

## O PAPEL DÚBIO DOS NEUTRÓFILOS NA INFECÇÃO POR PARASITOS DO GÊNERO *Leishmania*: UMA BREVE DISCUSSÃO

Guilherme Malafaia<sup>1</sup>; Simone Aparecida Rezende<sup>2</sup>

### RESUMO

Este estudo trata do envolvimento dos neutrófilos, granulócitos polimorfonucleares, no estabelecimento da infecção pelos parasitos do gênero *Leishmania*. Embora tais leucócitos sejam considerados a primeira linha de defesa do sistema imune inato do organismo contra agentes patogênicos, estudos têm indicado a participação do mesmo como veículo de disseminação dos parasitos *Leishmania major* no organismo hospedeiro. Por outro lado, estudos envolvendo os parasitos *Leishmania donovani* e/ou *Leishmania infantum/chagasi* têm demonstrado o papel protetor destas células, contrariando a hipótese do "Cavalo de Tróia" postulada para o modelo de infecção por *Leishmania major*. Pretende-se, portanto, discutir brevemente, através de uma revisão sistemática da literatura, o papel dúbio dos neutrófilos na infecção por parasitos causadores das leishmanioses.

**Palavras-chave:** *Neutrófilos. Leishmania. Macrófagos. Parasitos Intracelulares. Imunidade Inata.*

### THE DUAL ROLE OF NEUTROPHILS IN THE INFECTION BY PARASITES OF *Leishmania* GENUS: A BRIEF DISCUSSION

### ABSTRACT

This study deals with the involvement of neutrophils, polymorphonuclear granulocytes, in the establishment of the infection by parasites of the *Leishmania* genus. Although such leukocytes are considered the first line of defense of the innate immune system against pathogenic agents, studies have shown their participation as means of dissemination of the parasites *Leishmania major* in host organism. On the other hand, studies involving the parasites *Leishmania donovani* and/or *Leishmania infantum/chagasi* have shown the protective role of these cells, contradicting the "Trojan Horse" hypothesis assumed for the *Leishmania major* infection model. It is intended, therefore, to discuss briefly, through a systematic revision of literature, the dual role of the neutrophils in the infection by parasites which cause leishmaniasis.

**Key words:** *Neutrophils. Leishmania. Macrophages. Intracellular Parasites. Innate Immunity.*

## INTRODUÇÃO

Conforme discutido recentemente por Nathan (1) e Laskay et al. (2), os neutrófilos são considerados a primeira linha de defesa do organismo contra agentes infecciosos, principalmente por fagocitarem e eliminarem os invasores que tentam penetrar e instalar uma infecção no organismo hospedeiro. Estima-se que cerca de 100 bilhões de neutrófilos circulem em um indivíduo de 70 kg

diariamente, número este que pode aumentar em aproximadamente dez vezes durante uma infecção aguda (3).

Morfologicamente os neutrófilos diferenciam-se dos outros polimorfonucleares por apresentarem um núcleo formado por dois a cinco lóbulos (multilobulado) ligados entre si por finas pontes de cromatina e pela presença de diversos tipos de grânulos espalhados no citoplasma. Esses grânulos diferem entre si de acordo com a cronologia do aparecimento

<sup>1</sup>Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Laboratório de Imunoparasitologia, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, MG.

<sup>2</sup>Professora Doutora do Departamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia, Laboratório de Imunoparasitologia, Universidade Federal de Ouro Preto, MG.

durante a maturação dessas células na medula óssea e com a composição química de cada tipo (4). Tais grânulos podem ser primários ou azurófilos, secundários ou específicos e grânulos terciários, os quais contêm enzimas, proteínas e glicosaminoglicanas que participam de muitas funções dos neutrófilos (5).

