



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**LAYS GISELE SANTOS BOMFIM**

**NÍVEIS SÉRICOS DE TREM-1 NA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA E SUA  
MODULAÇÃO EM NEUTRÓFILOS EXPOSTOS À *Leishmania infantum***

**ARACAJU/SE  
2017**

**LAYS GISELE SANTOS BOMFIM**

**NÍVEIS SÉRICOS DE TREM-1 NA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA E SUA  
MODULAÇÃO EM NEUTRÓFILOS EXPOSTOS À *Leishmania infantum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

**ARACAJU/SE  
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

B695n Bomfim, Lays Gisele Santos  
Níveis séricos de TREM-1 na leishmaniose visceral humana e sua modulação em neutrófilos expostos à *Leishmania infantum* / Lays Gisele Santos Bomfim ; orientadora Tatiana Rodrigues de Moura. – Aracaju, 2017.  
59 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2017.

1. Leishmaniose visceral. 2. Leishmania 3. Neutrófilos. I. Moura, Tatiana Rodrigues de, orient. II. Título.

CDU 616.993.161

**LAYS GISELE SANTOS BOMFIM**

**NÍVEIS SÉRICOS DE TREM-1 NA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA E SUA  
MODULAÇÃO EM NEUTRÓFILOS EXPOSTOS À *Leishmania infantum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 23/02/2017

---

Orientadora: Dra. Tatiana Rodrigues de Moura

---

1º Examinador: Dra. Cristiane Bani Correa

---

2º Examinador: Dr. Diego Moura Tanajura

**ARACAJU/SE  
2017**

*Dedico este trabalho à minha família, pelo apoio incondicional; e à todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.*

## AGRADECIMENTOS

Eis então que chego ao fim de mais uma etapa da minha vida, foram dois anos de muito aprendizado, erros e novas experiências. Agradeço a todos(as) aqueles(as) que me acompanharam e estiveram presentes comigo, não teria chegado até aqui sem a ajuda e o apoio de vocês.

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por todas as forças que me concedeu para vencer todos os obstáculos que apareceram no caminho e me fazer seguir sempre em frente.

Aos meus queridos pais, Nadja Bomfim e Roque Bomfim, que são a minha razão de viver. Obrigada por todo apoio, compreensão e amor incondicional! Espero poder retribuir por tudo aquilo que vocês já fizeram por mim.

Às minhas irmãs, Alexandra Bomfim e Adrielly Bomfim, pelo companheirismo sincero, amor verdadeiro, confiança e apoio.

Aos meus tios e tias, e demais membros da família que sempre acreditaram e torceram por mim.

À minha querida orientadora, Tatiana Moura, um ser iluminado que Deus colocou em minha vida. Um exemplo de mãe, esposa, mulher e profissional! Obrigada pela oportunidade, ensinamentos, confiança, apoio, incentivo e, principalmente, por acreditar em mim.

Aos professores Roque Pacheco e Amélia Ribeiro, por terem trabalhado arduamente e construírem um grupo de pesquisa o qual me orgulho de fazer parte. Por toda luta diária para fazer do Laboratório de Biologia Molecular (LBM) um ambiente melhor em todos os aspectos, com infraestrutura e suportes adequados. Agradeço a vocês também pela oportunidade e por estarem sempre disponíveis em ajudar.

Às professoras Nalu Peres e Cristiane Correa e ao professor Diego Tanajura pelas discussões científicas e contribuições para o desenvolvimento do trabalho.

À professora Valéria Borges (Fiocruz Bahia) por toda contribuição científica e por abrir as portas do seu laboratório para que eu pudesse fazer o treinamento, juntamente com sua aluna Grazielle Quintela, a qual também agradeço pela disposição em ajudar.

Ao professor Michael Lipscomb (Howard University) pela contribuição científica, análise de dados e suporte financeiro.

Ao doutorando e meu “irmão científico”, Lucas Magalhães, obrigada por sempre estar disposto a me ajudar, por todo acompanhamento nos meus experimentos longos, por toda paciência em me ouvir nos meus momentos de desespero e crises existenciais.

Ao futuro farmacêutico Marcelo Anchieta, futura odontóloga Sthefanne Gondim e ao médico recém-formado Murilo Aires, obrigada pela ajuda que me deram nos meus experimentos, por me acompanharem e muitas vezes ficarem até tarde comigo do laboratório.

A todos os amigos do LBM: Aline Barreto, Mônica Rueda, Rodrigo Cazzaniga, Camilla Natália, Fabrícia Alvisi, Micheli Luize, Priscila Lima, Luana Celina, Márcio Bezerra, Roseane Nunes, Ricardo Louzada e Betânia. Obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar, pela convivência saudável e por compartilharem comigo ricos momentos.

Aos técnicos e funcionários do setor da Patologia do Hospital Universitário (HU / UFS), obrigada pelos favores e disposição em ajudar!

Aos meus amigos de longa data, que sempre depositaram carinho, confiança e apoio em mim.

À todas as pessoas que me doaram sangue para que os meus experimentos pudessem ser realizados.

Ao CNPq, CAPES, FAPITEC/SE e UFS pelo suporte material e financeiro.

Enfim, obrigada a todos(as)! Vocês foram essenciais para o desenvolvimento do trabalho.

“E aprendi que se depende sempre

De tanta, muita, diferente gente

Toda pessoa sempre é as marcas

Das lições diárias de outras tantas pessoas.

É tão bonito quando a gente entende

Que a gente é tanta gente

Onde quer que a gente vá.

É tão bonito quando a gente sente

Que nunca está sozinho

Por mais que pense estar...” (Caminhos do coração – Gonzaguinha)

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

## RESUMO

### **NÍVEIS SÉRICOS DE TREM-1 NA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA E SUA MODULAÇÃO EM NEUTRÓFILOS EXPOSTOS À *Leishmania infantum*.**

Lays Gisele Santos Bomfim. Aracaju/SE, 2017.

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença de infecção sistêmica e a forma clínica mais grave está associada a uma intensa resposta inflamatória. O *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1* (TREM-1) é um receptor de superfície celular constitutivamente expresso em neutrófilos e monócitos e desempenha um papel fundamental na resposta imune inata, sendo capaz de amplificar e regular a resposta inflamatória. Sua ativação e expressão é sinérgica a ativação de TLR 2 e 4, que culmina na ativação de mecanismos microbicidas. Sua forma sérica solúvel, sTREM-1, tem sido descrita em doenças inflamatórias como sepse e artrite reumatoide e atua como um inibidor da via TREM-1. Uma vez que a via TREM-1 está associada a ativação de neutrófilos, células que constituem a primeira linha de defesa e uma fonte principal de TREM-1, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os níveis séricos de sTREM-1 nos pacientes com leishmaniose visceral e investigar o efeito da *Leishmania infantum* na modulação de TREM-1 em neutrófilos. Para isso, soros de pacientes com diferentes formas clínicas da LV foram coletados antes e após o tratamento para mensurar os níveis séricos de sTREM-1 por ELISA. Além disso, neutrófilos de doadores humanos saudáveis foram purificados a partir de sangue periférico e expostos à *L. infantum* com uma taxa de 1, 5 e 10 parasitos por neutrófilo, para avaliar a liberação do sTREM-1 no sobrenadante. Por fim, foi avaliada a expressão de TREM-1 de superfície em neutrófilos expostos à *L. infantum*, bem como a expressão gênica de TREM-1, DAP12 e IL-8 por PCR em Tempo Real. Pacientes com a forma grave da LV apresentaram níveis séricos elevados de sTREM-1 comparados aos níveis séricos das outras formas clínicas. Comparando os pacientes com LV grave com os demais grupos (LV clássica D0, D30 e D180; DTH+; CTR) foi observada uma AUC acima de 0,8 com valor de  $p \leq 0,01$  em todas as curvas ROC. O melhor poder de discriminação da curva ROC foi entre LV grave de LV clássica D30 com uma sensibilidade de 93,75% e especificidade de 87,50%. Os níveis séricos de sTREM-1 foram correlacionados positivamente com o tamanho do fígado e negativamente com o número de leucócitos dos pacientes com LV. Experimentos *in vitro* com neutrófilos de doadores saudáveis demonstraram que a liberação de sTREM-1 no sobrenadante da cultura estava associada a um aumento da taxa de parasitos de *L. infantum*, e ao tempo de exposição. Além disso, através da citometria de fluxo foi demonstrado que a exposição por *L. infantum* reduz a frequência, MFI e iMFI de TREM-1 na superfície de neutrófilos infectados, e aumenta a expressão gênica de TREM-1, DAP12 e IL-8. Nesse trabalho foi descrito, pela primeira vez, que o TREM-1 é modulado pela presença da *L. infantum*, sendo sua forma solúvel elevada na forma grave da LV e modulada em neutrófilos.

