



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – PIBIC

**Papel do TREM-1 na modulação da resposta microbicida de neutrófilos infectados
com *L. infantum***

Área do conhecimento: Ciências Biológicas
Subárea do conhecimento: Imunologia
Especialidade do conhecimento: Imunologia Celular

Relatório Final
Período da bolsa: de agosto de 2017 a julho de 2018

Este projeto é desenvolvido com bolsa de iniciação científica

PIBIC/CNPq

Orientador: D^{ra} Tatiana Rodrigues de Moura
Autor: Karin Yasmin Santos Fonsêca



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	2
2.	OBJETIVOS.....	4
3.	METODOLOGIA.....	5
3.1.	Meio de cultivo de <i>L. infantum</i>	5
3.2.	Parasitas.....	5
3.3.	Marcação dos parasitos.....	6
3.4.	Separação e cultura de neutrófilos.....	6
3.5.	Exposição de neutrófilos à <i>L. infantum</i> na presença do inibidor da via de TREM-1.....	7
3.6.	Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....	8
3.7.	Viabilidade dos parasitos.....	8
3.8.	Detecção de TREM-1 de superfície.....	8
3.9.	Análise dos dados de citometria de fluxo.....	9
3.10.	Expressão gênica.....	10
3.11.	Análise Estatística.....	10
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	11
5.	CONCLUSÕES.....	17
6.	PERSPECTIVAS.....	17
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
8.	OUTRAS ATIVIDADES.....	20



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

1

RESUMO

Leishmaniose visceral (LV) é uma doença tropical negligenciada, fatal se não tratada precocemente. O controle da infecção por *L. infantum* é mediado pela ativação de mecanismos microbicidas de neutrófilos e macrófagos. O TREM-1, receptor de superfície celular expresso em neutrófilos e monócitos, amplifica e regula a resposta inflamatória, na imunidade inata. A forma solúvel do TREM-1 (sTREM-1) está elevada no soro de pacientes com doenças inflamatórias infecciosas e não-infecciosas, e, recentemente, foi correlacionado a gravidade na LV. O objetivo do trabalho foi avaliar o papel do TREM-1 na modulação da resposta microbicida de neutrófilos infectados com *L. infantum*. Neutrófilos obtidos do sangue periféricos foram expostos à *L. infantum* na presença do peptídeo LP17, um inibidor do TREM-1. Por citometria de fluxo, foram avaliadas as taxas de infecção, produção de ROS e expressão de TREM-1 em neutrófilos expostos a *L. infantum*. Além disso, foram avaliadas a expressão gênica de TREM-1 e IL-8 e carga parasitária em neutrófilos expostos a *L. infantum*. A expressão de TREM-1 em neutrófilos infectados não foi diferente entre os grupos tratados ou não com inibidor. A inibição do TREM-1 aumentou a carga parasitária ($p=0,0221$) e reduziu em aproximadamente 23% a produção de ROS. A inibição de TREM-1 reduziu a expressão gênica de TREM-1 em 34,61% e de IL-8 em 37,88%. Os resultados sugerem que a via do TREM-1 em neutrófilos é importante para o controle da infecção por *L. infantum*.

PALAVRAS-CHAVE: Leishmaniose Visceral, Neutrófilos, TREM-1 e LP17.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

2

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral, com elevada incidência e letalidade, principalmente em indivíduos não tratados, crianças desnutridas e portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), torna-se uma das mais importantes doenças da atualidade (BRASIL, 2014). Essa enfermidade apresenta evolução crônica e quadro clínico caracterizado por febre irregular de intensidade média e longa duração, hepatomegalia, esplenomegalia, acompanhada dos sinais biológicos de anemia, leucopenia, trombocitopenia e hipoalbuminemia (NEVES, 2016).

Em Sergipe de 2010 a 2015 foram notificados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação um total de 370 casos de Leishmaniose Visceral, gerando uma média de mais de 61 casos por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE. BRASIL., 2016). Além disso, o número de casos de Leishmaniose Visceral Humana e a frequência de cães soro positivos, principal reservatório do agente etiológico, aumentaram entre os anos de 2008 e 2014 em Sergipe (CAMPOS et al., 2017).

Os agentes etiológicos dessa enfermidade são protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*. Na América do Sul a espécie responsável pelas manifestações clínicas é a *L. chagasi*, que alguns autores também consideram como sinônimo chamar de *L. infantum* (NEVES, 2016), pois estudos têm demonstrado pertencerem à mesma espécie (STEVERDING, 2017). Esse protozoário é unicelular e heteróxico, transmitidos pelas fêmeas dos insetos vetores denominados flebotomíneos, sendo a principal espécie brasileira *Lutzomyia longipalpis* (BRASIL, 2014). Seu ciclo é caracterizado pela inoculação das formas promastigotas, durante o repasto sanguíneo do vetor, e geração de uma resposta inflamatória que cursa com recrutamento de células do sistema fagocitário. Essas formas são fagocitadas e como mecanismos de escape, a *Leishmania spp.* se modifica para a forma amastigota que resistem à ação de vacúolos e se multiplicam. A continuação do ciclo



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

3

acontece quando durante a alimentação, o flebotômíneo ingere parasitos, que no seu trato digestivo se diferenciam em promastigotas. Esses parasitos migram para glândula salivar e se diferenciam em metacíclicos, forma mais infectante, e durante o repasto sanguíneo são inoculados com a saliva na derme do hospedeiro vertebrado, completando o ciclo (SACKS; KAMHAWI, 2001).

