram demonstradas *in vitro*,

podendo induzir resistências secundárias especialmente em indivíduos imunocomprometidos, devido à elevada possibilidade de reinfeção (Davidson *et al.*, 2009).

1.5.1.5. Pentamidina

Isotionato de pentamidina (Pentacarinat®, Pentam®) tem sido utilizado no tratamento de VL e CL, especialmente em leishmanioses do Novo Mundo, possuindo um possível interesse para ser usado como profilaxia secundária em indivíduos com SIDA e VL. A administração é intramuscular ou intravenosa e apresenta efeitos secundários muito severos (Dorlo & Kager, 2008; WHO, 2010; Gadelha *et al.*, 2015).

1.5.2. Fármacos utilizados em situação de imunossupressão

Para imunodeprimidos, em particular no caso de doentes renais ou de indivíduos HIV⁺/SIDA, os fármacos usualmente aplicados é a miltefosine, os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B lipossomal, sendo esta última a mais comumente usada (Silva *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015).

1.6. Prevenção

Evitar a picada de flebótomos é o modo mais eficiente de prevenir a leishmaniose, quer humana e/ou canídea, quer em ambiente doméstico ou peridoméstico. O método de controlo do vetor depende do comportamento deste e dos hábitos sociais e culturais da população. A prevenção eficaz da leishmaniose deve ser o resultado da aplicação do conjunto integrado de ações protetoras que tenham em consideração o vetor, o parasita e o hospedeiro (WHO, 2010; Pace, 2014).

1.6.1. Inseticidas

Poderá ser aplicado inseticida nas paredes interiores ou exteriores das habitações, em cortinados ou em redes mosquiteiras, dormindo sob estas, atendendo à espessura da malha da rede, de modo que os flebótomos não a atravessem. A aplicação de repelentes, precaver o exercício de atividades externas durante o período crepuscular, evitar ter

árvores e arbustos que atraíam os flebótomos em redor das habitações é sugerido como elementos que podem prevenir a transmissão do parasita pelo vetor. Pulverizações de inseticida no espaço onde estão os animais domésticos, nomeadamente cães, e o uso de coleiras impregnadas poderá prevenir a transmissão zoonótica canina. Fatores como a segurança, aplicação, eficácia, custo, tempo de duração, impacto ambiental e disponibilidade dos inseticidas devem ser ponderados (WHO, 2010; Pace, 2014). Alguns dos inseticidas disponíveis para pulverização no interior das habitações são organoclorados, organofosforados (malatião), carbamatos (propoxur) e piretróides sintéticos (deltametrina e cialotrina) (WHO, 2010).

1.6.2. Vacinas

O aumento do conhecimento da patogénese de infeção por *Leishmania*, as interações imunitárias entre o parasita e o hospedeiro vertebrado, bem como, o conhecimento total do genoma de *Leishmania* são fatores importante que devem ser considerados no desenvolvimento de vacinas de caráter profilático ou curativo (Kumar & Engwerda, 2014). Existe uma necessidade de vacinação eficaz que confira proteção contra a leishmaniose, quer para animais como para os seres humanos (Ameen, 2010).

1.6.2.1. Leishmaniose humana

Devido às resistências às terapias anti-*Leishmania*, o desenvolvimento de uma vacina profilática que confira proteção à população é necessária. Contudo, apesar das várias tentativas ao longo das últimas décadas, ainda não existe uma vacina eficaz contra a leishmaniose humana (Modabber, 2010).

Numa prática antiga, na tentativa de se encontrar um tratamento profilático para a leishmaniose, inoculava-se parasitas virulentos vivos intradermicamente de modo a poder conferir imunização contra os efeitos clínicos mais severos. Este processo denomina-se de leishmanização e apesar de ter sido aplicado nos países do Médio Oriente, foi um método desaconselhado pela WHO, tendo caído em desuso, pois em alguns indivíduos desenvolviam-se lesões cutâneas de difícil cura. Porém, este pode ser parte de um processo para o desenvolvimento de uma vacina para a LC, apesar de enfrentar inúmeros problemas como por exemplo a standardização do produto vacinal. A dificuldade destas vacinas reside no processo de uniformização da cultura dos

parasitas a nível laboratorial, na segurança do hospedeiro e na virulência associada ao parasita (Noazin *et al.*, 2009; WHO, 2010; Kumar & Engwerda, 2014).

As vacinas de primeira geração para o controlo da CL e VL foram desenvolvidas com base em promastigotas mortos ou extratos destes, tendo sido testados com ou sem adjuvantes. Este é um processo de desenvolvimento simples e consequentemente pouco dispendioso (Evans & Kedzierski, 2012). A eficácia destas vacinas profiláticas necessita de ser comprovada de forma efetiva, sendo controversos os resultados dos diferentes estudos. Contudo, foram encontrados alguns problemas, como a perda de eficácia dos extratos ao longo do tempo e a standardização do processo (WHO, 2010; Kumar & Engwerda, 2014; Mendonça *et al.*, 2015).

As vacinas de segunda geração, são as que atualmente possuem maior crescimento, baseando-se em proteínas recombinantes, DNA e organismos geneticamente modificados (vacinas vetoriais, parasitas atenuados), consistindo em processos de imunização através de antigénios pré-definidos (Mendonça *et al.*, 2015). Alguns estudos demonstraram que este tipo de vacinas induzem uma resposta imunitária protetora contra *Leishmania*, contudo não se prevê o desenvolvimento ou a disponibilidade de uma vacina profilática para breve (WHO, 2010).

Vacinas para a leishmaniose humana com recurso a adjuvantes estão a ser desenvolvidas, tais como a histona H1, proteína 11 da membrana do cinetoplasto (KMP-11, do inglês *Kinetoplastid membrane protein-11*) ou através de antígenos presentes na saliva do flebótomo, entre outros, são algumas das propostas em estudo, mas por vezes estes estudos não passam da fase III dos estudos clínicos (Oliveira *et al.*, 2009; Modabber, 2010; Mendonça *et al.*, 2015).

1.6.2.2. Leishmaniose canina

O controlo da leishmaniose canina é fundamental, quer para fins de saúde pública, quer para proteção animal da doença. A capacidade de resposta à infeção é dependente do sistema imunitário do animal (resposta específica do tipo Th1), levando à necessidade de uma vacina que proteja ou diminua a progressão da infeção provocada pelo parasita. Atualmente existem duas vacinas anti-*Leishmania* comercializadas para canídeos no Brasil (Leishmune e LeishTec) e uma na Europa (CaniLeish®) (WHO, 2010; Martin *et al.*, 2014)

1.7. Sistema Imunitário

O sistema imunitário é constituído por órgãos linfóides que produzem células fagocíticas responsáveis pela proteção do organismo de agressões externas e internas, estabelecendo respostas imunitárias. A resposta imunitária inata e adquirida contribui para o controlo de doenças infecciosas e parasitárias, procurando manter o equilíbrio homeostático do organismo (Burmester & Pezzutto, 2005; Arosa *et al.*, 2012).

As respostas imunitárias são mediadas por leucócitos que incluem as células mononucleares, nomeadamente os linfócitos e os monócitos, e as células polimorfonucleares (PMN) das quais fazem parte os eosinófilos, basófilos e neutrófilos (Burmester & Pezzutto, 2005; Arosa *et al.*, 2012).

Após lesão tecidual são libertadas quimiocinas que ativam a resposta imunitária inata desenvolvida por células fagocíticas [neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DC, do inglês *dendritic cells*)]. Neutrófilos e macrófagos migram para o local da inflamação de modo a eliminar rapidamente os agentes patogénicos. Este tipo de células, conjuntamente com a barreira epitelial, constitui a linha de defesa primária do sistema imunitário (Burmester & Pezzutto, 2005; Abbas & Lichtman, 2011; Arosa *et al.*, 2012).

Os macrófagos e as DC são células apresentadoras de antígeno (APC, do inglês *antigen-presenting cells*). Apresentam resíduos de péptidos, oriundos dos antígenos dos agentes patogénicos, complexados com moléculas de classe I (MHCI) e de classe II (MHCII) do complexo major de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) que são reconhecidos pelos recetores dos linfócitos T (TCR, do inglês *T cell receptor*). Este reconhecimento estimula a diferenciação de células T indiferenciadas (*naïve*) em células efetoras que proliferam, ocorrendo a transição da resposta inata para a resposta adquirida que é específica para cada antígeno.

MHC I liga-se a péptidos citosólicos originando o complexo MHCI-péptido antigénico que é reconhecido por células T CD8⁺ (células T citotóxicas). MHC II liga-se a péptidos que se encontram em vesículas intracelulares de APC. Este complexo MHCII-péptido

antigénico é reconhecido pelas células T CD4⁺ (células T *helper*, Th). Esta diferenciação no processo de apresentação antigénica reflete a especificidade das células relativamente às moléculas de MHC. As células CD4⁺ Th podem ser diferenciadas em células Th1 e Th2 consoante as citocinas que são produzidas. As células Th1 produzem citocinas pro-inflamatórias, como por exemplo, interferão gama (IFN- γ , do inglês *interferon gamma*) que estimula a opsonização, a fagocitose, ativa os mecanismos microbicidas dos macrófagos, promove a atividade citotóxica das células NK (do inglês *natural killer cells*) e induz a diferenciação das células T CD8⁺ em células citotóxicas que promovem a apoptose de células infetadas (Teixeira *et al.*, 2006). As células Th2 produzem citocinas anti-inflamatórias, como é o caso de IL (interleucina, do inglês *interleukin*) -4 e IL-5 que ativam, por exemplo, os eosinófilos e estimulam a resposta humoral (produção de anticorpos pelos linfócitos B).

As células B ao reconhecerem as proteínas que vêm agregadas ao agente invasor através dos seus recetores (BCR, do inglês *B cell receptor*) diferenciam-se em células plasmáticas produzindo anticorpos, dando origem à resposta imunitária humoral. Os anticorpos produzidos podem bloquear e eliminar os agentes patogénicos que circulam nos fluidos ou mucosas. Este tipo de imunidade tem ação eficiente sobre agentes invasores extracelulares. Quando os agentes patogénicos são internalizados pelas células do hospedeiro, são destruídos nas vesículas fagocitárias das células fagocíticas ou são as próprias células infetadas que são destruídas (Coico & Sunshine, 2009; Abbas & Lichtman, 2011; Arosa *et al.*, 2012).

1.7.1. Sistema Imunitário Inato

A inoculação de promastigotas de *Leishmania* na barreira epitelial do hospedeiro vertebrado induz a libertação de mediadores inflamatórios que ativam o sistema imunitário inato.

Leishmania spp. possui grande quantidade de proteínas de superfície que revestem o corpo celular e o flagelo, tais como o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína de 63 kDa (gp63). A gp63 é a molécula alvo para o fator C3 da cascata do complemento, estando relacionada com a iniciação da fagocitose e consequente sobrevivência intracelular dos parasitas nos macrófagos. Para que a cascata do complemento continue, o C3 deve ser clivado em C3a e C3b. O C3a funciona como fator quimiotático das células fagocitárias,

promovendo o seu recrutamento para o local da lesão, facilitando a fagocitose do parasita. O fragmento C3b adere à membrana celular, opsoniza o parasita, sendo reconhecido pelos recetores C3 (RC3) e C5 (RC5) das células fagocíticas, fomentando a fagocitose. C3b também causa a clivagem de C5 nos fragmentos C5a e C5b. O C5a induz a quimiotaxia das células fagocitárias enquanto que o fragmento C5b origina a polimerização do complexo de ataque à membrana (MAC, do inglês *membrane attack complex*) com a consequente permeabilização da membrana e lise celular (Teixeira *et al.*, 2006; Abbas & Lichtman, 2011).

Porém, na presença de promastigotas, o C3 é clivado na forma C3b inativa (iC3b), impedindo a continuação da cascata do complemento e a constituição do complexo de ataque à membrana. Desta forma, o parasita impede a sua destruição através do sistema de complemento e utiliza as propriedades dos fatores do complemento para facilitar a internalização pelas células hospedeiras (Liu & Uzonna, 2012).

A libertação de quimiocinas pelas células endoteliais induz a migração das células fagocíticas, como neutrófilos, macrófagos, DC imaturas e NK para o local de infeção. Estas células também libertam quimiocinas, recrutando outros leucócitos. Os macrófagos, as DC e as NK produzem citocinas que estimulam a diferenciação de linfócitos, e eventualmente a ativação de outros leucócitos, gerando-se um ciclo na resposta imunitária (Teixeira *et al.*, 2006; Lieke *et al.*, 2008; Abbas & Lichtman, 2011; Ribeiro-Gomes & Sacks, 2012).

As células fagocíticas possuem recetores de reconhecimento padrão (PPR, do inglês *Pattern Recognition Receptors*), como por exemplo a família dos recetores Toll-like (TLR), que reconhecem padrões moleculares comuns a agentes patogénicos (PAMP, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*), isto é, sequências moleculares que não existem ou não são expressos nas células dos mamíferos, como por exemplo, sequências CpG (citosina-fosfato-guanina) e lipopolissacarídeo (LPS, do inglês *lipopolysaccharide*). Os TLR com localização transmembranar são os recetores com maior predomínio no sistema imunitário inato, reconhecendo inclusive alguns antígenos de *Leishmania*. Após o reconhecimento e ligação aos PAMP, estes recetores sinalizam cascatas que conduzem à ativação de fatores de transcrição nucleares, originando a produção de citocinas que promovem diferentes respostas celulares e estabelecem a ligação com a resposta imunitária adquirida (Lieke *et al.*, 2008; Abbas & Lichtman, 2011; Liu & Uzonna, 2012).

Após o reconhecimento, os agentes patogênicos são internalizados pelos neutrófilos e macrófagos. Estas células segregam o fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumoral necrosis factor*) - α e a IL-1 que têm ação estimuladora sobre as células endoteliais, conduzindo à liberação de mais quimiocinas, ocorrendo o recrutamento adicional de leucócitos (Teixeira *et al.*, 2006; Liu & Uzonna, 2012). Os macrófagos também libertam IL-12 que ativa as células NK. Estas células produzem IFN- γ , estimulando as DC e os macrófagos a apresentar antígenos aos linfócitos T (Abbas & Lichtman, 2011).

Macrófagos infectados por *Leishmania* não segregam IL-12 e, conseqüentemente não estimulam a diferenciação de células CD4⁺ Th1, nem a subsequente produção de IFN- γ (Liu & Uzonna, 2012). *Leishmania* também interfere com a sinalização intracelular das DC, afetando as suas funções de apresentação de antígeno e, portanto, a sua capacidade de induzir imunidade celular mediada contra o parasita (Teixeira *et al.*, 2006; Lieke *et al.*, 2008; Soong, 2008; Liu & Uzonna, 2012).

Na leishmaniose humana, a resposta imune bem como o desfecho clínico é dependente do predomínio das células Th1 ou Th2. A resposta mediada por células Th1, com conseqüente produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12 está associada à resolução da doença e à destruição do parasita, enquanto que a diferenciação de uma resposta Th2, com produção de IL-4 e IL-10, contribui para a progressão da doença e incremento da parasitemia. Estas citocinas conseguem inibir a diferenciação de células T₀ (células indeferenciadas) em Th1, com conseqüente ausência de resolução de doença. Na CL, as respostas imunitárias são responsáveis por um espectro clínico diverso, sendo que o predomínio de uma resposta Th1 está associada a lesões localizadas que curam de forma espontânea, enquanto que uma resposta Th2 está relacionada com lesões difusas. Na MCL verifica-se a resposta mista Th1/Th2 se encontra associada a atividade inflamatória agressiva e crônica (Lieke *et al.*, 2008; Soong, 2008; Liu & Uzonna, 2012).

Para além das características intrínsecas do parasita, a resposta imunitária do hospedeiro influencia a suscetibilidade à infecção e o desenvolvimento da doença, com conseqüências importantes sobre o prognóstico, realçando a importância da escolha da terapêutica a aplicar (Ameen, 2010; Brelaz-de-Castro *et al.*, 2012).

1.7.1.1. Neutrófilos

Os neutrófilos são produzidos e maturados na medula óssea, sendo os leucócitos mais abundantes do sistema circulatório sanguíneo. Quando na circulação sanguínea, os neutrófilos possuem um tempo de vida de cerca de 24 h, sofrendo posteriormente apoptose espontânea (Zawrotniak & Rapala-Kozik, 2013).

Após a deposição de promastigotas na barreira epitelial do hospedeiro vertebrado pelo flebótomo inicia-se a resposta inflamatória local, sendo os neutrófilos as primeiras células recrutadas para o local da infecção, seguidos dos macrófagos (van Zandbergen *et al.*, 2002; Nathan, 2006).

Os neutrófilos dispõem de dois processos de reconhecimento dos microrganismos, os mecanismos dependentes e independentes de opsonina. No processo de reconhecimento independente de opsonina ocorre a ligação dos PAMP aos PRR, ou seja, os ligandos de microrganismos são diretamente reconhecidos pelos recetores celulares. Este processo é utilizado por microrganismos como *E. coli* ou *Pseudomonas*. As opsoninas são moléculas que revestem a superfície dos microrganismos, promovendo a internalização pelas células fagocíticas. O processo dependente de opsonina requer a opsonização dos microrganismos. As opsoninas são elementos facilitadores do reconhecimento e adesão de microrganismos aos recetores das células fagocíticas e à posterior fagocitose. As opsoninas podem ser imunoglobulinas, fragmentos C3bi e C3b do sistema complemento, a fibronectina, a proteína C reativa e a lectina de ligação à manose (MBL, do inglês *mannose-binding lectin*) (Laskay *et al.*, 2008).

Após reconhecimento do agente patogénico, os neutrófilos fagocitam os parasitas, ocorrendo a fusão do fagossoma constituído por grânulos azurófilos com os lisossomas formando os fagolisossomas. Nos fagolisossomas são libertados os componentes hidrolíticos dos grânulos, como as proteases lisossomais e proteínas bactericidas. A elastase neutrófilica (NE, do inglês *neutrophil elastase*), a catepsina G (CatG, do inglês *cathepsin G*) e a proteinase 3 (PR3) são enzimas proteolíticas envolvidas na atividade microbicida dos neutrófilos devido à sua capacidade para clivar componentes da matriz extracelular e moléculas da superfície celular (Heutinck *et al.*, 2010). Contudo, as proteases têm uma ação alargada, podendo modular proteoliticamente quimiocinas, citocinas e recetores celulares, funcionando como reguladores da resposta imunitária, e ainda induzir a apoptose celular (Korkmaz *et al.*, 2008; Pham, 2008).

As proteases lisossomais clivam as proteínas microbianas, levando à ativação da enzima fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina reduzida (NADPH, do inglês *reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) que gera um aumento da quantidade das espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*). A ativação da NADPH oxidase no fagossoma converte o oxigénio molecular em ROS, como é o caso do anião superóxido (O_2^-) e de radicais livres de hidrogénio (H^+), contribuindo para a defesa do organismo contra *Leishmania* (Arosa *et al.*, 2008; Abbas & Lichtman, 2011).

Contudo a superóxido dismutase (SOD, do inglês *superoxide dismutase*) 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) (Almeida *et al.*, 2013).

Outros produtos também são formados, como o ácido hipocloroso (HOCl). A libertação de HOCl depende da atividade da enzima mieloperoxidase granular (MPO), que é uma hemoproteína (150 kDa) que catalisa a reação do anião de cloreto (Cl^-) com H_2O_2 , formando HOCl. Contudo, quando a capacidade antioxidativa da célula é excedida, ocorre a oxidação de estruturas celulares e a célula entra em apoptose, por stresse oxidativo (Almeida *et al.*, 2013).

No entanto, foi demonstrado que neutrófilos infetados por *Leishmania* conseguem resistir aos mecanismos microbicidas desencadeados nos fagolisossomas, atrasando a apoptose dos neutrófilos, ampliando o tempo de semivida e modulando a atividade macrofágica (Aga *et al.*, 2002). Este facto sugere que os neutrófilos podem servir como células hospedeiras temporárias de *Leishmania* na fase inicial da infeção. Assim, o recrutamento rápido de PMN pode ser benéfico para a sobrevivência dos parasitas (Laufs *et al.*, 2002).

Quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como IL-8, TNF- α , IFN- γ e IL-15 podem estar envolvidas no prolongamento da vida dos neutrófilos infetados por *Leishmania* bem como, no atraso da apoptose. A IL-8 tem propriedades quimiotáticas e exerce ação autócrina, recrutando mais neutrófilos para o local da infeção (Laskay *et al.*, 2008). Foi demonstrado que PMN em contacto com *Leishmania* libertam maior quantidade de IL-8 (van Zandbergen *et al.*, 2002).

Os neutrófilos humanos também são capazes de produzir proteína 10 induzida pelo interferão gama (IP-10, do inglês *gamma interferon-inducible protein*) que é um dos mediadores de ativação das células NK. As células NK quando ativadas produzem IFN-

γ , exercendo uma ação regulatória sobre os linfócitos Th1 que promovem a diferenciação de resposta imunitária protetora adquirida. Contudo na presença de *Leishmania* a produção de IP-10 por neutrófilos é bloqueada, sugerindo que *Leishmania* interfere com as funções de modulação de neutrófilos humanos, conseguindo contornar as defesas do sistema imunitário (van Zandbergen *et al.*, 2002).

Um outro mecanismo de combate microbiano é a libertação de armadilhas extracelulares pelos neutrófilos (NET, do inglês *neutrophil extracellular traps*) (Urban *et al.*, 2009). Após estimulação por agentes patogénicos, os neutrófilos libertam as NET com aparência de redes ou teias, constituídas por fibras de cromatina descondensadas, histonas e proteínas citosólicas e granulares, levando à degradação e morte de agentes invasores e a consequentes alterações morfológicas nos neutrófilos. A alteração morfológica no citoesqueleto neutrofílico é conseguida pela ação da integrina Mac-1, criando fraturas ao nível das membranas nuclear e plasmática, permitindo a libertação das NET (Brinkmann & Zychlinsky, 2012). As enzimas responsáveis pela descondensação da cromatina são a NE, a lactotransferrina (LTF, do inglês *lactotransferrin*), a CatG, a MPO, a PR3 e a peptidilarginina deiminase 4 (PAD4, do inglês *peptidylarginine deiminase 4*) que atuam ao nível do núcleo celular (Zawrotniak & Rapala-Kozik, 2013; Rochael *et al.*, 2015) (Fig. 3).

A NE degrada a histona H1, sendo esta degradação acrescida pela MPO. A PAD4 degrada a histona H3, por um processo denominado de citrulinização, em que ocorre a conversão dos resíduos de arginina em citrulina. Este processo é induzido pelo H₂O₂ sobre a histona H3, ocorrendo a descondensação da cromatina. Assim a produção de ROS, originado pela NADPH oxidase induz a formação de NET (Rochael *et al.*, 2015).

Este mecanismo utilizado pelos neutrófilos leva a uma diminuição da viabilidade celular e consequentemente a um processo de morte celular, denominado de netose, distinto de apoptose, que consiste numa morte celular programada e da necrose que é um tipo de morte celular descontrolada e patológica (Fuchs *et al.*, 2007).

A formação de NET é um dos mecanismos que permite aos neutrófilos cumprirem a sua função antimicrobiana, através da imobilização dos microrganismos, impedindo a disseminação da infeção, conduzindo os agentes patogénicos à morte através das enzimas contidas nas NET (Zawrotniak & Rapala-Kozik, 2013).

Promastigotas de *Leishmania* conseguem ativar a netose com o envolvimento de ROS gerado por NADPH, PAD4 e de NE (Rocha *et al.*, 2015).

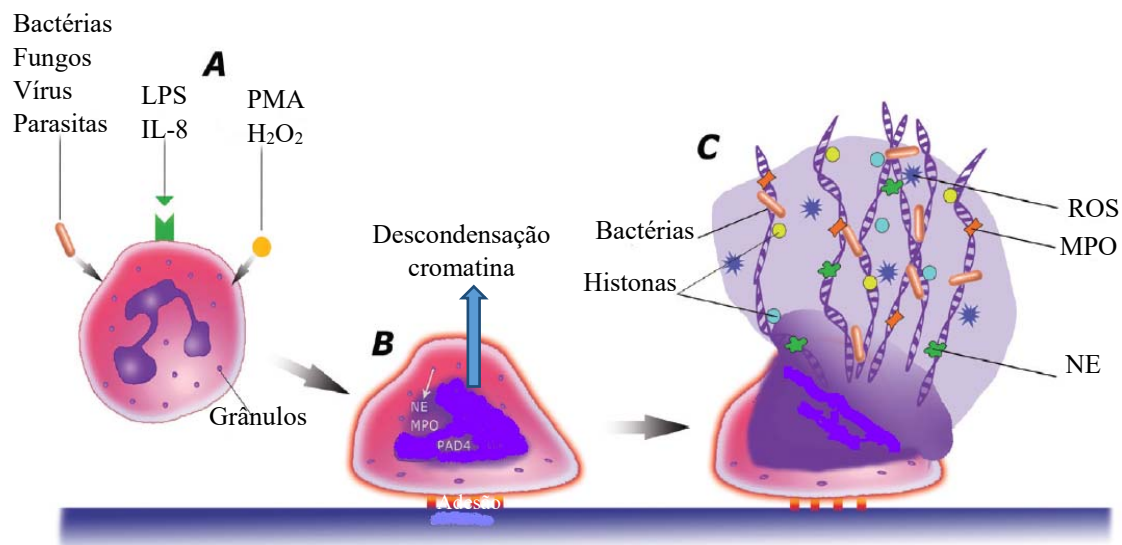


Figura 3: Esquemática do processo de liberação de NET.

Após estimulação de receptores (A) por agentes patogênicos ou fatores químicos ocorre a aderência de neutrófilos ao endotélio e a descondensação de cromatina, devido à clivagem de histonas por NE, MPO e PAD4 (B). Na fase final, ocorre a liberação de NET e os agentes patogênicos ficam imobilizados (C) (Adaptada de Zawrotniak & Rapala-Kozik, 2013).