**Palavras-chave:** *Leishmania infantum*. Leishmaniose visceral. Neutrófilos. TREM-1.

## ABSTRACT

### **SERUM LEVELS OF TREM-1 IN HUMAN VISCERAL LEISHMANIASIS AND ITS MODULATION IN NEUTROPHILS EXPOSED TO *Leishmania infantum*.**

Lays Gisele Santos Bomfim. Aracaju/SE, 2017.

Visceral Leishmaniasis (VL) is a disease of systemic infectious and the most severe clinical form is associated with an intense inflammatory response. *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1* (TREM-1) is a cell surface receptor constitutively expressed in neutrophils and monocytes and plays a key role in the innate immune response, being able to amplify and regulate the inflammatory response. Its activation and expression is synergistic to the activation of TLR 2 and 4, which culminates in the activation of microbicidal mechanisms. Its soluble serum form, sTREM-1, has been described in inflammatory diseases such as sepsis and rheumatoid arthritis, acting as TREM-1 pathway inhibitor. Since TREM-1 pathway is associated with neutrophils activation, cells that constitute the first host's line of defense and a major source of TREM-1, the aim of the present study was to evaluate serum levels of sTREM-1 in patients with VL and investigate the effect of *Leishmania infantum* on the modulation of TREM-1 in neutrophils. Thereby, sera from patients with different clinical forms of VL were collected before and after treatment to measure serum levels of sTREM-1 by ELISA. In addition, neutrophils from healthy human donors were purified from peripheral blood and exposed to *L. infantum* at a rate of 1, 5 and 10 parasites per neutrophil to evaluate the release of sTREM-1 in the supernatant. Ultimately, the expression of surface TREM-1 in neutrophils exposed to *L. infantum*, as well as the gene expression of TREM-1, DAP12 and IL-8 by Real-time PCR was evaluated. Patients with severe VL presented elevated serum levels of sTREM-1 compared to serum levels of other clinical forms. Comparing the patients with severe VL with the other groups (classic VL D0, D30 and D180; DTH+; CTR), an AUC above 0.8 was observed with a value of  $p \leq 0.01$  in all ROC curves. The best discriminating power of the ROC curve was between severe VL of classic VL D30 with a sensitivity of 93.75% and specificity of 87.50%. Serum levels of sTREM-1 were positively correlated with liver size and negatively correlated with the number of leukocytes from VL patients. *In vitro* experiments with neutrophils from healthy donors demonstrated that the release of sTREM-1 into the culture supernatant was associated with an increased parasite rate of *L. infantum*, and the time of exposure. In addition, flow cytometry has demonstrated that exposure by *L. infantum* reduces the frequency, MFI and iMFI of TREM-1 on the surface of infected neutrophils, and increases the gene expression of TREM-1, DAP12 and IL-8. In this work, it was described for the first time that TREM-1 is modulated by the presence of *L. infantum*, its soluble form being elevated in the severe form of VL and modulated in neutrophils.

**Key-words:** *Leishmania infantum*. Visceral leishmaniasis. Neutrophils. TREM-1.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Via esquemática de TREM-1 e sTREM-1 na inflamação .....	26
<b>Figura 2-</b> Níveis séricos de sTREM-1 dos pacientes com LV antes (D0) e pós-tratamento (D30 e D180), LV grave, indivíduos DTH+ e grupo controle .....	38
<b>Figura 3-</b> Curvas ROC dos níveis séricos de sTREM-1.....	39
<b>Figura 4-</b> Correlação entre os níveis séricos de sTREM-1 com tamanho do fígado e leucócitos dos pacientes com LV (D0 clássica, D0 grave D30) .....	40
<b>Figura 5-</b> Liberação de sTREM-1 por neutrófilos, em resposta à exposição por <i>L. infantum</i> ...	41
<b>Figura 6-</b> Dosagem de MMP-9 no sobrenadante de neutrófilos expostos à <i>L. infantum</i> .....	42
<b>Figura 7-</b> Infecção de neutrófilos expostos à <i>L. infantum</i> .....	43
<b>Figura 8-</b> Expressão de TREM-1 de superfície em neutrófilos expostos e não expostos à <i>L. infantum</i> .....	44
<b>Figura 9-</b> Expressão de TREM-1 de superfície em neutrófilos infectados e não infectados com <i>L. infantum</i> .....	46
<b>Figura 10-</b> Expressão gênica de neutrófilos mediante exposição à <i>L. infantum</i> .....	47

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Sistema de *score* prognóstico para LV grave ..... 19

**Tabela 2-** Dados clínicos dos pacientes com LV na fase de pré-tratamento ..... 40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT: Alanina Aminotransferase

AST: Aspartato Aminostransferase

B.O.D: Biochemical Oxygen Demand (Demanda Bioquímica de Oxigênio)

CCL: Chemokine Ligands (Ligante de Quimiocina)

CD: *Cluster* de Diferenciação

cDNA: DNA complementar

CXCR: *Chemokine Receptor* (Receptor de Quimiocina)

DAP12: *DNAX activation protein of 12 kDa*

DENV: Vírus da Dengue

DMSO: dimetilsulfóxido

DTH+: *Delayed-type Hypersensitivity* (Hipersensibilidade do tipo tardia)

ELISA: *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay* (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

FSC: *forward- scatter*

G-CSF: Fator Estimulador de Colônias De Granulócitos

GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos)

HIV: *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

ICAMs: Moléculas de Adesão Intercelular

IFI: Interferon Induced Protein (Proteína Induzida Por Interferon)

IL: Interleucina

iMFI: Mediana da Intensidade de Fluorescência Integrada

INF- $\gamma$ : Interferon- $\gamma$

*L.i.*: *Leishmania infantum*

LPS: Lipopolissacarídeo

LT: Leishmaniose Tegumentar

LV: Leishmaniose Visceral

MCP-1: *Monocyte Chemotactic Protein-1* (Proteína Quimiotática de Monócitos-1)

MFI: *Median Fluorescence Intensity* (Mediana da Intensidade de Fluorescência)

MHC: *Major Histocompatibility Complex* (Complexo Principal de Histocompatibilidade)

MMP: Metaloproteinase

MPO: Mieloperoxidase

NADPH: Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina

NETs: *Neutrophil Extracellular Traps*

NK: Célula *Natural Killer*

NLR: *Nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptor* (Receptor *NOD-Like*)

NNN: Meio de cultura Neal, Novy, Nicolle

PAMPs: Padrões Moleculares Associados à Patógenos

PRR: Receptores de Reconhecimento de Padrão

ROC: *Receiver Operator Characteristic* (Característica de Operação do Receptor)

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

SLA: *Soluble Leishmania Antigen* (Antígeno Solúvel de *Leishmania*)

