

SEPARAÇÃO E CONTAGEM DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Erika Oliveira da SILVA¹
Liliane Coelho da ROCHA²
Maricleide de Farias NAIFF³

¹Bolsista PAIC/FAPEAM/INPA; ²Coorientadora INPA; ³Orientadora INPA.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), configura-se um conjunto de enfermidade polimórfica da pele e das mucosas, caracterizada pela existência de uma variedade de formas clínicas, variando de lesões auto-resolutivas a lesões desfigurante, causadas por diversas espécies de *Leishmania* dermatrópica dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (Silveira *et al.* 2004).

No Brasil, a LTA destaca-se por sua ampla distribuição, ocorrendo em todos os Estados da Federação, com mais de 25.000 casos por anos, sendo a região norte pioneira em contribuição com sua incidência (Brasil 2007).

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório, transmitido através da picada de flebotomíneos, que se multiplica nas células do sistema fagócito mononuclear de mamíferos suscetíveis (Marsden 1986; Lainson *et al.* 1987).

A resposta imune contra diversos microrganismos é classificada em resposta imune inata e adaptativa. Após o parasito entrar em contato com as células apresentadoras de antígenos (APCS), que podem ser macrófagos ou células dendríticas, podem ser fagocitados, permitindo após seu processamento, a apresentação dos antígenos aos linfócitos T (Hoffmann *et al.* 1999). O início da resposta imune só ocorre após a célula fagocítica identificar o microrganismo como algo não próprio do ser humano, através dos receptores de reconhecimento padrão, do inglês, pattern-recognition receptors (Gordon 2012). Entre os receptores de reconhecimento padrão esta o Toll-Like Receptor (TLR), dando início a resposta imune adaptativa.

No momento existem 13 TLRs descritos em humanos. Estes apresentam padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) de acordo com o substrato (Uematsu *et al.* 2006).

Diversos estudos imunológicos têm sido feitos para aumentar a compreensão da resposta adaptativa na LTA. Assim, esta doença vem sendo usada como um modelo de respostas Th1 e Th2. Infelizmente, há ainda diversos aspectos dos passos iniciais da infecção de *Leishmania* em seres humanos, que ainda são em grande parte desconhecidas. A relação entre TLRs e leishmânia pode ser um mecanismo chave no desenvolvimento da doença ou no controle da mesma. E sua ativação poderia influenciar na destruição intracelular do parasito, permitindo uma resposta inflamatória inicial mais eficaz.

Quase todos os estudos experimentais *in vitro* ou *in vivo* em TLRs utilizaram espécies de *Leishmania* não encontradas no Brasil. Entretanto, dentre os primeiros estudos foram utilizadas células expostas à infecção por *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* com o objetivo de identificar e quantificar a expressão dos receptores toll-like 2,4 e 9 (Tuon 2011). Recentemente, macrófagos de lesões de pacientes com LTA causada por *L. (V.) braziliensis* foram estudadas descrevendo-se o padrão de expressão de receptores toll-like 2 e 4 (TLR2 e TLR4) (Tuon *et al.* 2012).

O evento crucial para indução da resposta imune curativa contra a *Leishmania* é a ativação de células capazes de produzir citocinas protetoras. As citocinas levam à ativação de macrófagos via Interferon gama (IFN- γ), resultando na síntese de intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio consequentemente, à morte dos parasitos intracelulares (Salaizo-Suazo *et al.* 1999). Se a resposta for do tipo Th1, citocinas como IL-2, IFN- γ , Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e Inteleucina (IL-12) serão produzidas, ativando os macrófagos e, consequentemente, levando a destruição dos parasitos. Mas, se a resposta for do tipo Th2 serão produzidos IL-4 e IL-10, que inibem a ativação macrófágica e, consequentemente, as formas clínicas aparecerão. A *Leishmania* é capaz de direcionar a diferenciação de células T para uma resposta do tipo Th2, caracterizada pela persistência da infecção (Bogdan e Rollinghoff 1998; Reis *et al.* 2006)

Paralelamente à existência de uma resposta imunológica por parte do hospedeiro, a sobrevivência e a persistência parasitária dependem de estratégias de escape da resposta imune inata e adaptativa (Reis *et al.* 2006).

Sabendo da importância dos TLRs na resposta imune da doença cutânea pela *Leishmania*, a ausência de estudos de células mononucleares de humanos envolvidos na resposta à infecção por *Leishmania* no Estado do Amazonas, e com intuito de averiguar a expressão destes receptores em estudo posterior, o presente estudo visa à separação e contagem de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do sangue periférico humano

Este estudo foi realizado no Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). Foram inclusos pacientes com o diagnóstico clínico-parasitológico positivo para LTA, com idade maior de 18 anos, de ambos os sexos, residentes do município de Rio Preto da Eva e Manaus. Os critérios de exclusão foram: menores de 18 anos e mulheres grávidas. O grupo controle foi composto de cinco pacientes saudáveis e sem histórico anterior para infecção por *Leishmania*. O sangue venoso foi coletado em tubos vacutainer (BD Vacutainer™), contendo anticoagulante EDTA. O estudo faz parte de um projeto aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do INPA com o protocolo número 84/12.