1.8. Hospedeiro imunocomprometido

1.8.1. Desnutrição

A desnutrição engloba deficiências de nutrientes como proteínas, zinco, ferro, entre outros, sendo que a deficiência de proteína está associada à ineficácia das respostas imunes mediadas por células fagocitárias (Chandra, 2002). A correlação entre insuficiência nutricional e uma resposta imune ineficaz tem sido sugerida, sendo também referida como um dos fatores de risco para o desenvolvimento de leishmaniose (Kumar *et al.*, 2014).

Um estudo demonstrou que em doentes com insuficiência nutricional e VL causada por *L. donovani*, a respiração oxidativa de PMN é disfuncional (Kumar & Engward, 2014).

1.8.2. Doença renal crónica

A imunossupressão é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças oportunistas como a VL devido à diminuição de imunidade dos doentes, especialmente em doentes transplantados (transplante renal e outros), oncológicos e hematológicos. Nestes casos as manifestações clínicas da leishmaniose podem ser anómalas, bem como a resposta ao tratamento, dado que o sistema imunitário está deficitário e os sinais clínicos da doença causadora da imunossupressão podem sobrepor-se às manifestações clínicas da leishmaniose ou ocorrer agravamento das manifestações clínicas decorrentes da infeção por *Leishmania*. A relação entre VL e a imunossupressão ainda não se encontra totalmente conhecida. Um dos aspetos que ainda não foram explorados é a eventual existência de uma relação direta entre a gravidade da VL e o tipo ou a dose de imunossupressores (Silva *et al.*, 2013).

Maior acesso a cuidados de saúde nos países endémicos tem vindo a aumentar a probabilidade dos doentes serem tratados e da taxa de sobrevivência de doentes com patologias imunossupressoras serem mais elevadas, conduzindo a que haja uma maior probabilidade de adquirirem infeções por *Leishmania spp* (Silva *et al.*, 2015).

A doença renal crónica (CKD, do inglês *chronic kidney disease*) baseia-se numa perda gradual da função renal, podendo evoluir para doença renal crónica grave, como insuficiência renal e doença renal terminal (DRT) necessitando, por norma, de um transplante e/ou de hemodiálise. CKD é um fator de imunossupressão em indivíduos com CKD sendo suscetíveis a infeções microbianas que podem conduzir à morte dos doentes (Liu *et al.*, 2015). A capacidade oxidativa dos neutrófilos tem sido avaliada em doentes com CKD (como cães, gatos, humanos) e os resultados têm-se mostrado controversos dentro do mesmo tipo de doentes (Silva *et al.*, 2013).

Tem sido demonstrado que em casos de CKD pode ocorrer produção excessiva do ião superóxido (O_2^-), levando à alteração da função das células endoteliais por peroxidação lipídica, redução do fluxo renal e excreção de sódio, com a consequente indução precoce de apoptose. Porém, também pode não se verificar diferenças ou ocorrer uma baixa produção do ião superóxido, afetando a competência da resposta imune inata (Silva *et al.*, 2013).

Tendo em conta que indivíduos com CKD são suscetíveis a infecções microbianas, o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS, do inglês bacterial *lipopolysaccharide*) pode ligar-se a TLR4, presente especialmente na membrana dos monócitos. A sinalização de TLR4 por LPS pode ativar as vias de sinalização, como NF-kB, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, TNF- α e IL-1. Foi verificado que indivíduos com CKD possuem menor número de monócitos e de células CD14⁺ (co-receptor de TLR4) e menor expressão de TLR4. Na presença do LPS, foi demonstrado menor produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) (Liu *et al.*, 2015).

A incidência de VL está a aumentar em indivíduos imunodeprimidos, tendo sido demonstrado que alguns deles desenvolveram VL meses após o transplante renal. Doentes transplantados renais, residentes em áreas endêmicas ou oriundos de países endêmicos que apresentem febre e pancitopenia, devem ser submetidos a um teste de diagnóstico para VL (Oliveira *et al.*, 2008).

Em áreas endêmicas, os indivíduos transplantados podem apresentar reativação de leishmaniose, especialmente quando se verifica a ocorrência de casos de leishmaniose logo após a intervenção cirúrgica, quando a imunossupressão é acentuada. A ocorrência de leishmaniose em transplantados também pode ser devida devido à migração dos indivíduos num quadro clínico ainda imunodeprimido para áreas endêmicas em leishmaniose (Fig. 4). A leishmaniose pode ainda ocorrer por transplante de um órgão e/ou de sangue infetado por *Leishmania* (van Griensven *et al.*, 2014).

Casos descritos que evidenciem a relação entre a transplantação e a leishmaniose ainda não são muitos, possivelmente devido a não ocorrer uma declaração dos mesmos, bem como, não existir uma sensibilização do clínico de modo a reportar este tipo de casos. Não existem estudos epidemiológicos, nem dados sistemáticos sobre a incidência e prevalência de VL em indivíduos com transplantes renais (Silva *et al.*, 2015).

Protocolos clínicos a aplicar para o diagnóstico ou tratamento de pacientes transplantados renais infetados com VL ainda não foram estabelecidos, além do mais, a avaliação serológica para leishmaniose antes de se realizar um transplante renal não ocorre na maioria dos países (Silva *et al.*, 2015).

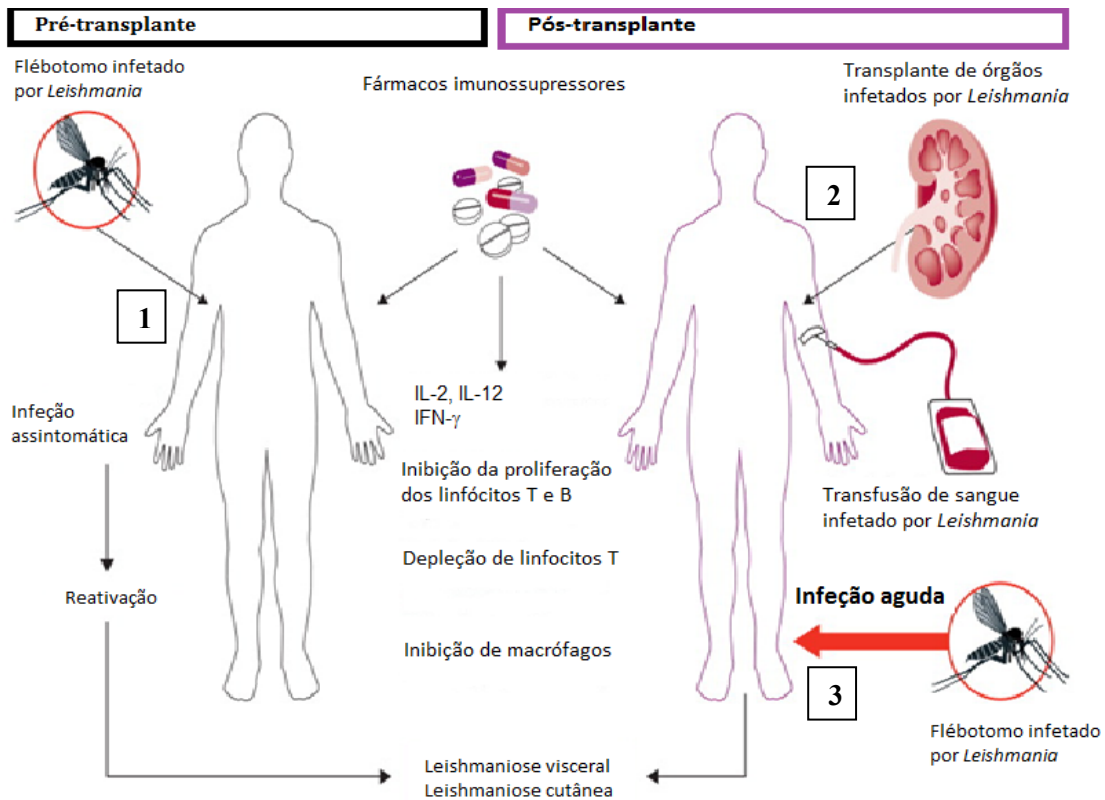


Figura 4: Modelo de leishmaniose em indivíduos transplantados.

A leishmaniose em doentes transplantados (quadro clínico de imunodepressão) poderá ocorrer por: (1) reativação de uma infecção assintomática que ocorreu numa fase anterior ao transplante (pré-transplante); (2) aquisição iatrogénica de *Leishmania* através de órgão ou sangue infectado proveniente de dador infectado ou (3) por aquisição *de novo* da infecção através da inoculação de parasitas pelo vetor num indivíduo transplantado que vive ou migra para áreas endémicas (Adaptada de Antinori *et al.*, 2008).

Indivíduos com co-infecção HIV⁺/*Leishmania* e problemas renais é uma invulgar associação e existem poucos casos descritos. Os sinais clínicos são diversos, como hematuria, síndrome nefrótica (proteinúria, hipoalbuminemia e edema generalizado), entre outros. Por norma os indivíduos apresentam primariamente infecção por HIV, com posteriores problemas renais (síndrome nefrótica) e VL. O número de células T CD4⁺ é baixo (< 200 células.ml⁻¹) e a carga de HIV é elevada. Contudo se for aplicada terapêutica anti-parasitária adequada e ocorrer maior controlo do HIV, os indivíduos recuperam das funções renais parcial ou totalmente (Vassallo *et al.*, 2014).

1.8.3. Vírus da imunodeficiência humana

O primeiro caso relatado de co-infecção HIV⁺/*Leishmania* foi em 1985, desde então o número de casos relatados têm aumentado, tendo sido reportados em trinta e cinco países (Alvar *et al.*, 2008)

Com a inserção da terapia anti-retroviral de alta atividade (HAART, do inglês *highly active antiretroviral therapy*) verificou-se uma alteração na progressão das infecções por HIV para o estado clínico de SIDA e, também na gravidade das infecções oportunistas. No caso específico da co-infecção HIV/*Leishmania*, no final dos anos 90, foi constatado o decréscimo de incidência na Europa. Contudo, a co-infecção HIV/*Leishmania* continua a ser um problema grave, pois com o aumento da esperança média de vida dos indivíduos HIV⁺ tem-se verificado reactivação de VL ao longo da vida do indivíduo (Vassallo *et al.*, 2014).

Curiosamente, a infecção por HIV e a infecção por *Leishmania* ocorre nas mesmas células, macrófagos e DC, comprometendo a função destas células e, consequentemente, a ação de outras células imunitárias, comportando um efeito aditivo na patogenicidade. Não existem dados acerca do efeito do parasita nas DC mas tem sido sugerido que a co-infecção pode modificar o modo de infecção de cada um dos agentes patogénicos (Garg *et al.*, 2007)

Tem sido relatado que citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 α funcionam como mediadoras na progressão de HIV tipo 1 (HIV-1). TNF- α é produzido por macrófagos e monócitos ativados, regulando a expressão do gene HIV-1 através de uma ação positiva sobre a via de sinalização de um fator de transcrição celular, o fator nuclear kB (NF-kB, do inglês *nuclear factor kappa B*). A IL-1 α estimula a replicação do vírus em macrófagos derivados de monócitos infetados. Dados clínicos sugerem que *Leishmania* promove a replicação viral do HIV-1 através do aumento de TNF- α e IL-1 α , dado que tem sido detetado uma elevada concentração destas citocinas em macrófagos parasitados. Assim, na co-infecção HIV-1/*Leishmania*, a replicação viral de HIV-1 pode ser beneficiada através das citoquinas mediadas por *Leishmania*, estabelecendo-se uma relação simbiótica. Por outro lado, as perturbações imunitárias causadas por HIV são particularmente favoráveis à multiplicação descontrolada do parasita, diminuindo a esperança média de vida do doente (Alvar *et al.*, 2008; Santos-Oliveira *et al.*, 2013).

O recetor da quimiocina C-C do tipo 5 (CCR5, do inglês *chemokine receptor type 5*) presente na membrana celular é importante para a entrada do HIV nas células alvo. A

expressão aumentada deste recetor está relacionada com elevada carga viral, acelerando a progressão para SIDA. Doentes co-infetados por HIV/*Leishmania* apresentam a expressão do recetor CCR5 aumentada em comparação com indivíduos apenas infetados com *Leishmania* ou com HIV, tendo sido sugerido que o parasita funcione como um impulsor da progressão de HIV para o estado clínico de SIDA. Contudo, a relação biológica que se estabelece entre *Leishmania* e HIV deverá ser explorada. Além disso, estes doentes também apresentam níveis reduzidos de IL-15, citocina que estimula a resposta Th1. Esta citocina, libertada pelos macrófagos, aumenta a atividade das células T CD4⁺ e T CD8⁺, conduzindo ao incremento da produção de IFN- γ pelas NK. A reduzida produção de IL-15 poderá ser indicativo de respostas imunitárias insuficientes contra o HIV (d’Ettorre *et al.*, 2006).

Por outro lado, o aumento descontrolado do parasitismo está provavelmente relacionado com deficiência das funções macrofágicas causadas pelo HIV-1. Macrófagos co-infetados revelam capacidade diminuída para fagocitar inúmeros agentes patogénicos, contudo a internalização de *Leishmania* é aumentada após a infeção pelo vírus (Alvar *et al.*, 2008).

O controlo da infeção depende de macrófagos e das células Th1 e Th2. Em indivíduos imunocomprometidos por HIV-1 a resposta imunitária contra *Leishmania* é predominantemente do tipo Th2, explicando a elevada suscetibilidade à infeção parasitária, a severidade da parasitose e a reativação de infeções assintomáticas (Alvar *et al.*, 2008).

Foi confirmado *in vitro* e *ex vivo* que o HIV-1 pode modular a produção de citocinas em resposta à infeção por *Leishmania* (Wolday *et al.*, 2000). A adição de HIV-1 às culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*) de doadores humanos saudáveis diminuiu a produção de IFN- γ , IL-12 e IL-18 e aumentou a produção de IL-4 e IL-10. PBMC de doentes co-infetados por HIV/*Leishmania* não produzem IFN- γ em resposta à presença de *Leishmania* mas revelaram a libertação de maior quantidade de IL-4 e IL-10 em comparação com doentes HIV⁺. Estes dados indicam que existe o predomínio de uma resposta anti-inflamatória à infeção por *Leishmania* em doentes HIV-1⁺ (Nigro *et al.*, 1999).

1.9. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo geral analisar a atividade dos PMN de indivíduos com sistema imunitário imunocomprometido (imunocomprometidos) e com sistema imunitário normal (saudáveis), sem doença parasitária, quando expostos a promastigotas do parasita *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis*..

Os objetivos específicos são:

- Analisar a resposta oxidativa produzida por PMN humanos de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos quando expostos a promastigotas de *Leishmania* spp.;
- Analisar a desgranulação através da atividade enzimática de NE e CatG dos sobrenadantes de PMN humanos de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos quando expostos a promastigotas de *Leishmania* spp.;
- Verificar a existência de produção de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET, *neutrophil extracellular traps*) por PMN humanos de indivíduos saudáveis e de indivíduos imunocomprometidos quando expostos a promastigotas de *Leishmania* spp.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras biológicas e Parasitas

Para analisar as interações que se estabelecem entre *Leishmania* spp. e o hospedeiro vertebrado durante a fase inicial da infeção foram utilizados PMN isolados de sangue periférico humano e promastigotas de *Leishmania* spp.

2.1.1. Dadores de amostras biológicas

Neste estudo foi utilizado sangue periférico humano, pertencente a indivíduos do género feminino e masculino, maiores de 18 anos de idade e residentes em Portugal continental.

A amostra foi constituída por dois grupos, cada um constituído por 10 indivíduos. Um dos grupos foi constituído por indivíduos que não tinham doenças infecciosas e parasitárias ou que comprometiam o sistema imunitário, que daqui em diante serão designados como saudáveis. O segundo grupo incluiu 10 indivíduos sem doenças infecciosas e parasitárias mas com sistema imunitário debilitado, será denominado de imunocomprometido.

Aos participantes foi aplicado um questionário para preenchimento que se revelou imprescindível para a seleção dos indivíduos que poderiam participar neste estudo.

Aos participantes previamente selecionados foi efetuada a colheita de 20 mL de sangue periférico (15 mL utilizados com anticoagulante e 5mL sem anticoagulante), uma única vez, sendo o sangue colhido utilizado unicamente neste estudo. Aos participantes foi informado o tipo de técnica médica a que foram submetidos, bem como, o objetivo do estudo, no qual participaram de forma livre e voluntária, assinando um consentimento informado. Para ser preservado o anonimato e privacidade dos participantes não será revelado nem descrito o processo de identificação dos mesmos.

Foi estimado a probabilidade de os participantes selecionados para este estudo terem estado em contacto com *Leishmania*, através da aplicação de um teste serológico, o teste de aglutinação direta (DAT, do inglês *direct agglutination test*).

2.1.2. Parasitas

Neste estudo foram utilizados promastigotas na fase estacionária da curva de crescimento de três espécies cutâneas, *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis* e promastigotas virulentos de uma espécie visceral, *L. infantum*.

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

2.1.2.1. *Leishmania infantum*

Os parasitas *L. infantum* (MCAN/PT/2012/IMT0005SG) foram isolados de um caso de leishmaniose canina do Seixal (Setúbal, Portugal). De modo a assegurar a virulência, os parasitas foram inoculados em murganhos BALB/c. Os promastigotas virulentos utilizados foram obtidos a partir de amastigotas isolados do baço ou fígado dos murganhos supracitados.

Os promastigotas utilizados neste estudo foram mantidos até à quarta passagem em cultura, inclusive, de modo a garantir a virulência dos mesmos (Santos-Gomes & Abranches, 1996).

2.1.2.2. *Leishmania amazonensis*

L. amazonensis (MHOM/BR/1973/M2269) foi isolado de um paciente com LTA do Estado do Pará (Brasil). Os parasitas foram identificados a partir de anticorpos monoclonais e isoenzimas, no Instituto Evandro Chagas (Estado de Belém do Pará, Brasil) (Comunicação pessoal L. F. Passero).

2.1.2.3. *Leishmania shawi*

L. shawi (MHOM/BR/96/M15789) foi isolado de um indivíduo com LC, em Buriticupu (Estado do Maranhão, Brasil). Os parasitas foram mantidos em murganhos BALB/c, sendo posteriormente isolados a partir de lesões nas patas dos animais. A identificação dos parasitas foi realizada a partir de anticorpos monoclonais e eletroforese enzimática multilocus, no Instituto Evandro Chagas (Comunicação pessoal L. F. Passero).

2.1.2.4. *Leishmania guyanensis*

L. guyanensis (MHOM/BR/2001/M19663) foi isolada de um paciente residente em Santarém (Estado do Pará, Brasil) com leishmaniose cutânea localizada (LCL). A identificação dos parasitas foi concretizada através de isoenzimas, no Instituto Evandro Chagas. Os parasitas foram mantidos em murganhos BALB/c, sendo posteriormente isolados a partir de lesões nas patas dos animais (Comunicação pessoal L. F. Passero)

2.1.2.5. Cultura de promastigotas

Para a cultura de promastigotas foi utilizado meio de Schneider (SCHN, do inglês *Schneider's Insect Medium*, Sigma-Aldrich) contendo 0,5% (m/v) L-glutamina (Merck, Alemanha) e suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS, do inglês *fetal bovine serum*) inativado (Sigma-Aldrich, Alemanha), 100 U.mL⁻¹ de penicilina (Sigma-Aldrich) e 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina (Sigma-Aldrich) (SCHN completo). O pH final foi ajustado para 7,2 Os parasitas foram incubados numa estufa refrigerada (Lovibond, Alemanha) a +24 °C.

2.1.2.6. Contagem de promastigotas

Num tubo seco (*Eppendorf*, DeltaLab, Espanha) foi adicionado 10 µL de cultura de *Leishmania* spp. e 10 µL de meio RPMI (do inglês *Roswell Park Memorial Institute culture medium*) 1640 (Lonza) com 40% (v/v) de glicerol, para imobilizar os promastigotas. Foram colocados 10 µL da suspensão parasitária numa câmara de Neubauer. Para a contagem, foi utilizada a objetiva que permite ver integralmente a quadrícula com 1 mm (milímetro) de lado (grelha do meio) e foram contabilizadas o número de *Leishmania* presentes em cinco quadrículas. Foram contabilizados os parasitas que se encontravam nas quatro quadrículas das extremidades e na quadrícula central da câmara de Neubauer.

A determinação da concentração de promastigotas foi estimada de acordo com a seguinte equação:

$$N = \frac{n}{p} \times 10^4 \times FD$$

em que:

N- número de células.mL⁻¹

n- número de promastigotas contados

p- número de quadrantes da câmara de Neubauer

FD – fator de diluição

10^4 - Na câmara de Neubauer, o número de células que se encontra em $0,1 \text{ mm}^3$ corresponde a $0,0001 \text{ mL}$. Para o cálculo do número de células em 1 mL multiplica-se o número de células existentes em $0,0001 \text{ mL}$ por 10^4 .

2.2. Células polimorfonucleares

Os leucócitos (glóbulos brancos) que possuem um papel fundamental no sistema imunitário dividem-se em leucócitos polimorfonucleares e células mononucleares (linfócitos e monócitos). Os leucócitos polimorfonucleares (PMN, do inglês *polymorphonuclear leukocytes*) granulócitos são caracterizados por possuir um núcleo lobulado de dimensões variáveis e serem ricos em grânulos citoplasmáticos. Dependendo dos tipos de grânulos, estas células podem classificar-se em neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Contrariamente, nas células mononucleares, os grânulos são pouco evidentes (Arosa *et al.*, 2012).

2.2.1. Isolamento e purificação de PMN humanos

Para cada um dos grupos em estudo foram realizados dez isolamentos independentes. Em cada caso foram retirados 15 mL de sangue periférico para um tubo com o anticoagulante citrato fosfato dextrose adenina (CPDA, do inglês, *citrate phosphate dextrose adenine*) após desinfecção da região do antebraço. Foram adicionados 15 mL de NaCl $0,9\%$ (m/v) (Panreac) e 15 mL de dextrano 6% (m/v) (Sigma-Aldrich) ao tubo (Falcon, 50 mL) que continha o sangue. De seguida, a amostra foi homogeneizada, tapada e incubada a 37°C durante 15 min (Fig. 5A). Os tubos foram inclinados a 45° . O sobrenadante foi cuidadosamente recolhido para um novo tubo seco (Falcon, 50 mL) e lavado com NaCl $0,9\%$ (m/v) a $400\times g$ durante 10 min à temperatura ambiente (TA) em centrífuga com rotor basculante (Centrifuge 5810R, VWR). De seguida, foi efetuada a lise osmótica dos eritrócitos contaminantes pela adição de 15 mL de água destilada estéril com agitação ligeira durante 1 min e adicionado 15 mL de NaCl $1,8\%$ (m/v) diluído em tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) para equilibrar a osmolaridade (Fig. 5B). As células foram centrifugadas a $400\times g$ durante 10

min à TA. A suspensão celular de PMN foi ressuspensa em 1 mL de HBSS (do inglês, *Hank's balanced salt solution*, Sigma-Aldrich).

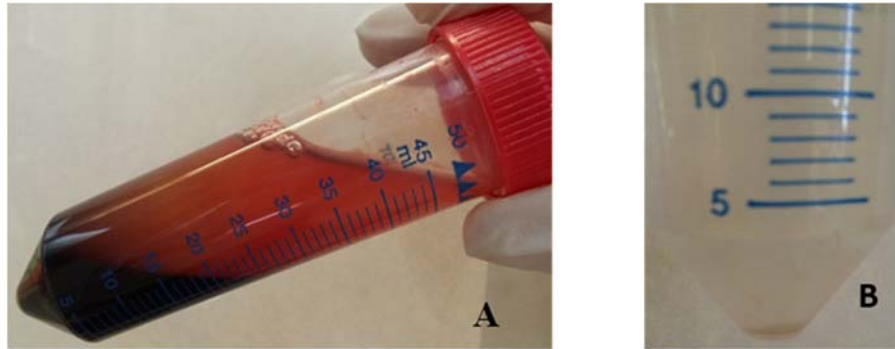


Figura 5: Isolamento e purificação de PMN.

Após incubação do sangue periférico com Dextrano e NaCl, é possível visualizar o sobrenadante que contém PMN e eritrócitos (cor vermelho claro) (A) e a purificação da população de PMN (sedimentado no tubo) após a lise osmótica de eritrócitos (B).

2.2.1.1. Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada por microscopia óptica em câmara de Neubauer após coloração com azul de tripano. O azul de tripano é um corante que permite avaliar a viabilidade celular através da coloração apresentada. As células com a membrana celular íntegra e mitocôndrias funcionais têm a capacidade de excluir o corante, sendo células viáveis, enquanto as células não viáveis ficam coradas de azul.

2.2.1.2. Contagem das células viáveis

Num tubo seco (*Eppendorf*) foi adicionado 90 μL de azul de tripano e 10 μL da suspensão celular. Foi colocado 10 μL da mistura da suspensão celular com azul tripano na câmara de Neubauer. Foram contabilizadas as células que não se encontravam coradas de azul nos quatro quadrantes externos da câmara de Neubauer.

A viabilidade celular foi estimada de acordo com a equação descrita em 2.2.1.1

2.2.1.3. Pureza neutrófila

A percentagem e pureza da população de neutrófilos foram determinados após citocentrifugação (*cytospin*), em lâminas de vidro, de 100 μL de suspensão celular, a

55×g durante 4 min (StatSpin® Cytofuge 2, USA). Após fixação com metanol (VWR International) e coloração com Giemsa (1:10) (Sigma-Aldrich), as lâminas foram analisadas por observação em microscópio ótico. A pureza dos neutrófilos foi determinada pela morfologia celular e a percentagem neutrofilica foi definida por contagem de neutrófilos e células totais em dez campos microscópicos (ampliação 1000×) por lâmina e em dez amostras independentes para ambos os grupos em estudo.