SSC: *side- scatter*

sTREM-1: *Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells* (Forma solúvel do TREM-1)

Th1: Célula T *helper*

TLR: Receptor *Toll-Like*

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$

TREM: *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells*

VHS: Velocidade de Hemossedimentação

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
<b>2.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos da Leishmaniose Visceral</b> .....	17
<b>2.2 Ciclo biológico da <i>Leishmania</i></b> .....	19
<b>2.3 Neutrófilos: características gerais</b> .....	20
<b>2.4 Neutrófilos e a infecção por <i>Leishmania</i></b> .....	22
<b>2.5 Papel do TREM-1 na resposta imune</b> .....	24
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	28
<b>3.1 Geral</b> .....	28
<b>3.2 Específicos</b> .....	28
<b>4 DESENHO DO ESTUDO</b> .....	29
<b>4.1 Objetivo específico 1</b> .....	29
<b>4.2 Objetivo específico 2</b> .....	29
<b>4.3 Objetivos específicos 3 e 4</b> .....	30
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
<b>5.1 População estudada e aspectos éticos</b> .....	31
<b>5.2 Dosagem de sTREM-1 e MMP-9</b> .....	32
<b>5.3 Meio de cultivo de <i>L. infantum</i></b> .....	32
<b>5.4 Parasitos</b> .....	33
<b>5.5 Separação e cultura de neutrófilos</b> .....	33
<b>5.6 Exposição dos neutrófilos à <i>L. infantum</i></b> .....	34
<b>5.7 Citometria de fluxo</b> .....	34
5.7.1 Marcação dos parasitos .....	34
5.7.2 Detecção de TREM-1 de superfície .....	35
5.7.3 Análise dos dados de citometria de fluxo .....	35
<b>5.8 Expressão gênica- qPCR em Tempo Real</b> .....	36
5.8.1 Extração de RNA .....	36
5.8.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) .....	36
5.8.3 PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR) .....	36
<b>5.9 Curva ROC</b> .....	37
<b>5.10 Análises estatísticas</b> .....	37
<b>6 RESULTADOS</b> .....	39
<b>6.1 Níveis séricos de sTREM-1 associado à gravidade da LV</b> .....	39
<b>6.2 Dados clínicos dos pacientes com LV clássica e LV grave</b> .....	40

<b>6.3 Liberação de sTREM-1 em neutrófilos expostos à <i>L. infantum</i> está associada a um aumento da taxa de parasitos .....</b>	<b>42</b>
<b>6.4 <i>Leishmania infantum</i> modula a expressão de TREM-1 na superfície de neutrófilos .....</b>	<b>43</b>
<b>6.5 Expressão gênica de TREM-1, DAP12 e IL-8 é aumentada nos neutrófilos expostos à <i>L. infantum</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>9 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

---

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada por um parasito protozoário do gênero *Leishmania*, típica de países que estão localizados em regiões tropicais e subtropicais do globo, sendo classificada como uma doença tropical negligenciada (WERNECK, 2010).

Estima-se que 500 mil novos casos de LV surgem anualmente, sendo que 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sudão do Sul e Sudão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012), atingindo principalmente as populações pobres desses países, e apesar de haver métodos para diagnóstico e tratamento específico, a maioria da população não tem acesso a estes procedimentos, elevando os índices de casos, os quais podem ser tornar fatais, caso a doença não seja diagnosticada e tratada a tempo (GONTIJO, CÉLIA MARIA FERREIRA; MELO, 2004).

A LV se estabelece devido a um conjunto de fatores do parasito e do hospedeiro, como fatores de virulência do parasito, caráter genético, estado nutricional e resposta imune do indivíduo. Sabe-se que dentre estes fatores, a resposta imune é um fator primordial tanto para o estabelecimento bem como para a cura da LV (CARVALHO; ARAÚJO; CARVALHO, 2004).

O reconhecimento dos patógenos é o primeiro passo para o desenvolvimento de uma resposta imunológica. Neste sentido, células da imunidade inata expressam vários receptores de superfície celular e moléculas de sensoriamento intracelulares que permitem o reconhecimento autônomo de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), que dão início à resposta pró-inflamatória contra micro-organismos (WEBER et al., 2014). Receptores Toll-like (TLR) e NOD-like (NLR), que reconhecem um grupo diverso de estruturas microbianas altamente conservadas, representam dois grandes exemplos de receptores da imunidade inata com funções de ativação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Contudo, no ano de 2000, foi identificado um novo grupo de receptores da imunidade inata, conservado evolutivamente, sendo chamados de *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells* (TREM) (BOUCHON; DIETRICH; COLONNA, 2000). Desde então, este grupo de receptores vem sendo estudado e caracterizado.

TREM-1, também conhecido como CD354, é constitutivamente expresso em neutrófilos e em subconjuntos de monócitos e macrófagos, e foi o primeiro receptor identificado e melhor caracterizado da família TREM com funções de ativação (BOUCHON; DIETRICH; COLONNA, 2000; WEBER et al., 2014). Este receptor tem sido identificado também em células epiteliais das vias aéreas, células endoteliais hepáticas, células NK,

dendríticas e em células B e T (CHEN et al., 2008; MATESANZ-ISABEL et al., 2011; RIGO et al., 2012).

A expressão do TREM-1 é regulada mediante a exposição de células a produtos microbianos, cuja ativação e expressão deste receptor ocorrem em sinergia com TLR 2 e 4, resultando na produção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias que amplificam a resposta imune inata e adaptativa. TREM-1 também pode ser produzido na sua forma solúvel (sTREM-1), e elevados níveis no soro são indicativos de infecções microbianas e doenças inflamatórias não-infecciosas (GIBOT et al., 2004b).

Até o presente momento não há trabalhos avaliando o papel do TREM-1 na Leishmaniose Visceral (LV), uma doença de infecção sistêmica que está associada a uma intensa resposta inflamatória, cujo controle envolve a ativação de fagócitos como os neutrófilos, que constituem a primeira linha de defesa na infecção e uma fonte principal de TREM-1.

Diante disso, uma vez que o papel deste receptor ainda é pouco esclarecido, o objetivo do presente estudo foi avaliar os níveis séricos de sTREM-1 nos pacientes com leishmaniose visceral e investigar o efeito da *L. infantum* na modulação de TREM-1 em neutrófilos. Acreditamos que o estudo deste receptor poderá trazer resultados promissores na compreensão de como as respostas inflamatórias inatas são reguladas, que poderá contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens imunoterapêuticas, que beneficiarão as populações de áreas endêmicas, no que diz respeito ao controle e tratamento da doença.

### **2.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos da Leishmaniose Visceral**

As leishmanioses afetam de forma considerável a população mundial, apresentando um grande impacto na saúde pública global. É um grupo de doenças causadas pelo parasito protozoário do gênero *Leishmania*, no qual mais de 20 espécies são conhecidas como infectantes para os seres humanos (KILLICK-KENDRICK; RIOUX, 2002). A doença é transmitida por insetos fêmeas de flebotomíneos infectados, e afeta principalmente as pessoas pobres na África, Ásia e América Latina, sendo associada à desnutrição, deslocamento da população, condições precárias de habitação, sistema imunológico debilitado e falta de recursos. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO), mais de 98 países e territórios são endêmicos para leishmaniose, com registro de 20.000 a 40.000 mortes por ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

As leishmanioses apresentam manifestação cutânea ou visceral, conhecidas como Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV), respectivamente. Possuem caráter zoonótico que acometem o homem e diversas espécies de animais domésticos e silvestres (CHANCE et al., 1978). Estima-se que cerca de 500 mil casos novos de LV ocorrem a cada ano em todo o mundo. Mais de 90% dos casos de LV globais ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul (DESJEUX, 2001; VERMA et al., 2010).