Estudos desenvolvidos durante a década de 1980, já demonstravam a importância dos neutrófilos na defesa orgânica, principalmente contra microrganismos. Portanto, a migração destas células para os tecidos agredidos é de crucial importância para a sobrevivência do indivíduo. Crianças com anormalidades na migração de neutrófilos apresentaram infecções repetitivas (6) e animais “depletados” experimentalmente de neutrófilos circulantes mostraram-se incapazes de combater bactérias gram-negativas presentes em seus pulmões (7).

Recentemente pesquisas têm relatado o envolvimento dos neutrófilos na infecção pelos parasitos do gênero *Leishmania* e a constatação da habilidade destes fagócitos em responderem de forma rápida eficiente a uma variedade de microrganismos patogênicos, sugerem que tais células podem ser um alvo inicial da infecção por *Leishmania*.

Estudos *in vitro* ou em modelos experimentais têm demonstrado que os neutrófilos podem sofrer morte celular programada e servirem de veículo para os parasitos *Leishmania*, permitindo a entrada silenciosa dos mesmos no organismo hospedeiro, assumindo um papel importante para o estabelecimento da infecção (2). Por outro lado, tem sido relatado que os neutrófilos contribuem para o desenvolvimento de uma imunidade protetora durante a infecção inicial por *Leishmania*, assumindo um papel contrário ao estabelecimento da infecção no organismo hospedeiro (8). Desta forma, este trabalho propõe uma breve discussão acerca dos aspectos mais relevantes e atuais sobre o papel dos neutrófilos na infecção pelos parasitos do gênero *Leishmania*.

## A INTERAÇÃO NEURÓFILO/LEISHMANIA

No que tange ao envolvimento dos neutrófilos na infecção por vários patógenos intracelulares, este está muito bem documentado na literatura. Embora a maioria

dos microrganismos seja eliminada prontamente pelos neutrófilos (1), alguns microrganismos patogênicos sobrevivem no ambiente hostil criado no interior dos neutrófilos, seja devido à mecanismos que os permitem escapar dos fagossomos, seja devido ao bloqueio da fusão do fagossomo com o lisossomo ou ainda, devido à capacidade de inibir a indução de um “burst” oxidativo.

A bactéria *Anaplasma phagocytophilum*, por exemplo, causadora da ehrlichiose granulocytic humana (ELE) infecta primeiramente os neutrófilos e para a manutenção de sua sobrevivência nesses granulócitos, inibe a fusão fagossoma/lisossoma e a geração de radicais livres de oxigênio (ROS) nessas células (9,10). A capacidade de sobreviver no interior dos neutrófilos também tem sido relatada em vários outros patógenos, conforme discutido no estudo de revisão realizado por Laskay et al. (11). Nesse estudo, os autores apresentam diversos trabalhos que demonstraram que os patógenos *Salmonella typhi*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium leprae*, *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica*, *Haemophilus somnus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella typhimurium*, *Legionella pneumophila*, *Haemophilus somnus*, *Histoplasma capsulatum*, *Burkholderia pseudomallei*, entre outros, são capazes de sobreviverem no interior dos neutrófilos.

No que tange ao papel dos neutrófilos na infecção por *Leishmania*, esse tem sido investigado principalmente em estudos envolvendo modelos experimentais de leishmaniose cutânea (LC), uma variedade de leishmaniose que de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (12), apresenta uma incidência mundial de 1 a 1,5 milhões de casos. Estudos em modelos experimentais demonstraram que em pouco tempo após a reação inflamatória na pele dos animais inoculados com *L. major*, observa-se uma intensidade considerável de neutrófilos no local da lesão, como por exemplo, no estudo recente desenvolvido por Perters et al. (13). Nesse estudo, os autores utilizando-se de uma avançada tecnologia de captação de imagens, registraram em tempo real, a migração e a acumulação rápida de neutrófilos no sítio da picada do mosquito *Phlebotomus duboscqi* (infectado com *L. major*) em camundongos C57BL/6, bem como, a interação dos neutrófilos com os macrófagos residenciais.