2.2.1.4. Taxa de infecção dos neutrófilos

A taxa de infecção foi determinada por contagem de neutrófilos infetados em lâminas de vidro após citocentrifugação de 100 µL de suspensão celular a 55×g durante 4 min e observação por microscopia ótica das lâminas após fixação com metanol e coloração com Giemsa (1:10). Foram incubados PMN de indivíduos saudáveis e imunodeprimidos com *Leishmania* spp, durante 2 h, numa proporção de 1PMN:3 parasitas. A taxa de infecção foi obtida por contagem de neutrófilos infetados presentes num total de 100 células em dez campos microscópicos (ampliação 1000×) por lâmina e em dez amostras independentes, por espécie de *Leishmania* e para ambos os grupos em estudo.

2.3. Resposta imunitária inata

Os neutrófilos são componentes importantes da imunidade inata, necessários para manter a homeostasia do organismo. São células efetoras polimorfonucleares de vida curta (aproximadamente 24 h), constituindo a linha de defesa primária contra agentes patogénicos. Na inflamação aguda, os neutrófilos presentes na corrente sanguínea são rapidamente recrutados para o local da infecção em resposta a fatores quimiotáticos libertados por agentes patogénicos ou células do hospedeiro. Após a adesão ao endotélio dos vasos sanguíneos, os neutrófilos migram para o local da infecção, seguindo o gradiente quimiotático. No local da inflamação, as células imunitárias ativadas adquirem a capacidade de destruir os organismos patogénicos, através de uma série de estratégias, que inclui a fagocitose, a desgranulação, a produção de radicais oxidativos e a formação de NET. Na fagocitose ocorre a conseqüente internalização de microrganismos nos fagossomas dos neutrófilos. Na desgranulação, verifica-se o processo de fusão dos fagossomas e lisossomas, formando fagolisossomas, com a libertação do conteúdo intra lisossomal que engloba os fatores antimicrobianos

derivados da exocitose dos grânulos. Os processos anteriores associados à produção de ROS geram um ambiente propício para a destruição intracelular de agentes patogênicos. Um outro mecanismo de defesa dos neutrófilos é a produção de NET, que possuem um aspecto semelhante a redes ou teias, formadas por fibras de cromatina descondensadas, envolvendo extracelularmente os agentes patogênicos (Zawrotniak & Rapala-Kozik, 2013).

2.3.1. Respiração oxidativa

2.3.1.1. Produção de ião superóxido por neutrófilos

Os neutrófilos são leucócitos facilmente recrutáveis, constituindo a primeira linha de resposta imunitária inata do hospedeiro contra agentes patogênicos invasores. Sob condições patológicas, a NADPH oxidase é ativada induzindo a produção de ROS, processo denominado de respiração oxidativa. Uma das ROS é o ião superóxido (O_2^-) que resulta da redução do oxigênio molecular pela oxidase NADPH e que desempenha um importante papel na defesa do hospedeiro e na sinalização celular, participando na atividade antimicrobiana dos PMN (Pliyev *et al.*, 2014).

Para a quantificação da produção do ião superóxido (O_2^-) foi utilizado o método colorimétrico de redução de azul de nitrotetrazólio (NBT, do inglês *nitroblue tetrazolium*) adaptado de Choi *et al.* (2006) e Sukhumavasi *et al.* (2007). Após a internalização celular de NBT (cor amarela) e redução do O_2^- pela NADPH formam-se cristais de *formazan*, de coloração azul, no interior das células que podem ser observados à vista desarmada ou por microscopia ótica. Com solventes orgânicos é possível solubilizar os cristais de *formazan* e efetuar uma estimativa da redução do NBT através de leitura em espectrofotômetro e, indiretamente quantificar os níveis de ião superóxido produzido pelas células.

Em placas de 96 poços de fundo redondo (Sigma-Aldrich) foram colocados PMN (5×10^5 /poço) isolados de sangue periférico humano. Em cada poço foi adicionado 300 μ L de uma suspensão de promastigostas de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* (15×10^5) em HBSS com 5% (v/v) de FBS e 0,4% (v/v) de NBT (Sigma-Aldrich). Perfazendo no final uma proporção de PMN/parasitas de 1:3.

Os poços aos quais foram adicionados apenas PMN foram utilizados como controle negativo. Os poços aos quais foram adicionados PMN e 1,2 μ g.mL⁻¹ de acetato de forbol

miristato (PMA, do inglês *phorbol myristate acetate*, Sigma-Aldrich), um ativador da respiração oxidativa, PMN e 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de LPS (Sigma-Aldrich) ou PMN e meio condicionante de linfócitos (MCLinf) foram analisados para a identificação do composto mais estimulador da produção de superóxido para ser utilizado como controlo positivo nos ensaios seguintes. O indutor escolhido foi também adicionado a PMN incubados na presença de parasitas de *Leishmania* spp.

As placas foram incubadas durante 2 h em estufa (MCO-18 AIC, Sanyo) a 37°C, em atmosfera húmida com 5% de CO₂.

Após incubação, as culturas foram centrifugadas a 300×g, 10 min à TA e lavadas duas vezes com 200 μL de NaCl 0,9% (m/v) diluído em PBS morno para retirar os grânulos extracelulares de *formazan*. De seguida, foi adicionado a cada poço 100 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*, Sigma-Aldrich) 10% com 100 μL de HCl (Merck) 0,1N (Fig. 6). A absorvância das amostras foi lida num leitor de placas de ELISA (Anthos 2010, Áustria) com comprimento de onda de 570 nm. Os ensaios foram realizados em triplicado. Os poços que continham HBSS com 5% FBS e 0,4% de NBT foram espectrofotometricamente lidos como brancos. É assumido que a intensidade da reacção colorimétrica é directamente proporcional à atividade enzimática.

Conjuntamente, foi efetuada a cito-centrifugação das células em lâminas que foram posteriormente fixadas com metanol e coradas com 1% de safranina O (Sigma-Aldrich). Os cristais de *formazan* resultantes da redução do NBT pelo ião superóxido foram observados nas lâminas ao microscópio ótico e imagens digitais foram adquiridas com software *Motic Images Plus* versão 2.0.

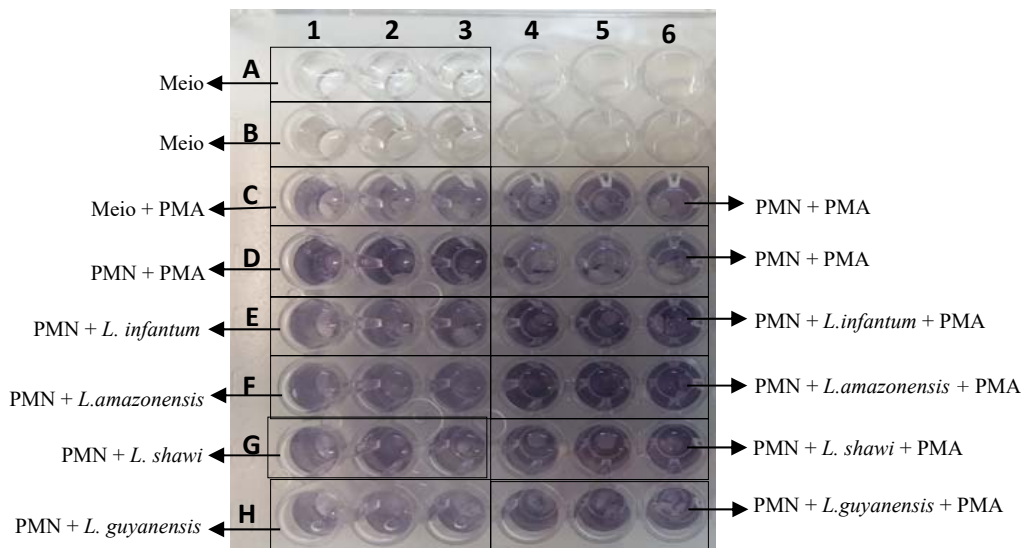


Figura 6: Esquema ilustrativo do ensaio colorimétrico de NBT para quantificação do ião superóxido.

Imagem representativa da dissolução dos cristais de *formazan* após adição de SDS a 10% e HCL 0,1N. Meio (HBSS 5% de FBS e 0,4% de NBT), PMN (células polimorfonucleares), PMN + *Leishmania* (PMN incubados na presença de *Leishmania* spp.), PMN + *Leishmania* + PMA (PMN incubados na presença de *Leishmania* spp. e PMA). As amostras foram analisadas em triplicado.

2.3.2. Exocitose granular

2.3.2.1. Exocitose de elastase neutrofílica e catepsina G

A NE e a CatG são proteases da serina armazenadas nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos. A exocitose das enzimas NE e CatG por neutrófilos modula o processo inflamatório e participa na destruição intracelular de agentes patogénicos. Estas enzimas também estão envolvidas na formação das NET devido à sua elevada afinidade para com o DNA (Trzybulska *et al.*, 2014, Huang *et al.*, 2015).

Em placas de 96 poços de fundo redondo foram colocados PMN (5×10^5 /poço) isolados de sangue periférico humano. Promastigostas de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* (15×10^5 /poço) ressuspendidos em 300 μ L de HBSS com 5% de FBS, foram adicionados aos PMN de modo a respeitar a proporção de PMN/parasitas de 1:3. As placas foram incubadas durante 2 h a 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO₂. Cada amostra foi analisada em triplicado.

Poços com PMN e HBSS suplementado com 5% de FBS foram considerados controlos negativos. PMN estimulados com PMA, LPS ou MCL foram utilizados para identificar

o melhor indutor de exocitose de modo a poderem ser utilizados como controlos positivos. Após incubação a suspensão celular foi retirada de cada poço e centrifugada a $400 \times g$ durante 10 min.

A atividade enzimática de NE e de CatG foi imediatamente medida, através do uso de substratos sintéticos e colorimétricos, *N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-pNA* (Sigma-Aldrich) na concentração de 1mM para NE e *N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA* (Sigma-Aldrich) na concentração de 25 mM para CatG (Morohoshi *et al.*, 2006, Mydel *et al.* 2008),

Os substratos foram diluídos em tampão de reação (25 mM Tris-HCl) com pH 7,5. Numa nova placa com poços de fundo redondo foi colocado 100 μ L dos sobrenadantes provenientes da infeção de PMN + *Leishmania* spp. e adicionado 100 μ L dos substratos.

A absorvância dos respetivos poços foi lida a 415 nm num leitor de placas de ELISA (TRIADTM 1065, DYNEX Technologies, EUA) aos 0 min (logo após a adição do substrato), aos 15 min e aos 30 min de incubação a 37°C, em atmosfera húmida com 5% de CO₂.

As absorvâncias dos poços com meio HBSS e o substrato de NE ou CATG foram lidas como brancos. Sendo os substratos colorimétricos foi assumido que a intensidade da reação colorimétrica é diretamente proporcional à atividade da respetiva enzima.

2.4. NET

As NET são libertadas quando ocorre contacto com agentes patogénicos, num processo chamado netose. As redes são formadas no espaço extracelular por fibras de cromatina descondensada envolvidas por proteínas (histonas) normalmente encontrados no núcleo, em grânulos ou no citoplasma de neutrófilos. A principal função das NET é dificultar a progressão e causar a destruição dos agentes patogénicos (Zawrotniak & Rapala-Kozik, 2013; Halverson, 2015).

A capacidade de *Leishmania* spp. induzir a formação de NET foi avaliada em PMN isolados de sangue periférico humano incubados durante 2 h com *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* através de microscopia eletrónica de varrimento. Foram ainda avaliados PMN (controlo negativo), PMN estimulados por PMA (controlo positivo) e PMN com *Leishmania* spp. e com PMA.

As preparações para microscopia eletrônica de varrimento foram realizadas de acordo com o protocolo estabelecido por Brinkmann *et al.* (2010).

Nos poços de uma placa de 96 poços foram colocadas lamelas redondas de vidro de 22 mm, devidamente esterilizadas. Foram adicionados PMN (5×10^5 /poço) e promastigotas de *Leishmania* spp. (15×10^5 /poço) ressuspensos em 500 μ L de HBSS suplementado com 5% de FBS, na proporção de 1:3. As placas foram incubadas durante 2 h a 37°C em atmosfera húmida com 5 % de CO₂.

Terminado o período de incubação, as lamelas foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS, durante 8 h e de seguida cuidadosamente transferidas para nova placa com a parte superior da lamela (onde ocorreu a fixação das células e /ou adição de parasitas) virada para baixo. As lamelas foram pós-fixadas com uma solução 2,5% de glutaraldeído (Sigma-Aldrich) em PBS durante 30 min. Foram lavadas três vezes em água destilada durante 5 min. Depois das lavagens, as lamelas foram incubadas com uma solução de 500 μ L de água destilada e 0,5% (v/v) de tetróxido de ósmio (OsO₄, do inglês *osmium tetroxide*, Sigma-Aldrich) durante 30 min. O processo de lavagem foi repetido e seguido por uma nova incubação com uma solução de 500 μ L de água destilada e 1% de ácido tânico (do inglês, *tannic acid*, Sigma-Aldrich) durante 30 min. De seguida, as lamelas foram novamente lavadas e incubadas com a solução de OsO₄ durante 30 min. Após lavagem, foram desidratadas por sucessivas passagens em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90% and 100%) por períodos de 5 min e conservadas a 4°C em placas de 24 poços (Sigma-Aldrich) com 1 mL de etanol a 100%. Posteriormente, as lamelas foram secas e revestidas com partículas de paládio de ouro (metalização) e observadas em microscopia eletrônica de varrimento (JEOL 5200-LV, Japão). Imagens digitais foram adquiridas para posterior determinação da ocorrência ou ausência de libertação de NET, que possuem a aparência de redes, teias, ou fios, constituídas por fibras de cromatina descondensadas, histonas e proteínas citosólicas e granulares, por PMN expostos às diversas espécies de *Leishmania* spp.

A microscopia eletrônica de varrimento e aquisição das imagens foi gentilmente concretizada pela Professora Doutora Graça Alexandre-Pires da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa.

A edição das fotografias das NET foi gerada com o programa *GIMP* versão 2.8.

2.5. Meio condicionado de linfócitos (MCLinf)

2.5.1. Células mononucleares

As células mononucleares englobam linfócitos e monócitos, constituindo cerca de 20% a 30% dos leucócitos presentes no sangue periférico dos mamíferos.

Existem duas grandes famílias de linfócitos, os linfócitos B responsáveis pela imunidade humoral, envolvidos no reconhecimento de agentes efetores e antigénios, sinalizando-os com vista à destruição dos mesmos. Os linfócitos T são as principais células da imunidade celular, pois promovem a destruição das células infetadas ou neoplásicas e dirigem a atuação de outras células do sistema imunitário

Existem três subtipos de linfócitos T, os linfócitos T auxiliares ou T *helper* (Th) que auxiliam outras células, tais como linfócitos B ou macrófagos a desempenharem atividades que fazem parte da resposta imunitária global a uma determinada estimulação antigénica ou inflamatória. Os linfócitos T citotóxicos (Tc) atuam diretamente sobre células infetadas e os linfócitos T reguladores (Treg) estão envolvidos na regulação da resposta imunitária específica (Arosa *et al.*, 2012).

Os linfócitos necessitam de ser estimulados por antigénios ou mitogénios, para que proliferem e se diferenciem, produzindo anticorpos e/ou citocinas (Aleksandr *et al.*, 2015).

2.5.1.1. Separação e diferenciação de células mononucleares

Um método simples para a separação dos linfócitos dos restantes constituintes celulares do sangue periférico consiste na preparação de um gradiente de densidade, com o auxílio de Hystopaque® 1077 (Sigma-Aldrich), substância constituída por uma solução solução estéril de polissacarose (57 g.L^{-1}) e diatrizoato de sódio (90 g.L^{-1}) com densidade de $1,076\text{-}1,078 \text{ g.mL}^{-1}$. Este método baseia-se na diferença de densidade das células mononucleares em relação aos restantes constituintes celulares (glóbulos vermelhos e PMN).

Num tubo de 15 mL foi colocado 2 mL de Hystopaque® 1077. Sobre o gradiente foi adicionado delicadamente 2 mL de sangue. Os tubos foram centrifugados a $340\times g$ sem travão, durante 30 min à TA, numa centrífuga com rotor basculante. Após centrifugação, o anel rico em células mononucleares (Fig. 7A) que se situa entre o

plasma (Fig. 7B) e o gradiente de Hystopaque® foi cuidadosamente recolhido (Fig. 7C). Foi efetuada uma lavagem com NaCl 0,9% (m/v) a $300\times g$, durante 10 min à TA. Os monócitos foram ressuspensos em meio RPMI completo aquecido a 37°C suplementado com 10% (v/v) do fator estimulador de colónias (CSF, do inglês *colony stimulating factor*) e verificada a viabilidade celular pela coloração de azul tripano (conforme descrito em 2.1.2.6). A adição de 10% de CSF, glicoproteínas secretadas pelo hibridoma L929 induz a diferenciação dos monócitos em macrófagos.

Numa placa de seis poços foi colocado 3 mL de suspensão celular com CSF por poço. A placa foi incubada a 37°C , em atmosfera húmida com 5% de CO_2 , durante 24 h, de modo a promover a diferenciação das células monocitárias presentes na suspensão celular, em macrófagos.

Os macrófagos são células com capacidade de aderir a um substrato como é o caso do plástico, depositando-se na base da placa, ficando os linfócitos em suspensão, no sobrenadante.

Após o período de incubação o sobrenadante foi retirado e transferido para um tubo seco (Falcon, 15 mL). Os tubos foram centrifugados a 24°C , $300\times g$, durante 10 min à TA. O sobrenadante foi descartado e as células linfocitárias foram ressuspensas em RPMI completo. Foi efetuada a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer e a concentração celular ajustada para 10^6 linfócitos.mL⁻¹.

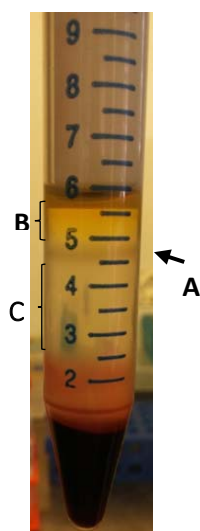


Figura 7: Isolamento de células mononucleares a partir de sangue periférico de humano.

O anel de células mononucleares (A) indicado por uma seta fica situado entre o plasma (B) e o Hystopaque® 1077 (C).

2.5.2. Mitogénio

Os mitógenos são proteínas, da família das lectinas, tais como a fitohemaglutinina (PHA, do inglês *phytohemagglutinin*), a concanavalina A (ConA, do inglês *concanavalin A*), entre outras. Os mitogénios ligam-se a recetores celulares específicos de hidratos de carbono existentes na membrana dos linfócitos, estimulando a proliferação celular (Beinke *et al.* 2015).

A ConA, pertencente à família das lectinas leguminosas e estimulador de células T foi a primeira lectina a ser disponibilizada comercialmente, sendo amplamente utilizada nas áreas da biologia e bioquímica, especialmente, para caracterizar glicoproteínas e estudar a regulação de diversas células envolvidas no sistema imunitário (Dwyer & Johnson, 1981).

No presente estudo a ConA foi utilizado numa concentração de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em meio RPMI 1640.

2.5.2.1. Proliferação linfocitária

Em microplaca de 96 poços com fundo em U (Sigma-Aldrich) foi colocado $50 \mu\text{L}$ de RPMI suplementado com 20% FCS inativado e adicionado $50 \mu\text{L}$ da suspensão de linfócitos. Aos poços foi ainda adicionado $50 \mu\text{L}$ do mitogénio ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e a placa foi deixada a incubar entre quatro a cinco dias, a 37°C numa atmosfera de 5% de CO_2 . O sobrenadante de cada um dos poços foi recolhido para um tubo seco (Falcon, 15 mL) e centrifugado a $3000\times g$, durante 10 min à TA. O sobrenadante (MCLinf) foi recolhido e crioconservado (-20°C).

2.5.3. Teste de aglutinação direta

2.5.3.1. Antígeno

Antígeno é uma molécula presente na superfície dos microorganismos, tais como parasitas, vírus ou bactérias, que serão reconhecidos por anticorpos. Os anticorpos são proteínas específicas que foram produzidas pelos linfócitos B e T, após estimulação destes por um determinado antígeno. A especificidade da ligação anticorpo-antígeno (Fig. 8) está dependente das estruturas químicas do antígeno e do anticorpo.

O antígeno utilizado para a realização da DAT foi gentilmente cedido pelo Professor Doutor Saul Semião Santos, Universidade Tiradentes, Aracaju, Brasil.

O antígeno foi diluído em HBSS, tendo sido utilizado na concentração de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$

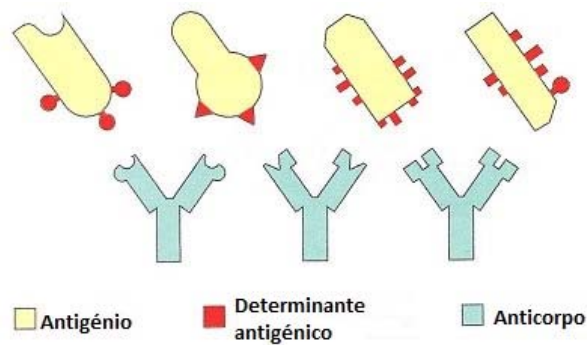


Figura 8: Imagem ilustrativa da interação anticorpo-antígeno.

O antígeno (amarelo) está presente na superfície dos microorganismos e possui determinantes antigênicos (vermelho) que possuem um grau de especificidade para determinado anticorpo (azul) que são produzidos pelas células T e B do organismo do hospedeiro (imagem adaptada de <http://www.estudopratico.com.br/antigenos-e-anticorpos-o-que-sao-e-qual-sua-relacao>).

2.5.3.2. Soros

Dos 20 mL de sangue recolhido a cada um dos participantes, 5 mL de sangue foram utilizados para DAT. Os 5 mL de sangue foram colocados num tubo seco (Falcon, 15 mL). Os tubos foram deixados à TA até ficarem coagulados (cerca de 30 min). Posteriormente, foram centrifugados a $2000\times g$, durante 10 min, a 4°C . O sobrenadante foi recolhido para um tubo seco (*Eppendorf*, 2 mL) (*DeltaLab*) e conservado a -20°C .

Soros de indivíduos com leishmaniose visceral gentilmente cedidos pelo Professor Doutor Carlos Henrique Nery Costa da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil, foram utilizados como controlos positivos.

2.5.4. Metodologia de execução do DAT

As reações de aglutinação decorrem da ligação anticorpo/antígeno, baseada na deteção de anticorpos específicos mediante a utilização de antígenos conhecidos. O teste de

aglutinação directa (DAT, do inglês *direct agglutination test*) em microplaca foi desenvolvido para o diagnóstico da leishmaniose visceral. Apesar de ter sido inicialmente desenvolvido por Allain e Kagan (1975) foi Harith *et al.* (1986) que estabeleceram um ensaio serológico caracterizado por apresentar uma metodologia simplificada mas com elevados níveis de sensibilidade e especificidade.

Foram realizadas diluições seriadas do anticorpo em relação a uma quantidade constante de antigénio. Após um período de incubação, para que ocorra aglutinação, o resultado é expresso pela máxima diluição em que se observa a aglutinação.

No caso de as amostras serem negativas, será observado um precipitado de cor azul. Este efeito ocorre devido à ausência de anticorpo na amostra, levando a que o antigénio não adsorvido ao anticorpo precipite. Contudo também pode ocorrer, devido ao excesso de anticorpos na amostra, falsos-negativos, ou seja, quando existe uma elevada presença de anticorpos na amostra. Para precaver esta situação, recorre-se a diluições seriadas do soro. Contudo, estas devem ser controladas para evitar que ocorram falsos-positivos. No caso de as amostras serem positivas, não ocorre precipitado por o anticorpo se ligar ao antigénio.

Utilizando microplacas de 96 poços com fundo em V (Sigma-Aldrich) foram colocados 50 μ L da solução diluente [de HCL 0,15M com 0.2% gelatina (Sigma-Aldrich) em água destilada e 0,2M de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)] em cada poço. A presença de 2-mercaptoetanol na solução diluente aumenta a especificidade da reação e facilita a leitura. Foram adicionados 50 μ L de soro a cada um dos poços da coluna B e D e efetuadas diluições de 1:10 para as colunas C e E, respetivamente. Aos poços da coluna A não foi adicionado soro, sendo os poços considerados controlos negativos. As placas foram incubadas a 37°C durante 1 h. Posteriormente 50 μ L de antigénio foi adicionado a cada poço, tendo as placas ficado a incubar durante 18 h à TA. Uma vez que a suspensão antigénica é tratada com formaldeído, não ocorre proliferação bacteriana durante a incubação. A leitura da placa foi realizada visualmente (Fig. 9). O título do soro foi determinado pela diluição anterior que apresentava um precipitado homogéneo (ponto) azul similar ao controlo negativo.

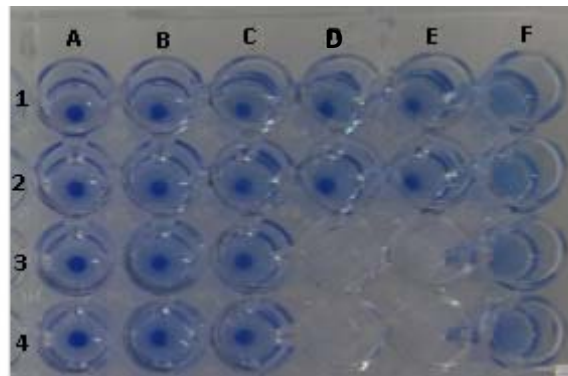


Figura 9: DAT.