Apesar de seu caráter rural, levantamentos epidemiológicos no Brasil demonstram que a incidência de LV está em expansão e urbanização, estando presente em 21 Estados da Federação, atingindo todas as cinco regiões do país, causando surtos e apresentando, em alguns estudos, uma tendência ao aumento da letalidade (BRASIL, 2009, 2011a, 2011b). Na década de 1990, cerca de 90% dos casos de LV ocorriam na região Nordeste, no entanto, este quadro vem se modificando ao longo do tempo. No período de 2010 à 2015, o Brasil registrou cerca de 22.044 casos de LV, sendo que destes, 55,1% dos casos ocorreram no Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE. BRASIL, 2016).

No estado de Sergipe, casos de LV vêm sendo registrados desde 1934 (TAVARES; TAVARES, 1999). No período de 2000 a 2015, Sergipe registrou cerca de 854 casos confirmados, apresentando uma média de 57 casos por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE. BRASIL, 2016).

A LV é mais frequente em crianças menores de 10 anos (54,4%), sendo que dentro desta faixa, a frequência é mais intensa em crianças de até quatro anos. Nas demais faixas etárias observa-se uma distribuição homogênea, e o gênero masculino é proporcionalmente o mais afetado, cerca de 60% (BRASIL, 2009; GÓES; JERALDO; OLIVEIRA, 2013). A razão da maior susceptibilidade das crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular, agravado pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas, além de uma maior exposição ao vetor no peridomicílio (BRASIL, 2009).

As manifestações clínicas da LV exibem um largo espectro que varia de maneira discreta ou sem sintomas à forma clássica da doença. Estas manifestações são classificadas nas formas: assintomática (apenas infecção), subclínica (também denominada oligossintomática) e outra chamada clássica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

A forma assintomática é a mais comum dentre todas e não há evidência de manifestações clínicas. Está, normalmente, associada com a presença de casos de LV na família ou vizinhos, o que pode sugerir a exposição aos mesmos fatores de risco, principalmente quando comparados entre membros de uma mesma família. Cerca de 20% destes indivíduos podem apresentar manifestações clínicas, desenvolvendo a chamada forma aguda e os demais podem permanecer assintomáticos ou evoluir para a forma oligossintomática da doença (D'OLIVEIRA JÚNIOR et al., 1997). O indivíduo apresenta reatividade cutânea de hipersensibilidade tardia (DTH) positiva para antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), também conhecido como teste de Montenegro.

A forma oligossintomática acomete, geralmente, crianças de áreas endêmicas. O quadro clínico é discreto, com manifestação de febre, pequena hepatomegalia, hiperglobulinemia, aumento do VHS (Velocidade de Hemossedimentação) e sorologia positiva para LV. A forma subclínica não está associada à esplenomegalia ou leucopenias importantes. Na verdade, quando ocorrem estas alterações, costuma-se dizer que houve uma manifestação específica da doença clinicamente detectável. Tem-se demonstrado, também, que a maioria dos casos subclínicos evolui para a cura espontânea ao invés da doença clínica (KAFETZIS, 2003; TAVARES; TAVARES, 1999).

A forma clássica da doença tem como principais sintomas a febre de longa duração, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia, plaquetopenia e perda de peso (MURRAY et al., 2005). O agravamento da forma clássica pode levar o paciente a evoluir para forma grave, onde há uma severa diminuição de neutrófilos e plaquetas, favorecendo infecções bacterianas e quadros hemorrágicos, respectivamente, que podem levar o paciente ao óbito (SAMPAIO et al., 2010). Sampaio et. al. (2010) propuseram um *score* de gravidade para LV composto por

seis preditores de risco em morte em pacientes (Tabela 1). O paciente que totalizar 3 pontos é classificado como grave.

**Tabela 1-** Sistema de *score* prognóstico para LV grave.

Variável	Score
Dispneia	1
Infecções associadas	1
Contagem de neutrófilos <500 / mm <sup>3</sup>	1
Icterícia	2
Manifestações hemorrágicas	2
Total de plaquetas <50.000 / mm <sup>3</sup>	3

Dado extraído e adaptado (SAMPAIO et al., 2010)

A apresentação da forma clínica da doença está associada à virulência da cepa do parasito, e principalmente ao sistema imune do hospedeiro (BOAKYE.; WILSON; KWEKU, 2005), sendo importante destacar que essas formas clínicas não são exclusivas, podendo o paciente migrar da forma oligossintomática para sintomática ou grave.

## 2.2 Ciclo biológico da *Leishmania*

*Leishmania sp.* é um parasito unicelular e heteroxeno, transmitido entre diversos mamíferos por insetos vetores do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (NIETO et al., 2011). Durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectadas, a forma promastigota (longas, flageladas e extracelulares) do parasito é inoculada no hospedeiro vertebrado, e provoca uma reação inflamatória local com recrutamento de células do sistema fagocitário mononuclear (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). No momento da fagocitose, as promastigotas são internalizadas em um vacúolo que se funde com lisossomos, originando o vacúolo parasitóforo. Para escapar do ambiente ácido e de enzimas que possam destruí-las, as promastigotas se transformam em formas amastigotas (esféricas, intracelulares e sem flagelo) que resistem à ação do vacúolo parasitóforo e se multiplicam. Após sucessivas multiplicações ocorre o rompimento das células infectadas e as formas amastigotas infectam

novas células do hospedeiro, onde na LV, tem como órgãos alvos o baço, fígado, linfonodos e medula óssea (DESCOTEAUX; TURCO, 1999). O ciclo continua quando um flebotomíneo se alimenta de um hospedeiro infectado, ingerindo parasitos que irão se reproduzir no seu tubo digestivo, transformando-se novamente em promastigotas. Após o estágio de metaciclogênese, é alcançada a forma metacíclica infectante na glândula salivar do inseto. Desta forma, o ciclo é completado quando num próximo repasto sanguíneo do inseto, parasitos são novamente inoculados em algum hospedeiro vertebrado (STUART et al., 2008).

### **2.3 Neutrófilos: características gerais**

Durante as fases iniciais da infecção, a resposta da imunidade inata é bastante importante para a sobrevivência do hospedeiro. Dentre as principais células efetoras desta imunidade encontram-se os neutrófilos, que são os leucócitos mais abundantes e constituem cerca de 60 a 70% da circulação das células brancas no sangue (SHESHACHALAM et al., 2014).

Os neutrófilos são terminalmente formados através da proliferação e diferenciação das células precursoras da medula óssea durante a hematopoiese, através da estimulação de citocinas, principalmente o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), que culminam em sua formação, a uma taxa de  $10^{11}$  por dia, podendo chegar a  $10^{12}$  por dia durante uma infecção (MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014).

Os receptores de quimiocina CXCR4 e CXCR2 são essenciais, para a manutenção e liberação dos neutrófilos na medula óssea, respectivamente. Por esses receptores serem expressos em células endoteliais, estromais e osteoclastos, fazem com que os neutrófilos fiquem retidos na medula até completarem totalmente seu processo de maturação (SILVA, 2015). Após a maturação, os neutrófilos são liberados da medula e vão para corrente sanguínea, e quando ocorre uma lesão física, mecânica ou infecção, sinais inflamatórios são produzidos pelas células do hospedeiro e por produtos secretados pelo patógeno. Esses fatores estimuladores irão desencadear uma série de respostas do organismo, que vão desde a estimulação da expressão de moléculas de adesão da superfamília das selectinas (tipo E e P) e das integrinas (ICAMs- moléculas de adesão intercelular) pelas células endoteliais próximas ao local de inflamação, até a sinalização para o aumento da produção leucocitária nas células progenitoras da medula óssea via IL-17 (MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014).