Estudos recentes apresentam uma nova compreensão da resposta imune à doença, indicando que a sua progressão depende de interações mais complexas que a estabelecida entre células Th1 (T helper 1) e Th2 (T helper 2). Como modulador importante da imunidade adaptativa contra os parasitos, as células Th17 atuam principalmente no recrutamento de neutrófilos e possuem um duplo papel no local de infecção. A interação entre a resposta Th17 e os neutrófilos vem sendo apontada como crucial componente na resposta imune anti-*Leishmania* (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017).

Neutrófilos são células da imunidade inata que operam como primeira linha de defesa e possuem um importante papel na eliminação dos patógenos. Em 2000, foi descrito um nova família de receptores, denominada TREM (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells) que participa de diversos processos celulares, como inflamação, coagulação e homeostase óssea. Dentro desta família, o receptor TREM-1, foi o primeiro a ser identificado, e possui importante expressão nos neutrófilos. Esse receptor por meio de sua via de sinalização associa-se à molécula adaptadora DAP12 promove uma ação pró-inflamatória, através de mecanismos como a secreção das citocinas IL-8 e TNF- α (BOUCHON; DIETRICH; COLONNA, 2000). Acreditava-se que o TREM-1 expressava-se somente em neutrófilos e monócitos, mas descobertas recentes atribuem esse receptor a células do parênquima como células epiteliais das vias aéreas (RIGO et al., 2012). Além disso, embora nenhum ligante específico (endógeno) tenha sido descoberto, TREM-1 parece ser ativado por inúmeros PAMPs, agindo em sinergia com outros receptores de reconhecimento de padrão como TLR e NLR (ARTS et al., 2013; TAMMARO et al., 2017).



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

4

Além da forma de receptor ligado a membrana, o TREM-1 apresenta-se também como proteína solúvel denominada sTREM-1, que parece possuir uma resposta moduladora negativa para inflamação (GIBOT et al., 2004). Para formação dessa proteína foram propostas duas alternativas: splicing alternativo e posterior liberação (BARUAH et al., 2015) e clivagem do receptor de membrana por metaloproteinases (GÓMEZ-PIÑA et al., 2007). Inúmeras pesquisas apontam também para o possível papel do sTREM-1 como biomarcador de doenças inflamatórias infecciosas e não infecciosas (CAO; GU; ZHANG, 2017; WU et al., 2012), além de indicadores de severidade de determinadas enfermidades, como a própria leishmaniose visceral humana (BOMFIM et al., 2017).

Com o objetivo de diminuir a resposta inflamatória, trabalhos investiram na investigação de peptídeos baseados na mecânica inflamatória desenvolvida pelo receptor TREM-1. Um deles foi criado através da sequência encontrado no ectodomínio do TREM-1 de humanos e camundongos, adequadamente mimetizando o sTREM-1. Esse peptídeo, denominado LP17, foi capaz de diminuir a resposta inflamatória em monócitos, induzida por LPS e agonistas do receptor (GIBOT et al., 2004) e em neutrófilos (BOSTANCI et al., 2013; MOHAMADZADEH et al., 2006).

Por fim, a expressiva prevalência de pacientes com leishmaniose visceral humana no estado de Sergipe, novas descobertas que desmascaram a imunopatogênese dessa doença e a associam a elevadas concentrações de sTREM-1 em pacientes graves (BOMFIM et al., 2017), demonstram a necessidade de mais estudos para esse tema. Dessa forma, esse trabalho objetiva avaliar a atuação do inibidor da via de TREM-1 na infecção de neutrófilos pela *L. infantum*.

2. OBJETIVOS

GERAL



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

5

- Avaliar o papel do TREM-1 na modulação da resposta microbicida de neutrófilos infectados com *L. infantum*.

ESPECÍFICOS

- Avaliar a infecção de neutrófilos por *L. infantum* na presença do inibidor da via do TREM-1.
- Avaliar a expressão de TREM-1 de superfície em neutrófilos infectados por *L. infantum* na presença do inibidor da via do TREM-1.
- Quantificar o RNAm de TREM-1 e IL-8 em neutrófilos infectados por *L. infantum* na presença do inibidor da via do TREM-1.
- Mensurar os níveis de superóxido em neutrófilos infectados por *L. infantum* na presença do inibidor da via do TREM-1.

3. METODOLOGIA OU DESCRIÇÃO TÉCNICA

3.1. Meio de cultivo de *L. infantum*

O meio Schneider (Sigma®) foi utilizado para o cultivo dos parasitos. Quando dito completo, consiste no meio Schneider® suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Ambion®) e antibiótico Penicilina (100 µg/mL).

3.2. Parasitos

A cepa do parasito *L. infantum* utilizada neste estudo foi a LVHSE 49, isolada de um paciente com Leishmaniose Visceral. Os parasitos congelados foram retirados do ultrafreezer (Revco®) e descongelados a temperatura ambiente (24°C), e em seguida foram



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

6

transferidos para um tubo contendo 10 mL de solução salina a 4°C, que foi duas vezes centrifugado a 3000 rpm / 4°C por 10 minutos para obtenção dos parasitos viáveis. Em seguida os parasitos foram ressuspensos em uma garrafa de cultura contendo 3 mL de Schneider completo que foi armazenada na estufa B.O.D. a temperatura de 24°C. Após cerca de 3 a 7 dias os parasitos foram transferidos para uma nova garrafa de cultura, em uma quantidade de 1×10^5 promastigotas/mL no meio Schneider completo, e mantidos na estufa B.O.D. Contagens diárias foram realizadas para o acompanhamento do crescimento dos parasitos através da câmara de Neubauer. As contagens visam observar as fases de crescimento logarítmico, em que há maior atividade metabólica do isolado; e de crescimento estacionário, em que há maior quantidade das formas promastigotas metacíclicas, que são mais infectantes, sendo assim, as que foram utilizadas para a infecção dos neutrófilos.