Separação de células mononucleares

O sangue foi colocado cuidadosamente sobre meio de separação de linfócitos (Histopaque – 1077, Sigma) numa proporção de 2 mL sangue para 4 mL de Ficol, e centrifugada a 520 g, durante 25 minutos à temperatura ambiente sem travão em centrífuga com rotor basculante. Após centrifugação o anel de células mononucleares foi cuidadosamente recolhido e submetido a três lavagens com solução de PBS 1X, a 370 g durante 10 minutos a +4°C. O sedimento foi ressuspenso em 350 µl de RNAlater™ (QIAGEN) e armazenada em -80°C até seu uso.

Isolamento de parasitos e expansão parasitária

De cada paciente foi realizado a coleta de sangue e paralelamente o exame de diagnóstico para LTA por escarificação da borda das lesões cutâneas para pesquisa de amastigotas em lâmina e isolamento parasitário a partir do raspado. As lâminas foram coradas pelo método Panótico e observadas em microscópio óptico com aumento de 1000x. O diagnóstico positivo foi confirmado pelo encontro de formas amastigotas presentes na lâmina. O isolamento dos parasitos foi realizado em meio NNN ágar sangue pela sementeira do raspado da lesão. Após o crescimento dos flagelados no meio, estes foram transferidos para frascos de cultura de células contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino para a expansão celular.

Preparo de Massa para Criopreservação

O frasco de cultura de células após expansão celular foi centrifugado durante 15 minutos a 4.400 rpm. Após centrifugação foi retirado o sobrenadante e o pellet ressuspendido em solução de criopreservação, que consiste em 30% de soro fetal bovino + 70% de meio Schneider/3ml de SFB + 7ml de meio, e transferido para tubos de criopreservação passando então por um processo de congelamento gradual e armazenados em freezer -80°C até seu uso.

Preparo de Massa para Isoenzimas

Após crescimento parasitário em meio próprio, o material foi centrifugado para obtenção de pellet a 500 rpm por 15 minutos e refrigerado a 4°C. O sedimento foi lavado 1x em tampão de isoenzimas (0,85% NaCl, 0,01m EDTA) a 500 rpm por 15 minutos. Em seguida ressuspendeu-se em 1ml do mesmo tampão em frasco de criopreservação e centrifugado a 400 rpm por 7 minutos. Após centrifugação foi retirado o sobrenadante e armazenado em freezer -80°C até seu uso.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de estudo foram atendidos 18 pacientes no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do INPA, dos quais foram selecionados 11 indivíduos com exame direto positivo para *Leishmania* sp. oriundos de Rio Preto da Eva e Manaus conforme observado na tabela 1. Do total dos 11 pacientes envolvidos na pesquisa, 10% eram do sexo masculino e 1% do sexo feminino, a idade variou na faixa etária de 23 a 59 anos. Estes pacientes apresentaram lesões cutâneas ulceradas localizadas nos membros superiores e inferiores.

Através da coleta do sangue desses pacientes foi feita a separação e contagem de células mononucleares criopreservadas para posterior estudo dos receptores Toll-like.

Para a continuidade deste estudo, parasitos foram separados, criopreservados e expandidos para caracterização por isoenzimas, permitindo assim o estudo de associação de receptores específicos à espécie de *Leishmania*.

Na infecção por parasitos os TLRs desempenham um papel essencial na ligação entre a imunidade inata e a adaptativa aumentando a fagocitose e o processo de morte dos patógenos (Pasare e Medzhitov 2004).

Na Leishmaniose os TLRs mais estudados são o TLR2 e TLR4 sendo demonstrado sua participação no reconhecimento e subsequente resposta imune em *Leishmania (Leishmania) major* (Ribeiro-Gomes *et al.* 2007; Becker *et al.* 2003; Flandin *et al.* 2006).

No primeiro estudo a relatar a resposta imunológica relacionada com TLR2 e TLR4 com por *L. (V.) braziliensis*, foi demonstrado que TLR2 é o TLR mais comum na doença ativa, principalmente em macrófagos sem correlação com a quantidade de citocinas e outras células. Os autores também afirmam que a participação de TLR2 e TLR4 é semelhante a *L. major* (Tuon *et al.* 2012).

A maioria dos estudos envolvendo TLRs e *Leishmania* envolveu estudos em modelos animais e *in vitro* em espécies não encontradas no Brasil e o que se percebe é que ainda existem muitas lacunas dentro do processo de resposta imunológica que necessitam ser elucidadas.

Sabendo-se que é relevante o papel que os TLRs têm na resposta imune inata e esta, por sua vez, pode influenciar a resposta imune adaptativa e, conseqüentemente, o fenótipo da doença, além de que o desenvolvimento de novos medicamentos, vacinas, testes de diagnóstico e de prognóstico, perspectivas estão relacionadas com o conhecimento da resposta imune é importante o estudo das células da resposta imune que expressam TLR, bem como a relação destes receptores com outras células e a produção de citocinas em espécies que ocorrem no país e principalmente as que estão relacionadas com a LTA da região norte como a *L. (V.) guyanensis* entre outras.