Conforme muito bem comentado por John & Hunter (14) e apresentado na Figura 1, a resposta imune aos parasitos oriundos da picada do mosquito vetor nos animais estudados por Peters et al. (13), inclui um rápido influxo de neutrófilos no local da lesão e posterior fagocitose dos parasitos *L. major* ali presentes. Após sofrerem apoptose, os neutrófilos são fagocitados pelos macrófagos

recrutados via secreção das quimiocinas MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  (11). Ao fagocitar corpos apoptóticos, os macrófagos têm suas funções microbicidas silenciadas (15,16), representando uma importante via de evasão da resposta imune e consequente estabelecimento da infecção pelo parasito *L. major*.

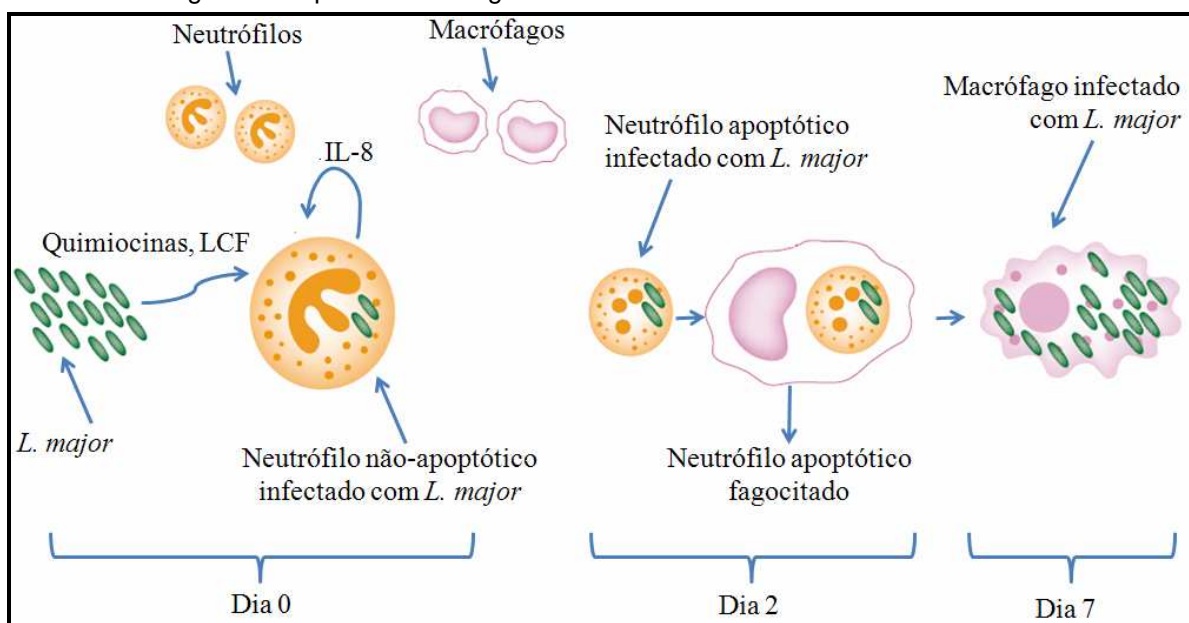


Figura 1 – A hipótese do "Cavalo de Tróia" para o modelo de infecção para *L. major*.  
Fonte: Modificada de Laskay et al. (11).

Com relação ao recrutamento dos neutrófilos para o local de infecção, esse tem sido associado aos altos níveis de quimiocina MIP-2 e KC (homóloga de IL-8 em murinos) produzidas pelas células residentes (17) induzidos pelos parasitos *Leishmania*. Laufs et al. (18) demonstraram que a incubação in vitro de neutrófilos humano em presença de *L. major* resultou, também, em secreção elevada de IL-8. Esses dados sugerem que o recrutamento de neutrófilos pode ser importante para o parasito durante a infecção in vivo.