3.3. Marcação dos parasitos

Para os experimentos de citometria de fluxo, os parasitos foram marcados previamente com a sonda CellTracker™ Violeta BMQC (Life Technologies) conforme descrito por (DAGLEY et al., 2015). Resumidamente, os parasitos foram ressuspensos em 1 mL de RPMI puro contendo 5 μ M de CellTracker™ e incubados durante 30 minutos / 27°C. Em seguida os parasitos foram centrifugados a 3000 rpm / 10 minutos / 4°C, ressuspensos em RPMI completo (suplementado com 10% de soro bovino fetal) e incubados novamente durante 30 minutos / 27°C. Após esse período as células foram ressuspensas em PBS, centrifugadas à 3000 rpm por 10 minutos a 4°C com a finalidade de remover a sonda não internalizada.

A marcação dos parasitos com o CellTracker™ permite a identificação das populações de neutrófilos que estão infectados ou não com *Leishmania*. Esta sonda atravessa livremente através da membrana das células. Após a conversão, a sonda se torna



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

7

fluorescente, ficando retida nas células vivas através de várias gerações, onde são transferidas para células filhas.

3.4. Separação e cultura de neutrófilos

Os neutrófilos foram isolados por centrifugação utilizando meio Polymorphprep, segundo as instruções do fabricante (Axis-Shield, Oslo, Noruega) por 40 minutos a 1300 rpm / 25°C, sem aceleração e freio. Após a centrifugação, duas bandas foram detectáveis: a primeira constituída de células mononucleares e a segunda banda enriquecida por polimorfonucleares (PMN), caracteristicamente neutrófilos (aproximadamente 94% de pureza). Os neutrófilos foram recolhidos e lavados três vezes com salina a 4°C / 1300 rpm por 10 minutos. Em seguida foi realizada a contagem das células em câmara Neubauer e posterior suspensão em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Carsbad, CA, USA) suplementado com 1% de nutridoma e 1% de ampicilina. Os neutrófilos foram plaqueados na quantidade de 5×10^5 por poço, em placa de 96 poços. Para os experimentos que avaliaram a viabilidade dos parasitos, cada condição foi realizada em triplicata. Além disso, um poço extra de cada condição foi adicionado e posteriormente armazenado em Trizol para futura extração de RNA.

3.5. Exposição de neutrófilos à *L. infantum* na presença do inibidor da via de TREM-1

Os neutrófilos foram expostos a promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária na proporção de 5:1 (Leishmania:neutrófilo) durante 30 minutos e 3 horas de incubação a 37°C e 5% CO₂. Junto à exposição, os neutrófilos foram dispostos em duas condições: presença do inibidor da via de TREM-1 (LP17 - 100 ng/mL) e presença de um peptídeo



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

8

controle, contendo os mesmos aminoácidos do LP17 em uma sequência diferente. Os dados para a síntese dos peptídeos foram obtidos com base no trabalho de Gibot *et al.* (2004).

3.6. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

A geração intracelular de peróxido de hidrogênio foi detectada utilizando a sonda DCFH-DA (Sigma-Aldrich). Esta sonda é célula-permeável e ao ser hidrolisada intracelularmente resulta na formação de um produto fluorescente que pode ser detectado por citometria de fluxo. Deste modo, após 30 minutos de exposição a *L. infantum* a placa foi centrifugada para lavagem das células com PBS e remoção dos parasitos não internalizados (1500 rpm / 4°C durante 10 minutos). Em seguida ocorreu a incubação das células com a sonda DCFH-DA (25 µM) na ausência de luz, por 30 minutos / 37°C / 5% CO₂. Após a incubação, a placa foi centrifugada novamente para remoção da sonda não internalizada e posteriormente as células foram ressuspensas em PBS (200 µL/poço) para realização da leitura por citometria de fluxo utilizando o aparelho FACSCANTO II.

3.7. Viabilidade dos parasitos

Após 3 horas de infecção, a placa de cultura foi centrifugada a 1500 rpm / 4°C por 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi transferido para outra placa e armazenado no freezer -20°C, para posterior dosagem de sTREM-1, e ao pellet contendo as células sedimentadas, foi adicionado 200 µL do meio Schneider completo. Após 24 h foi realizada a contagem de parasitos viáveis por microscopia óptica.

3.8. Detecção de TREM-1 de superfície



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

9

Após o tempo de exposição, a placa foi centrifugada para lavagem das células com PBS e remoção dos parasitos não internalizados (1500 rpm / 4°C por 10 minutos). Em seguida realizou-se a incubação das células com soro Fc Block (solução bloqueio - 2% de soro fetal de cabra, 2% de soro bovino fetal) na ausência de luz, durante 30 minutos a 4°C. Este soro serve para bloquear ligações inespecíficas e aumentar a especificidade do teste. Em seguida as células foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo de superfície TREM-1-PE (Biolegend®) na ausência de luz a 4°C por 30 minutos. Posteriormente as células foram lavadas novamente e ressuspensas em PBS para realização da leitura por citometria de fluxo, utilizando o aparelho BD FACSCANTO II.

