

AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA E A EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRODUZIDAS NA INFECÇÃO POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* EM GOLDEN HAMSTERS (*Mesocricetus auratus*)

Giovanna Chiqueto Duarte (PIBIC/FA), Camila Alves Mota, Daniele Stefanie Sara Lopes Lera-Nonose, Maria Valdrinez Campana Lonardonni (Co-Orientadora), Thaís Gomes Verzignassi Silveira (Orientadora), e-mail: giduarte16@gmail.com

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

Ciências Biológicas, imunologia.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar, carga parasitária, imunidade.

Resumo:

A leishmaniose é encontrada em todo o mundo, sendo endêmica em 97 países, inclusive no Brasil. Estudos recentes mostraram que pacientes subclínicos infectados por *Leishmania braziliensis* produzem menores níveis de IFN- γ e TNF- α , e mesmo assim não desenvolvem a doença. Estes casos apresentam fraca resposta imune tipo Th1 e a regulação negativa da resposta inflamatória não é mediada pelas citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-27, levantando-se a hipótese de um maior envolvimento da imunidade inata no controle da replicação parasitária. Curiosamente, esses pacientes apresentaram níveis de IL-17 semelhantes aos de pacientes com leishmaniose cutânea (LC). A maioria dos estudos envolvidos com a regulação da resposta imune na infecção por *Leishmania* servem de alicerce para a pesquisa de novas terapias e vacinas. Por meio da técnica de qPCR, nesse estudo foi avaliado o perfil de expressão de RNAm das citocinas IL-10, IFN- γ e IL-17, e a carga parasitária em golden hamsters *Mesocricetus auratus* infectados por *Leishmania braziliensis*. Os resultados são preliminares mas condizentes com a literatura e com a carga parasitária mostrando início da resposta imune no tecido linfonodal com visceralização subsequente. As citocinas apresentaram padrão que sugere predomínio da produção de IL-10 com consequente modulação negativa de IL-17.

Introdução

A leishmaniose tegumentar (LT) é encontrada em todas as regiões do Brasil, sendo a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, a espécie de maior prevalência em humanos, causando as formas cutânea e mucocutânea da doença. Estudos recentes mostraram que pacientes subclínicos infectados por *L. braziliensis* apresentam fraca resposta imune tipo Th1 e a regulação negativa da resposta inflamatória não é mediada pelas interleucinas (IL) anti-inflamatórias IL-10 e IL-27, levantando-se a hipótese de um maior envolvimento da imunidade inata no controle da replicação parasitária. Curiosamente, esses pacientes apresentaram níveis de IL-17 semelhantes aos de pacientes com LT. A LT causada pela *L. braziliensis* é caracterizada

pela alta produção de IFN- γ e TNF- α , responsáveis pela forte resposta inflamatória e patologia da doença. Oliveira et al. demonstrou que IL-10 e fator de crescimento transformador beta (TGF- β) são capazes de modular negativamente a produção de TNF- α e IL-17 em células de pacientes com LT (OLIVEIRA, 2014).

O golden hamster *Mesocricetus auratus* é o modelo mais susceptível para a infecção por espécies de *Leishmania* (*Viannia*), reproduzindo a maioria das características clínicas e histopatológicas observadas na doença humana.

O objetivo desse estudo foi avaliar o perfil de expressão do RNAm das citocinas IL-10, IFN- γ e IL-17 e a carga parasitária de golden hamsters *Mesocricetus auratus* frente à infecção por *L. braziliensis*.

Materiais e métodos

Para obtenção das amostras estudadas, foram usadas fêmeas adultas de golden hamsters *Mesocricetus auratus* obtidas no Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com água e ração padronizadas *ad libitum*, com temperatura ambiente controlada, e luz com ciclos de 12h claro-escuro. No primeiro mês de estudo, 5×10^6 promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária foram inoculadas na pata posterior direita dos animais. Nos quatro meses seguintes, os linfonodos poplíteos direitos e baços foram coletados nos tempos 0, 2, 8, e 15 semanas após a infecção. Um grupo de cinco animais foi eutanasiado, para cada tempo, totalizando 20 animais. Assim que as amostras eram obtidas, iniciou-se a extração do DNA dos tecidos para determinação da carga parasitária via qPCR. A concentração e a pureza do DNA foram medidas em espectrofotômetro NanoDrop™ Lite e fluorímetro Qubit 2.0. Foram utilizados iniciadores da PCR que amplificam uma região do minicírculo do kDNA do parasito pertencente ao subgênero *Leishmania* (*Viannia*), e como normalizador, iniciadores que amplificam o gene do GAPDH de hamster. A qPCR foi realizada em termociclador em tempo real StepOnePlus™ (Applied Biosystems). A quantificação absoluta foi feita usando como padrão a curva de diluição seriada do DNA purificado de cada gene (kDNA e GAPDH).