Na coluna A estão os controlos negativos (A1, A2, A3, A4) e na coluna F os controlos positivos (F1, F2, F3, F4). A cada um dos poços da coluna B e D foram adicionados soros de diferentes indivíduos sendo que na coluna C e E correspondem a diluições seriadas de 1:10.

2.6. Análise estatística

Neste estudo foram realizados dez ensaios para cada um dos grupos em estudo (sem doenças infecciosas ou parasitárias, sem sistema imunitário debilitado (saudáveis) e com sistema imunitário debilitado (imunocomprometidos)). Cada amostra foi ainda analisada em triplicado, em todos os ensaios, excepto o DAT.

A análise estatística foi realizada com o programa *IBM SPSS Statistics 22*. Aos resultados foi aplicado inicialmente o teste *Kolmogorov-Smirnov* para testar a normalidade da distribuição da amostra, sendo considerado um intervalo de 95% de confiança ($p > 0.05$). Posteriormente foi aplicado o teste paramétrico *T-Student* para amostras emparelhadas. Foi considerado um intervalo de 95% de confiança ($p < 0.05$). Os resultados apresentados foram concebidos a partir de médias.

Os gráficos foram gerados com o programa *Graphpad Prism 6.0* (USA). Os gráficos apresentados são constituídos por médias e valores máximos e mínimos.

Na amostra utilizada no presente estudo, foi analisada a significância estatística das seguintes comparações:

- Respiração oxidativa:

- O controlo positivo foi determinado por comparação dos níveis de produção do ião superóxido produzidos por PMN com PMN estimulado por PMA, MCLinf ou LPS, com aplicação do teste estatístico não paramétrico *Wilcoxon*.

- Produção do ião superóxido por PMN, PMN estimulados com PMA, PMN expostos a promastigotas de *Leishmania* spp. com/sem exposição a PMA, de ambos os grupos constituintes da amostra, indivíduos saudáveis e imunocomprometidos, com aplicação do teste estatístico paramétrico *t-Student*.
 - Comparação na produção do ião superóxido entre as diferentes espécies de *Leishmania* spp. em ambos os grupos da amostra em estudo.
 - Comparação entre os grupos da amostra em estudo, na produção do ião superóxido por PMN expostos a diferentes espécies de *Leishmania* spp.

- Respiração não oxidativa:

- O controlo positivo foi determinado por comparação dos níveis de atividade enzimática de PMN, PMN estimulado por PMA, MCL ou LPS, com aplicação do teste estatístico não paramétrico *Wilcoxon*.
- Valores da atividade enzimática de NE e CatG dos sobrenadantes de PMN, PMN estimulado por PMA, PMN expostos a promastigotas de *Leishmania* spp. na presença ou ausência de PMA, para ambos os grupos constituintes da amostra em estudo, indivíduos saudáveis e imunocomprometidos, com aplicação do teste estatístico paramétrico *t-Student*.
 - Comparação da exocitose de CatG e NE entre as diferentes espécies de *Leishmania* spp. em ambos os grupos da amostra em estudo.
 - Comparação entre os grupos da amostra em estudo, na exocitose de CatG e NE por PMN expostos a diferentes espécies de *Leishmania* spp.

- NET

- Foi comparado a formação de NET em PMN incubados na presença de promastigotas de *Leishmania* spp com/ sem exposição a PMA para ambos os grupos em estudo, com aplicação do teste estatístico paramétrico *t-Student*.
 - Comparação da formação de NET entre as diferentes espécies de *Leishmania* spp. no grupo dos indivíduos imunodeprimidos em estudo.

3. Resultados

3.1.DAT

3.1.1. Os participantes do estudo não evidenciaram contacto anterior com *L. infantum*

O DAT permitiu verificar que todas as amostras, de todos os indivíduos selecionados e que integraram ambos os grupos em estudo, apresentaram resultados negativos, o que indica que os indivíduos não desenvolveram anticorpos anti-*L. infantum*, sugerindo que nunca foram infectados

3.2. Pureza e infecção dos neutrófilos

3.2.1. A metodologia aplicada permitiu obter suspensões de neutrófilos com elevado nível de pureza

Lâminas de *citospins* de PMN de indivíduos saudáveis e de indivíduos imunocomprometidos foram observadas ao microscópio ótico após serem corados com Giemsa.

Foi analisada a percentagem de pureza de neutrófilos para ambos os grupos em estudo. A percentagem de pureza de PMN de indivíduos saudáveis foi de 92% e a de indivíduos imunocomprometidos foi de 94%.

Os neutrófilos apresentavam morfologia normal (Fig. 10), com núcleo segmentado fortemente corado de rosa, constituído por 2 a 5 lobos unidos por fibras de cromatina.

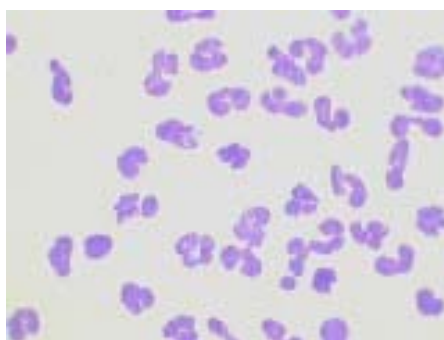


Figura 10: Morfologia de neutrófilos humanos.

Neutrófilos isolados de sangue periférico por gradiente de densidade, corados por Giemsa e observados ao microscópio ótico (ampliação 1000x).

3.2.2. Promastigotas de *Leishmania* spp. são fagocitadas por PMN de indivíduos saudáveis e de indivíduos imunocomprometidos

Foram observadas ao microscópio ótico lâminas de *citospins* de PMN de indivíduos saudáveis e de indivíduos imunocomprometidos expostos a promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* durante 2 h.

Foi observado internalização por PMN de todas as espécies de parasitas de *Leishmania* utilizadas neste estudo, tendo os promastigotas diferenciado-se na forma amastigota. Estes resultados demonstram que independentemente do estado imunitário do indivíduo, os PMN têm capacidade para reconhecer e fagocitar promastigotas de espécies cutâneas e viscerais de *Leishmania*.

A taxa de infecção dos neutrófilos humanos por *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis* após 2h de incubação variou entre 19% e 23%, independentemente da origem dos PMN (Tabela 1).

Estes resultados demonstram que independentemente do estado imunitário do indivíduo, os PMN têm capacidade para reconhecer e fagocitar promastigotas de espécies cutâneas e viscerais de *Leishmania* de modo semelhante. As taxas de infecção estimadas foram relativamente elevadas e o processo de internalização do parasita foi rápido (2 h).

Média de infecção de neutrófilos (%)

Parasitas	Saudáveis	Imunocomprometidos
<i>L. infantum</i>	21	20
<i>L. amazonensis</i>	19	22
<i>L. shawi</i>	21	22
<i>L. guyanensis</i>	23	19

Tabela 1: Taxa de infecção de neutrófilos humanos com espécies diferentes de *Leishmania*.

Neutrófilos isolados de indivíduos saudáveis e de indivíduos imunocomprometidos expostos durante 2 h a promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis* foram observados em microscopia ótica e contabilizado o número de células infectadas num total de 100 neutrófilos.

3.3. Controlos positivos

3.3.1. PMA e MCLinf foram selecionados como controlos positivos

Com o objetivo de identificar o melhor indutor de atividade dos PMN para vir a ser utilizado nos ensaios de exocitose de NE, CatG e produção de ião superóxido como controlo positivo, células estimuladas por PMA (Fig. 11 A), MCLinf (Fig. 11 B) e LPS (Fig. 11 C) foram comparadas com células não estimuladas (CN). Foram selecionados os compostos que induziram maior atividade dos PMN.

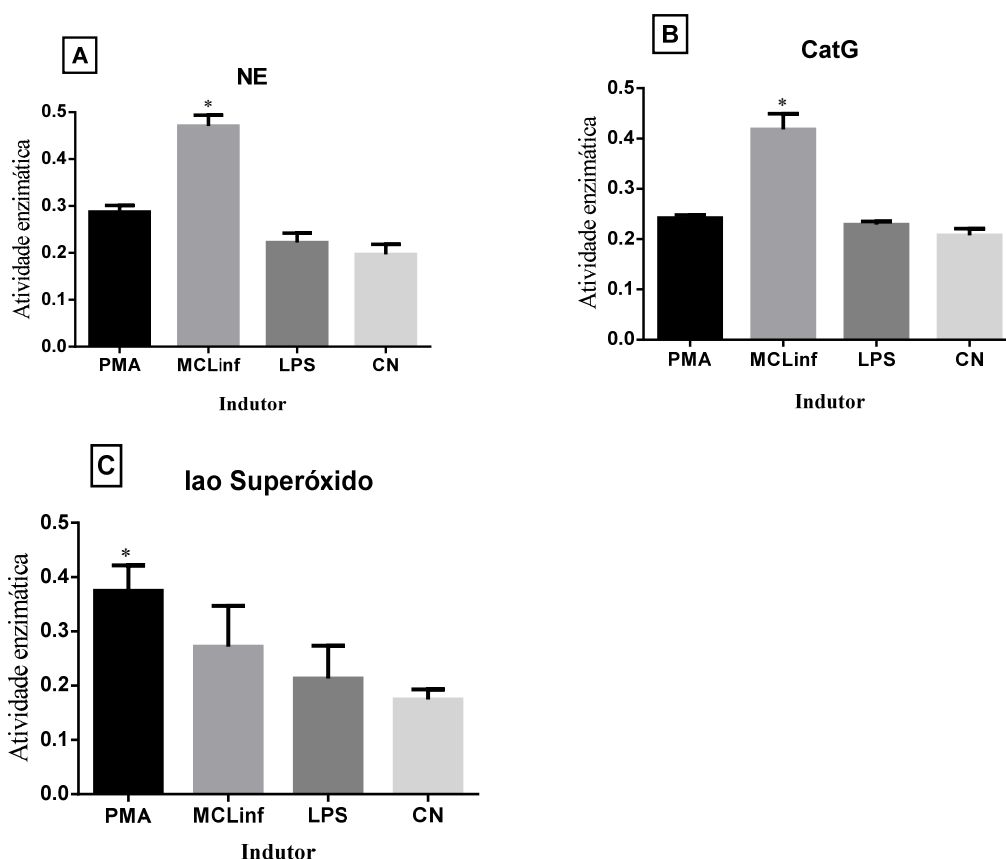


Figura 11: Indutores da atividade de PMN.

A capacidade de PMA, MCLinf e LPS induzir a exocitose de NE (A) e de CatG (B) e de promover a produção do ião superóxido por PMN humanos (C) foi comparada com PMN não estimulado (CN). Todos os ensaios foram incubados durante 2 h. Na produção de ião superóxido as absorvâncias foram lidas a 570 nm e para CatG e NE as absorvâncias foram lidas a 415 nm. Os resultados encontram-se expressos através da média e desvio padrão de três experiências independentes realizadas em triplicado. O teste não paramétrico *Wilcoxon* foi utilizado para comparar as amostras. * ($p < 0,05$) indica diferenças significativas entre PMN (CN) e as outras condições.

Na produção do ião superóxido verificou-se que PMN estimulados por PMA apresentaram aumento significativo da intensidade espectrofotométrica, quando comparado com PMN não estimulados (CN) ($p=0,009$), indicando um significativo incremento da produção de O_2^- . Para NE e CatG verificou-se que existe exocitose significativamente mais elevada nos PMN estimulados por MCLinf ($p<0,001$) quando comparado com PMN sem estimulação. Pelo que PMA e MCLinf foram utilizados regularmente nos nossos ensaios como controlo positivo (CP) e PMN sem estimulação como controlo negativo (CN).

3.4. Distribuição da amostra

Para o grupo de indivíduos saudáveis e para o grupo de indivíduos imunocomprometidos, quer nos resultados do ensaio da respiração oxidativa (ião superóxido), quer nos ensaios de atividade enzimática (catepsina G e elastase neutrofílica) foi verificado um nível de significância superior a 5%, ou seja, $p \geq \alpha = 0,05$ (Tab. 2), para ambos os casos, demonstrando que a amostra tem uma distribuição normal, proveniente de uma população normal.

Análise estatística (*p-value*)

	Saudáveis	Imunocomprometidos
Ião Superóxido	$p= 0,113$	$p= 0,093$
Catepsina G	$p= 0,176$	$p= 0,116$
Elastase neutrofílica	$p= 0,283$	$p= 0,124$

Tabela 2: Resultado estatístico da normalidade da amostra.

O teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov* foi aplicado ao grupo de indivíduos saudáveis ($n=10$) e ao grupo de indivíduos imunocomprometidos ($n=10$), de modo a testar a normalidade da distribuição da amostra. Para valor de $p>0,05$ não é rejeitada a hipótese nula, ou seja, considera-se que a amostra tem uma distribuição normal.

3.5. Respiração oxidativa e exocitose granular

3.5.1. Ião Superóxido

3.5.1.1. *Leishmania* spp. induz PMN de indivíduos saudáveis a produzir ião superóxido

Foi realizada a quantificação da produção de O_2^- por PMN, PMN estimulado por PMA, PMN expostos a promastigotas de *L. infantum* (LI), *L. amazonensis* (LA), *L. shawi* (LS) ou *L. guyanensis* (LG). Foi também quantificada a produção de O_2^- em PMN estimulados por PMA e expostos a promastigotas de *L. infantum* (LI⁺), *L. amazonensis* (LA⁺), *L. shawi* (LS⁺) ou *L. guyanensis* (LG⁺).

Verificou-se que PMN estimulados por PMA apresentaram aumento significativo da intensidade espectrofotométrica quando comparado com PMN não estimulados (CN) ($p=0,009$), indicando que as células estavam ativas e capazes de entrar em stress oxidativo, libertando radicais oxidativos.

Observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p<0,001$) na produção de O_2^- quando se compararam os sobrenadantes do CN com os sobrenadantes de PMN expostos a promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis*. Os níveis de produção de superóxido foram idênticos em todos os casos de PMN expostos ao parasita. Estes resultados indicam que a presença do parasita induz a produção do ião superóxido por PMN (Fig. 12).

PMN estimulados por PMA e expostos aos parasitas apresentaram níveis elevados de produção de O_2^- quando comparados com o CN ($p<0,001$).

Os PMN estimulados com PMA e expostos a promastigotas de *L. infantum* (LI⁺ $p=0,004$), *L. amazonensis* (LA⁺ $p=0,001$), *L. shawi* (LS⁺ $p=0,017$) ou de *L. guyanensis* (LG⁺ $p=0,004$) apresentaram aumentos significativos do ião superóxido quando comparados com PMN expostos aos respetivos parasitas (LI, LA, LS ou LG) e com o CP ($<0,001$).

Estes resultados indicam que mesmo na presença de *Leishmania* spp., os PMN são capazes de incrementar a produção do superóxido quando adicionalmente estimulados (PMA), demonstrando a viabilidade e competência destas células na produção de radicais oxidativos.

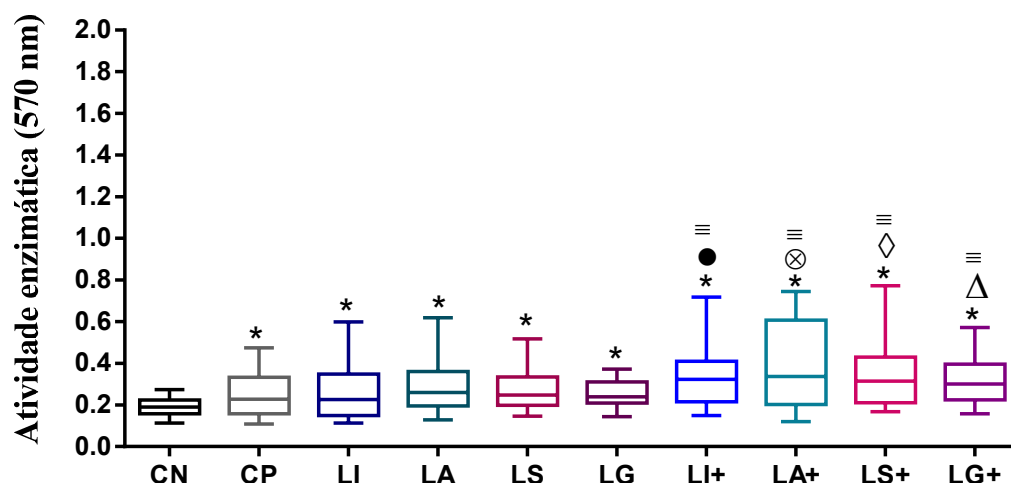


Figura 12: Respiração oxidativa de PMN de indivíduos saudáveis quando expostos a parasitas de *Leishmania* spp.

Os sobrenadantes de PMN (controlo negativo, CN), PMN+PMA (controlo positivo, CP), PMN+*Leishmania* spp. e PMN+ PMA+*Leishmania* spp. foram incubados com NBT. Após a incubação, os cristais de *formazan* foram solubilizados e a atividade enzimática lida a 570 nm. Os PMN foram expostos a promastigotas de *L. infantum* (LI), *L. amazonensis* (LA), *L. shawi* (LS) ou *L. guyanensis* (LG) e incubados na presença de promastigotas de *Leishmania* spp. na presença de PMA (LI+, LS+, LS+, LG+). Os resultados encontram-se expressos através da mediana e valores máximos e mínimos de dez experiências independentes realizadas em triplicado. O teste paramétrico *T-Student* foi utilizado para comparar as amostras ($p < 0,05$). * indica diferenças significativas entre CN e as outras condições; • indica diferenças estatísticas entre LI e as outras condições; ⊗ indica diferenças estatísticas entre LA e as outras condições; ◇ indica diferenças estatísticas entre LS e as outras condições; Δ ($p < 0,05$) indica diferenças estatísticas entre LG e as outras condições e ≡ indica diferenças estatísticas entre CP e outras condições.

3.5.1.2.L. *infantum* e *L. amazonensis* induzem a produção do ião superóxido por PMN de indivíduos imunocomprometidos

PMN de indivíduos imunocomprometidos estimulados por PMA apresentaram aumento significativo da intensidade espectralométrica ($p < 0,001$) quando comparado com os valores de absorvância evidenciado por PMN (CN), indicando aumento de produção de O_2^- . Quando se compararam os valores de absorvância dos sobrenadantes do CN com os dos PMN expostos a promastigotas de *Leishmania* spp. (Fig. 13) verificaram-se aumentos significativos de absorvâncias em PMN expostos a parasitas da espécie *L. infantum* ($p = 0,012$) e da espécie *L. amazonensis* ($p = 0,030$). Este resultado indica que estes parasitas induzem a produção do ião superóxido por PMN de indivíduos

imunocomprometidos. As restantes espécies de *Leishmania* causadoras de CL não parecem perturbar os PMN de indivíduos imunocomprometidos, não induzindo níveis importantes de stress oxidativo.

Os valores de absorvância dos sobrenadantes do CN foram comparados com os valores de PMN estimulados por PMA e expostos a promastigotas de *Leishmania* spp. PMN estimulados por PMA e expostos a promastigotas de *L. infantum* ($p < 0,001$), *L. amazonensis* ($p = 0,001$) ou *L. guyanensis* ($p < 0,001$) evidenciaram aumentos significativos do ião superóxido.

Os PMN estimulados com PMA e expostos a promastigotas de *L. infantum* (LI⁺ $p = 0,005$), *L. shawi* (LS⁺ $p = 0,001$) ou de *L. guyanensis* (LG⁺ $p < 0,001$) apresentaram aumentos significativos do ião superóxido quando comparados com PMN expostos aos respetivos parasitas (LI, LS ou LG).

Foi demonstrado que os PMN estavam viáveis na presença de *Leishmania* spp. e quando estimulados por PMA são capazes de induzir a produção do superóxido.

Na presença conjunta do parasita e do PMA também conduziu a produção significativa de ião superóxido, mas nunca foi superior ao CP o que aponta para o controlo do stress oxidativo pelo parasita ou que a célula atingiu o limite máximo de produção do superóxido.

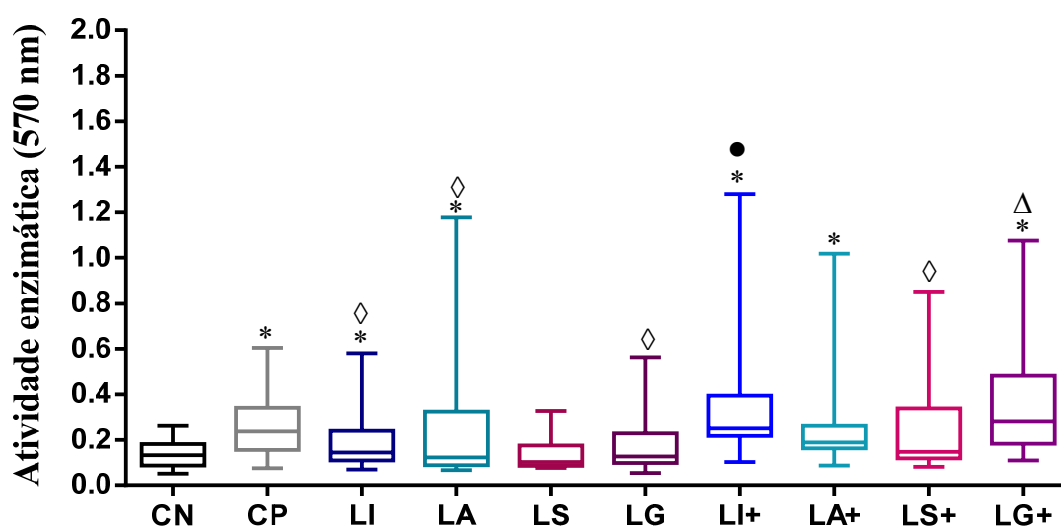


Figura 13: Respiração oxidativa em PMN de indivíduos imunocomprometidos expostos a promastigotas de *Leishmania* spp.

Os sobrenadantes de PMN (controle negativo, CN), PMN+PMA (controle positivo, CP), PMN+*Leishmania* spp. e PMN+PMA+*Leishmania* spp. de indivíduos imunocomprometidos foram incubadas com NBT. Após a incubação, os cristais de *formazan* foram solubilizados e a atividade enzimática lida a 570 nm. Os PMN foram expostos a promastigotas de *L. infantum* (LI), *L. amazonensis* (LA), *L. shawi* (LS) ou *L. guyanensis* (LG) e incubados na presença de promastigotas de *Leishmania* spp. na presença de PMA (LI⁺, LS⁺, LS⁺, LG⁺). Os resultados encontram-se expressos através da mediana e valores máximos e mínimos de dez experiências independentes realizadas em triplicado. O teste paramétrico *T-Student* ($p < 0,05$) foi utilizado para comparar as amostras. * indica diferenças significativas entre CN e as outras condições; • indica diferenças estatísticas entre LI e as outras condições; ⊗ indica diferenças estatísticas entre LA e as outras condições; ◇ indica diferenças estatísticas entre LS e as outras condições; Δ indica diferenças estatísticas entre LG e as outras condições.

3.5.1.3. PMN de indivíduos saudáveis evidenciam maior capacidade de produção de ião superóxido quando incubados na presença de *L. infantum*

Ao se comparar a produção do ião superóxido por PMN de indivíduos imunocomprometidos e saudáveis expostos às diferentes espécies de *Leishmania*, foi verificado aumento da produção do ião superóxido por PMN de indivíduos saudáveis quando expostos a promastigotas de *L. infantum* (LI $p=0,008$) (Fig. 14). Assim, os PMN de indivíduos saudáveis têm uma capacidade de respiração oxidativa, nomeadamente na produção de ião superóxido, mais eficaz do que PMN de indivíduos imunocomprometidos.

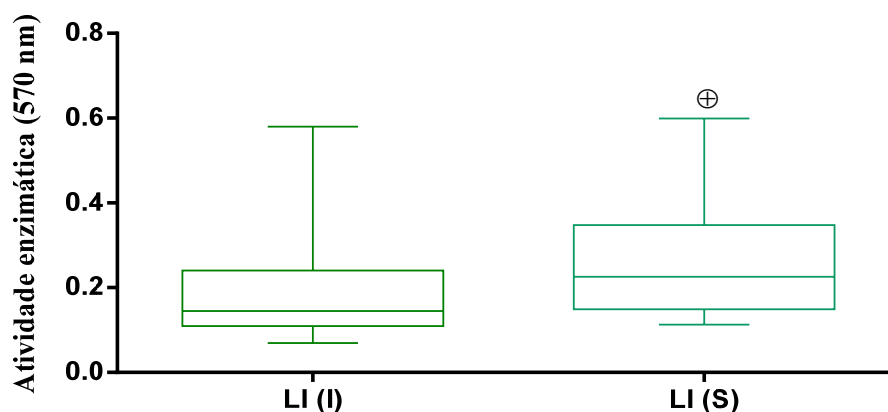


Figura 14: Comparação da respiração oxidativa em PMN de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos expostos a promastigotas de *Leishmania* spp.

Os sobrenadantes de PMN de indivíduos imunocomprometidos (I) e saudáveis (S) foram expostos a promastigotas de *L. infantum* (LI). Os resultados encontram-se expressos através da mediana de dez experiências independentes realizadas em triplicado. O teste paramétrico *T-Student* ($p < 0,05$) foi utilizado para comparar as amostras. ⊕ indica diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre LI (I) e LI (S).

3.5.2. Exocitose de CatG e NE

3.5.2.1. *Leishmania* spp. induz a exocitose de CatG por PMN de indivíduos saudáveis

Foi quantificada espectrofotometricamente a atividade enzimática de CatG (Fig. 15) em sobrenadantes de culturas de PMN sem estimulação (controlo negativo, CN), PMN estimulado por MCLinf (controlo positivo, CP) e em sobrenadantes de PMN expostos a parasitas de *L. infantum* (LI), *L. amazonensis* (LA), *L. shawi* (LS) ou *L. guyanensis* (LG). Após a adição do substrato específico para a enzima, a absorvância foi medida imediatamente (0 min) e após 15 min e 30 min.