3.9. Análise dos dados de citometria de fluxo

Os experimentos de citometria de fluxo, expressão na superfície celular de TREM-1 e produção de ROS, foram lidos no aparelho FACSCANTO II, utilizando o software FACSDIVA (BD Biosciences) para a aquisição de trinta mil eventos por amostra. A análise dos resultados foi feita no programa FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA). A definição da população de neutrófilos foi feita a partir da criação de uma região em gráfico do tipo dot plot baseado no tamanho no eixo “x” (FSC: forward scatter) versus granulosidade das células (SSC: side-scatter) no eixo “y”, e dentro desta população de neutrófilos foram realizadas análises para avaliar a frequência total de neutrófilos infectados, a frequência total de neutrófilos TREM-1+ e a frequência total de neutrófilos ROS+. Além disso, foram criadas subpopulações (infectados: Leish+ e não infectados: Leish-) para avaliar onde ocorria a maior e menor expressão de TREM-1. Finalmente, foi avaliada a mediana da intensidade de fluorescência, a fim de avaliar a intensidade de brilho das células (MFI), visto que, esta medida está proporcionalmente associada à maior expressão de moléculas na superfície celular. A fim de integrar as medidas de avaliação de frequência e de MFI, empregou-se também a intensidade de fluorescência integrada (iMFI), que é obtida através



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

10

da multiplicação da frequência de células pela intensidade média de fluorescência: **iMFI= frequência de células X MFI.**

3.10. Expressão gênica

A expressão gênica é um procedimento que pode ser dividido em três etapas: extração de RNA, síntese de DNA complementar (cDNA) e PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR). A primeira etapa ocorreu após o tempo de infecção, em que a placa foi centrifugada por 10 minutos à 4°C/ 405g. Em seguida foi removido o sobrenadante da cultura (que foi armazenado em freezer -20°C, para análise posterior), e o pellet contendo células foi ressuspendido no reagente Trizol (Life TechnologiesTM) e armazenado em freezer -80°C para posterior extração do RNA, de acordo com as instruções do fabricante. Na segunda etapa, a síntese de cDNA, a reação de transcrição reversa foi realizada utilizando 1 µg de RNA total diluído em uma solução com volume final de 20 µL por reação. A síntese de cDNA foi realizada utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems), cujas etapas de incubação foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante. Por fim, na etapa final, as amplificações por PCR em Tempo Real foram realizadas utilizando o sistema TaqMan (Thermo.Scientific) que consiste na utilização de sondas e primers específicos para cada TREM-1 e DAP-12. Como controle endógeno das amostras foi utilizado o GAPDH, que é um gene constitutivamente expresso na célula. As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems). Os níveis de expressão do gene alvo transcrito em cada amostra foram calculados pelo método Ct comparativo (fórmula 2-ΔCt) após a normalização com o gene endógeno.

3.11. Análise Estatística



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

11

Para a realização da análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prisma versão 7.00. Para avaliação da normalidade, usou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os grupos paramétricos foram analisados pelo Teste T de Student, enquanto os grupos não paramétricos foram avaliados pelo Teste Wilcoxon. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para investigar se a inibição da via de TREM-1 modula a resposta do neutrófilo mediante exposição por *L. infantum*, neutrófilos de doadores saudáveis ($n = 5$) foram expostos ao parasito na presença ou não do inibidor da via do TREM-1, LP17. Após 30 minutos foi avaliada a taxa de infecção e a produção de ROS por citometria de fluxo. Como resultado, foi observado que a presença do LP17 não alterou a taxa de infecção dos neutrófilos em comparação ao grupo controle (Figura 1).

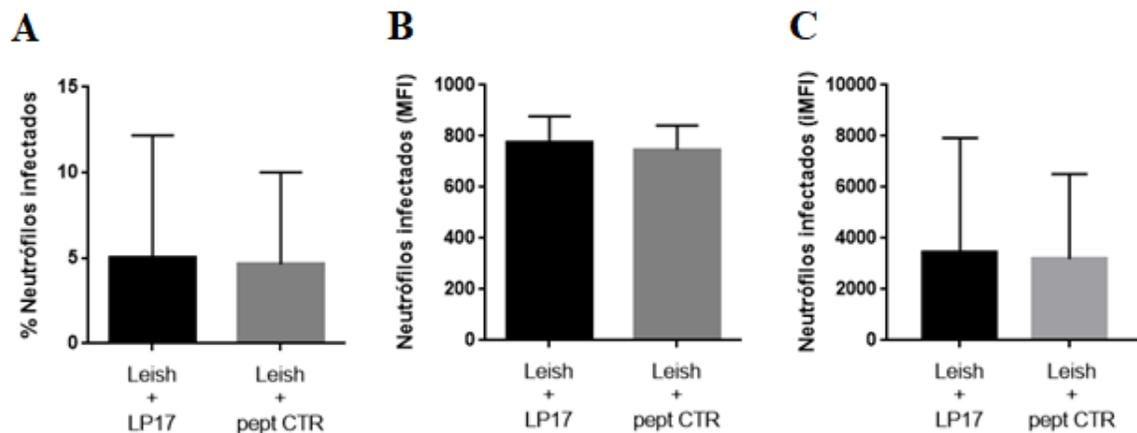


Figura 1: Taxa de infecção dos neutrófilos após 30 minutos de exposição a *L. infantum* na presença do inibidor da via TREM-1 (LP17) ou peptídeo controle (CTR). Neutrófilos humanos foram expostos a *L. infantum* (taxa de exposição 5 parasitos:1 neutrófilo) previamente marcada com CellTracker™, na presença de LP17 ou peptídeo controle, na concentração de 100 ng/mL. Após 30



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

12

minutos, foram avaliados a porcentagem (A), o MFI (B) e o iMFI (C) de neutrófilos infectados. As barras representam a média e o desvio padrão de 2 experimentos independentes com 4 doadores.