Tabela1. Número de isolados de células mononucleares e parasitos de pacientes com LTA de Rio Preto da Eva e Manaus.

ISOLADOS	SEXO	IDADE	CÉLULAS MONONUCLEARES	CRIOPRESERVAÇÃO	ISOENZIMAS
MHOM/BR/13/IM6101	Masculino	31	X	X	X
MHOM/BR/13/IM6106	Feminino	38	X	X	X
MHOM/BR/13/IM6110	Masculino	59	X	X	X
MHOM/BR/13/IM6112	Masculino	59	X	X	X
MHOM/BR/14/IM6116	Masculino	27	X	X	X
MHOM/BR/14/IM6117	Masculino	33	X	X	X
MHOM/BR/14/IM6118	Masculino	23	X	X	X
MHOM/BR/14/IM6119	Masculino	23	X	X	X
MHOM/BR/14/IM6120	Masculino	40	X	X	X
MHOM/BR/14/IM6121	Masculino	41	X	X	X
MHOM/BR/14/IM6122	Masculino	34	X	X	X

Legenda: Isolados: M- mamífero; HOM- *Homo sapiens*; BR-país de origem (Brasil)/ano de isolamento/código original utilizado pelo INPA.

CONCLUSÃO

O estudo com pacientes com LTA na região amazônica pode ser considerado laborioso devido às diversas dificuldades em acesso a população atingida pela patogenia, ocasionados pelas características demográficas, logística, entre outros fatores que contribuem para dificuldades em chegar a estas pessoas com a doença, assim não permitindo um maior sucesso na pesquisa com o isolamento de células que apresentam um tempo curto de sobrevivência para a sua preservação e estudo.

No entanto, iniciativas que possam trazer informações preliminares sobre como são expressos os receptores Toll-like em pacientes infectados pela LTA ajudam a entender como funciona o mecanismo dessa infecção e sua associação com células do hospedeiro, sendo de extrema importância para o controle da patologia e assim elucidar a relação entre parasito, hospedeiro e resposta imune.

REFERÊNCIAS

- Becker, I.; Salaiza, N.; Aguirre, M.; Delgado, J.; Carrillo-Carrasco, N.; Kobels, L.G. 2003. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *MolBiochemParasitol*, 130: 65-74.
- Bogdan, C.; Rollinghoff, M. 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *InternationalJournal of Parasitology*, 28(1): 121-134.
- Brasil, M.S. 2007. *Secretaria de Vigilância em Saúde*. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar americana. Brasília. Ministério da Saúde 17 p.
- Ferreira, C.C.; Marohio, G.G.; Partarua, A.K. 2012. Estudo sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana com Enfoque na Farmacoterapia. *Revista Científica do ITPAC*, 5(4).

- Gordon, S. 2012. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111: 927–30.
- Hoffman, J.A.; Kafatos, F.C.; Janeway, C.A.; Ezekowitz, R.A. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284: 1313–8.
- Kumar, H.; Kawai, T.; Akira, S. 2009. Toll-like receptors and innate immunity. *BiochemBiophys Res Commun*, 388: 621–5.
- Lainson, R.; Ryan, L.; Shaw, J.J. 1987. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82(3):421-4.
- Pasare, C.; Medzhitov, R. 2004. Toll-like receptors: linking innate adaptive immunity. *MicrobesInfect*, 6: 1382–7.
- Reis, L.; Brito, M.; Souza, M.; Pereira, V. 2006. Mecanismos Imunológicos na Resposta Celular e Humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Atualização*, 35: 103-115.
- Ribeiro, G; F.L.; M.C; Alexandre-Moreira, M.S.; Dias, W.B.; Lopes, M.F.; Nunes, M.P. 2007. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J Immunol*, 179: 3988-94.
- Salaiza-Suazo, N.; Volkow, P.; Tamayo, R.P.; Moll, H.; Gillitzer, R.; Pérez-Torres, A.; Pérez-Montfort, R.; Domínguez, J.D.; Velasco-Castrejón, O.; Crippa, M.; Becker, I. 1999. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania Mexicana* modifies the immunohistological profile *Leishmania Mexicana* modifies the immunohistological profile *Leishmania Mexicana* but not the disease outcome. *Trop Med Int Health*, 4: 801-811.
- Silveira, F.T.; Lainson, R.; Corbett, C. 2004. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil- A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99: 239-251.
- Tuon, F.F. 2011. *Identificação e quantificação da expressão de receptores toll-like 2,4 e 9 na leishmaniose cutânea humana*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo 81pp.
- Tuon, F.F.; Fernandes, E.R; Duarte, M.I.S; Amato, V.S. 2012. Expression of TLR2 and TLR4 in lesions of patients with tegumentary American Leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 54(3): 159-63.
- Uematsu, S.; Akira, S. 2006. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med (Berl)*, 84: 712–25.