Quando comparado com o CN, a atividade de CatG mostrou-se significativamente mais elevada nos PMN estimulados por MCLinf (CP) em todos os tempos de incubação com o substrato ($p < 0,001$). Estes resultados confirmam que MCLinf é um bom controlo positivo.

Aos 0 min, a atividade de CatG nos sobrenadantes de PMN expostos a LI ($p=0,020$, Fig. 15 A), LA ($p=0,010$, Fig. 15 B), LS ($p=0,010$, Fig. 15 C) ou LG ($p=0,017$, Fig. 15 D) revelou-se significativamente mais elevada em comparação com os valores de absorvância de CN. Estes resultados são indicativos de que a presença de *Leishmania* spp. induz a exocitose de CatG pelos neutrófilos humanos e que a quantidade de enzima disponível é suficiente para causar a rápida clivagem do substrato.

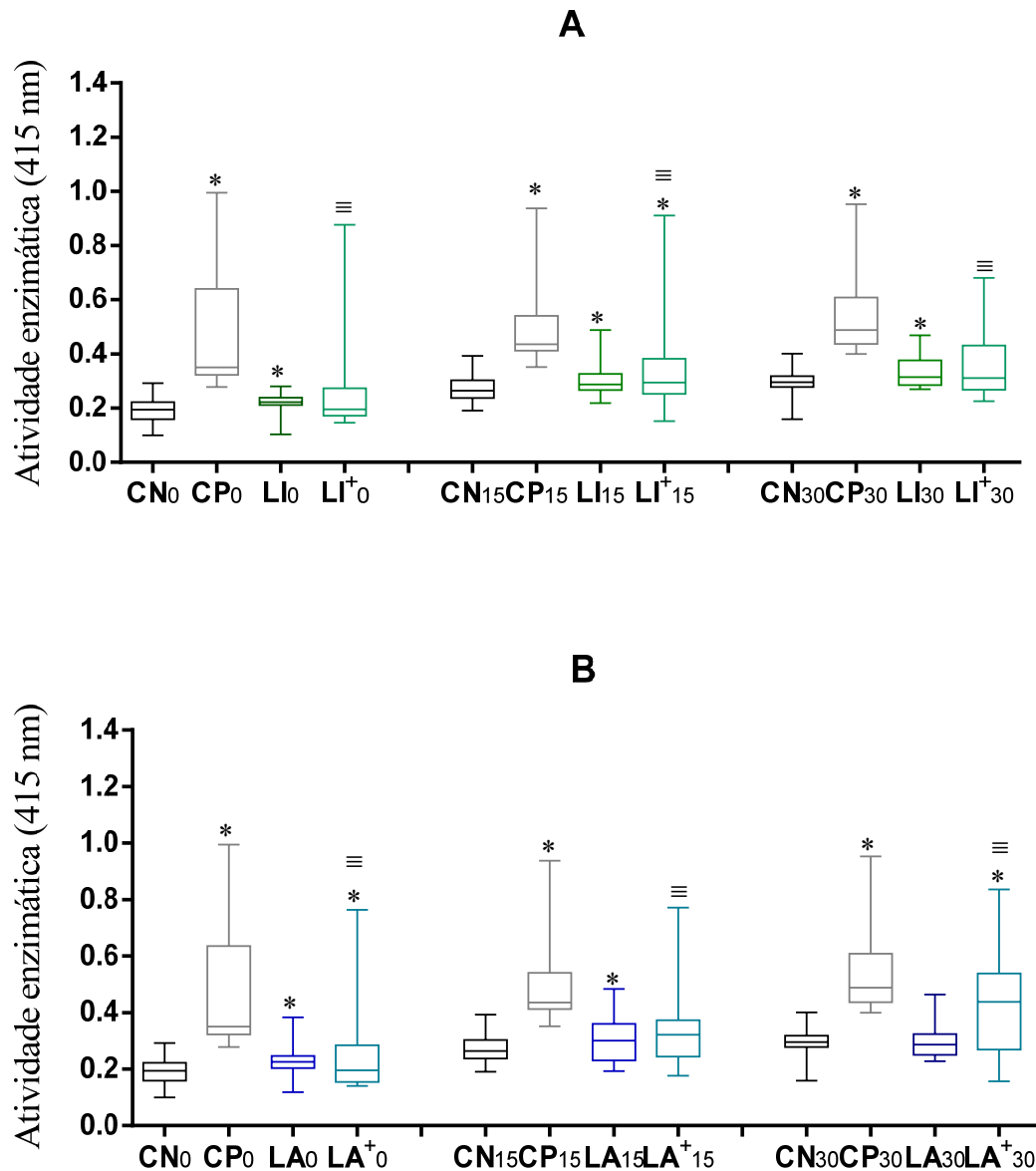
Também foi verificado aumentos significativos de absorvância nos sobrenadantes de LA⁺ ($p_{0min}=0,012$) e LG⁺ ($p_{0min}=0,017$) quando comparado com CN. Mas, também foi observado reduções significativas da atividade da CatG, nos sobrenadantes de LA⁺ ($p < 0,001$) e LG⁺ ($p < 0,001$) quando comparados com o CP. Estes resultados sugerem que embora o parasita permita atividade enzimática, ocorre regulação negativa na libertação da enzima ou até inibição, ainda que parcial, da ação da CatG, de modo a evitar a total destruição do parasita.

Aos 15 min verificaram-se aumentos significativos da atividade da CatG no sobrenadante de LI ($p_{15min}=0,029$) e LA ($p_{15min}=0,013$) em comparação com os valores de absorvância de CN. Estes resultados são indicativos de que após 15 min de contacto com o substrato a enzima continuava ativa. De modo similar, foram verificados aumentos significativos da atividade da CatG em sobrenadantes de LI⁺ quando comparados com o CN ($p_{15min}=0,045$). Porém, LI⁺ ($p_{15min}=0,003$) evidenciou menor actividade enzimática quando comparado com o CP, sugerindo algum controlo parasitário na exocitose ou na actividade da CatG.

Aos 30 min, foi observado aumento significativo nos valores da absorvância de sobrenadantes de PMN incubados com *L. infantum* ($p=0,004$) quando comparado com CN. Estes resultados são indicativos de que unicamente a *L. infantum* induziu a exocitose de quantidades suficientes de CatG que permitiu a continuação da atividade enzimática por um longo período (30 min).

Curiosamente, sobrenadantes de PMN estimulados por MCLinf e expostos a LA⁺ ($p_{30min}=0,002$) e LG⁺ ($p_{30min}=0,008$) mostraram aos 30 min aumentos significativos da atividade enzimática, quando comparados com CN. Porém, esta atividade evidenciada nos sobrenadantes de LA⁺ ($p_{30min}=0,007$) e LG⁺ ($p_{30min} < 0,001$) é significativamente menor do que a observada no CP, voltando a apontar para a intervenção do parasita na modulação da exocitose enzimática ou na atividade da CatG.

Em conjunto, estes resultados indicam que os PMN isolados de indivíduos saudáveis apresentavam-se competentes na indução de uma resposta enzimática eficaz quando confrontados com parasitas de espécies cutâneas e da espécie visceral e que esta resposta se mostrou duradoura, em particular no caso da espécie visceral (*L. infantum*). Contudo, os resultados também apontam para a regulação da atividade enzimática pelos parasitas. *L. shawi* e *L. guyanensis* foram as espécies que induziram menor atividade enzimática.



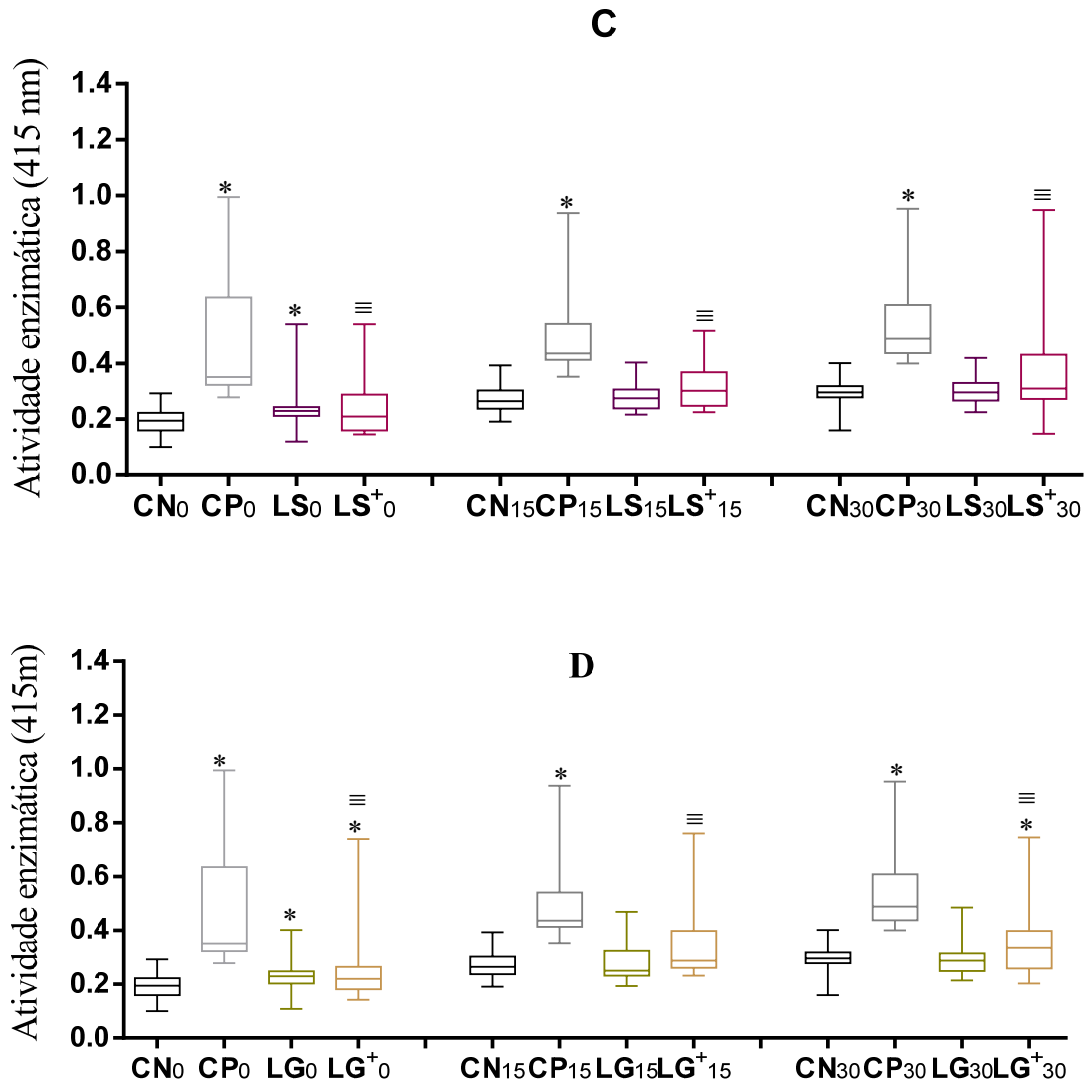


Figura 15: Exocitose de CatG por PMN de indivíduos saudáveis expostos a promastigotas de *Leishmania* spp.

Os sobrenadantes de PMN (controlo negativo, CN), PMN+MCLinf (controlo positivo, CP), PMN+*Leishmania* spp. (LI, LA, LS, LG) e PMN+MCLinf+*Leishmania* spp. (LI⁺, LA⁺, LS⁺, LG⁺) foram incubadas com o substrato N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA e a atividade enzimática lida a 415 nm, aos 0 min (0), aos 15 min (15) e aos 30 (min) de incubação. Os PMN foram incubados na presença de *L. infantum* (A), *L. amazonensis* (B), *L. shawi* (C) ou *L. guyanensis* (D). Os resultados encontram-se expressos através da mediana e valores máximos e mínimos de dez experiências independentes realizadas em triplicado. O teste paramétrico *T-Student* foi utilizado para comparar as amostras. * e ≡ (p < 0,05) indicam diferenças estatísticas entre CN ou CP e as outras condições, respetivamente.

3.5.2.2. *Leishmania* spp. induz a exocitose da CatG por PMN de indivíduos imunocomprometidos

Foi quantificada espectrofotometricamente a atividade enzimática de CatG em sobrenadantes de culturas de PMN sem estimulação (controlo negativo), PMN estimuladas por MCLinf (controlo positivo), PMN expostos a parasitas da espécie *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis*. Após a adição do substrato específico aos sobrenadantes, a absorvância, foi medida de imediato (0 min), aos 15 min e aos 30 min.

Aumentos significativos foram observadas no CP aos 0 min ($p=0,010$), 15 min e 30 min ($p_{15min, 30min} < 0,001$) quando comparado com o CN (Fig. 18), confirmando que MCLinf funciona igualmente como indutor da atividade da CatG em PMN de indivíduos imunocomprometidos, podendo ser usado como controlo positivo.

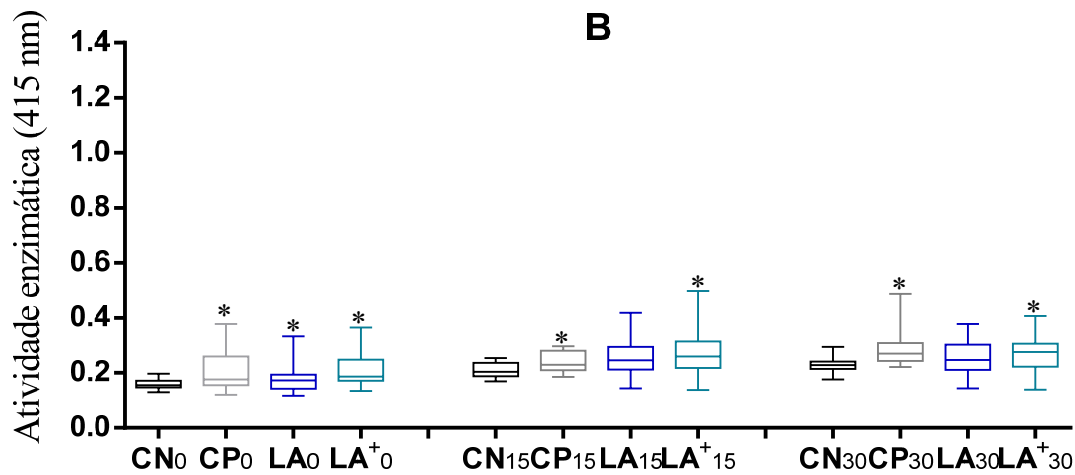
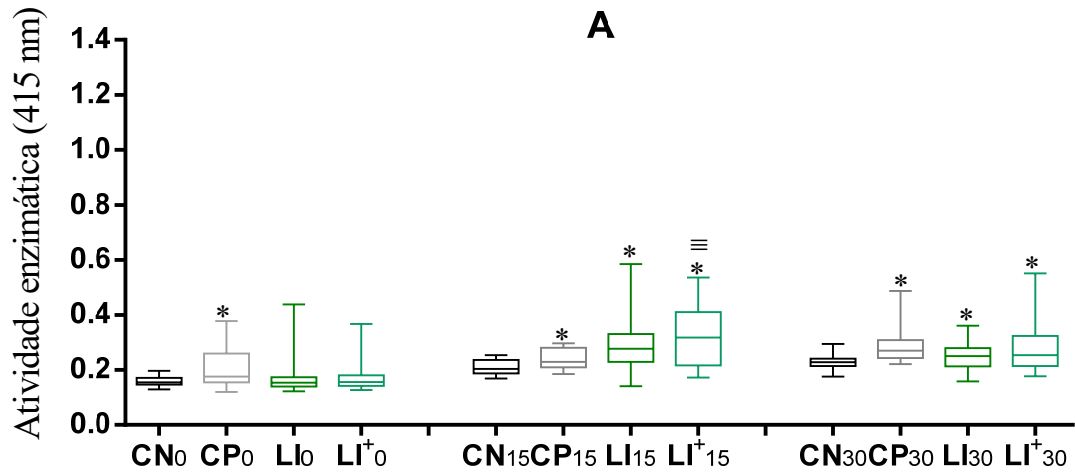
Aos 0 min, verificaram-se aumentos na atividade da CatG nos sobrenadantes de PMN expostos a LA ($p=0,015$, Fig. 16 B), LS ($p=0,005$, Fig. 16 C) ou LG ($p=0,005$, Fig. 16 D) quando comparados com a atividade enzimática dos CN, indicando a exocitose dos grânulos ricos em CatG por PMN de indivíduos imunocomprometidos. De modo similar, os sobrenadantes de LA⁺ ($p_{0min}=0,001$) e de LS⁺ ($p_{0min}= 0,006$) também apresentaram atividade enzimática significativa.

Aos 15 min verificou-se um aumento significativo da exocitose de CatG por PMN expostos a *L. infantum* ($p_{15min} < 0,001$). No caso específico de PMN exposto a promastigotas de *L. infantum* (Fig. 16 A), os resultados sugerem que foi necessário maior tempo para que a enzima atuasse no substrato. Aumentos significativos na atividade da CatG nos sobrenadantes de LI⁺ ($p_{15min} < 0,001$), LA⁺ ($p_{15min} = 0,003$), LS⁺ ($p_{15min} < 0,001$) e LG⁺ ($p_{15min}=0,004$) também foram observados quando comparados com o CN. Nos casos específicos de PMN estimulados por MCLinf e expostos a promastigotas de *L. infantum* ($p_{15min} < 0,001$) ou de *L. shawi* ($p_{15min} = 0,002$) observaram-se aumentos na atividade enzimática quando comparado com o CP, evidenciando pela primeira vez um efeito sinérgico entre o parasita e MCLinf na indução da exocitose da CatG.

Aos 30 min, constatou-se que a atividade da CatG perdurava nos sobrenadantes de LI ($p=0,033$), LS ($p=0,001$) e LG ($p=0,023$). Os sobrenadantes de PMN estimulados por MCLinf e expostos a promastigotas das diferentes espécies de *Leishmania* também

evidenciaram aumentos significativos da atividade da CatG ($p_{LI^+}=0,009$, $p_{LA^+}=0,012$, $p_{LS^+}=0,002$, $p_{LG^+}=0,005$) comparativamente ao CN.

No seu conjunto estes resultados evidenciam a durabilidade da atividade enzimática, particularmente nos casos dos PMN expostos às espécies cutâneas *L. shawi* e *L. guyanensis*.



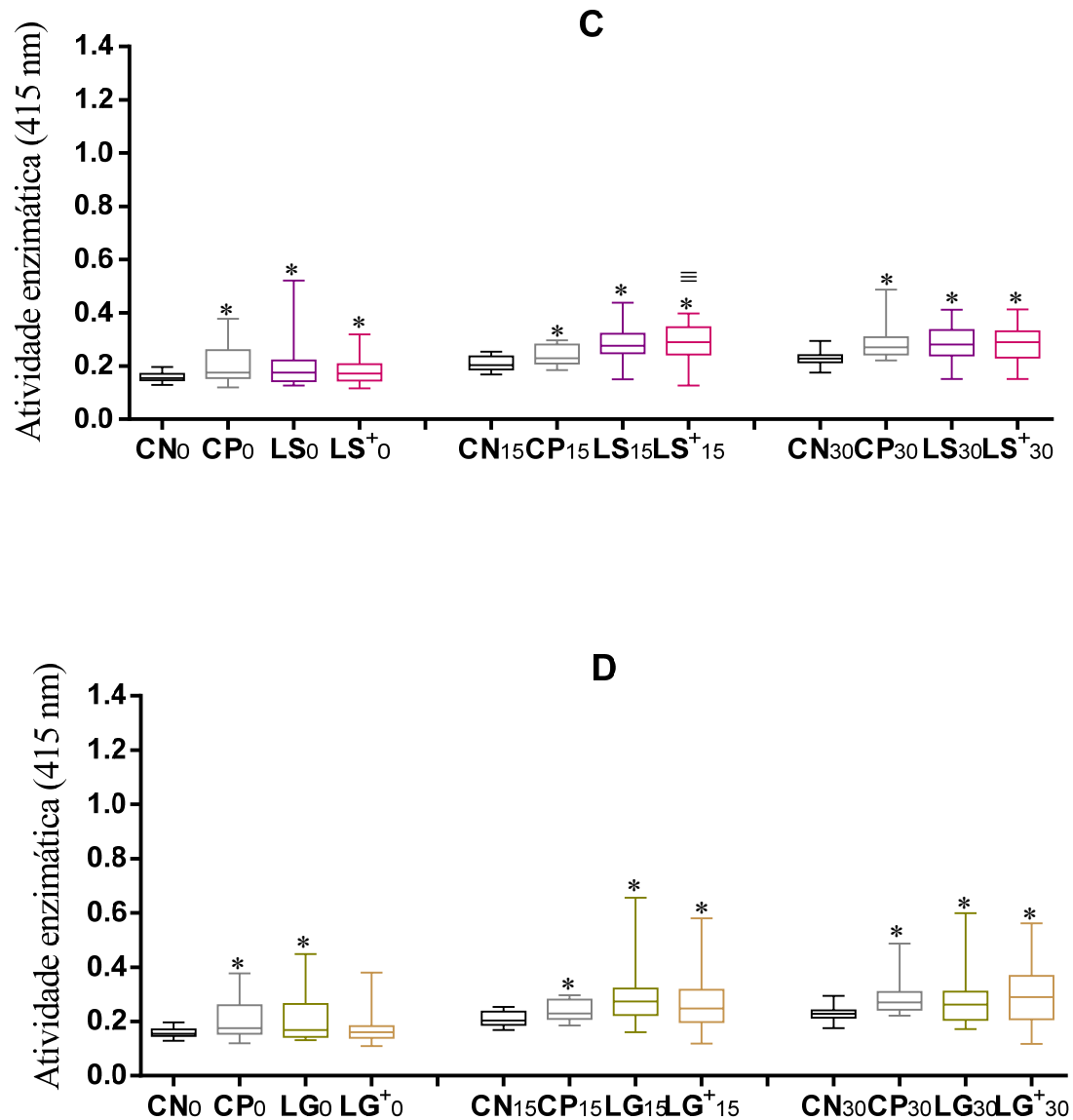


Figura 16: Excitose de Cat G por PMN de indivíduos imunocomprometidos expostos a promastigotas de *Leishmania* spp.

Os sobrenadantes de PMN (controle negativo, CN), PMN+MCLinf (controle positivo, CP), PMN+*Leishmania* spp. (LI, LA, LS, LG) e PMN+MCLinf+*Leishmania* spp. (LI⁺, LA⁺, LS⁺, LG⁺) foram incubadas com o substrato N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA e a absorvância lida a 415 nm, aos 0 min (0), aos 15 min (15) e aos 30 min (30) de incubação. Os PMN foram incubados na presença de *L. infantum* (A), *L. amazonensis* (B), *L. shawi* (C) ou *L. guyanensis* (D). Os resultados encontram-se expressos através da mdiana e de valores máximos e mínimos de dez experiências independentes realizadas em triplicado. O teste paramétrico *T-Student* foi utilizado para comparar as amostras. * e ≡ (p < 0,05) indicam diferenças estatísticas entre CN ou CP e as outras condições, respetivamente.

3.5.2.3. *L. guyanensis* é a espécie de *Leishmania* que induz maior exocitose de CatG

Ao se comparar as espécies de *Leishmania* spp entre si, no grupo dos indivíduos imunocomprometidos, no ensaio experimental que pretendia avaliar a atividade enzimática de CatG foram verificadas diferenças estatisticamente significativas aos 30 min.

Assim, foi observado um aumento da exocitose de CatG por LG ($p_{30\text{min}} = 0,017$, Fig. 17) em comparação com LI, sendo que *L. guyanensis* é parasita que induz maior exocitose de CatG, em PMN de indivíduos imunocomprometidos.

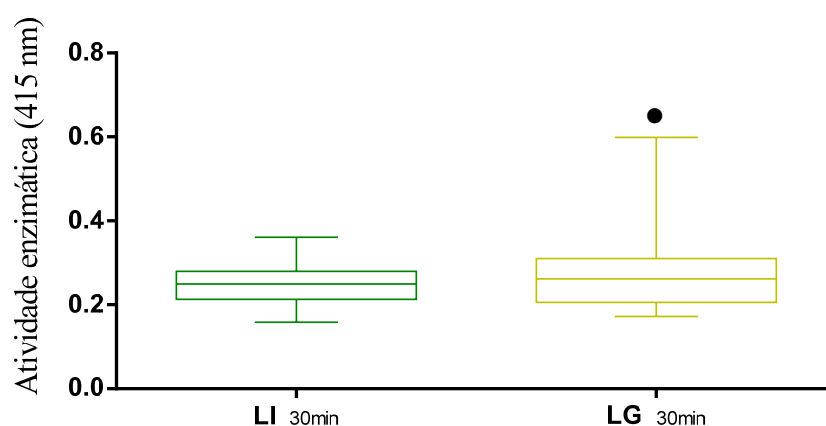


Figura 17: Comparação dos níveis de atividade enzimática da CatG libertada por PMN de indivíduos imunocomprometidos expostos a promastigotas de *Leishmania* spp. ao fim de 30 min de incubação com o substrato.

Os PMN foram expostos a promastigotas de *L. infantum* (LI) ou *L. guyanensis* (LG). Os resultados encontram-se expressos através da mediana e valores máximos e mínimos de dez experiências independentes realizadas em triplicado. O teste paramétrico *T-Student* foi utilizado para comparar as amostras. ● indica diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre LI e LG.