Ao avaliarmos a produção de ROS, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa na porcentagem, MFI e iMFI de ROS, nota-se uma tendência de redução da fluorescência (MFI e iMFI) na presença do LP17, o que indica uma redução da produção de ROS. Essa redução foi de aproximadamente 23% em comparação a média encontrada na presença do peptídeo controle (Figura 2). Como controle positivo da produção de ROS, foi utilizado o PMA, agente estimulador capaz de disparar a explosão respiratória em células fagocitárias através da ativação direta da proteína quinase C.

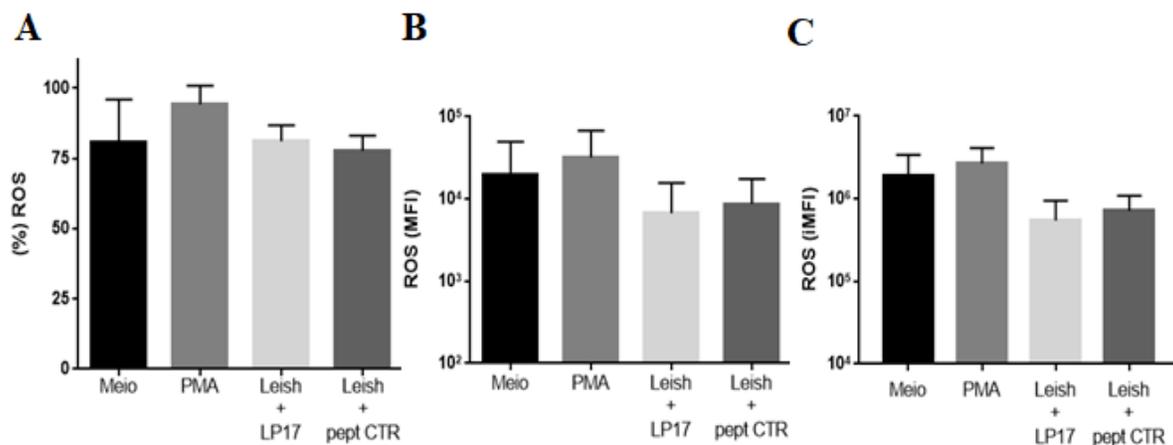


Figura 2: Produção de ROS em neutrófilos expostos a *L. infantum* na presença do inibidor da via TREM-1 (LP17). Neutrófilos humanos foram expostos a *L. infantum* (taxa de exposição 5 parasitos:1 neutrófilo) previamente marcada com CellTrackerTM, na presença de LP17 e peptídeo controle, na concentração de 100 ng/mL. Após 30 minutos, avaliou-se a porcentagem de ROS (A), o MFI (B) e o iMFI(C). As barras representam a média e o desvio padrão de 2 experimentos independentes com 4 doadores.

Em seguida, foram avaliadas a taxa de infecção e a expressão de TREM-1 de superfície em neutrófilos após três horas de exposição à *L. infantum*. Por essa metodologia, a presença do LP17 não alterou a taxa de infecção dos neutrófilos em comparação ao peptídeo controle, assim como aconteceu após trinta minutos de exposição (Figura 3).

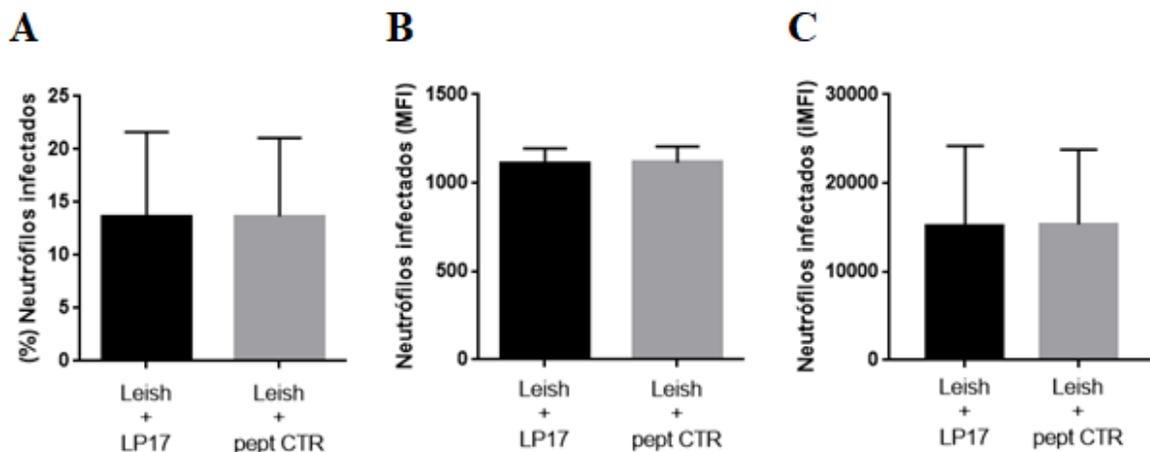


Figura 3: Taxa de infecção dos neutrófilos após 3 horas de exposição a *L. infantum* na presença do inibidor da via TREM-1 (LP17) ou peptídeo controle (CTR). Neutrófilos humanos foram expostos a *L. infantum* (taxa de exposição 5 parasitos:1 neutrófilo) previamente marcada com CellTracker™, na presença de LP17 ou peptídeo controle, na concentração de 100 ng/mL. Após 3 horas, foram avaliados a porcentagem (A), o MFI (B) e o iMFI (C) de neutrófilos infectados. As barras representam a média e o desvio padrão de 3 experimentos independentes com 5 doadores.

