



## **COMPARAÇÃO DA FAGOCITOSE DE *LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS* ENTRE NEUTRÓFILOS E MACRÓFAGOS HUMANOS**

Izabella Ventura de Souza (PIBIC/CNPq/UEM), Lais de Souza Braga, Thaís Gomes Verzignassi Silveira (Coorientador), Sandra Mara Alessi Aristides (Orientador), e-mail: [smaaristides@gmail.com](mailto:smaaristides@gmail.com).

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

### **Ciências Biológicas, Imunologia Celular.**

**Palavras-chave:** fagocitose, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, leucócitos.

### **Resumo:**

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que acometem o homem, causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. A doença pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro. Este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta imune por neutrófilos e monócitos isolados do sangue humano, comparando-os pela atividade fagocítica, frente à infecção com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Foram coletados 8 mL de sangue de 16 indivíduos, as células mononucleares e as polimorfonucleares foram separadas, infectadas com *L. (L.) amazonensis* e então testadas para fagocitose. Os neutrófilos apresentaram maior atividade fagocítica nos tempos iniciais de infecção e os macrófagos nos tempos finais, porém sem significância estatística. Tais resultados mostram que estas células auxiliam no combate à infecção e, além disso, podem estar induzindo a dicotomia da resposta imune.

### **Introdução**

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) está entre as endemias de maior importância em saúde pública no Brasil, devido sua ampla distribuição, à ocorrência de formas clínicas graves e pela dificuldade ao diagnóstico, bem como ao tratamento. Esta enfermidade é causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. No Brasil, a *L. (Viannia) braziliensis* e a *L. (Leishmania) amazonensis* são as espécies mais amplamente distribuídas (SARAVIA et al., 1989; ALVES et al., 2006). As manifestações clínicas da doença dependem de complexas interações entre a capacidade de invasão do parasito, o tropismo e a patogenicidade relacionada à imunogenicidade do hospedeiro (GARNHAM et al., 1987). Os neutrófilos e monócitos são os principais mediadores na resposta imune



inata e predispõem o hospedeiro a uma resposta imune adaptativa voltada à resistência ou à suscetibilidade à doença. Avaliamos o papel destas células, pela fagocitose, no desenvolvimento da LTA. Para isto estudamos neutrófilos e macrófagos humanos infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na pesquisa da capacidade fagocítica destas células.

## **Materiais e métodos**

### *Amostras de sangue e Obtenção de monócitos e neutrófilos*

Foram coletados 8,0 mL de sangue humano com heparina ou EDTA, para obtenção de células polimorfonucleares e mononucleares de indivíduos sem história de LTA e morando em área não endêmica da doença. As células foram purificadas com a utilização de Mono-Poly Resolving Medium (M-PRM; MP-Biomedicals; França). Em um tubo falcon de 15 mL foi pipetado 5,3 mL de M-PRM e adicionado 8 mL de sangue e submetido a centrifugação por 45 min., 400 x g a 22°C. Formaram-se duas camadas, a mononucleares e de polimorfonucleares, transferidas para tubos distintos. Para o excesso de hemácias foi adicionado tampão de lise e novamente centrifugado. Este material foi lavado com solução de Hanks e ressuspenso em RPMI. As células obtidas foram avaliadas quanto à viabilidade por azul de tripan, a pureza e a contagem realizadas pela diluição em Líquido de Turk.

### *Cultivo de L. (L.) amazonensis*

A *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) foi cultivada em meio 199.

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

As células ( $2 \times 10^6$  células/mL) foram adicionadas às placas de 24 poços com lamínulas de 13 mm e incubadas com meio RPMI (Gibco, EUA) por 3 h/37°C/5% CO<sub>2</sub>. Após o tempo de aderência, as células foram lavadas com solução de Hanks, ficando aproximadamente  $2 \times 10^5$  células (RIBEIRO-GOMES et al., 2010). Estas células receberam ( $2 \times 10^6$ ) promastigotas de *L. (L.) amazonensis* opsonizadas ou não com de soro humano normal. Após 1, 2, 3, 5, 8 e 16 horas de incubação as lamínulas foram coradas com hematoxilina-eosina e visualizadas em microscópio (Olympus CX21, Japão). Em cada lamínula contou-se 200 células, e nestas quantas fagocitaram e em cada, quantas partículas foram fagocitadas. O índice fagocítico foi obtido pela porcentagem de células com fagocitose multiplicada pelo número médio de partículas fagocitadas.