Os neutrófilos são considerados como a primeira linha de defesa do sistema imunológico, pois são capazes de migrar rapidamente para o local da infecção e mediar as fases

iniciais da resposta inflamatória. O processo de migração dos neutrófilos dos vasos sanguíneos para o sítio da infecção ocorre através da interação entre selectinas do endotélio e dos neutrófilos, promovendo o rolamento seguido de uma firme adesão dessas células ao endotélio e posterior transmigração através do endotélio e membrana basal (KENNEDY; DELEO, 2009). Uma vez no líquido intersticial, os neutrófilos são atraídos pelo gradiente quimiotático para o local da infecção, onde ocorrerá o reconhecimento do patógeno via receptores presentes na membrana do neutrófilo do tipo Fc (Fc $\gamma$ RIIa/ CD32, Fc $\gamma$ RIIIb/ CD16 e Fc $\gamma$ RIV), capazes de identificar mediadores solúveis oriundos do sistema complemento, e imunoglobulinas (IgG), que agem com a função de opsonização do microrganismo, como também através de receptores de padrões moleculares associados a patógenos (PRR), principalmente os do tipo TLR, que levará a fagocitose do patógeno e ativação de mecanismos microbicidas dos neutrófilos, como degranulação, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e produção de citocinas e quimiocinas (BORREGAARD, 2010; MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014).

À medida que o neutrófilo é ativado, os grânulos presentes no citoplasma são mobilizados e fundem com o fagossomo ou com a membrana plasmática. Estes grânulos são reservas de proteínas e peptídeos que possuem diversos papéis em resposta a estímulos inflamatórios, onde são classificados de acordo com a sua ordem de formação, tamanho, morfologia e pela presença de mieloperoxidase (MPO), sendo divididos em:

- **Grânulos primários:** também conhecidos como azurófilos ou MPO-positivos, como o próprio nome sugere, são os maiores e primeiros grânulos a serem produzidos, contêm mieloperoxidase,  $\alpha$ -defensinas, lisozima, elastase neutrofílica, protease 3 e catepsina 3, que são responsáveis pela maior parte da resposta microbicida;

- **Grânulos secundários:** também conhecidos como específicos, são menores e formados após os grânulos primários, MPO-negativos, possuem lactoferrina, lisozimas e proteínas presentes na membrana plasmática;

- **Grânulos terciários:** são os menores e últimos grânulos a serem formados, MPO-negativos, têm poucas proteínas antimicrobicidas, porém servem como estoque de metaloproteinases, tais como gelatinase (BORREGAARD, 2010).

A diferença no conteúdo destes grânulos ocorre devido a mudança que os neutrófilos passam em sua biologia, desde o seu processo de maturação na medula óssea até a chegada no local da inflamação, alterando seu perfil transcricional. Como a formação dos grânulos ocorre através de vesículas que brotam do complexo de Golgi e se fundem, formando uma estrutura granular, cujo conteúdo é determinado pelo programa de transcrição proteica ativo no momento da sua formação, o conteúdo dos grânulos também altera (SHESHACHALAM et al., 2014).

A resposta imunológica rápida dos neutrófilos não depende apenas parcialmente das proteínas granulares pré-formadas com atividade antimicrobiana, mas também da capacidade de gerar atividade de explosão respiratória (SHESHACHALAM et al., 2014). A produção de ROS acontece na membrana plasmática do fagolisossomo, que é dependente da participação de todos os grânulos, principalmente dos específicos, pois eles apresentam o citocromo b<sub>558</sub> em sua membrana, que, ao fundir-se com o fagossomo, torna um componente essencial na formação da NADPH oxidase, possibilitando o transporte de elétrons entre o NADPH no citoplasma para o O<sub>2</sub> presente no lúmen do fagossomo, colaborando para a principal atividade desse complexo, a geração de superóxido de oxigênio (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) através da redução molecular do oxigênio (O<sub>2</sub>), que induz o influxo de íons H<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>. Esse gradiente de íons leva à fusão dos grânulos azurófilos e de grânulos específicos ao fagolisossomo, onde proteases séricas solúveis são liberadas. O superóxido e os íons 2H<sup>+</sup> formam peróxido de hidrogênio que é convertido em ácido hipocloroso (HClO), letal para o patógeno (BORREGAARD, 2010).

Outro mecanismo que vem sendo descrito é a formação de NETs “*neutrophil extracellular traps*” (armadilhas extracelulares de neutrófilos), onde os neutrófilos estimulados liberam histonas de DNA, proteínas e enzimas dos grânulos que juntos formam uma rede de fibras extracelular capaz de imobilizar e matar patógenos (BRINKMANN, 2004). Ainda não é claro os mecanismos moleculares pelos quais se dá a formação de NET, mas sabe-se que os neutrófilos seguem os estímulos vindos do microrganismo e seguem essa via como última opção. Primeiro fagocitam, depois fazem a degranulação e, por fim, entram em apoptose ou NETose (PILLAY et al., 2013).

Além disso, a participação dos neutrófilos na ativação e modulação da resposta imune adaptativa vem sendo estudada. O aparecimento de novos estudos colocam o neutrófilo agindo ativamente em fases da resposta imune em que se pensava serem desempenhados somente por outras células. As citocinas imunorreguladoras liberadas pelos neutrófilos são capazes de comandar a rede de sinalização e interagir com as outras células do sistema imune modulando sua resposta, tais como os macrófagos, células dendríticas, natural killer (NK) e linfócitos (MANTOVANI et al., 2011; MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014).

## **2.4 Neutrófilos e a infecção por *Leishmania***

A *Leishmania sp.* é um parasito intracelular obrigatório no hospedeiro vertebrado e infecta células do sistema imunológico, podendo escapar da resposta imune do hospedeiro. Como constituem a primeira linha de defesa do organismo, os neutrófilos entram em contato precoce com promastigotas de *Leishmania*, e podem desempenhar um papel importante tanto para o controle, como para disseminação da infecção (GUIMARAES-COSTA et al., 2009; LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003).

Estudos em camundongos mostraram que os neutrófilos são predominantemente recrutados e infectados nas fases iniciais de infecção na pele (TACCHINI-COTTIER et al., 2000). Ribeiro-Gomes et al. (2007) observaram que após quatro horas de infecção por *L. major*, ocorreu um recrutamento maior de neutrófilos, enquanto que o pico de recrutamento de monócitos ocorreu um dia após a infecção. Em modelo de leishmaniose visceral esse recrutamento foi um pouco mais tardio, onde foi observado que em camundongos infectados com *L. infantum*, o pico de migração de neutrófilos ocorreu seis horas após a inoculação dos parasitos na orelha, e o pico de migração de macrófagos ocorreu após três dias de infecção. Além disso, foi observada também a presença de neutrófilos infectados, e essa situação se manteve até um dia após a infecção (THALHOFER et al., 2011).

O papel dos neutrófilos durante as fases iniciais da infecção é complexo e multifacetado. Estudos demonstram que os neutrófilos que entram em contato, mas não matam promastigotas, podem agir como “Cavalos de Tróia” (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003) ou “Coelhos de Tróia” (RITTER; FRISCHKNECHT; VAN ZANDBERGEN, 2009), pelo qual células parasitadas ou parasitas livres que escaparam de neutrófilos, respectivamente, podem ser facilmente internalizados pelos fagócitos vizinhos (tais como macrófagos ou células dendríticas) de uma maneira que possa contribuir para o aumento da infecção e persistência do parasito. Por outro lado, foi demonstrado que os neutrófilos possuem alguma atividade leishmanicida direta *in vitro*, sugerindo que estas células podem representar um importante componente da resposta imune contra promastigotas (CARLSEN et al., 2013; GUIMARAES-COSTA et al., 2009).