Na análise da expressão de TREM-1 na superfície de neutrófilos, o grupo não exposto (composto somente por neutrófilos) representou o controle negativo e apresentou taxas maiores de expressão de TREM-1 que os demais. Observou-se que a infecção pela *L. infantum* (grupo Leish +) promoveu uma redução da expressão de TREM-1 em porcentagem e iMFI em comparação ao grupo de neutrófilos expostos mas não infectados (grupo Leish -), embora não estatisticamente significativa. A presença do inibidor de TREM-1 (LP17) não modificou a expressão comparada aos neutrófilos expostos na ausência do inibidor (Figura 4). A redução da expressão na superfície celular de TREM-1

em neutrófilos que foram expostos e infectados pela *L. infantum* já foi demonstrada por outros autores (BOMFIM et al., 2017).

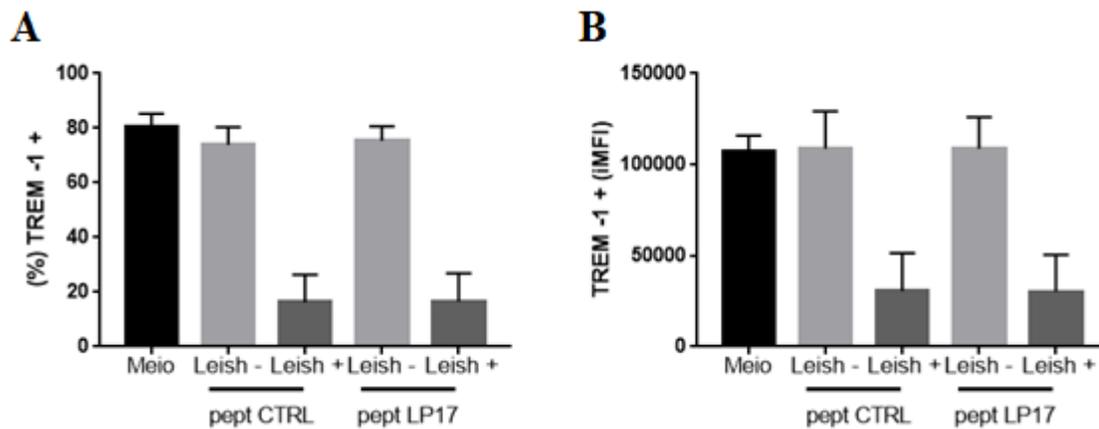


Figura 4: Expressão de TREM-1 de superfície em neutrófilos infectados pela *L. infantum*. Neutrófilos humanos foram expostos a *L. infantum* (taxa de exposição 5 parasitos:1 neutrófilo) previamente marcada com CellTracker™, na presença de LP17 e peptídeo controle, na concentração de 100 ng/mL. Após 3 horas de exposição, a porcentagem (A) e MFI (B) da expressão de TREM-1 na superfície celular foi detectada pela fluorescência com anti-TREM-1-PE, por citometria de fluxo. Os grupos Leish + e Leish - representam os neutrófilos infectados e não infectados pelos parasitos, respectivamente. As barras representam a média e o desvio padrão de 3 experimentos independentes com 5 doadores.

A avaliação da resposta microbicida dos neutrófilos por *L. infantum* na presença de inibidores da via do TREM-1 também foi feita através da contagem de parasitos viáveis. Foi observado que inibição do TREM-1 favoreceu o estabelecimento da infecção (Figura 5). A diferença de resultado da infecção analisada pela técnica citometria de fluxo comparada pela carga parasitária, pode ser justificada a partir do fato que o último método avalia a viabilidade do parasito, através da contagem do número de parasitos viáveis, gerando dados mais robustos quanto às taxas de infecção do agente.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

