

PRODUÇÃO DE INTERLEUCINA-1 E OUTRAS CITOCINAS DA IMUNIDADE NATURAL INDUZIDAS POR AMASTIGOTAS DE *L. (V.) braziliensis* EM CULTURAS DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS

Clayson Moura GOMES, Milton Adriano Pelli de OLIVEIRA, Ledice Inácia de Araújo PEREIRA, Sebastião Alves PINTO, Fernanda Bugalho DUARTE, Miriam Leandro DORTA, Fátima RIBEIRO-DIAS

Departamento de Imunologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública Universidade Federal de Goiás.

1. Mestrando – claysonmoura@yahoo.com.br ; 2. Orientador - mapoliv@iptsp.ufg.br
PALAVRAS-CHAVE: Interleucina-1, Interleucina -10, Interleucina-6, *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

SUORTE FINANCEIRO: CNPq, FUNAPE, FAPEG

INTRODUÇÃO:

As Leishmanioses são zoonoses presentes nos quatro continentes, sendo consideradas endêmicas em 88 países. Aproximadamente 1 a 1,5 milhão de pessoas desenvolvem as formas tegumentares como a leishmaniose cutânea localizada, a difusa, a disseminada e a mucosa. (DESJEUX, 2004). No Brasil, a *L. (V.) braziliensis* é o principal agente causador da leishmaniose tegumentar, desencadeando principalmente a forma cutânea localizada, mas também a forma mucosa ou muco-cutânea da doença (HERWALDT 1999).

A infecção natural por leishmânia começa quando o inseto vetor inocula formas promastigotas infectantes na pele do hospedeiro, as quais são fagocitadas pelos neutrófilos recém chegados que sofrerão apoptose e serão fagocitados pelos macrófagos (LASKAY *et al.*, 2003), as células hospedeiras do parasito. Dentro do vacúolo fagocítico dos macrófagos, os protozoários transformam-se em amastigotas e multiplicam através de divisão binária simples. Depois de vários ciclos de divisão, são liberados como amastigotas devido à ruptura da célula hospedeira. As amastigotas emergentes serão novamente fagocitadas por macrófagos perpetuando a infecção no hospedeiro (HERWALDT, 1999).

A resposta imune inicial é extremamente importante para definir o padrão de resposta imune adquirida que será gerada contra o patógeno e para prover células hospedeiras ou microbicidas para os parasitos (VORONOV *et al.*, 2010). De uma

maneira geral, a indução de uma resposta imune inata que favoreça o perfil Th1 irá controlar o parasito e a não geração desta resposta imune promove a exacerbação da lesão (MCMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004; ROCHA *et al.*, 2007). Geralmente, a ausência da geração do perfil Th1 está relacionada à geração de outros perfis, como o Th2 e o Th17, ambos associados com exacerbação da doença em camundongos (MCMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004; PITTA *et al.*, 2009; NYLEN & GAUTAM, 2010). Como a geração dos diferentes perfis de resposta imune pode ser decisiva no controle dos parasitos, as leishmânias mais bem adaptadas ao hospedeiro devem induzir uma resposta imune que favoreça a sua sobrevivência. Assim, investigamos a produção de citocinas da imunidade inata induzidas por leishmânias isoladas de formas clínicas cutânea ou mucosa.

MATERIAL E MÉTODOS:

Formas amastigotas de leishmânias (três isolados de lesões cutâneas (JCJ8, RPL5, CSA7) e três de lesões mucosas (PPS6, ASL9, JBC8)) foram selecionadas aleatoriamente do estoque de parasitos do Leishbank (Banco de leishmânias da região Centro Oeste/UFG/Goiás) e mantidas em camundongos C57BL/6 desprovidos do gene para $INF\gamma$ (IFNgKO) como descrito anteriormente (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Após a lesão atingir 3mm, os animais foram sacrificados e as formas amastigotas foram purificadas das patas por gradiente de Percoll® (LANG *et al.*, 2005). Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram separadas a partir de sangue total de doadores saudáveis do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da UFG em gradiente de Ficol-Hypaque (Pharmingen). PBMCs foram cultivadas em RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino na quantidade de $1,5 \times 10^6$ células/ml na presença ou ausência de 3×10^5 formas amastigotas de *L. (V) braziliensis*. Após diferentes intervalos de tempo o sobrenadante da cultura foi colhido para avaliação das citocinas $IFN\gamma$, IL-17, $TNF\alpha$, IL-6, IL1 β , IL-10 e TGF β por ELISA. Alternativamente, as células foram lisadas para quantificação das citocinas por PCR em tempo real. Os resultados foram comparados quanto a significância dos mesmos pelo método de análise não paramétrica do Teste T student's pareado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Para promover uma infecção eficiente, os parasitos do gênero *Leishmania* devem ser internalizados por macrófagos e no interior destas células proliferarem na forma amastigotas. Estas são liberadas e novamente devem penetrar em novos