Na LV a ativação dos neutrófilos é uma importante via para o controle da infecção (YIZENGAW et al., 2016). Em pacientes com LV, o alto estado inflamatório com uma resposta imune exacerbada contribui na patogênese da doença (COSTA et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2016; SANTOS-OLIVEIRA et al., 2013), visto que, estes pacientes são severamente neutropênicos, e de fato, infecções são comuns nesses indivíduos e são as principais causas de óbitos (ENDRIS et al., 2014). Um ensaio clínico demonstrou que a adição de fator estimulante de colônias granulócitos-macrófagos (GM-CSF) à terapia antimonial pentavalente melhorou a

neutropenia em pacientes com LV e reduziu o risco de adquirir infecção secundária, enfatizando ainda mais o papel dos neutrófilos durante a LV (BADARÓ et al., 1994).

A fagocitose de *L. major* por neutrófilos humanos previne a fusão com grânulos primários e terciários, que contêm as máquinas necessárias para a geração e acidificação das espécies reativas de oxigênio, que são os processos críticos para sobrevivência do parasito (MOLLINEDO et al., 2010). As espécies *L. donovani* (GABRIEL et al., 2011) e *L. infantum* (GUIMARÃES-COSTA et al., 2014), são capazes de induzir a liberação de NETs. Entretanto, apenas a sobrevivência de *L. infantum* que foi comprometida através da atividade de NETs. Ao passo que a sobrevivência de *L. donovani* não foi comprometida. Estes resultados, não só demonstram as multifaces dos neutrófilos, como também, revelam as diferenças entre as espécies de parasitos pertencentes ao mesmo gênero. Deste modo, devido à diversidade de respostas, o papel dos neutrófilos na promoção da resistência do hospedeiro ou susceptibilidade à infecção por *Leishmania* ainda é um assunto controverso e precisa ser melhor explorado.

## 2.5 Papel do TREM-1 na resposta imune

A descoberta de um receptor associado à DAP12 em Células NK, chamado NKp44 (CANTONI et al., 1999), sugeriu a possível existência de receptores associados a DAP12 ainda desconhecidos também em outras células envolvidas em respostas inatas. Através da pesquisa na base de dados do GenBank, utilizando a sequência de cDNA (DNA complementar) com o polipéptido NKp44, Bouchon, Dietrich e Colonna (2000), identificaram novos receptores da superfamília de imunoglobulinas (Ig), constitutivamente expressos em células mielóides. Estes receptores foram designados TREM (*Triggering Receptor Expressed Myeloid Cells*), e constituem uma família de receptores de superfície celular que participa de diversos processos celulares, como inflamação, coagulação e homeostase óssea. Um desses receptores, TREM-1, intercede respostas inflamatórias, desempenhando um importante papel nas infecções sistêmicas (ARTS et al., 2013).

TREM-1 é constitutivamente expresso em neutrófilos e em subconjuntos de monócitos e macrófagos, e a sua ativação induz a secreção de quimiocinas e citocinas inflamatórias, como IL-8 e MPO em neutrófilos, e MCP-1, IL-8 e TNF- $\alpha$  em monócitos (BOUCHON; DIETRICH; COLONNA, 2000). Arts et al. (2013) também relatam a produção de outras citocinas e quimiocinas, além de IL-8 e TNF- $\alpha$ , tais como: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 e IL-12p40, MIP-1 $\alpha$ , membrana cofator da proteína-1 e -2, e GM-CSF; e também moléculas co-estimulatórias, como

CD1a, CD86 e MHC de classe II, enquanto que uma diminuição da produção de IL-10 foi observada.

Estudos vêm demonstrando que o TREM-1 modula vias de sinalização induzidas por classes conhecidas de PRRs (receptores de reconhecimento de padrões), como TLRs (Toll-like Receptors) e NLRs (NOD-like Receptors) (ARTS et al., 2013). Os TLRs identificam os patógenos e ativam as células da imunidade inata para eliminá-lo e moldar a resposta imune adaptativa. A sinergia TREM-1 e TLRs promove a produção de citocinas pró-inflamatórias em monócitos (GIBOT et al., 2004a, 2004b) e em neutrófilos (BOUCHON; DIETRICH; COLONNA, 2000; RADSAK et al., 2004). No entanto, antes da cascata de sinalização de TREM-1 ser iniciada, este receptor precisa se ligar a um ligante. Embora o ligante exato ainda não tenha sido determinado, vários ligantes putativos estão sendo propostos. Diferentes hipóteses sugerem que a expressão do TREM-1 é mais regulada mediante a exposição de células a produtos microbianos, indicando assim, que o ligante do TREM-1 está presente no patógeno (ARTS et al., 2013; BOUCHON; DIETRICH; COLONNA, 2000).

Há sugestões que peptidoglicanos na superfície de bactérias Gram-positivas e endotoxinas de bactérias Gram-negativas podem estar envolvidos na estimulação de TREM-1 (ARTS et al., 2013; BOUCHON; DIETRICH; COLONNA, 2000; BUCKLAND et al., 2011; POUKOULIDOU et al., 2011). Porém, estudos mais detalhados são necessários para comprovar essa hipótese. Além disso, os ligantes naturais de TREM-1 também pode se ligar ao TLR4 ou as estruturas responsáveis pelo reconhecimento de LPS.

Modelos experimentais de camundongos com pneumonia por *Streptococcus pneumoniae* e asma induzida por *Aspergillus fumigatus* demonstram que a estimulação de TREM-1 parece exercer eficazes respostas antibacterianas e antifúngicas, exercendo um papel protetor na resposta imune inata (BUCKLAND et al., 2011; LAGLER et al., 2009). O aumento da regulação do TREM-1 parece ser um passo crucial durante o início da resposta de citocinas contra o choque séptico, assim como em outras infecções (BOUCHON et al., 2001).

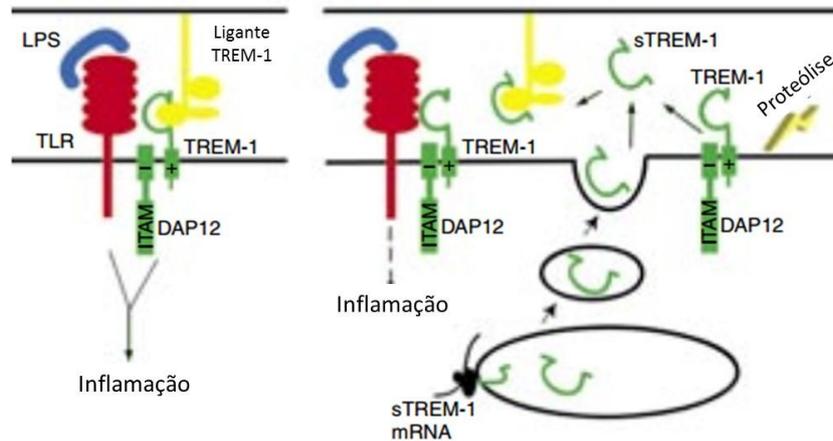
A fim de investigar o papel do TREM-1 na homeostase e na doença, Weber et al. (2014), por meio de um modelo experimental de infecção e inflamação por *Leishmania major*, vírus influenza e *Legionella pneumophila* em camundongos deficientes para TREM-1, observaram que a completa ausência de TREM-1 atenua significativamente a morbidade de patologias imuno-mediadas, enquanto o controle microbiano continua intacto. Estes achados não só demonstram um claro papel inesperado para TREM-1 em doenças inflamatórias crônicas, infecções parasitárias e virais, mas também ilustram o potencial de uma intervenção terapêutica em várias configurações de doenças.