15

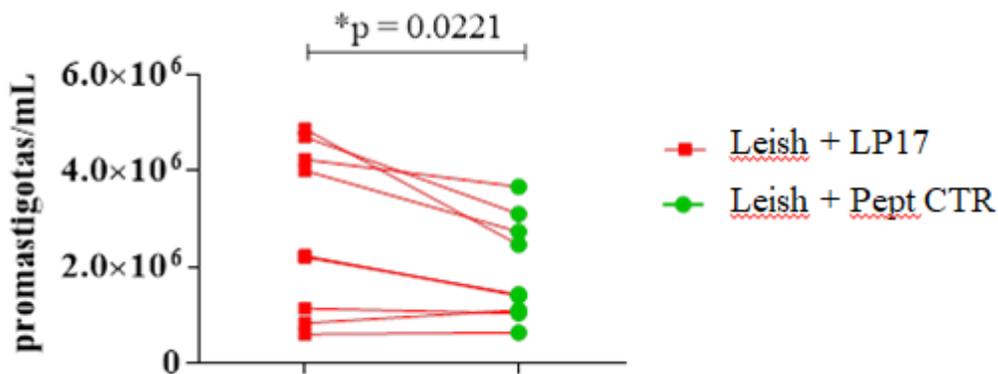


Figura 5: Antagonismo de TREM-1 aumenta a viabilidade de *L. infantum* em neutrófilos. Neutrófilos humanos foram purificados do sangue periférico e expostos a *L. infantum* (taxa de exposição 5 parasitos:1 neutrófilo) na presença de LP17 e peptídeo controle (100 ng/mL) durante 3 horas. Após exposição, o meio RPMI foi substituído pelo meio Schneider completo, e após 24 horas foi realizada a contagem de parasitos viáveis. Os pontos representam a média da triplicata de cada doador (n = 9). O asterisco representa a diferença estatística pelo teste T de Student (* p<0,05).

O último passo do estudo foi avaliar as expressões gênicas de TREM-1 e IL-8 em neutrófilos expostos à *L. infantum* na presença do LP17 ou peptídeo controle. Embora não tenham sido constatadas diferenças estatisticamente significativas entre as condições analisadas, por se tratar de uma avaliação preliminar, observou-se uma tendência do LP17 reduzir a quantidade de mRNA de TREM-1 e IL-8 em comparação ao peptídeo controle. Quanto a expressão gênica de TREM-1, o LP17 reduziu 34,61% da média de quantidade de mRNA encontrada na presença do peptídeo controle e em relação ao IL-8 a redução foi de 37,88% (Figura 6). Comparando-se a expressão do grupo de neutrófilos cultivados apenas com meio de cultura, nota-se que estas células apresentam valores menores de expressão gênica, o que corrobora com a literatura, já que trabalhos demonstraram que a presença do parasito *L. infantum* aumenta o nível de expressão gênica de TREM-1 IL-8 (BOMFIM et al., 2017).

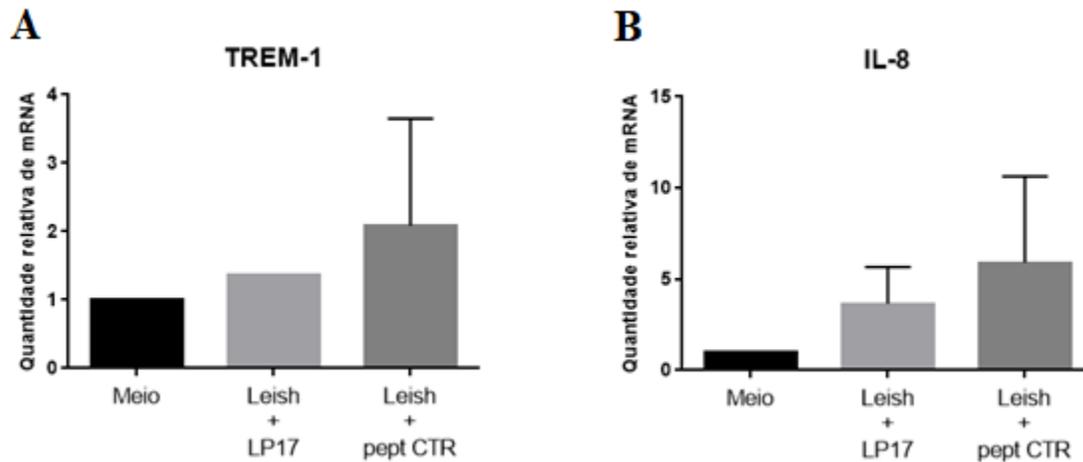


Figura 6: Expressão gênica de TREM-1 e IL-8 em neutrófilos expostos a *L. infantum* com LP17. Neutrófilos de três doadores saudáveis foram expostos a *L. infantum* (taxa de exposição 5 parasitos:1 neutrófilo) na presença de LP17 ou peptídeo controle. O grupo controle foi composto de neutrófilos cultivados apenas no meio de cultura RPMI. A expressão gênica relativa foi avaliada após 30 minutos de exposição ao parasito. As barras representam a média e o desvio padrão de um experimento com 3 doadores.

Os resultados sugerem uma ação anti-inflamatória do peptídeo LP17 com diminuição da produção de ROS e da expressão da citocina IL-8. A modulação do LP17 em reduzir a resposta inflamatória já foi observada *in vivo* por outros autores em camundongos e ratos, no choque hemorrágico (GIBOT et al., 2009), choque séptico (GIBOT et al., 2006a) e pneumonia (GIBOT et al., 2006b). O papel do LP17 em inúmeras doenças infecciosas e não infecciosas, reduzindo a inflamação é demonstrada na literatura (TAMMARO et al., 2017). A partir desse estado de menor inflamação, o agente etiológico da Leishmaniose Visceral Humana parece estabelecer melhor sua infecção nos neutrófilos. Alguns autores sugerem que a infecção de neutrófilos por esse parasito provocaria redução em suas funções efetoras celulares, dentre elas a produção de ROS, propiciando um melhor



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

17

estabelecimento do agente (YIZENGAW et al., 2016). Dessa forma, a partir do momento que o LP17 parece diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio, é natural que na sua presença haja maior taxa de infecção dessa célula, o que foi demonstrada nos nossos resultados.

5. CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que a inibição da via do TREM-1, com o peptídeo LP17, favoreceu o estabelecimento da *L. infantum* em neutrófilos, provavelmente pela diminuição da produção de ROS e da resposta inflamatória, TREM-1 e IL-8.