Já van Zandbergen et al. (19) demonstraram que promastigotas de *Leishmania* são capazes de induzir e recrutar ativamente a migração de neutrófilos humanos por meio da liberação de um fator quimiotático (LCF). Este fator quimiotático possui atividade no recrutamento de neutrófilos, sem agir nos outros leucócitos e nas células natural killers (NK), sugerindo, portanto, que o recrutamento inicial dos neutrófilos ocorra por meio do LCF, e que a IL-8 induzida pelo parasito funcione

como uma alça de amplificação do recrutamento dos neutrófilos para o sítio inflamatório. Além disso, van Zandbergen et al. (19) demonstraram que ocorre uma diminuição nos níveis de IP-10 nos neutrófilos incubados com promastigotas de *Leishmania*. IP-10 é uma quimiocina da classe CXC, produzida por polimorfonucleares, com atividade de recrutar e ativar células NK e linfócitos do tipo Th1 para o local da reação inflamatória, auxiliando, assim, no estabelecimento de uma resposta imune eficiente contra patógenos intracelulares. Ao diminuir a produção desta quimiocina, acredita-se que o parasito evite a formação de uma resposta imune eficiente, facilitando o estabelecimento da infecção.

Como foi possível perceber, os dados apresentados até aqui corroboram com a hipótese do "Cavalo de Tróia" para o modelo de infecção por *L. major*, a qual postula que a tomada de neutrófilos infectados é um mecanismo importante para a entrada "silenciosa" dos parasitos nos macrófagos, suas células hospedeiras definitivas. Contudo, nem todos os aspectos relacionados ao

envolvimento dos neutrófilos na infecção pelos parasitos *Leishmania* estão totalmente elucidados.

Estudos com linhagens de camundongos resistentes à infecção por *L. major* (C57BL/6 e C3H/HeJ), nos quais é induzida uma depleção dos neutrófilos por injeções de anticorpos monoclonais no momento da inoculação dos parasitos ou na primeira semana de infecção, que bloqueiam os neutrófilos (NIMP-R14) ou os neutrófilos juntamente com os eosinófilos (RB6-8C5), têm demonstrado um aumento na carga parasitária no sítio de infecção desses animais (20-22), revelando um papel protetor dos neutrófilos nas linhagens *L. major*/resistentes de camundongos nas primeiras semanas de infecção. Em contraste, no modelo experimental *L. major*/susceptível (BALB/c), a ausência dos neutrófilos durante a primeira semana de infecção tem um efeito oposto, reduzindo significativamente o número de parasitos nos linfonodos drenantes e no sítio de infecção (23). Em adição, a ausência dos neutrófilos durante a primeira semana de infecção modifica o desenvolvimento da resposta imune levando a uma menor produção da IL-4 e maior produção de IFN- $\gamma$ , fato esse, que pode estar diretamente relacionado à diminuição da carga parasitária nesses animais (23).

Com relação ao papel dos neutrófilos nas infecções pelos parasitos causadores da leishmaniose visceral (LV) (a variante mais grave das leishmanioses), também permanece pouco compreendido. Conforme demonstrado em um dos estudos pioneiros nesta área, desenvolvido por Pearson & Steigbigel (24) e mais recentemente por Rousseay et al. (25) e Carter et al. (26), os neutrófilos, in vivo, são capazes de fagocitar e albergar os parasitos *L. donovani* e *L. chagasi/infantum*. Em modelos experimentais de LV a depleção dos neutrófilos, ou a depleção simultânea dos neutrófilos e dos eosinófilos durante a primeira semana de infecção, não altera a eliminação dos parasitos no fígado, mas induz a um aumento significativo da carga parasitária esplênica (25,27).