Resultados e Discussão

A carga parasitária foi determinada pelo método de quantificação absoluta, e para sua padronização, construiu-se curva padrão de diluição seriada utilizando quantidades de DNA equivalentes a 5×10^4 a 5×10^{-3} L (V.) *braziliensis* MHOM/BR/75/M2903 (Figura 1A). Em paralelo, uma curva padrão foi construída para detectar o gene GAPDH utilizando o DNA extraído de 0,4 mg de tecido esplênico diluído serialmente até o DNA correspondente a 4×10^{-6} mg de tecido (Figura 1B). Ambas as curvas de *melting* geradas após a reação de qPCR apresentaram pico único, demonstrando a especificidade dos iniciadores da PCR. Primeiro, as curvas padrão do kDNA e GAPDH foram utilizadas para verificar a eficiência de amplificação dos iniciadores da PCR escolhidos e, em seguida, ambas foram

amplificadas juntas a um grupo de amostras. Os resultados foram expressos como o número de parasitos por mg de tecido.

A carga parasitária do baço mostrou a presença do DNA do parasito *L. braziliensis* a partir da oitava semana de infecção, sendo equivalente a $34,68 \pm 37,25$ parasitos/mg de tecido, e permaneceu detectável até a 15ª semana, com $10,27 \pm 1,79$ parasitos/mg de tecido. Já no linfonodo, o DNA do parasito *L. braziliensis* foi detectado em todos os tempos avaliados, com alta carga parasitária, equivalente a $9141,26 \pm 6280,48$ parasitos/mg de tecido na segunda semana, $37587,57 \pm 30113,86$ parasitos/mg de tecido na oitava e $1716,95 \pm 645,74$ parasitos/mg de tecido na 15ª semana.

Seguindo a fisiopatogenia da leishmaniose, assim que as promastigotas são introduzidas na pele, ocorre fagocitose por macrófagos e células de Langerhans. Aquelas que se localizam dentro destas últimas são levadas aos linfonodos de drenagem, sendo apresentadas às células do sistema imune. Desse modo, espera-se alta carga parasitária nos tecidos linfonodais adjacentes ao sitio de inoculação desde o início da infecção. Já a visceralização da infecção parasitária para sítios distantes da inoculação, como o baço, só ocorre em fases mais avançadas do processo infeccioso.