6. PERSPECTIVAS

A prevalência da Leishmaniose Visceral (LV), uma doença negligenciada no mundo, assim com novas descobertas de sua imunopatogênese justificam os estudos nessa área. A atuação dos neutrófilos e do TREM-1 na gravidade da LV demonstra um caminho promissor dessa investigação. Dessa forma, maiores investigações quanto à modulação do TREM-1 em neutrófilos expostos à *L. infantum* devem ser realizadas. Os próximos passos deste trabalho será aumentar o número de experimentos para comprovar a participação da via TREM-1 na modulação da resposta microbicida e inflamatória em neutrófilos infectados. Além disso, estamos avaliando o perfil desse receptor em neutrófilos durante o tratamento da Leishmaniose Visceral. Esses resultados abrirão perspectivas para possíveis alvos de imunoterapia na LV.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

18

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARTS, R. J. W. et al. TREM-1: intracellular signaling pathways and interaction with pattern recognition receptors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 2, p. 209–215, 1 fev. 2013.
- BARUAH, S. et al. Identification of a Novel Splice Variant Isoform of TREM-1 in Human Neutrophil Granules. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 12, p. 5725–5731, 2015.
- BOMFIM, L. G. S. et al. Leishmania infantum induces the release of sTREM-1 in visceral leishmaniasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. NOV, p. 1–8, 2017.
- BOSTANCI, N. et al. Porphyromonas gingivalis Regulates TREM-1 in Human Polymorphonuclear Neutrophils via Its Gingipains. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 2–9, 2013.
- BOUCHON, A.; DIETRICH, J.; COLONNA, M. Cutting Edge: Inflammatory Responses Can Be Triggered by TREM-1, a Novel Receptor Expressed on Neutrophils and Monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 10, p. 4991–4995, 2000.
- CAMPOS, R. et al. Epidemiological aspects and spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil. **Geospatial Health**, v. 12, n. 1, 2017.
- CAO, C.; GU, J.; ZHANG, J. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cell-1 (sTREM-1): a potential biomarker for the diagnosis of infectious diseases. **Frontiers of Medicine**, v. 11, n. 2, p. 169–177, 2017.
- DAGLEY, M. J. et al. High-Content Assay for Measuring Intracellular Growth of Leishmania in Human Macrophages. **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 13, n. 7, p. 389–401, set. 2015.
- GIBOT, S. et al. A Soluble Form of the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 Modulates the Inflammatory Response in Murine Sepsis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 11, p. 1419–1426, 2004.
- GIBOT, S. et al. Modulation of the Triggering Receptor Expressed on the Myeloid Cell



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

19

Type 1 Pathway in Murine Septic Shock. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 5, p. 2823–2830, 2006a.

GIBOT, S. et al. Modulation of the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells – 1 Pathway during Pneumonia in Rats. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, 2006b.

GIBOT, S. et al. EFFECTS OF THE TREM 1 PATHWAY MODULATION DURING HEMORRHAGIC SHOCK IN RATS. **SHOCK**, v. 32, n. 6, p. 633–637, 2009.

GÓMEZ-PIÑA, V. et al. Metalloproteinases shed TREM-1 ectodomain from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 179, n. 6, p. 4065–73, 2007.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. DA C. et al. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. OCT, 2017.

MOHAMADZADEH, M. et al. Activation of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 on Human Neutrophils by Marburg and Ebola Viruses. v. 80, n. 14, p. 7235–7244, 2006.

RIGO, I. et al. Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) in airway epithelial cells by 1,25(OH)₂ vitamin D₃. **Innate Immun**, v. 18, n. 2, p. 250–257, 2012.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 453–483, out. 2001.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. p. 1–10, 2017.

TAMMARO, A. et al. TREM-1 and its potential ligands in non-infectious diseases: from biology to clinical perspectives. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 177, p. 81–95, 2017.

WU, Y. et al. Accuracy of plasma sTREM-1 for sepsis diagnosis in systemic inflammatory patients: A systematic review and meta-analysis. **Critical Care**, v. 16, n. 6, 2012.

YIZENGAW, E. et al. Visceral leishmaniasis patients display altered composition and



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

20

maturity of neutrophils as well as impaired neutrophil effector functions. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. NOV, p. 1–12, 2016.

8. OUTRAS ATIVIDADES

Atividades extras foram desenvolvidas com a presença em sessões científicas promovidas pelo LIBM. As sessões ocorrem semanalmente e têm o objetivo de promover discussões, debates científicos e delineamento de experimentos sobre a área de pesquisa do grupo. Ademais, foram realizados o acompanhamento e auxílio dos experimentos envolvendo outros projetos e linhas de pesquisa do grupo, como também, visita e avaliação clínica dos pacientes com leishmaniose visceral alocados na enfermaria do Hospital Universitário.

Além disso, outras atividades não vinculadas ao grupo de pesquisa do LIBM foram desenvolvidas, dentre elas:

- Realização do evento de Rastreamento de Doença Real no HU através Liga de Nefrologia de Sergipe – LINESE, nos dias 24 de março e 05 de maio de 2018;
- Participação como ouvinte do 5º Simpósio Multidisciplinar de Hipertensão Arterial Dr. Clóvis Oliveira Andrade, nos dias 08 de junho de 2018.
- Submissão de resumo no XXIX Congresso Brasileiro de Nefrologia;
- Submissão de resumo no MEDTROP – 2018, 54º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.