macrófagos para manter uma infecção eficiente (MCMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004). Ao reconhecer os parasitos, os macrófagos são capazes de produzir vários mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios, que por sua vez, vão interferir com a geração de uma resposta imune específica. Em nossos experimentos, foi observado que PBMCs humanas produzem mais IL-1 ($185\% \pm 39$), IL-10 ($67\% \pm 1$), IL-6 ($26\% \pm 19$) e TGF β (10,39 vezes) após o estímulo com amastigotas de *L. (V.) braziliensis in vitro*. Entretanto, formas amastigotas desta espécie não induzem a produção de IFN γ , TNF e IL-17. Parasitos isolados de lesões cutâneas ou mucosas induzem quantidades similares de IL-10 e IL-6, porém, a quantidade de IL-1 foi maior quando PBMCs eram cultivadas na presença de parasitos oriundos de lesões cutâneas. Esta maior produção de IL-1 foi observada principalmente em células estimuladas com os isolados JCJ8 (Figura 1 A,B e C) e CSA7 (Figura 1G e H), enquanto o isolado RPL5 induziu uma produção de IL-1 similar aos isolados de mucosa (Figura 1 D,E e F). Uma tendência dos isolados obtidos de lesões cutâneas induzirem mais IL-1 foi confirmada pelo método da PCR em tempo real (PBMCs estimuladas com amastigotas de lesão cutânea produziram $9,14 \pm 2,77$ vezes mais IL-1 β do que as PBMCs não estimuladas e quando estimuladas com amastigotas de lesão mucosa o aumento foi de $5,61 \pm 2,21$ vezes em relação ao não estimulado). O papel da IL-1 na leishmaniose tem sido explorado recentemente, mas continua pouco esclarecedor. Experimentos utilizando o modelo murino infectado por *L. major* sugerem que a IL-1 é importante para a ativação de uma resposta imune protetora do tipo Th1 (VON STEBUT, 2003), entretanto, animais deficientes em IL-1 possuem uma menor lesão e uma menor disseminação dos parasitos (VORONOV *et al.*, 2010). No modelo murino de leishmaniose e outros modelos, a IL-1 também se mostrou importante na geração de uma resposta Th2 ou Th17, ambas prejudiciais ao hospedeiro infectado (KOSTKA *et al.*, 2006; NYLEN & GAUTAM, 2010). A nossa hipótese é que uma baixa produção de IL-1 pode dificultar a formação de uma resposta imune adquirida eficiente, embora diminua a migração de células hospedeiras para o parasito. Desta forma, o parasito teria a possibilidade de sobreviver por mais tempo no hospedeiro de uma maneira silenciosa.