Sobre esse aspecto, destaca-se o recente estudo de McFarlane et al. (8), no qual os autores ao estudarem o papel dos neutrófilos no desenvolvimento de uma resposta imune contra a infecção por *L. donovani* em camundongos BALB/c, demonstraram a importância dos neutrófilos como células efetoras no sítio da infecção, contribuindo ativamente com a eliminação dos

parasitos inoculados. Quando camundongos infectados com *L. donovani* tiveram seus neutrófilos seletivamente depletados com o anticorpo monoclonal NIMP-R14, os animais apresentaram um aumento significativo do número de parasitos no baço e na medula óssea. A susceptibilidade aumentada foi associada com a presença de esplenomegalia, falhas na maturação de granulomas hepáticos e uma redução na indução da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) pelos granulomas hepáticos. No baço, a depleção dos neutrófilos foi associada a um aumento significativo das citocinas IL-4 e IL-10, bem como, à reduzida secreção de IFN- $\gamma$  pelas células TCD4+ e TCD8+. Os autores sugerem que os neutrófilos possuem um papel crítico no desenvolvimento de uma resposta imune protetora contra o parasito *L. donovani*, influenciando diretamente o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1. Entretanto, poucos estudos foram desenvolvidos a fim de investigar o papel dos neutrófilos no desenvolvimento de uma resposta imune contra a infecção pelos causadores da leishmaniose visceral.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora alguns mecanismos relacionados ao envolvimento existente entre os neutrófilos e os parasitos do gênero *Leishmania* tenham sido recentemente elucidados, estudos ainda necessitam de serem realizados. Há necessidade de compreender melhor o papel dos neutrófilos nos modelos experimentais de resistência e susceptibilidade à infecção por *L. major*, bem como, de que forma a hipótese do "Cavalo de Tróia" no modelo de infecção por *L. major* contribui para o estabelecimento da infecção no organismo hospedeiro e o seu envolvimento com a resposta imune adaptativa. Além disso, há de se investigar o papel dos neutrófilos na infecção por diferentes espécies de parasitos *Leishmania*, pois como foi possível observar neste estudo, parece que os neutrófilos têm um papel protetor contra a infecção por parasitos causadores da LV, diferentemente das evidências observadas nos estudos de LC, onde tais granulócitos têm sido considerados veículos de disseminação dos parasitos *Leishmania* no organismo hospedeiro. A avaliação do papel dos neutrófilos em etapas mais tardias na infecção tem sido pouco explorada.

Diante da constatação do

envolvimento dos neutrófilos na infecção por vários patógenos intracelulares obrigatórios ou facultativos, das funções atribuídas a este granulócito no sistema imunológico, e da constatação de que seu papel na infecção por *Leishmania* ainda é pouco compreendido, é possível que existam muitos outros aspectos influentes na interface “parasito-hospedeiro”.

Nesse sentido, os estudos envolvendo a presente temática são importantes, pois podem ajudar na superação de muitos desafios pertinentes às leishmanioses e até mesmo na instituição de medidas preventivas e terapêuticas precoces.

Guilherme Malafaia

Simone Aparecida Rezende

Rua Vereador Paulo Elias, n. 8A.

Vila Itacolomy, CEP: 35400-000.

Ouro Preto, MG.

E-mail: [guilherme@nupeb.ufop.br](mailto:guilherme@nupeb.ufop.br)