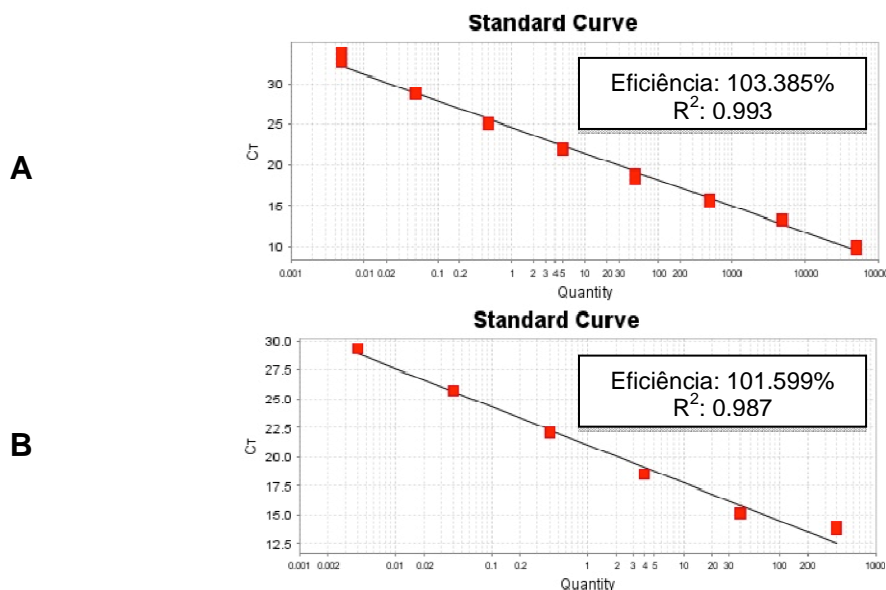


Figura 1 – Curvas padrão representativas da qPCR para detecção do kDNA de *Leishmania (Viannia)* (A) e do gene do GAPDH de hamster (B).

O tecido esplênico foi utilizado apenas para quantificação da carga parasitária e comprovação da visceralização da infecção, sendo o tecido linfonodal destinado ao estudo da expressão das citocinas.

A expressão gênica da IL-10 e IL-17 nas amostras de linfonodo poplíteo foi calculada por quantificação relativa (*relative quantification*, RQ) usando o método do Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$). Os valores encontrados foram expressos como o número de vezes em que houve alteração da fluorescência (*fold change*) em relação às amostras de linfonodo obtidas de hamsters não

infectados (Figura 2). Não foi possível detectar IFN- γ nas amostras testadas, e estão sendo feitas investigações para confirmar o resultado.

Na infecção por microrganismos intracelulares, a ativação das células Th2 leva ao agravamento desta, estando a IL-10 envolvida neste processo. A cronicidade da doença é estabelecida quando predomina a resposta imune tipo Th2, com alta expressão de IL-10, inativando os macrófagos. Estudos mostram que altos níveis de IL-10 são capazes de modular negativamente a produção de IL-17. No perfil encontrado, observa-se aumento inicial de ambas as citocinas, mostrando ativação da resposta imune. A diminuição da expressão após oito semanas de infecção pode ser explicada pela disseminação e visceralização da infecção e diminuição da atividade inflamatória linfonodal, ainda em equilíbrio. Após 15 semanas ocorre uma elevação da produção do RNAm da IL-10 e modulação negativa do RNAm da IL-17. Esses resultados são preliminares, os ensaios serão repetidos para garantir a robustez do estudo, e outras citocinas serão investigadas.

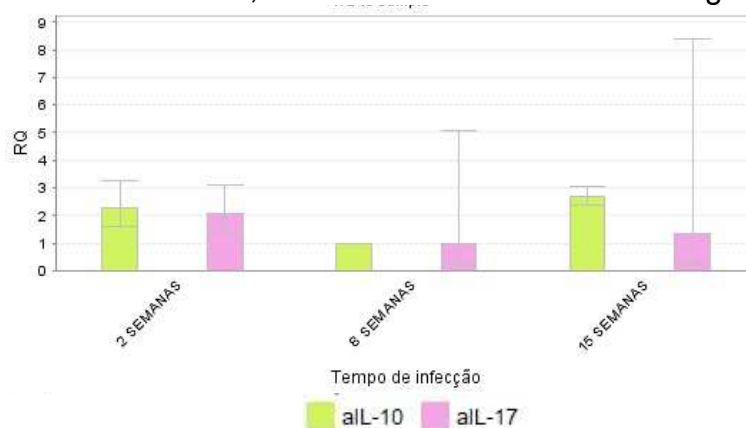


Figura 2 – Expressão gênica do RNAm das interleucinas IL-10 e IL-17 em linfonodos de hamsters infectados por *L. braziliensis* durante duas, oito e quinze semanas, comparada aos linfonodos de hamsters não infectados (calibrador, não mostrado no gráfico).

Conclusões

Os resultados são preliminares mas condizentes com a literatura, com a carga parasitária mostrando início da resposta imune no tecido linfonodal com visceralização subsequente. As citocinas apresentaram padrão que sugere predomínio de altos níveis de IL-10 com consequente modulação negativa de IL-17.

Agradecimentos

A Fundação Araucária pela concessão da Bolsa PIBIC.

Referências

OLIVEIRA W.N.; RIBEIRO L.E.; SCHRIEFFER A.; MACHADO P.; CARVALHO E.M.; BACELLAR O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine*. 2014; 66:127–32.