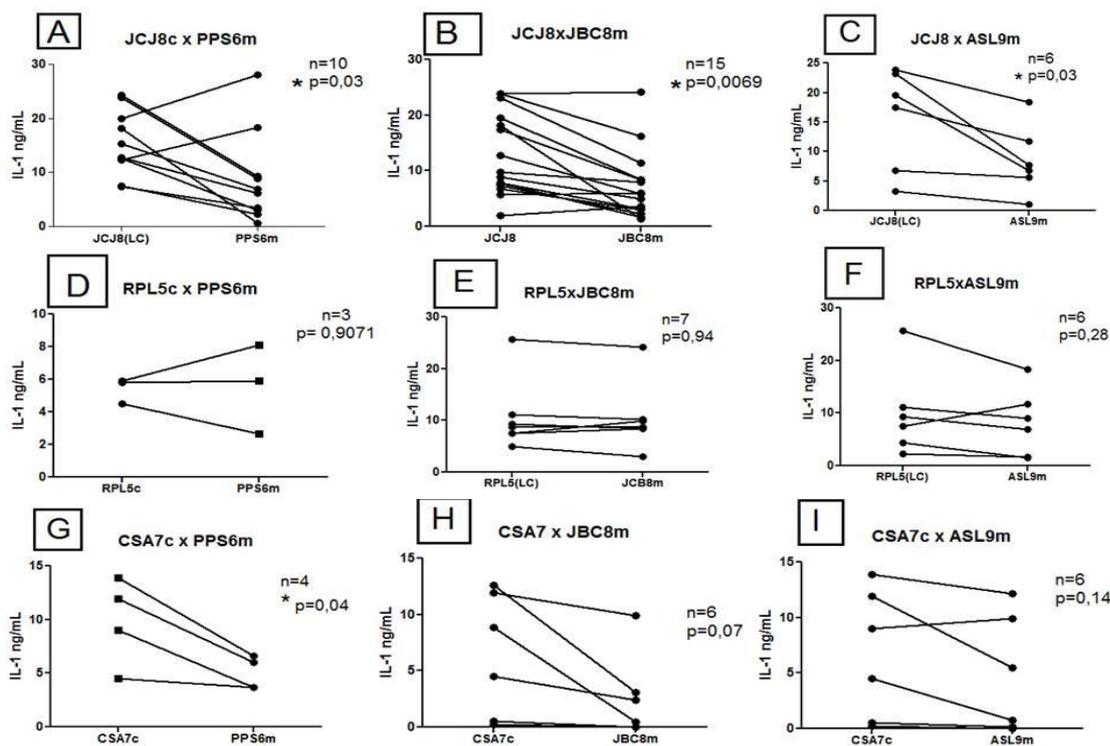


Figura 1. Quantidade de IL1 produzida (ng/mL) por PBMCs de doadores saudáveis estimuladas ou não com formas amastigotas de leishmânia oriundas de lesões cutâneas (JCJ8, RPL5 e CSA7) ou mucosa (PPS6, JBC8 e ASL9). Os círculos representam a produção de IL-1 no sobrenadante de cultura de PBMCs de cada doador. * indica a diferença estatística seguida do valor p (teste t de student's). n indica o número de doadores .

CONCLUSÃO:

Formas amastigotas de *L. braziliensis* oriundas de lesão cutânea induzem a produção de IL-1 em níveis mais altos que amastigotas obtidas de lesões mucosas.

REFERÊNCIAS:

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis** [S.l.], v. 27, n. 5, p. 305-18, Sep 2004.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet** [S.l.], v. 354, n. 9185, p. 1191-9, Oct 2 1999.

KOSTKA, S. L.; KNOP, J.; KONUR, A.; UDEY, M. C.&VON STEBUT, E. Distinct roles for IL-1 receptor type I signaling in early versus established *Leishmania major* infections. **J Invest Dermatol** [S.l.], v. 126, n. 7, p. 1582-9, Jul 2006.

LANG, T.; GOYARD, S.; LEBASTARD, M.&MILON, G. Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. **Cell Microbiol** [S.I.], v. 7, n. 3, p. 383-92, Mar 2005.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.&SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends Microbiol** [S.I.], v. 11, n. 5, p. 210-4, May 2003.

MCMAHON-PRATT, D.&ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunol Rev** [S.I.], v. 201, p. 206-24, Oct 2004.

NYLEN, S.&GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. **J Glob Infect Dis** [S.I.], v. 2, n. 2, p. 135-46, May 2010.

OLIVEIRA, M. A. P.; PIRES, A. S.; BASTOS, R. P.; LIMA, G. M. C. A.; PINTO, S. A.; PEREIRA, L. I. A.; PEREIRA, A. J. C. S.; ABRAHAMSOHN, I. A.; DORTA, M. L.&RIBEIRO-DIAS, F. *Leishmania spp.* parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo** [S.I.], v. 52, n. 2, p. 83-88, 2010.

PITTA, M. G.; ROMANO, A.; CABANTOUS, S.; HENRI, S.; HAMMAD, A.; KOURIBA, B.; ARGIRO, L.; EL KHEIR, M.; BUCHETON, B.; MARY, C.; EL-SAFI, S. H.&DESSEIN, A. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **J Clin Invest** [S.I.], v. 119, n. 8, p. 2379-87, Aug 2009.

ROCHA, F. J.; SCHLEICHER, U.; MATTNER, J.; ALBER, G.&BOGDAN, C. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. **Infect Immun** [S.I.], v. 75, n. 8, p. 3823-32, Aug 2007.

VON STEBUT, E. E., J. M.; BELKAID, Y.; KOSTKA, S. L.; MOLLE, K.; KNOP, J.; SUNDERKOTTER, C.; UDEY, M. C. I. . Interleukin 1alpha promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice. **Journal of Experimental Medicine** [S.I.], v. 198, n. 2, p. 191-9, 2003.

VORONOV, E.; DOTAN, S.; GAYVORONSKY, L.; WHITE, R. M.; COHEN, I.; KRELIN, Y.; BENCHETRIT, F.; ELKABETS, M.; HUSZAR, M.; EL-ON, J.&APTE, R. N. IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. **Int Immunol** [S.I.], v. 22, n. 4, p. 245-257, Feb 24 2010.