## **Resultados e Discussão**

A média da viabilidade foi de 93,9% para monócitos e de 92,8% para neutrófilos

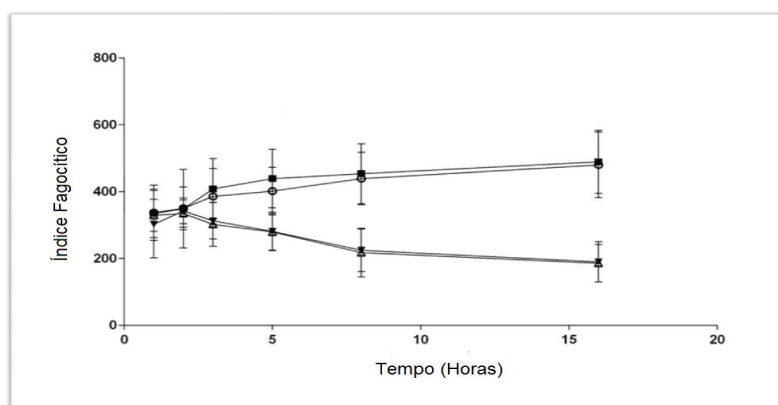


dos 16 indivíduos. A média de pureza foi de 95,6% para monócitos e de 98% para neutrófilos. A contagem de monócitos teve uma média de  $5,5 \times 10^6$  células/mL e a de neutrófilos  $6,2 \times 10^6$  células/mL. Os dados epidemiológicos dos indivíduos são apresentados na tabela 1.

Os dados (tabela 2 e figura 1) mostram que os neutrófilos apresentaram maior atividade fagocítica nas primeiras horas e os macrófagos nas últimas horas após infecção com o parasito opsonizado ou não, porém sem diferença estatística. Nossos resultados estão de acordo com estudos que apontam os neutrófilos têm papel protetor e/ou imunorregulador na resposta inicial contra infecção (CHARMOY et al., 2007). Deste modo, os neutrófilos e macrófagos podem estar induzindo a dicotomia da resposta imune.

**Tabela 1.** Dados epidemiológicos dos indivíduos sem histórico de LTA

| Indivíduos                   | (%)  |
|------------------------------|------|
| <b>Gênero</b>                |      |
| Feminino                     | 85   |
| Masculino                    | 15   |
| <b>Idade</b>                 |      |
| 18-20 anos                   | 72,5 |
| 21-40 anos                   | 27,5 |
| <b>Localidade</b>            |      |
| Maringá                      | 100  |
| <b>Lazer</b>                 |      |
| Academia                     | 30   |
| Caminhada                    | 17,5 |
| Cinema e Leitura             | 17,5 |
| Handebol, Futebol ou Bateria | 2,5  |
| Sem Atividade                | 20   |



**Figura 1** – Cinética do índice fagocítico em células mononucleares e polimorfonucleares infectadas. Macrófagos e neutrófilos isolados de 16 indivíduos saudáveis e infectados com *L. (L.) amazonensis*, incubados por 1, 2, 3, 5, 8 e 16 horas em 5%CO<sub>2</sub>/37°C e avaliadas quanto à fagocitose. Este gráfico representa a média ± SD das células isoladas dos 16 indivíduos. ○Macrófagos + *L. (L.) amazonensis*. ■ Macrófagos + *L. (L.) amazonensis* opsonizadas. ▲ Neutrófilos + *L. (L.) amazonensis*. ▼ Neutrófilos + *L. (L.) amazonensis* opsonizadas.



**Tabela 2.** Médias da fagocitose dos indivíduos sem histórico de LTA

|     | MO+LLa | MO+LLa* | NO+LLa | NO+LLa* |
|-----|--------|---------|--------|---------|
| C+  | 343,79 | 343,79  | 279,46 | 278,46  |
| 1h  | 337,33 | 334,98  | 329,39 | 302,37  |
| 2h  | 350,46 | 348,76  | 334,60 | 342,65  |
| 3h  | 385,90 | 408,58  | 302,01 | 312,50  |
| 5h  | 401,90 | 438,89  | 279,47 | 281,19  |
| 8h  | 438,97 | 453,64  | 217,86 | 224,75  |
| 16h | 389,98 | 397,47  | 151,10 | 142,58  |

MO: monócitos; NO: neutrófilos; LLa: *L. (L.) amazonensis*; LLa\*: *L. (L.) amazonensis* opsonizada com soro humano normal; C+: Controle

## Conclusões

Conclui-se, com este trabalho, que os neutrófilos apresentam maior fagocitose nos tempos iniciais de infecção e os macrófagos mais tardiamente, podendo constatar que os neutrófilos e os macrófagos auxiliam no combate à infecção bem como na dicotomia da resposta imune.

**Agradecimentos:** Ao PIBIC/CNPq/UEM pelo apoio financeiro.

## Referências

ALVES, P. T; CASTRO, C. A. C.; DORVAL, M. C. M. E. et al. **Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis***: Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba, v. 39, n.1, p. 43-46, 2006.

CHARMOY, M.; MEGNEKOU, R.; ALLENBACH, C. et al. ***Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection**. J. Leukoc. Biol., v. 82, n.2, p. 288-299, 2007.

GARNHAM, P. C. C. Introduction. In: PETERS, W. & KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, v.1, Academic Press Inc., London, 1987.

RIBEIRO-GOMES F. L., OTERO A. C., GOMES N. A. et al. **Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection**. J. Immunol., v. 172, p. 4454-4462, 2010.

SARAVIA, N. G. L.; VALDERRAMA, M.; LABRADA, A. F. et al. **The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in new world leishmaniasis**. J. Infect. Dis., v. 159, p. 725-735, 1989.