A resposta inicial a *Leishmania* é essencial para determinar o desenvolvimento ou resistência da doença. *In vitro*, a resposta divergente a *Leishmania*, caracterizada por alta ou baixa produção de IFN- $\gamma$  tem sido descrita como uma ferramenta potencial para prever tanto a resposta da vacina como a susceptibilidade à doença *in vivo*. Neste sentido, Carneiro et al., (2016), ao estimular com *Leishmania braziliensis* células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis, identificaram que os indivíduos não infectados e saudáveis apresentavam perfis diferentes, alguns com altas e outros com baixa produção de IFN- $\gamma$ . Através da análise de expressão gênica utilizando matrizes de genes imunes os autores verificaram que o grupo de altos produtores expressavam os genes CCL7, IL-8, IFI44L e IL-1 $\beta$ , os quais foram associados com vias relacionadas com a sinalização de IL-17 e TREM-1. O possível envolvimento de TREM-1 preferencialmente em indivíduos altos produtores de INF- $\gamma$  parece sugerir que uma resposta mais forte de *Leishmania* em seres humanos talvez esteja implicada na destruição de tecidos, levando ao desenvolvimento de lesões (CARNEIRO et al., 2016).

A forma solúvel do TREM-1 (sTREM-1) pode ser oriunda da clivagem proteolítica do TREM-1 de superfície, através da ação de metaloproteínases (GÓMEZ-PIÑA et al., 2007), ou da tradução de um processamento alternativo de TREM-1 (Figura 1), e tem sido relatada em doenças como sepse e artrite reumatoide, e elevados níveis no soro são indicativos de infecções microbianas e doenças inflamatórias não-infecciosas (GIBOT et al., 2004b; GÓMEZ-PIÑA et al., 2007; OKU et al., 2013). No entanto, esta forma solúvel do TREM-1, presente no soro e outros fluidos corporais, funciona como um inibidor, impedindo a ligação do ligante ao receptor de membrana do TREM-1, que acarretará na inibição de ativação desta via (DU et al., 2016; GIBOT et al., 2006; YUAN et al., 2015).

Alguns trabalhos também relatam que sTREM-1 pode ser utilizado como um biomarcador indireto de inflamação sistêmica (DETERMANN et al., 2009). Ruiz-Pacheco et al. (2014) sugerem que a redução da expressão de TREM-1 de superfície em neutrófilos, bem como o aumento de sTREM-1 durante a infecção pelo vírus da dengue (DENV), pode ser um mecanismo compensatório do sistema imunológico, como resultado do alto estado inflamatório, característico da infecção por DENV. No entanto, os autores ressaltam que não pode ser excluído o efeito anti-inflamatório do sTREM-1 que pode, indiretamente, beneficiar a infecção pelo DENV durante as fases iniciais do processo através do atraso da mensagem de alerta, que subsequentemente afetará o recrutamento de componentes da imunidade adaptativa.

Uma vez que na LV é observada uma elevada quantidade de citocinas, a avaliação do TREM-1 pode ser importante para a compreensão da resposta inflamatória na patogênese da doença.



**Figura 1-** Via esquemática de TREM-1 e sTREM-1 na inflamação. TREM-1 amplifica a sinalização TLR para mediar respostas inflamatórias (esquerda). O sTREM-1 pode ser gerado a partir de clivagem proteolítica do TREM-1 de superfície, ou da tradução de um processamento alternativo de TREM-1. Quando sTREM-1 é liberado para o soro, pode eliminar o(s) ligante(s) de TREM-1 disponível, possivelmente impedindo a amplificação adicional do sinal inflamatório e, deste modo, contendo a inflamação (direita). (Adaptado de KLESNEY-TAIT; TURNBULL; COLONNA, 2006)

### **3.1 Geral**

Avaliar os níveis séricos de sTREM-1 nos pacientes com leishmaniose visceral e investigar o efeito da *L. infantum* na modulação de TREM-1 em neutrófilos.

### **3.2 Específicos**

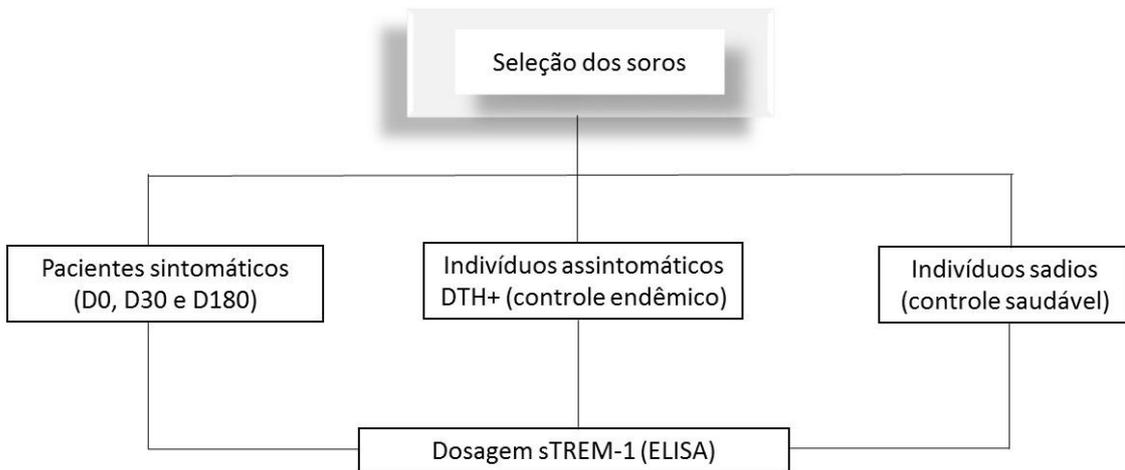
- 1- Avaliar a associação de níveis séricos de TREM-1 com as formas clínicas da doença;
- 2- Avaliar a liberação de sTREM-1 e MMP-9 em neutrófilos expostos à *L. infantum*;
- 3- Avaliar a expressão de TREM-1 de superfície em neutrófilos expostos à *L. infantum*;
- 4- Avaliar a expressão gênica de TREM-1, DAP12 e IL-8 em neutrófilos expostos à *L. infantum*.

## 4 DESENHO DO ESTUDO

---

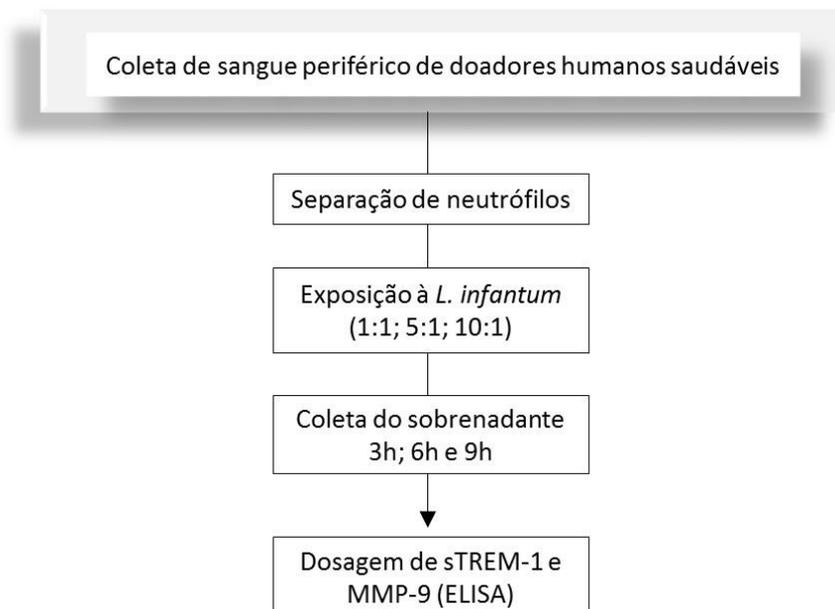
### 4.1 Objetivo específico 1

Avaliar a associação de níveis séricos de TREM-1 com as formas clínicas da doença.