Recebido em 08/04/09

Revisado em 09/05/09

Aceito em 24/06/09

## REFERÊNCIAS

- (1) NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 6, p. 173-182, 2006.
- (2) LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, New York, v. 213, n. 3/4, p. 183-191, 2008.
- (3) LEE, A.; WHYTE, M. K.; HASLETT, C. Inhibition of apoptosis e prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. **Journal of Leukocyte Biology**, Denver, v. 54, n. 4, p. 283-285, 1993.
- (4) BORREGAARD, N.; COWLE, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, Washington, v. 15, n. 89, p. 3503-21, 1997.
- (5) HELLEWELL, P. G.; WILLIAMS, T. J. The neutrophil. IN: **Immunopharmacology of neutrophils**. New York: Academic Press, 1994.
- (6) BEATTY, P. G.; HARLAN, J. M.; ROSEN, J. M.; et al. Absence of monoclonal antibody defined protein complex in a boy with abnormal leukocyte function. **Lancet**, v. 10, n. 1, p. 535-7, 1984.
- (7) REHM, S. R.; GROSS, G. N.; PIERCE, A. K. Early bacterial clearance from murine lungs: species-dependent phagocyte response. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 66, n. 2, p. 194-9, 1980.
- (8) MCFARLANE, E.; PEREZ, C.; CHARMOY, M.; et al. neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 76, n. 2, p. 532-541, 2008.
- (9) DUMLER, J. S.; CHOI, K. S.; GARCIA-GARCIA, J. C.; et al. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. **Emerging Infectious Diseases**, Miami, v. 11, n. 12, p. 1828-1834, 2005.
- (10) CARLYON, J. A., FIKRIG, E. Mechanisms of evasion of neutrophil killing by *Anaplasma phagocytophilum*. **Current Opinion in Hematology**, Paris, v. 13, n. 1, p. 28-33, 2006.
- (11) LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes: trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **TRENDS in Microbiology**, London, v. 11, n. 5, p. 210-214, 2003.
- (12) ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Program for the surveillance and control of leishmaniasis**. World Health Organization, Geneva, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>>. Acesso em: 20 fev. 2008.
- (13) PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N. S.; et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, Washington, v. 321, n. 5891, p. 971-974, 2008.
- (14) JOHN, B.; HUNTER, C. A. Neutrophil soldiers or trojan horses? **Science**, Washington, v. 321, n. 5891, p. 917-918, 2008.

- (15) MEAGHER, L. C.; SAVILL, J. S.; BAKER, A.; et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2. **Journal of Leukocyte Biology**, Denver, v. 52, n. 3, p. 269-273, 1992.
- (16) SUN, E. W.; SHI, Y.F. Apoptosis: the quiet death silences the immune system. **Pharmacology & Therapeutics**, Kansas, v. 92, n. 2/3, p. 135-145, 2001.
- (17) MULLER, K.; VAN ZANDBERGEN, G.; HANSEN, B.; et al. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 190, n. 1/2, p. 73-76, 2001.
- (18) LAUFS, H.; MULLER, K.; FLEISCHERM J.; et al. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 2, p. 826-835, 2002.
- (19) VAN ZANDBERGEN, G.; HERMANN, N.; LAUFS, H.; et al. *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**, Washington, v. 70, n. 8, p. 4177-4184, 2002.
- (20) LIMA, G.M.; VALLOCHI, A.L.; SILVA, U.R.; et al. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous *Leishmaniasis*. **Immunology Letters**, Berlin, v. 64, n. 2/3, p. 145-151, 1998.
- (21) CHEN, L.; ZHANG, Z. H.; WATANABE, T.; et al. The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. **Parasitology International**, Bangkok, v. 54, n. 2, p. 109-118, 2005.
- (22) RIBEIRO-GOMES, F. L.; OTERO, A. C.; GOMES, N. A.; et al. A. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 172, n. 7, p. 4454-4462, 2004.
- (23) TACCHINI-COTTIER, F.; ZWEIFEL, C.; BELKAID, Y.; et al. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4- Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 165, p. 2628-2636, 2000.
- (24) PEARSON, R. D.; STEIGBIGEL, R. T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 127, n. 4, p. 1438-1443, 1981.
- (25) ROUSSEAU, D.; DEMARTINO, S.; FERRUA, B.; et al. In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. **BMC Microbiology**, Nottingham, v. 1, p. 17, 2001.
- (26) CARTER, K. C.; SUNDAR, S.; SPICKETT, C.; et al. The in vivo susceptibility of *Leishmania donovani* to sodium stibogluconate is drug specific and can be reversed by inhibiting glutathione biosynthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Boston, v. 47, n. 5, p. 1529-1535, 2003.
- (27) SMELT, S. C.; COTTERELL, S. E.; ENGWERDA, R. C.; et al. B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 164, p. 3681-3688, 2000.