3.5.2.4. PMN de indivíduos saudáveis excitam mais CatG quando expostos a promastigotas de *L. infantum* e de *L. amazonensis*

Ao se comparar a exocitose de CatG, aos 0 min, por PMN de indivíduos imunocomprometidos e saudáveis, entre as diferentes espécies de *Leishmania*, foi verificado um aumento de exocitos de PMN de indivíduos saudáveis quando expostos a promastigotas de *L. amazonensis* ($p < 0,001$) (Fig. 18 A). Aos 30 min de incubação com

o substrato também foi observado aumento de exocitose de PMN de indivíduos saudáveis quando expostos a promastigotas de *L. infantum* (LI $p < 0,001$) (Fig. 18 B).

Assim, os PMN de indivíduos saudáveis têm uma capacidade mais eficaz na exocitose de CatG do que PMN de indivíduos imunocomprometidos.

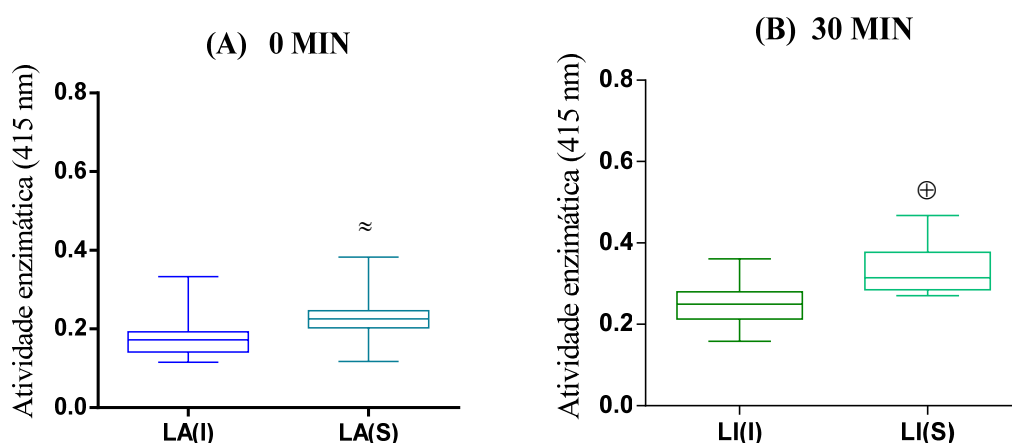


Figura 18: Comparação dos níveis de atividade de CatG libertada por PMN de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos expostos a promastigotas de *Leishmania* spp.

Os sobrenadantes de PMN de indivíduos imunocomprometidos (I) e saudáveis (S) foram expostos a promastigotas de *L. infantum* (LI) ou *L. amazonensis* (LA) aos 0 min (A) aos 30 min (B). Os resultados encontram-se expressos através da média de dez experiências independentes realizadas em triplicado. O teste paramétrico *T-Student* foi utilizado para comparar as amostras. ⊕ ($p < 0,05$) indica diferenças estatísticas entre PMN de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos.

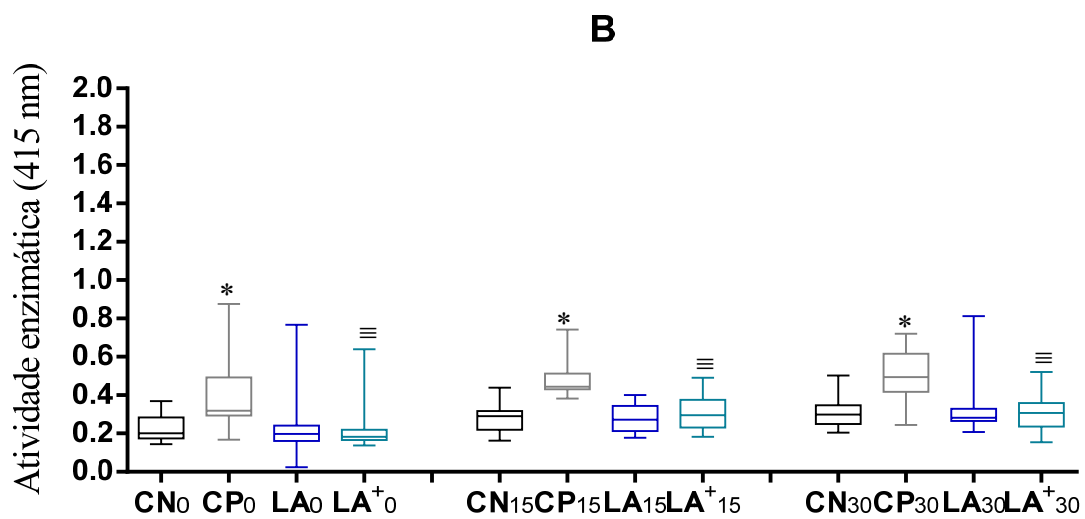
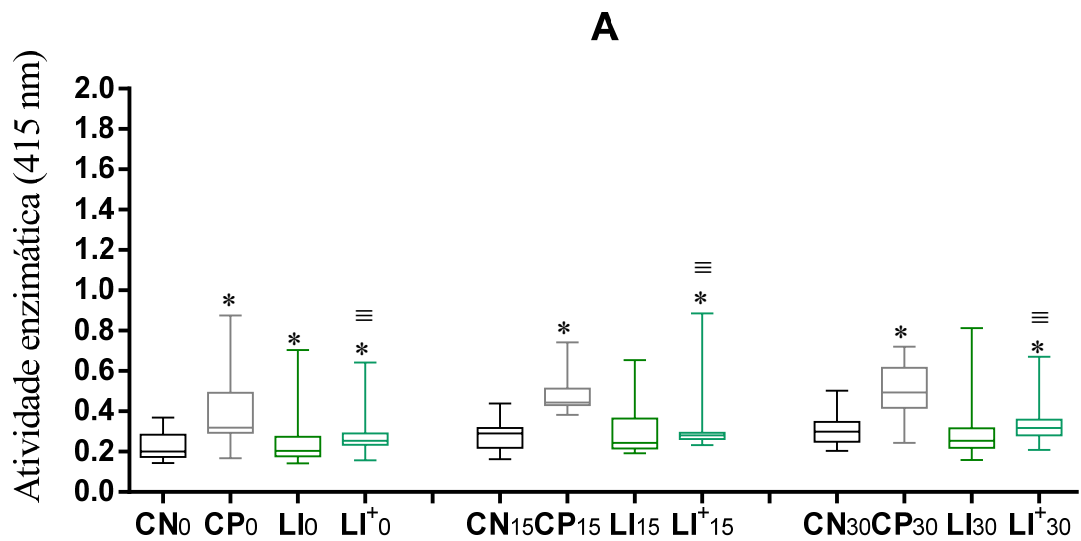
3.5.2.5. *L. infantum*, *L. shawi* e *L. guyanensis* induzem a exocitose de NE por PMN de indivíduos saudáveis

Foi constatada a existência de diferenças estatisticamente significativas entre a atividade enzimática de NE dos sobrenadantes de CN e de CP, verificando-se neste último um significativo aumento nos tempos de incubação analisados ($p_{0 \text{ min}, 15 \text{ min}, 30 \text{ min}} < 0,001$)

Aos 0 min foi verificado aumento significativo da atividade enzimática nos sobrenadantes de LI ($p=0,028$, Fig. 19 A), LS ($p=0,020$, Fig. 19 C) e LG ($p=0,032$, Fig. 19 D) quando comparado com o CN. Aos 30 min verificou-se aumentos significativos da atividade da NE em sobrenadantes de LI⁺ ($p=0,002$) e de LS ($p=0,012$, Fig. 19 B)

quando comparado com CN. Estes resultados indicam que *L. infantum*, *L. guyanensis* e *L. shawi* estimulam PMN de indivíduos saudáveis a libertar grânulos com NE.

Verificou-se ainda um aumento significativo da atividade de NE em sobrenadantes de LI⁺ ($p_{0min}=0,019$, $p_{15m}=0,010$, $p_{30min}<0,001$) e LG⁺ ($p_{0min}=0,015$) em comparação com CN. Porém, a atividade enzimática foi em todos os casos significativamente inferior ao CP ($P_{LI+0min, 15min, 30min}; LG, 0min<0,001$) sugerindo, à semelhança da CatG, a regulação da atividade enzimática pelo parasita.



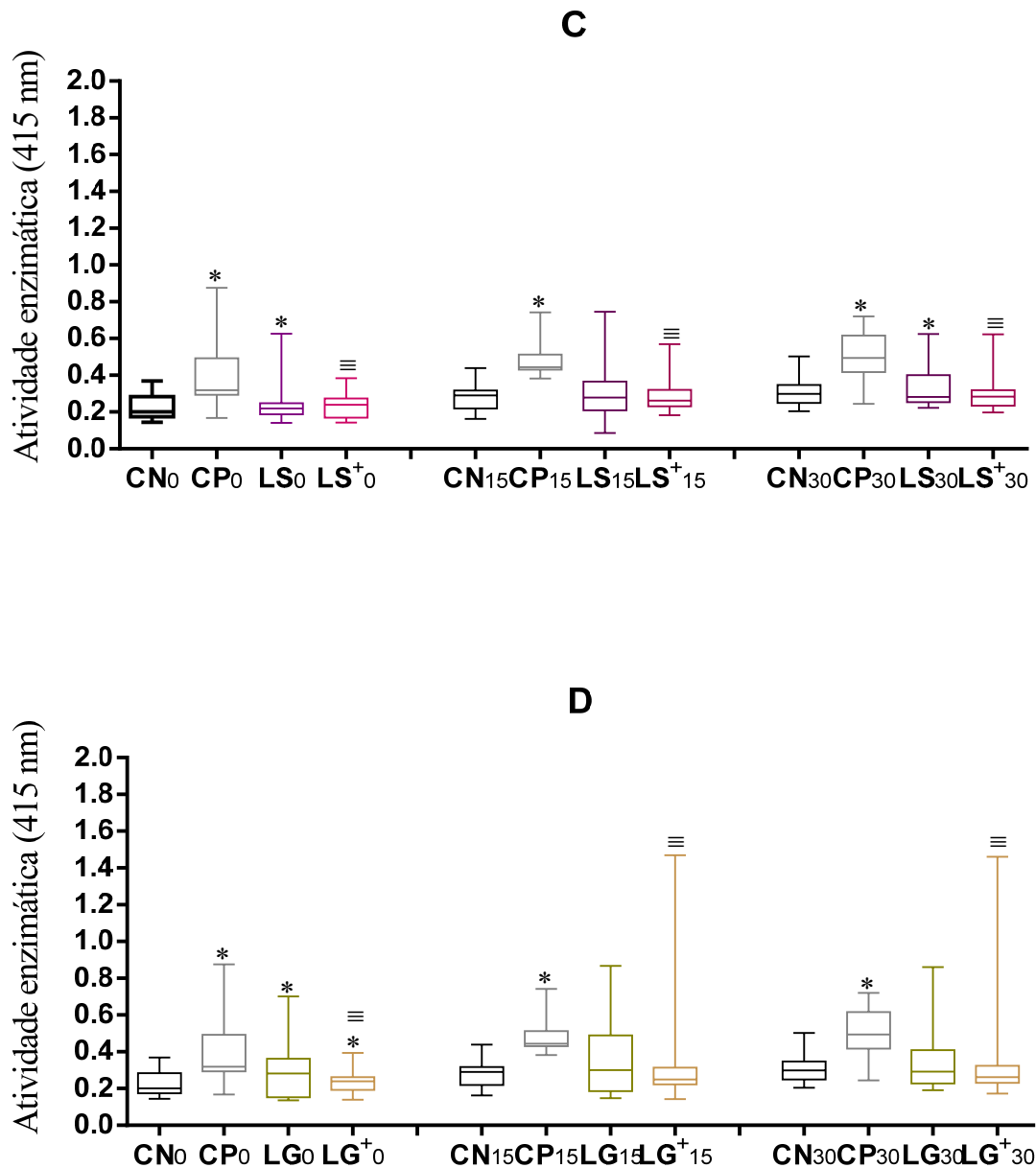


Figura 19: Exocitose de elastase neutrofílica por PMN de indivíduos saudáveis quando expostos a promastigotas de *Leishmania* spp.

Os sobrenadantes de PMN (controlo negativo, CN), PMN+MCLinf (controlo positivo, CP), PMN+*Leishmania* spp. (LI, LA, LS, LG) e PMN+MCLinf+ *Leishmania* spp. (LI⁺, LA⁺, LS⁺, LG⁺) foram incubadas com o substrato N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-pNA e a atividade enzimática lida a 415 nm aos 0 min (0), 15 min (15) e 30 (min) de incubação. Os PMN foram expostos a promastigotas de *L. infantum* (A), *L. amazonensis* (B), *L. shawi* (C) ou *L. guyanensis* (D). Os resultados encontram-se expressos através da média e valores máximos e mínimos de dez experiências independentes realizadas em triplicado. O teste paramétrico *T-Student* foi utilizado para comparar as amostras. * e ≡ (p < 0,05) indicam diferenças estatísticas entre CN ou CP e as outras condições, respetivamente.

3.5.2.6. *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* induzem a exocitose de NE em indivíduos imunocomprometidos

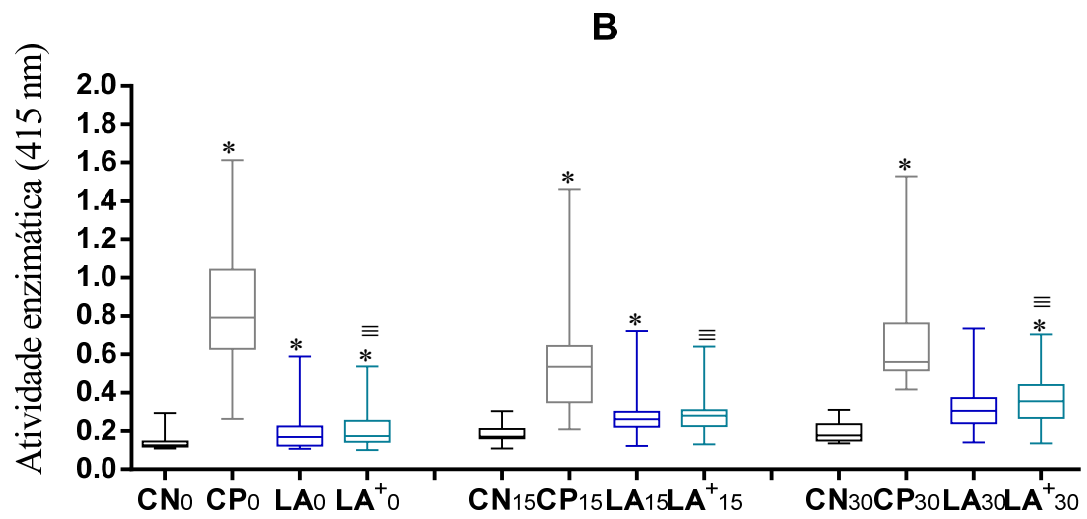
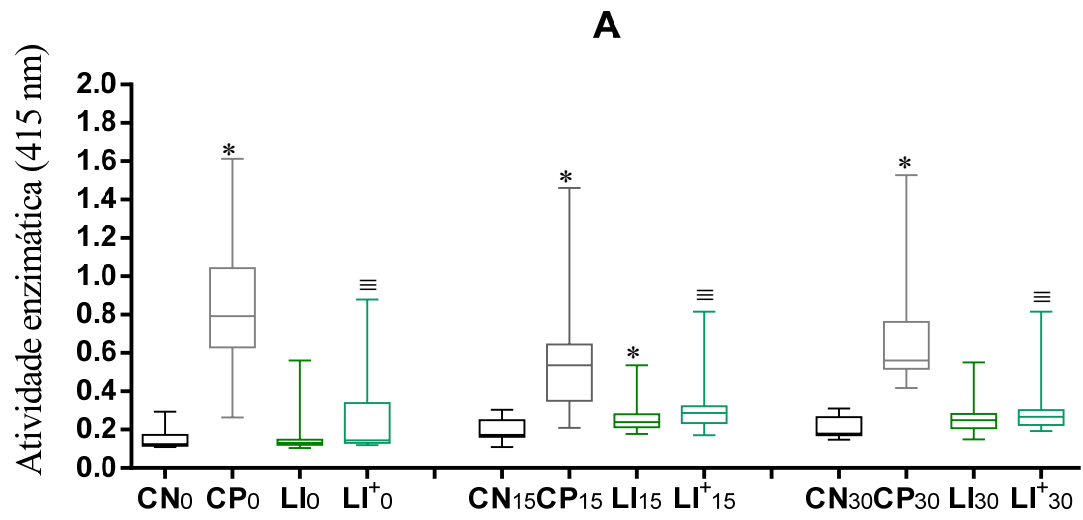
Sobrenadantes de PMN de indivíduos imunocomprometidos estimulados por MCLinf apresentaram elevada atividade da NE aos 0 min ($p < 0,001$), aos 15 min ($p = 0,004$) e aos 30 min ($p < 0,001$) quando comparado com o CN. Estes resultados confirmam que MCLinf funciona como controlo positivo de NE em PMN de indivíduos imunocomprometidos.

Aos 0 min, *L. amazonensis* ($p_{LA} = 0,012$, Fig. 20 B) e *L. shawi* ($p_{LS} = 0,013$, Fig. 20 C) induziram aumentos significativos na exocitose de NE, quando comparado com o CN. Também se verificaram aumentos significativos na exocitose de NE nos sobrenadantes de PMN estimulados com MCLinf e expostos aos parasitas da espécie *L. amazonensis* ($p_{LA+} = 0,004$) ou *L. shawi*, ($p_{LS} = 0,002$) em comparação o CN. Porém, quando comparado com o CP os valores de atividade enzimática mostraram-se significativamente inferiores ($p_{LI^+, LS^+} < 0,001$).

Aos 15 min, os sobrenadantes de PMN expostos a promastigotas de *L. infantum* ($p = 0,048$, Fig. 23A) ou de *L. amazonensis* ($p = 0,019$) evidenciaram aumentos significativos da atividade enzimática quando comparados com o CN. Porém, só se verificaram aumentos significativos na exocitose de NE nos sobrenadantes de PMN estimulados com MCLinf e expostos a promastigotas de *L. shawi* ($p_{LS+} = 0,019$) em comparação com o CN. Estes resultados são indicativos de que os PMN de indivíduos imunocomprometidos quando expostos à espécie visceral ou às espécies cutâneas de *Leishmania* excitam grânulos ricos em NE. Todavia, à semelhança do que foi observado anteriormente, estes parasitas (LA e LS) parecem exercer algum controlo na libertação dos grânulos com NE pelos PMN, impedindo a ocorrência de níveis elevados de atividade enzimática.

Aos 30 min foi verificado diferenças estatísticas significativas entre CN e *L. shawi* ($p = 0,013$, Fig. 20 C), com aumento de exocitose de PMN expostos a parasitas da espécie *L. shawi*.

Também se verificou uma diminuição significativa na exocitose de NE nos sobrenadantes de PMN estimulados com MCLinf e expostos aos parasitas da espécie *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* ($p_{30 \text{ min}} < 0,001$) em comparação com CP.



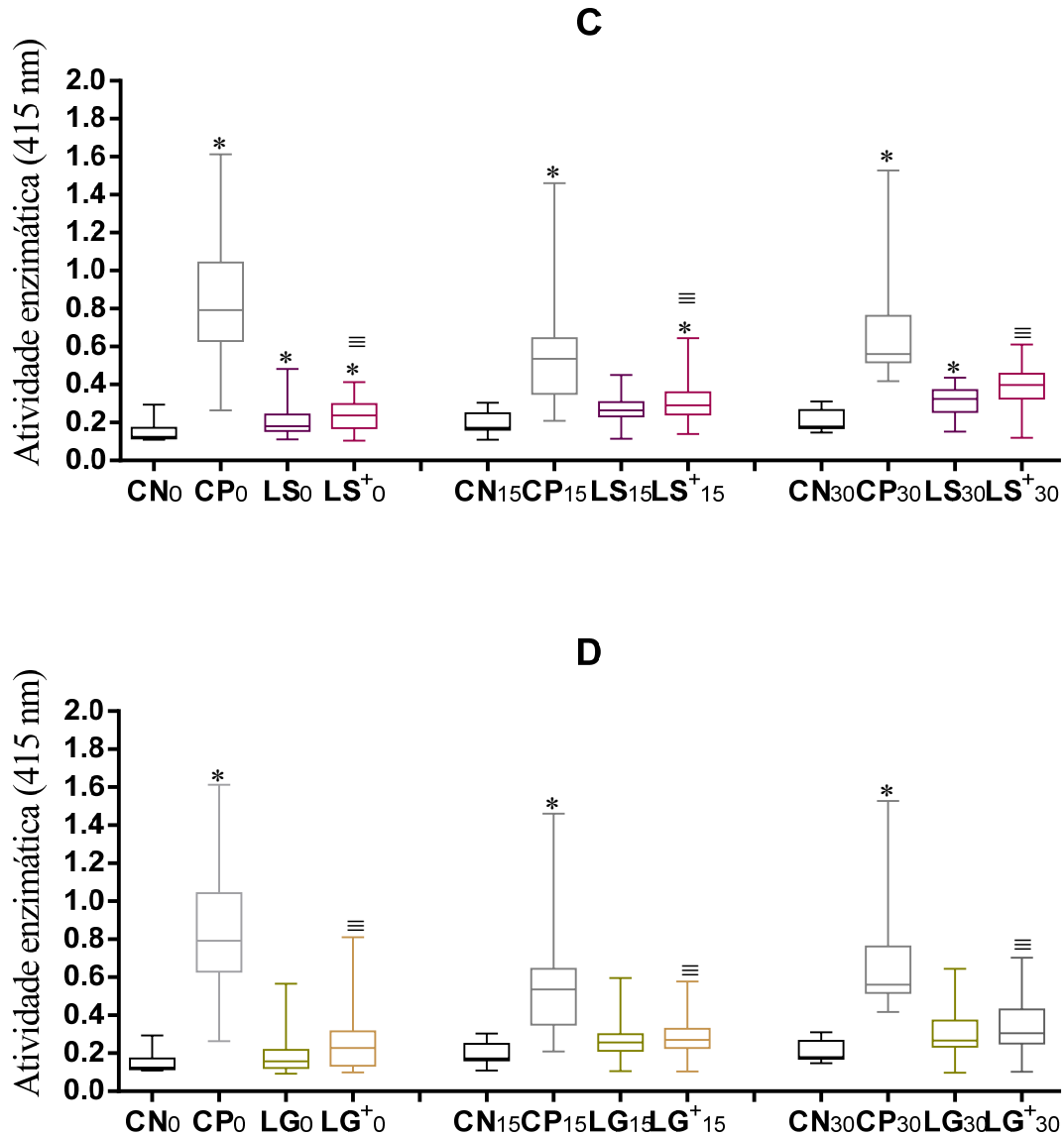


Figura 20: Exocitose de elastase neutrofílica por PMN de indivíduos imunocompetentes expostos a promastigotas de *Leishmania* spp.

Sobrenadantes de PMN (controle negativo, CN), PMN+MCLinf (controle positivo, CP), PMN+*Leishmania* spp. (LI, LA, LS, LG) e PMN+MCLinf+*Leishmania* spp. (LI⁺, LA⁺, LS⁺, LG⁺) foram incubadas com o substrato N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA e a atividade enzimática lida a 415 nm, aos 0 min (0), aos 15 min (15) e aos 30 min (30) de incubação. Os PMN foram expostos a promastigotas de *L. infantum* (LI) (A), *L. amazonensis* (LA) (B), *L. shawi* (LS) (C) ou *L. guyanensis* (LG) (D). Os resultados encontram-se expressos através da mediana e de valores máximos e mínimos de dez experiências independentes realizadas em triplicado. O teste paramétrico *T-Student* foi utilizado para comparar as amostras. * e ≡ (p < 0,05) indicam diferenças estatísticas entre CN ou CP e as outras condições, respectivamente.

3.5.3. *Leishmania* spp. induz a libertação de NET

PMN de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos expostos a promastigotas de *Leishmania* spp. foram observados por microscopia eletrônica de varrimento e imagens foram obtidas. PMN estimulados por PMA e PMN não estimulados foram também observados

Tendo em conta as dimensões (~5 um) e características morfológicas (forma redonda) das células foi confirmado que as células isoladas eram compatíveis com PMN (Fig. 21 A).

PMN não estimulados não emitiram NET (Fig. 21 A), quer no grupo dos indivíduos saudáveis quer no grupo dos indivíduos imunocomprometidos. Contudo, PMN de ambos os grupos em estudo estimulados por PMA produziram NET, quer em forma de fio (Fig. 21 B, C) quer em forma de nuvem (Fig. 21 D, E). Também foi observado a formação de NET em PMN expostos a promastigotas de *L. infantum* (Fig. 21 F, G), *L. amazonensis*, *L. shawi* (Fig. 21 H) ou *L. guyanensis* (Fig. 21 I) para ambos os grupos da amostra. PMN estimulados por PMA e expostos a promastigotas de *L. infantum* (Fig. 21 J), *L. amazonensis* (Fig. 21 K), *L. shawi* ou *L. guyanensis* (Fig. 21 L) formaram NET mais densas, em comparação com todas as situações anteriormente descritas.

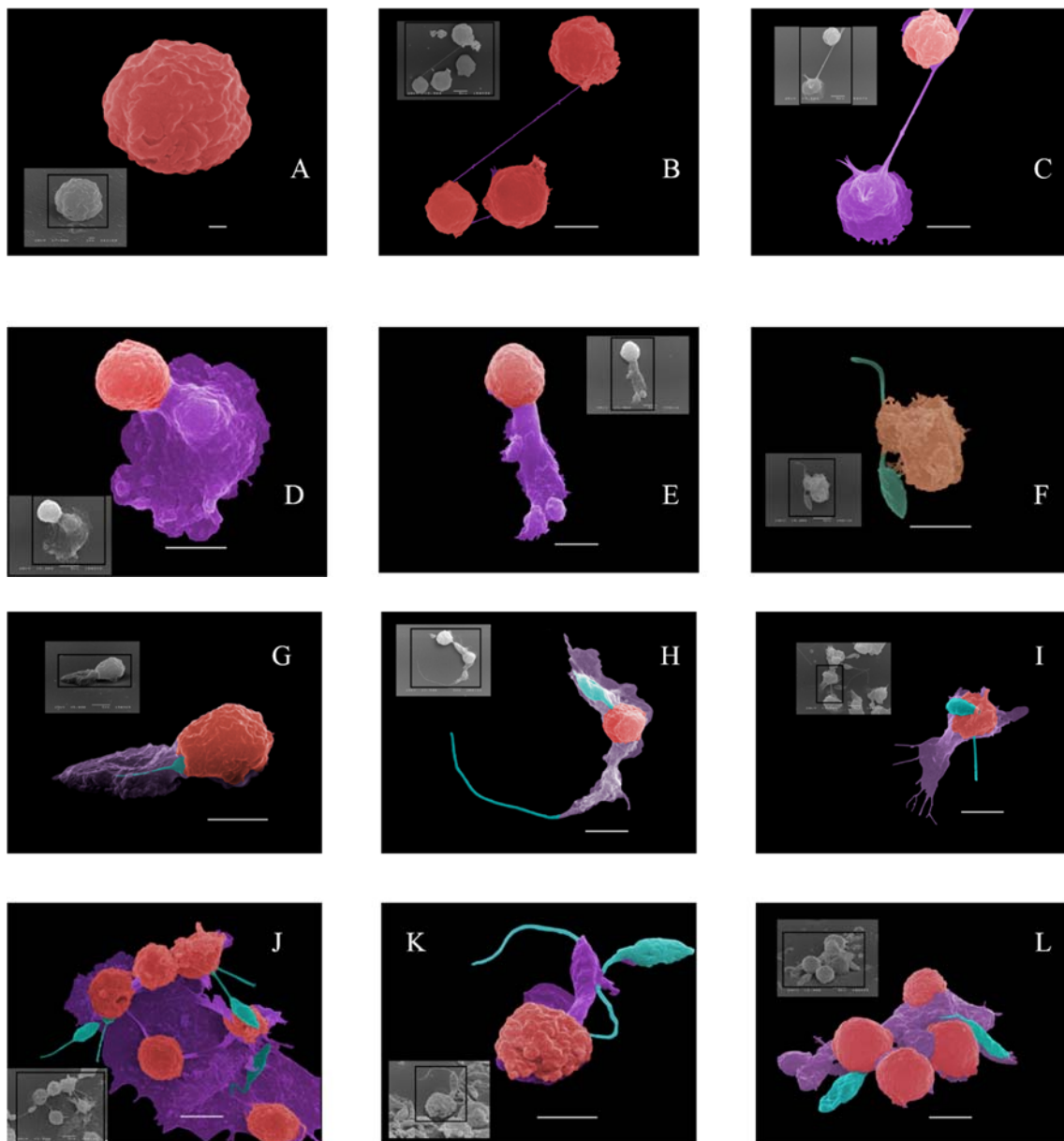


Figura 21: Liberação de NET por PMN humanos na presença de *Leishmania* spp.

PMN de indivíduos saudáveis (F, J) e imunocomprometidos (A, B, C, D, E, G, H, I, K, L) sem estimulação (A) e PMN estimulados com PMA (B, C, D, E). PMN foram expostos a promastigotas de *L. infantum* (F, G), *L. shawi* (H) ou *L. guyanensis* (I), bem como PMN estimulados por PMA e promastigotas de *Leishmania* spp (J, K, L) durante 2 h. A barra das figuras representa 1 μm (A), 5 μm (B, C, E, H, I, J, L) ou 10 μm (D, F, G, K) de diâmetro. As imagens foram observadas por microscopia eletrônica de varrimento e editadas pelo programa GIMP (vermelho/laranja - PMN, verde - promastigotas, roxo - NET e PMN em netosis).

3.5.3.1. *L. shawi* e *L. amazonensis* libertam maior quantidades de NET

Apesar de se notarem diferenças na quantidade de NET libertadas por PMN incubados com promastigotas de *Leishmania* spp. em comparação com PMN estimulados com PMA e expostos a parasitas das diferentes espécies de *Leishmania*, estas diferenças não revelaram significância estatística. No grupo de indivíduos imunocomprometidos, PMN estimulados por PMA e expostos a promastigotas de *L. infantum* apresentaram aumento significativo na libertação de NET ($p=0,046$, Fig. 22 A) quando comparados com PMN unicamente expostos a promastigotas de *L. infantum*. Adicionalmente, PMN expostos a promastigotas de *L. amazonensis* ou de *L. shawi* ($p_{LA, LS}=0,046$, Fig. 22 A) também mostraram elevada libertação de NET quando comparado com PMN expostos a promastigotas de *L. infantum*, indicando que quando na presença destas duas espécies cutâneas os PMN humanos parecem ser mais ativos, procurando controlar os parasitas extracelularmente.

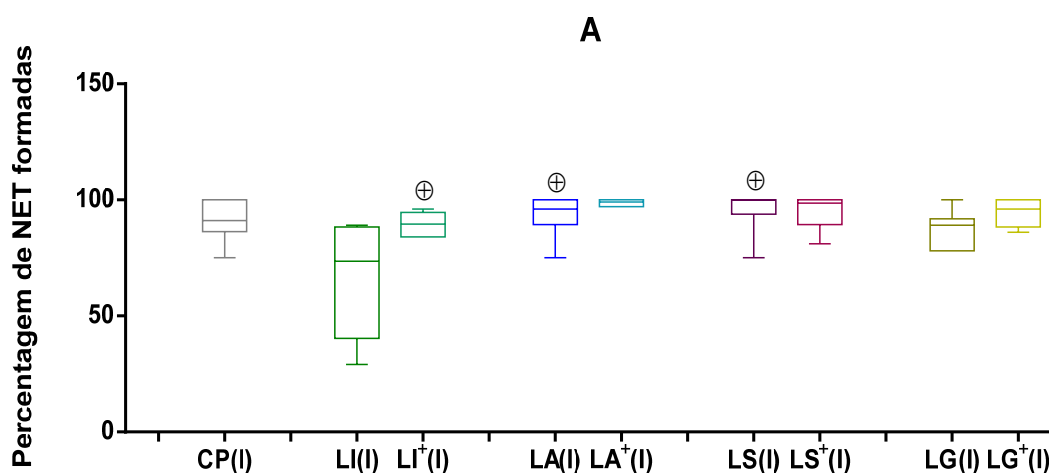


Figura 22: Formação de armadilhas extracelulares neutrofílicas por PMN de indivíduos imunocomprometidos.

A libertação de NET foi analisada em PMN-PMA (controlo positivo, CP), PMN+*Leishmania* e PMN +*Leishmania*+PMA de indivíduos imunodeprimidos (I). PMN de indivíduos imunocomprometidos incubados durante 2 h com promastigotas de *L. infantum* (LI), *L. amazonensis* (LA), *L. shawi* (LS) ou *L. guyanensis* (LG) e PMN estimulados com PMA e expostos a promastigotas de *L. infantum* (LI⁺), *L. amazonensis* (LA⁺), *L. shawi* (LS⁺) ou *L. guyanensis* (LG⁺) foram observados por microscopia de varrimento e as imagens adquiridas utilizadas para estimar a quantidade de NET libertadas. Os resultados encontram-se expressos através da mediana valores máximos e mínimos de dez experiências independentes realizadas em triplicado. O teste paramétrico *T-Student* foi utilizado para comparar as amostras. ⊕ ($p < 0,05$) indica diferenças estatísticas entre LI (I) e as outras condições.

4. Discussão e Conclusões

Discussão e conclusões

Os neutrófilos polimorfonucleares são as primeiras células efetoras a chegar a um local de infecção, atraídos por fatores quimiotáticos de agentes patogênicos, desempenham um papel fundamental na resposta imune inata. Estas células quando ativadas fagocitam e destroem agentes invasores intracelulares, como *Leishmania* spp., através de mecanismos antimicrobianos, como péptidos antimicrobianos, proteases e metabólitos de oxigênio. Neste trabalho foi verificado que neutrófilos de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos reconhecem promastigotas de *Leishmania* spp, e quando os parasitas são internalizados adquirem a forma amastigota, comprovando que neutrófilos humanos têm a capacidade de internalizar parasitas de *Leishmania* spp. Contudo, a relação entre neutrófilos e *Leishmania* parece ser controversa, dado que tem sido demonstrado que os parasitas podem ser destruídos (McFarlane *et al.*, 2008) ou sobreviver ao ambiente hostil intracelular dos neutrófilos (Carlsen *et al.*, 2013). Assim, estas células podem servir como hospedeiras intermediárias para *Leishmania*, na fase primordial da infecção, antes da sua internalização nos macrófagos, que são as células hospedeiras finais do parasita (Laufs *et al.*, 2002; van Zandbergen *et al.*, 2002). A migração de PMN de murganhos BALB/c ocorre após inoculação e infecção por *L. major* (espécie cutânea), verificando-se, contudo, a sobrevivência dos parasitas intracelularmente. Estes dados servem de base à especulação de que a internalização de *Leishmania* por PMN não conduz necessariamente à ativação da célula e consequente à morte do parasita (Laufs *et al.*, 2002). Promastigotas de *Leishmania* podem promover a migração de PMN para os locais de infecção, pois o recrutamento de PMN pode ser benéfico para os parasitas (van Zandbergen *et al.*, 2002).

A constatação de que a infecção por *L. major* prolonga o tempo de vida de PMN através da inibição da apoptose espontânea destas células representa uma forte evidência para o papel de PMN como células hospedeiras deste parasita intracelular (van Zandbergen *et al.*, 2002). Esta informação vem dar suporte às atuais evidências que os neutrófilos funcionam como células hospedeiras, ainda que transitórias, de *Leishmania*, sendo utilizadas pelo parasita para facilitar a infecção dos macrófagos, a célula hospedeira por excelência.

Contudo, os neutrófilos usam vias oxidativas e não oxidativas para destruir agentes patogênicos. Um dos objetivos do presente estudo pretendia analisar a resposta oxidativa produzida por PMN humanos de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos

quando expostos a parasitas de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* e de *L. guyanensis*.

A ativação da respiração oxidativa de PMN parece estar associada à eliminação de parasitas intracelulares. Os neutrófilos possuem agentes antimicrobianos eficazes, como ROS geradas a partir da NADPH oxidase, que é ativada por quimiocinas e outros mediadores solúveis. NADPH converte o oxigênio molecular em ião superóxido (O_2^-) que é libertado no fagossoma, sendo tóxico para os agentes patogénicos, como *Leishmania* (Laufs *et al.*, 2002; Fialkow *et al.*, 2007).

No presente trabalho as espécies de *Leishmania* analisadas (*L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis*) estimularam PMN de indivíduos saudáveis a produzir ião superóxido. Este resultado é indicativo de que a respiração oxidativa dos neutrófilos ocorre e é eficaz na presença do parasita, independentemente da espécie do mesmo, funcionando como um mecanismo do sistema imunitário inato na defesa do organismo. No entanto, em PMN de indivíduos imunocomprometidos apenas *L. infantum* e *L. amazonensis* induzem a produção do ião superóxido. Com os dados obtidos neste estudo, verificou-se que *L. infantum* e *L. amazonensis* são os parasitas em comum que induziram a produção de ião superóxido em neutrófilos humanos, independentemente do estado do sistema imunológico dos indivíduos. Tendo em consideração que as diferentes espécies em estudo pertencem a subgénero diferentes, verificou-se que as espécies do subgénero *Leishmania* (*L. infantum* e *L. amazonensis*) induziram sempre a produção de ião superóxido por neutrófilos. Este dado pode ser indicativo que possam existir proteínas ou macromoléculas comuns a este subgénero que possam estimular o neutrófilo a ativar a respiração oxidativa.

Foi demonstrado pelo nosso grupo, num outro estudo, que *L. infantum* induz a produção do ião superóxido por PMN de murganhos C57BL/6 (Marques *et al.*, 2015), o que vem corroborar os nossos resultados.

Neste trabalho de investigação verificou-se que duas das espécies cutâneas (*L. shawi* e *L. guyanensis*) de *Leishmania* do subgénero *Viannia* não induziram a produção de ião superóxido nos PMN, em indivíduos imunodeprimidos. Por outro lado, em indivíduos saudáveis, os parasitas *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* ou *L. guyanensis* induziram a produção do ião superóxido por PMN. Um artigo sugere que a capacidade dos neutrófilos para combater a infeção depende da estirpe de parasita utilizado para as

experiências, contudo esta é uma teoria que carece de ser explorada e suportada por uma explicação mais concisa e detalhada (Ritter *et al.*, 2009).

Têm sido elaborados alguns estudos no âmbito da interação imunológica estabelecida entre PMN e *Leishmania* spp, em que as espécies cutâneas têm ganho alguma ênfase. Existem algumas hipóteses sobre como as espécies cutâneas, nomeadamente, *L. major*, contornam a ação antimicrobiana por PMN, regulando negativamente o stress oxidativo.

PMN humanos fagocitam parasitas da espécie *L. major*, no entanto, os parasitas internalizados podem manter-se viáveis o que sugere a não activação dos mecanismos oxidativos e a inexistência de contacto do parasita com enzimas proteolíticas. Estes dados demonstraram que a presença desta espécie cutânea não provoca atividade oxidativa e consequente produção de ião superóxido pelos PMN (Mollinedo *et al.*, 2010). Em parte, este estudo corrobora os resultados obtidos, em que *L. shawi* e *L. guyanensis* não induziram a respiração oxidativa por PMN de indivíduos imunocomprometidos. Contudo, *L. amazonensis* induziu a respiração oxidativa, sendo pertencente ao mesmo subgénero de *L. major* e sendo também uma espécie cutânea. Contudo, isto pode ser indicativo de que *L. amazonensis* tem algum tipo de componente protéico, ou algum elemento ao nível antigénico que torne a célula neutrofílica mais suscetível à sua presença.

Considera-se que agentes patogénicos internalizados em PMN são fagocitados e destruídos, contudo, tem-se verificado que alguns conseguem sobreviver ao ambiente microbicida dos PMN. Microorganismos como *Salmonella typhi*, *Brucella abortus* ou *Haemophilus somnus* são exemplos de agentes que sobrevivem no interior de PMN sem despoletar a respiração oxidativa (Laskay *et al.*, 2008).

Para que o parasita sobreviva podem ocorrer diversos mecanismos, como o bloqueio da fusão fagossoma-lisossoma ou a inibição da ativação das vias de sinalização do sistema antimicrobiano e quimiotático das células efectoras, com a consequente não indução da respiração oxidativa. A não ativação dos neutrófilos leva a que a ocorra a apoptose dos mesmos, sendo posteriormente fagocitados por macrófagos, através de um processo que ocorre de forma natural. Este mesmo processo resultaria numa infeção e multiplicação de *Leishmania* nos macrófagos, permitindo que este fosse internalizado de uma forma silenciosa, sem ativar mecanismos de degradação do parasita pelos neutrófilos (Laskay *et al.*, 2008; Mollinedo *et al.*, 2010).

A fagocitose de *Leishmania* é dependente do tipo de mecanismo que os PMN possuem para a entrada do parasita nas células, opsonina dependente ou opsonina independente (Laufs *et al.* 2002). Foi demonstrado, *in vitro*, que o mecanismo de fagocitose dependente de opsonina levou à ativação de PMN e à destruição dos parasitas intracelulares, enquanto que, no mecanismo de fagocitose independente de opsonina, os parasitas de *Leishmania* internalizados em PMN não foram destruídos (Laufs *et al.* 2002). Os parasitas quando fagocitados na ausência de opsonina sobreviveram, na sua maioria, aproximadamente um dia. Os autores do artigo supracitado ainda confirmaram os resultados obtidos *in vitro* sobre a sobrevivência de *L. major* em PMN, através da detecção de parasitas intracelulares intactos em PMN isolados a partir da pele de murganhos infetados com *L. major*. Estes dados sugerem que PMN podem servir como células hospedeiras para a sobrevivência intracelular de *Leishmania*. Assim, é possível que a sobrevivência ou destruição dos parasitas pelos PMN esteja dependente de determinadas condições. No presente trabalho, os parasitas não foram opsonizados mas conseguiram ser internalizados e despoletar a produção de radicais oxidativos, porém a taxa de viabilidade/destruição não foi determinada.

Promastigotas de *L. major* têm a capacidade de selecionar os vacúolos de grânulos azurófilos, sendo estes vacúolos responsáveis pela geração de ROS em fagossomas de neutrófilos humanos. Assim, promastigotas de *Leishmania* podem ter a capacidade de modular e regular os processos de fusão dos grânulos de uma forma seletiva, contornando assim um mecanismo nocivo para o parasita, favorecendo a sobrevivência do parasita em neutrófilos humanos (Mollinedo *et al.*, 2010). Promastigotas de *L. donovani* podem ser fagocitados por neutrófilos em dois fagossomas distintos, com propriedades distintas (líticos ou não degradativos). A internalização dos parasitas nestes compartimentos é um fator decisivo para a sobrevivência ou destruição do parasita internalizado. Contudo o mecanismo que o parasita usa para evitar compartimentos não líticos carece de explicação (Gueirard *et al.*, 2008). Não obstante, o lipofosfoglicano (LPG) expresso na superfície do parasita parece ser necessário para manter o parasita no interior do fagossoma, influenciando a fusão dos compartimentos endocíticos do fagossoma com o lisossoma (Gueirard *et al.*, 2008).

Existe uma necessidade de se realizarem mais estudos e trabalhos de investigação que explorem o porquê de algumas das espécies cutâneas de *Leishmania* não induzem a respiração oxidativa em neutrófilos humanos.

Foi demonstrado que em neutrófilos humanos, de felinos e de canídeos, com problemas renais, a respiração oxidativa, ocorrendo uma diminuição de produção de ião superóxido, mesmo na presença de um estimulador como PMA e a viabilidade dos neutrófilos é afetada verificando-se um aumento da apoptose dos neutrófilos. Esta diminuição da ação de defesa pelos neutrófilos, bem como a viabilidade dos mesmos, pode ocorrer devido à ação das toxinas urémicas contribuindo para uma deficiente ação da respiração oxidativa, afetando a resposta imune inata (Silva *et al.*, 2013).

Doentes com doença crónica renal em fase terminal (CKD-5) possuem uma resposta imunitária deficiente, quer ao nível das células fagocitárias, APC ou das células B e T. Assim, parece existir uma susceptibilidade dos indivíduos imunocomprometidos a agentes infecciosos. Estes dados vêm dar suporte os nossos resultados, dado que na presença de algumas espécies de *Leishmania* spp os neutrófilos de indivíduos imunocomprometidos, devido a problemas renais, não tiveram uma resposta imunitária eficaz, não ocorrendo a ativação dos seus mecanismos de respiração oxidativa. Isto pode ser indicativo que doentes imunocomprometidos, devido a problemas renais têm uma maior suscetibilidade a agentes invasores e uma resposta imunitária diminuída (Baron *et al.*, 2014). Existe uma necessidade de se correlacionar *Leishmania* spp e a capacidade de respiração oxidativa pelos neutrófilos de indivíduos com CKD.

A cathepsina G (CATG) e a elastase neutrófila (NE) são proteases libertadas por grânulos azurófilos no interior do fagossoma do neutrófilo ativado. Estas enzimas estão envolvidas na regulação da imunidade inata, inflamação e infeção, exercendo ação microbicida nos agentes patogénicos internalizados nas células fagocíticas através de degradação proteolítica dos microrganismos e da decomposição de moléculas da matriz extracelular (Burster *et al.*, 2010; Heutinck *et al.*, 2010).

As proteases serínicas de neutrófilos (NSP, do inglês *neutrophil serine proteases*) clivam a elastina, fibronectina, colagénio e proteoglicanos, bem como várias proteínas plasmáticas (Korkmaz *et al.*, 2008). Estudos realizados em murganhos com uma deficiência na produção de proteases revelaram a importância das proteases no controlo da infeção pelo sistema imunitário inato, pois as NSP têm ação enzimática intracelular e extracelular (Pham, 2007). NSP modulam funções biológicas, nomeadamente a transformação de quimiocinas, controlam a sinalização celular, modulam as citocinas e a ativação de recetores específicos da superfície celular. A libertação de citocinas induz a rápida mobilização de grânulos azurófilos para a superfície dos neutrófilos.

Contudo, a regulação de NSP sobre a modulação das funções biológicas celulares e o mecanismo pelo qual as proteases estão ligadas à superfície da célula não está devidamente clarificado (Jerke *et al.*, 2015). Foi ainda demonstrado que na ausência de proteases de serina de neutrófilos não ocorre a morte dos microrganismos, como por exemplo de *Streptococcus pneumoniae* (Heutinck *et al.*, 2010) e que os murganhos deficientes em NE e CatG são mais suscetíveis a infecção por bactérias (Korkmaz *et al.*, 2010).

Neste estudo foi demonstrado que *Leishmania* spp. induz o aumento da exocitose da enzima CatG em indivíduos saudáveis e imunocomprometidos.

Em geral, as atividades proteolíticas da CatG são muitas, incluindo a defesa do hospedeiro. Os efeitos moduladores da CatG podem ser explorados através de inibidores específicos de CatG de modo a determinar a função das proteases presentes nos compartimentos endocíticos (Burster *et al.*, 2010). Vários péptidos derivados a partir da estrutura CatG também possuem propriedades antimicrobianas *in vitro* (Korkmaz *et al.*, 2010)

No caso específico da NE que dá um importante contributo para a diminuição da replicação de agentes patogénios, atuando sobre a clivagem de pré-caspase 3 e 9, que são as principais proteínas da via apoptótica, induzindo a apoptose dos neutrófilos (Hilda *et al.*, 2015).

No presente estudo *L. infantum*, *L. shawi* e *L. guyanensis* induziram a produção de NE em indivíduos saudáveis. *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. shawi* induziram a exocitose de NE em indivíduos imunocomprometidos.

Um trabalho experimental realizado anteriormente no nosso laboratório demonstrou que PMN incubados com *L. infantum* exocitam NE e CatG (Marques *et al.*, 2015), o que vai de encontro com os resultados obtidos no nosso estudo.

Uma mutação no gene *Pallid* em murganhos, permitiu verificar uma reduzida secreção de NE pelos neutrófilos em comparação com o grupo saudável. A proteína pallidin está associada à fusão do fagossoma com o lisossoma. Sendo a NE libertada pelos grânulos azurófilos, verifica-se que uma mutação ou inibição destes pode alterar parte da capacidade de resposta dos neutrófilos (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2007).

Para além de ser reconhecido com agente microbicida, NE está ainda envolvida na ativação de macrófagos e destruição do parasita (Ribeiro-Gomes, 2007). Por

exemplo, a incubação de neutrófilos com *L. braziliensis* leva à liberação de NE que está associada à morte intracelular deste parasita em macrófagos em co-cultura com neutrófilos, num processo dependente de sinalização por TLR4 (Falcão *et al.*, 2015). Também já foi verificado que neutrófilos de indivíduos com comprometimento da imunidade (com tuberculose pulmonar) excitam menores níveis de elastase em comparação com indivíduos saudáveis (Hilda *et al.*, 2015).

Nos resultados obtidos neste estudo os neutrófilos dos indivíduos imunocomprometidos exerceram uma resposta imunitária não oxidativa eficaz, libertando grânulos com NE na presença de *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. shawi*, exercendo possivelmente algum controle da infecção parasitária. Contudo, em indivíduos saudáveis, os PMN ativaram na presença de *L. infantum*, *L. shawi* e *L. guyanensis*. As espécies *L. infantum* e *L. shawi* são as espécies que induziram a exocitose de NE independentemente do estado do sistema imunitário. *L. guyanensis* parece ter ação diferencial de acordo com a origem dos PMN, sugerindo que possa haver alguma proteína ou fator antigénico que não active a resposta não oxidativa dos neutrófilos. Pois, não parece induzir especificamente a exocitose de grânulos ricos em NE no caso de indivíduos imunocompetentes, procurando assegurar a sua sobrevivência. Porém, no caso de indivíduos imunocomprometidos a situação é oposta indicando a provável existência de vias diferentes de indução da exocitose de grânulos.

Staphylococcus aureus produz inibidores específicos para a NSP, o que sugere que estas proteases são importantes para as defesas do hospedeiro contra esta bactéria. NE e CatG clivam fatores de virulência estafilocócicas, especialmente quando PR3 também está presente em sobrenadantes de neutrófilos desgranulados. Estes dados sugerem que NSP funcionam em conjunto para a inibição dos microrganismos invasores (Stapels *et al.*, 2015). *Schistosoma*, é um parasita da classe *Trematoda* sensível há presença de NE. Contudo estes parasitas produzem inibidores de proteases, tal como *S. aureus*, como o inibidor da protease do tipo Kunitz (SmKI-1) de *S. mansoni*., neutralizando os efeitos da NE (Ranasinghe *et al.*, 2015).

De forma similar *Leishmania* pode também produzir inibidores de proteases de serina, podendo a produção dos inibidores estar dependente da espécie de *Leishmania*, bem como, a capacidade de ação estar dependente da capacidade de resposta do sistema imunitário, o que explicaria a não exocitose de algumas proteases, como constatado nos resultados do presente trabalho.

Neste estudo foi verificado que *Leishmania* spp. induz a formação de NET em neutrófilos de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos. Foi ainda verificado que na presença de um estimulador, PMA, existe um aumento da formação de NET pelos neutrófilos. Na ausência de *Leishmania* spp. e de um estimulador não ocorre a formação de NET por neutrófilos de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos.

Todavia, as NET podem contribuir para a diminuição do número de parasitas no local da inoculação. Através de microscopia eletrônica de varrimento foi constatado que *Leishmania* é atraída pelas NET. Pois promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* têm a capacidade de induzir a formação de NET por neutrófilos humanos (Guimarães-Costa *et al*, 2009). O presente estudo vem corroborar estas evidências, verificando-se que na presença das espécies de *Leishmania* spp em estudo, ocorre a formação de NET.

Contudo, os resultados dos estudos científicos ainda são controversos. A diferente execução e compreensão de protocolos, a ausência de uniformização de técnicas laboratoriais, a diferente metodologia de isolamento de neutrófilos e cultura de *Leishmania* podem contribuir para a discrepância de resultados encontrados na bibliografia.

Em resumo, o presente trabalho permitiu ter uma visão imunitária sobre a ativação de PMN oriundas de diferentes indivíduos com sistemas imunitários competentes ou debilitados. Foi demonstrado que existem mecanismos microbicidas de PMN que se mantém praticamente inalterados, independentemente da competência do sistema imunitário e das espécies de *Leishmania*, como é o caso da exocitose de grânulos ricos em CatG ou da libertação de NET. Porém, alguns mecanismos relacionados com a ativação dos PMN que evidenciaram especificidades em relação às espécies de *Leishmania* e ao estado imunitário do dador, como por exemplo, os mecanismos de ativação do stress oxidativo ou da exocitose de grânulos ricos em NE. Estes resultados apontam ainda para a necessidade da continuação destes estudos, sobretudo analisando a relação entre a atividade microbicida dos neutrófilos e o reconhecimento do parasita pelos receptores de imunidade inata presentes nestas células.

5. Bibliografia

- Abbas AK, Lichtman AH. 2011. Basic Immunology Functions and Disorders of the Immune System. Third edition. *Saunders*. Philadelphia. Página 319.
- Adams ER, Jacquet D, Schoone G, Gidwani K, Boelaert M, et al. 2012. Leishmaniasis direct agglutination test: using pictorials as training materials to reduce inter-reader variability and improve accuracy. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6 (12): 1-6.
- Aga H, Muller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W, Laskay T. 2002. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infection Immunology*, 70 (2): 826–835.
- Alexander B, Young DG. 1992. Dispersal of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in a colombian focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 87 (3): 397-403.
- Almeida BF, Narciso LG, Melo LM, Preve PP, Bosco AM, Lima VM, Ciarlini PC. 2013. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 196 (1-2): 599-605.
- Allain DS, Kagan IG. 1975. A direct agglutination test for leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 24 (2): 232-236.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Boer M.D, Canãvate C, Dedet JP, Gradoni L, Horst RT, López-Vélez R, Moreno J. 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*. 21 (2): 334–359.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Jorge Cano J, Jannin J, den Boer M. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, 7 (5): 1-12.
- Ameen M. 2010. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clinical and Experimental Dermatology*, 35 (7): 699–705.
- Andrade M.S, Courtenay O, Brito MEF., Carvalho FG, Carvalho AWS, Soares F, Carvalho SM, Costa PL, Zampieri R, Floeter-Winter LM, Shaw JJ, Brandão-Filho SP. 2015. Infectiousness of sylvatic and synanthropic small rodents implicates a multi-host reservoir of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9 (10): 1-14.

- Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. 2008. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infectious Diseases*, 8 (3): 191–199.
- Arosa FA, Cardoso EM, Pacheco FC. 2012. Fundamentos de imunologia. 2º edição. *Lidel - edições técnicas, Lda*. Lisboa. Portugal, 605 páginas.
- Baron M, Belo R, Cathelin D, Moreira-Teixeira L, Cartery C, Rondeau E, Mesnard L, Leite-de-Moraes M. 2014. Innate-like and conventional T cell populations from hemodialyzed and kidney transplanted patients are equally compromised. *PLoS ONE*, 9 (8): 1-8.
- Bates PA, Depaquit J, Galati EAB, Kamhawi S, Maroli M, McDowell MA, Picado A, Ready PD., Salomón OD, Shaw JJ, Traub-Csekö YM, Warburg A. 2015. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. *Parasites & Vectors*, 8 (131): 1-8.
- Beinke C, Port M, Lamkowski A, Abend M. 2015. Comparing seven mitogens with pha PHA-M for improved lymphocyte stimulation in dicentric chromosome analysis for biodosimetry. *Radiation Protection Dosimetry*, 168 (2): 235–241.
- Bern C, Adler-Moore J, Berenguer J, Boelaert M, Boer M. den, Davidson R. N, Figueras C, Gradoni L, Kafetzis DA, Ritmeijer K, Rosenthal E, Royce C, Russo R, Sundar S, Alvar J. 2006. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 43 (7): 917–924.
- Brelaz-de-Castro MCA, Almeida AF, Oliveira AP, Assis-Souza M, Rocha LF, Pereira VRA. 2012. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cellular Immunology*, 279 (2): 180–186.
- Brinkmann V, Laube B, Abu AU, Goosmann C, Zychlinsky A. 2010. Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *Journal of Visualized Experiments*, (36): 3–5.
- Brinkmann V, Zychlinsky A. 2012. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *Journal Cellular Biology*, 198 (5): 773–783.

- Burmester GR, Pezzutto A. 2005. *Imunologia Texto e Atlas. Lidel - edições técnicas, Lda*. Lisboa, 340 pg.
- Burster T, Macmillan H, Hou T, Boehm BO, Mellins ED. 2010. Cathepsin G: roles in antigen presentation and beyond. *Molecular Immunology*, 47 (4): 658–665.
- Carlsen ED, Hay C, Henard CA, Popov V, Garg NJ, Soong L. 2013. *Leishmania amazonensis* amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. *Infection Immunology*, 81 (11): 3966–3967.
- Campino L, Maia C. 2010. Epidemiology of leishmaniasis in Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 23 (5): 859–864.
- Campino L, Pratlong F, Abranches P, Rioux J, Santos-Gomes G, Alves-Pires C, Cortes S., Ramada J, Cristovão JM, Afonso MO, Dedet JP. 2006. Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine International Health*, 11 (11): 1708–1714.
- Chandra RK. 2002. Nutrition and the immune system from birth to old age. *European Journal Clinical Nutrition*, 56 (3): 73–76.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J., Boelaert M. 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nature Reviews, Microbiology*. 5 (11): 873-882.
- Choi HS, Kim JW, Cha YN, Kim C. 2006. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 27 (1): 31-44.
- Coico R, Sunshine G. 2009. Immunology a short course. 6th edition. *John Wiley & Sons*. New Jersey, 416 páginas.
- Cook GC. 1996. Manson's Tropical Diseases. Twentieth edition. *Saunders*. London, England, 1779 páginas.
- Croft SL, Olliaro P. 2011. Leishmaniasis chemotherapy - challenges and opportunities. *Clinical Microbiology Infection*, 17 (10): 1478-1483.
- Croft SL, Sundar S., Fairlamb H.A. 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 19 (1): 111-126.

- Davidson RN, Boer M, Ritmeijer K. 2009. Paromomycin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103 (7): 653-660.
- Dorlo TPC, Balasegaram M, Beijnen JH, Vries PJ. 2012. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal Antimicrobiology Chemotherapy*. 67 (11): 2576–2597.
- Dorlo TPC, Kager PA. 2008. Pentamidine Dosage: A Base/Salt Confusion. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 2 (5): 1-3.
- Dostálová A, Volf P. 2012. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors*, 5 (276): 1-12.
- Downing T, Imamura H, Decuypere S, Clark TG, Coombs GH, Cotton JA, Hilley JD, Doncker S, Maes I, Mottram JC, Quail MA, Rijal S, Sanders M, Schonian G, Stark O, Sundar S, Vanaerschot M, Hertz-Fowler C, Dujardin JC, Berriman M. 2011. Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome Research*, 21 (12): 2143–2156.
- Dwyer JM, Johnson C. 1981. The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells. *Clinical Experimental Immunology*, 46 (2): 237-249.
- Elmahallawy EK, Martínez AS, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Mari JMN, Fernández JG. 2014. Diagnosis of leishmaniasis. *Journal Infection Developing Countries*, 8 (8): 961-972.
- Carlsen ED, Hay C, Henard CA, Popov V, Garg NJ, Lynn Soong L. 2013. *Leishmania amazonensis* Amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. *Infection and Immunity*, 81 (11): 3966–3974.
- d’Ettorre G, Ceccarelli G, Carnevalini M, Forcina G, Zaffiri L, Massetti AP, Mastroianni CM, Vullo V. 2006. Central role of interleukin-15 in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients with visceral leishmaniasis. *Acta Tropical*, 99 (1): 83–87.
- Evans KJ, Kedzierski L. 2012. Development of vaccines against visceral leishmaniasis. *Journal Tropical Medicine*, (2012): 1-14.

- Falcão SAC., Weinkopff T, Hurrel BP, Celes FS, Curvelo RP, Prates DB, Barral A, Borges VM, Tacchini-Cottier F, Oliveira CI. 2015. Exposure to *Leishmania braziliensis* triggers neutrophil activation and apoptosis. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 9 (3): 1-19.
- Fialkow L, Wang Y, Downey G.P. 2007. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology & Medicine*, 42 (2): 153–164.
- Foulet F, Botterel F, Buffet P, Morizot G, Rivollet D, Deniau M, Pratlong F, Costa JM., Bretagne S. 2007. Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a *real-time* PCR assay and sequencing of the cytochrome *b* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (7): 2110–2115.
- Frolov AK, Litvinenko RA. 2015. Effect of medicinal leeches' antigens on the proliferative response of human blood mononuclear cells and cytokine production in vitro. *Annals of Parasitology*, 61 (2): 97–104.
- Fuchs T, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal Cellular Biology*, 176 (2): 231–241.
- Gadelha EPN, Talhari S, Guerra JA O, Neves LO, Talhari C, Gontijo B, Silva Junior RMS, Talhari AC. 2015. Efficacy and safety of a single dose pentamidine (7mg/kg) for patients with cutaneous leishmaniasis caused by *L. guyanensis*: a pilot study. *Annals Brazilian Dermatology*, 90 (6): 807-813.
- Garg, R, Trudel N, Tremblay MJ. 2007. Consequences of the natural propensity of *Leishmania* and HIV-1 to target dendritic cells. *Trends Parasitology*, 23 (7): 317–324.
- Gidwani K, Rai M, Chakravarty J, Boelaert M, Sundar S. 2009. Short report: evaluation of *Leishmanin* skin test in indian visceral leishmaniasis. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 80 (4): 566–567.
- 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 (1): 100–111.

- Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Fromenta GS, Soares RPP, Morgado FN, Silva FC, Saraiva EM. 2009. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *PNAS*, 106 (16): 6748–6753.
- Halverson TWR, Wilton M, Poon KKH, Petri B, Lewenza S. 2015. DNA is an antimicrobial component of neutrophil extracellular traps. *PLOS Pathogens*, 11 (1): 1-23.
- Harith, AE, Kolk AHJ, Kager PA, Leeuwenburg J, Muigai R, Kiugu S, Kiugu S, Laarman JJ. 1986. A simple and economic direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80 (4): 583-587.
- Hendrickx S, Leemans A, Mondelaers A, Rijal S, Khanal B, Dujardin JC, Delputte P, Cos P, Maes L. 2015. Comparative fitness of a parent *Leishmania donovani* clinical isolate and its experimentally derived paromomycin-resistant strain. *PLoS ONE*, 10 (10): 1-14.
- Heutinck MK, Berge JMI, Hacke EC, Hamanna J, Rowshani AT. 2010. Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Molecular Immunology*, 47 (11-12): 1943–1955.
- Hilda JN, Narasimhan M, Das SD. 2015. *Mycobacterium tuberculosis* strains modify granular enzyme secretion and apoptosis of human neutrophils. *Molecular Immunology* 68 (2): 325–332.
- Huang G, Feng L, Liu B, He Y, Li Y, Chen Y. 2015. Synthesis and biological evaluation of nigranoic acid esters as novel human neutrophil elastase inhibitors. *Natural Product Research*, 29 (7): 1650-1656.
- Jerke U, Hernandez DP, Beaudette P, Korkmaz B, Dittmar G, Kettritz R. 2015. Neutrophil serine proteases exert proteolytic activity on endothelial cells. *International Society of Nephrology*, 88 (4): 764-775.
- Killick-Kendrick R. 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17 (3): 279–289.

- Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, Gauthier F. 2010. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic Ttargets in human diseases. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 62 (4): 227-242.
- Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F. 2008. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: Physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie*, 90 (2): 227-242.
- Kumar R, Engwerda C. 2014. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clinical & Translational Immunology*, 3 (3): 1-6.
- Kumar V, Bimal S, Chaudhary SKSR., Lal SC, Pandey K, Das VR, Das P. 2014. *Leishmania donovani*: Dynamics of *L. donovani* evasion of innate immune cell attack due to malnutrition in visceral leishmaniasis. *Nutrition*, 30 (4): 449–458.
- Lainson R, Ward RD, Shaw JJ. 1987. *Leishmania* in phlebotomid sandflies:VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proceedings Royal Society London*, 199 (1135): 309–320.
- 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 (4): 183–191.
- Laufs H, Müller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W, Laskay T. 2002. Intracellular Survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infection and Immunity*, 70 (2): 826–835.
- Lieke T, Nylén S, Eidsmo L, McMaster WR, Mohammadi AM, Khamesipour A, Berg L, Akuffo H. 2008. *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clinical and Experimental Immunology*, 153 (2): 221–230.
- Liese J, Schleicher U, Bogdan C, 2008. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology*, 213 (3-4): 377–387.

- Lodge R, Diallo TO, Descoteaux A. 2006. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cellular Microbiology*, 8 (12): 1922–1931.
- Liu D, Uzonna JE. 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): 1-8.
- Liu X, Tian Y, Meng Z, Chen Y, Ho IHT, Choy KW, Lichtner P, Wong SH, Yu J, Gin T, Wu WKK, Cheng CHK, Chan MTV. 2015. Up-regulation of cathepsin G in the development of chronic postsurgical pain. *Anesthesiology*, 123 (4): 838-850.
- Macmillanb TBH, Houb T, Boehm BO, Mellins ED. 2010. Cathepsin G: Roles in antigen presentation and beyond. *Molecular Immunology*, 47 (4): 658–665.
- Maia C, Parreira R, Cristóvão JM, Freitas FB, Afonso MO, Campino L. 2015. Molecular detection of *Leishmania* DNA and identification of blood meals in wild caught phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from southern Portugal. *Parasites & Vectors*, 8 (173): 2-10.
- Marques CS, Passero LFD, Vale-Gato I, Rodrigues A, Rodrigues OR, Martins C, Correia I, Tomás AM, Alexandre-Pires G, Ferronha MH, Santos-Gomes GM. 2015. New insights into neutrophil and *Leishmania infantum* *in vitro* immune interactions. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, (40):19–29.
- Marques N, Cabral S, Sá R, Coelho F, Oliveira J, Saraiva da Cunha JG, Meliço-Silvestre A. 2007. Leishmaniose visceral e infecção por vírus da imunodeficiência humana. *Acta Medica Portuguesa*, 20 (4): 291-298.
- Martin V, Vouldoukis I, Moreno J, McGahie D, Gueguen S, Cuisinier A-M. 2014. The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) remains effective against an experimental challenge one year later. *Veterinary Research*, 45 (69): 1-15.
- McFarlane E, Perez C, Charmoy M, Allenbach C, Carter KC, Alexander J, et al. 2008. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during on set of infection with *Leishmania donovani*. *Infection Immunology*, 76 (2): 532–541.

- Mendonça SCF, Cysne-Finkelstein L, Matos DCS. 2015. Kinetoplastid membrane protein-11 as a vaccine candidate and a virulence factor in *Leishmania*. *Frontiers Immunology*, 6 (524): 1-6.
- Modabber F. 2010. Leishmaniasis vaccines: past, present and future. *International Journal Antimicrobiology Agents*, 36 (1): 58–61.
- Mollinedo F, Janssen H, Iglesia-Vicente J, Villa-Pulgarin JA, Calafat J. 2010. Selective fusion of azurophilic granules with *Leishmania* containing phagosomes in human neutrophils. *Journal of Biology Chemistry*, 285 (45): 34528–34536.
- 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 (4): 318-324.
- Murray HW. 2001. Clinical and experimental advances in treatment in visceral leishmaniasis. *Antimicrobiology Agents Chemotherapy*, 45 (8): 2185–2197
- Mydel P, Shipley JM, Adair-Kirk TL, Kelley DG, Broekelmann TJ, Mecham RP, Senior RM. 2008. Neutrophil elastase cleaves laminin-332 (laminin-5) generating peptides that are chemotactic for neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (15): 9513-9522.
- Nathan C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, 6 (3): 173-182.
- Nigro L, Cacopardo B, Preiser W, Braner J, Cinatl J, Palermo F, Russo R, Doerr HW, Nunnari A. 1999. In vitro production of type 1 and type 2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells from subjects coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania infantum*. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 60 (1): 142–145.
- Noazin S, Khamesipour A, Moulton LH, Tanner M, Nasser K, Modabber F, Sharifi I, Khalil EA, Bernal ID, Antunes CM, Smith PG. 2009. Efficacy of killed whole-parasite vaccines in the prevention of leishmaniasis: a meta-analysis. *Vaccine*, 27 (35): 4747–4753.

- Oliveira CI, Nascimento IP, Barral A, Soto M, Barral-Netto M. 2009. Challenges and perspectives in vaccination against leishmaniasis. *Parasitology International*, 58 (4): 319–32.
- Oliveira RA, Silva LSV, Carvalho VP, Coutinho AF, Pinheiro FG, Lima CG, Junior JEL, Junior GB, Daher EFS. 2008. Visceral leishmaniasis after renal transplantation: report of 4 cases in northeastern Brazil. *Transplant Infectious Disease*, 10 (5): 364-368.
- ONLEISH. <http://www.onleish.org/index.php?article=25&visual=3>, acessado em 12.11.2015.
- Pace D. 2014. Leishmaniasis. *Journal of Infection*, 69 (1): 1-9.
- Pattabhi S, Whittle J, Mohamath R, El-Safi S, Moulton GG, Guderian JA, Colombara D, Abdoon AO, Mukhtar MM, Mondal D, Esfandiari J, Kumar S, Chun P, Reed SG, Bhatia A. 2010. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 4 (9): 1-11.
- Pham. CTN. 2008 Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40 (6-7): 1317–1333.
- Pliyev BK, Dimitrieva TV, Savchenko VG. 2015. Cytokine-mediated induction of MHC class II in human neutrophils is dependent on NADPH oxidase activity. *European Journal Cell Biology*, 94 (1): 67–70.
- Ranasinghe SL, Fischer K, Gobert GN, McManus DP. 2015. Functional expression of a novel Kunitz type protease inhibitor from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Parasites & Vectors*, 8 (408): 1-10.
- Ready PD. 2014. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology*, 6:147–154.
- Rey L. 2002. Bases de Parasitologia médica. Segunda edição. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 380 pg.
- Ribeiro-Gomes F L, Moniz-de-Souza MCA, Alexandre-Moreira MS, Dias WB, Lopes MF, Nunes MP, Lungarella G, DosReis GA. 2007. Neutrophils activate macrophages

for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *Journal of Immunology*, 179: 3988–3994.

Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-de-Souza MCA, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, Calich VL, Coutinho SG, Lopes MF, DosReis GA. 2014. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *Journal of Immunology*, 172 (7): 4454–4462.

Ribeiro-Gomes FL, Sacks D. 2012. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2 (59): 1-8.

Ritter U, Frischknecht F, van Zandbergen G. 2009. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends Parasitology*, 25 (11): 505–510.

Rochael NC, Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, DeSouza-Vieira TS, Oliveira MP, Souza LFG, Oliveira MF, Saraiva EM. 2015. Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of neutrophil extracellular traps triggered by *Leishmania* parasites. *Scientific Reports*, 5 (18302):1-11.

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

Santos-Oliveira JR, Regis EG, Giacoia-Gripp CB, Valverde JG, Alexandrino-de-Oliveira P, Lindoso JÂ, Goto H, Oliveira-Neto MP, Guerra JO, Grinsztejn B, Jerônimo SB, Morgado MG, Da-Cruz AM. 2013. Microbial translocation induces an intense pro-inflammatory response in patients with visceral leishmaniasis and HIV type 1 coinfection. *Journal Infection Disease*, 208 (1): 57–66.

Servier Medical Art. <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>, acessado em 04.01.2016.

Schallig HDFH, Cardoso L, Semião-Santos SJ. 2013. Seroepidemiology of canine leishmaniosis in Évora (southern Portugal): 20-year trends. *Parasites & Vectors*, 6 (100): 1-4.

Silva AA, Filho APS., Sesso RCC, Esmeraldo RM, Oliveira CMC, Fernandes PFCBC, Oliveira RA, Silva LSV, Carvalho VP, Costa CHN, Andrade JXA, Silva DMB, Chaves

- RV. 2015. Epidemiologic, clinical, diagnostic and therapeutic aspects of visceral leishmaniasis in renal transplant recipients: experience from thirty cases. *BMC Infectious Diseases*, 15 (96): 1-10.
- Silva AA, Pacheco-Silva A, De Castro CSR, Esmeraldo RM, Costa de Oliveira CM, Fernandes PF, Oliveira RA, Silva LS, Carvalho VP, Nery Costa CH. 2013. The risk factors for and effects of visceral leishmaniasis in graft and renal transplant recipients. *Transplantation*, 95 (5): 721–727.
- Silva ACRA, Almeida BFM, Soeiro CS, Ferreira WL, Lima VMF, Ciarlini PC. 2013. Oxidative stress, superoxide production, and apoptosis of neutrophils in dogs with chronic kidney disease. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 77 (2): 136–141.
- Silva JA, Araújo IM, Pavanetti LC, Okamoto LS, Dias M. 2014. Visceral leishmaniasis and pregnancy in renal transplanted patient: case report. *Jornal Brasileiro Nefrologia*. 37 (2): 268-270.
- Soong L. 2008. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *Journal Immunology*, 180 (7): 4355–4360.
- Srivastava P, Mehrotra S, Tiwary P, Chakravarty J, Sundar S. 2011. Diagnosis of indian visceral leishmaniasis by Nucleic acid detection using PCR. *PLoS ONE*, 6 (4): 1-5.
- Sundar S., Singh A, Rai M, Prajapati VK, Singh AK, Ostyn B, Boelaert M, Dujardin J-C, Chakravarty J. 2012. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral Leishmaniasis in India after a decade of use. *Clinical Infectious Diseases*, 55 (4): 543–550.
- Stapels DAC, Kuipers A, von Köckritz-Blickwede M, Ruyken M, Tromp AT, Horsburgh MJ, de Haas CJC, van Strijp JAG, van Kessel KPM, Rooijackers SHM. 2015. *Staphylococcus aureus* protects its immune-evasion proteins against degradation by neutrophil serine proteases. *Cellular Microbiology*, 18 (4): 536-45.
- Sukhumavasi W, Charlotte EE, Eric YD, 2007. Mouse neutrophils require JNK2 MAPK for *Toxoplasma gondii*-induced IL-12p40 and CCL2/MCP-1 release. *Journal of Immunology*, 179 (6): 3570-3577.
- Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barral-Netto M, Barral A. 2006. Chemokines in host–parasite interactions in leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, 22 (1): 32-40.

- Turner KG, Vacchina P, Robles-Murguía M, Wadsworth M, McDowell MA, Morales MA. 2015. Fitness and phenotypic characterization of miltefosine-resistant *Leishmania major*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9 (7): 1-15.
- Trzybulska D, Olewicz-Gawlik A, Graniczna K, Kisiel K, Moskal M, Cieslak D, Hrycaj P. 2014. Quantitative analysis of elastase and cathepsin G mRNA levels in peripheral blood CD14⁺ cells from patients with rheumatoid arthritis. *Cellular Immunology*, 292 (1-2): 40–44.
- Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A. 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *Public Library of Science Pathogens*, 5 (10): 1-18.
- van Griensven J, Carrillo E, Lopez-Velez R, Lynen L, Moreno J. 2014. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clinical Microbiology Infection*, 20 (4): 286–299.
- Vaish M, Bhatia A, Reed SG, Chakravarty J, Sundar S. 2012. Evaluation of rK28 antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in India. *Clinical Microbiology Infection*, 18 (1): 81–85.
- van Zandbergen G, Hermann N, Laufs H, Solbach W, Laskay T. 2002. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infection and Immunity*, 70 (8): 4177–4184.
- Vassallo M, Moranne O, Ambrosetti D, Jeande PY, Pomares C, Cassuto E, Boscagli A, Giraud G, Montagne N, Dentone C, Demacina I, Villaggio B, Secondo G, Ferrea G, Passeron C, Saudes L, Kaphan R, Marty P, Rosenthal E. 2014. Visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum* with renal involvement in HIV-infected patients. *BMC Infectious Diseases*, 14 (561): 1-8.
- Vilaplana C, Blanco S, Domínguez J, Giménez M, Ausina V, Tural C, Muñoz C. 2004. Noninvasive method for diagnosis of visceral leishmaniasis by a latex agglutination test for detection of antigens in urine samples. *Journal Clinical Microbiology*, 42 (4): 1853-1854.

WHO - World Health Organization. 2010. Control of the leishmaniasis. *World Health Organization Technical Report Series*, 949 (xii-xiii): 1-186.

WHO, 2015. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>, acesso a 11.11.2015.

WHO, 2013. <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> acesso a 11.11.2015.

Wolday D, Berhe N, Britton S, Akuffo H. 2000. HIV-1 alters T helper cytokines, interleukin-12 and interleukin-18 responses to the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *AIDS*, 14 (8): 921–929.

Wortmann G, Zapor M, Ressler R, Fraser S, Hartzell J, Pierson J, Weintrob A, Magill A. 2010. Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 83 (5): 1028–1033.

Zawrotniak M., Rapala-Kozik M. 2013. Neutrophil extracellular traps (NETs) formation and implications. *Acta Biochimica Polonica*, 60 (3): 277–284.