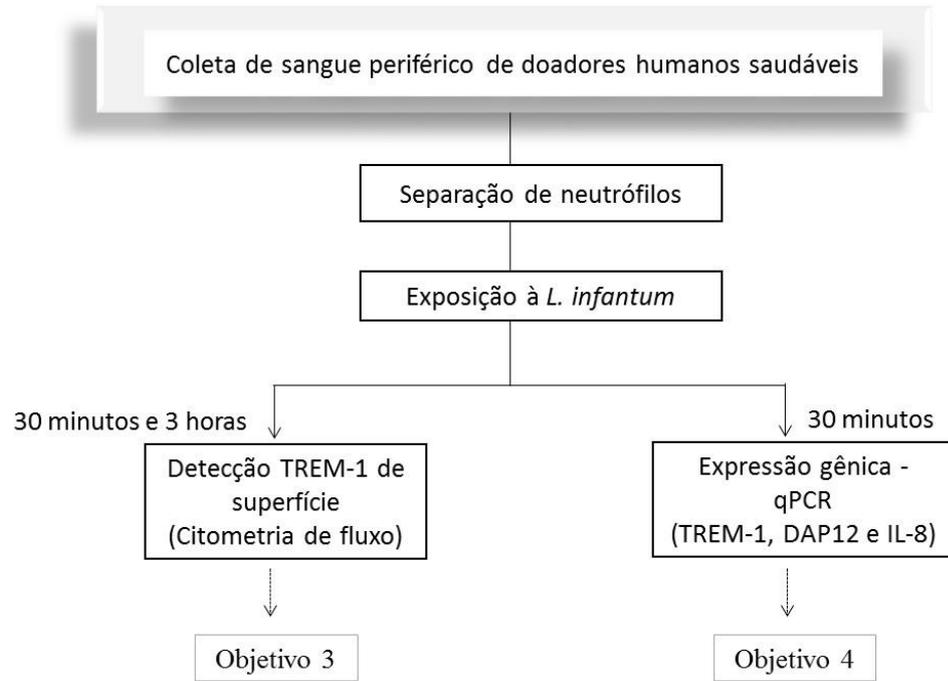
### 4.2 Objetivo específico 2

Avaliar a liberação de sTREM-1 e MMP-9 em neutrófilos expostos à *L. infantum*.



### 4.3 Objetivos específicos 3 e 4

- Avaliar a expressão de TREM-1 de superfície em neutrófilos expostos à *L. infantum*;
- Avaliar a expressão gênica de TREM-1, DAP12 e IL-8 em neutrófilos expostos à *L. infantum*.



## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 5.1 População estudada e aspectos éticos

Neste estudo foram utilizadas amostras de soros de indivíduos classificados em quatro grupos com base nas características clínicas:

- **Indivíduos com LV clássica (n=21):** pacientes com manifestação clássica de LV antes de receber o tratamento (D0), e com 30 e 180 dias pós-tratamento (D30 e D180).
- **Indivíduos com LV grave (n=8):** pacientes com manifestação grave de LV antes de receber o tratamento (D0). O prognóstico de gravidade foi baseado no *score* clínico descrito por Sampaio et al. (2010), sendo ele: dispneia, infecções associadas, contagem de neutrófilos  $<500 / \text{mm}^3$ , icterícia, manifestações hemorrágicas e contagem de plaquetas  $<50.000 / \text{mm}^3$ ;
- **Indivíduos assintomáticos (DTH+) (n=8):** familiares de pacientes com LV em que após realizar o teste de hipersensibilidade tardia (DTH) foi considerado positivo, com endurecimento no local do teste apresentando um diâmetro maior que cinco milímetros, detectável após 72 horas. Esses indivíduos foram infectados por *Leishmania*, no entanto, não desenvolveram a doença para sua forma clássica, sendo chamados de indivíduos assintomático.
- **Indivíduos saudáveis (Controles) (n=17):** indivíduos sadios, sem nenhum sinal ou sintoma clínico e que não apresentaram relatos de infecção prévia por *Leishmania*.

Os referidos pacientes com LV receberam acompanhamento ambulatorial e foram diagnosticados com LV através das características clínicas (febre, perda de peso, anemia, aumento do baço e do fígado, pancitopenia e hipergamaglobulinemia) e confirmação laboratorial baseada na observação direta do parasito em amostras de biópsia de medula óssea ou amostra de cultura do parasito em meio NNN (Neal, Novy, Nicolle) (Sigma-Aldrich), ou teste sorológico rK39 positivo (Kalazar Detect® Teste Rápido; INBIOS International Inc., Seattle, WA). Após o diagnóstico, os pacientes receberam tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde.

Grávidas, pacientes que receberam tratamentos imunossupressores e pacientes com comorbidades (incluindo infecção pelo HIV e malignidade) foram excluídos do estudo.

Para os experimentos de infecção *in vitro* foram utilizadas apenas amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis.

O presente estudo envolveu pesquisa com seres humanos e seguiu as instruções da Resolução 466/12, o qual foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário, Universidade Federal de Sergipe (CAAE-53366916.8.0000.5546).

## **5.2 Dosagem de sTREM-1 e MMP-9**

Os níveis séricos da molécula inflamatória sTREM-1 no soro e no sobrenadante da cultura de células foram quantificados por ensaio imunoenzimático ELISA, utilizando-se material e reagentes providos por *kit* de análise específico (DuoSet- Human TREM-1, R&D System, Minneapolis, USA), com limite de detecção entre 93,80 à 6.000 pg/mL. O *kit* é composto com anticorpo de captura anti-TREM-1 humano (anticorpo policlonal de cabra); anticorpo de detecção anti-TREM-1 humano (anticorpo policlonal de cabra biotinizado); proteína estreptavidina conjugada à enzima peroxidase, diluída 1:200, e substrato TMB, contendo peróxido de hidrogênio e cromóforo.

A dosagem de MMP-9 no sobrenadante da cultura de neutrófilos também foi realizada por ensaio imunoenzimático ELISA (Human MMP-9, Invitrogen), com limite de detecção entre 10 à 1500 pg/mL.

Ambos os ensaios foram realizados conforme protocolo descrito no *kit* de análise. Os níveis de sTREM-1 e MMP-9 foram mensurados a partir dos valores obtidos com a curva padrão realizada com as diferentes diluições conhecidas da proteína recombinante fornecida pelo *kit*.

## **5.3 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) (Sigma®).

## 5.4 Parasitos

O parasito *L. Infantum* (cepa LVHSE 49) utilizado neste estudo foi isolado de um paciente com LV em 2010 na cidade de Aracaju / SE. O parasito foi isolado através da punção da medula óssea, seguido do cultivo em meio NNN suplementado com Schneider completo. Após o crescimento, foi adicionado em um novo meio contendo apenas Schneider completo, e ao atingir a fase estacionária foi adicionado na solução de congelamento (90% de SFB + 10% DMSO- dimetilsulfóxido) e armazenado em ultrafreezer (Revco®). Para uso nos experimentos, os parasitos congelados foram retirados do ultrafreezer e descongelados à temperatura ambiente (25°C). Em seguida, foram realizadas duas lavagens adicionando-se 10 mL de solução salina e centrifugando-se a 1620 g / 4°C, para obtenção do pellet de parasitos. Logo após, os parasitos foram ressuspensos em 3 mL de meio Schneider completo. As culturas foram mantidas em estufa B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio), a temperatura de 24°C. Posteriormente (cerca de 3 a 7 dias), os parasitos foram re-inoculados pela transferência de  $1 \times 10^5$  promastigotas/mL para uma nova garrafa de cultura contendo Schneider completo, e mantidos em estufa B.O.D. A curva de crescimento dos parasitos foi realizada através de contagens diárias destes na cultura, utilizando câmara de Neubauer. Tal etapa teve como meta determinar 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 estas utilizadas para os experimentos de infecção. Deste modo, foi padronizado 5 dias, como tempo de cultivo do parasito para a infecção dos neutrófilos.

## 5.5 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 / 304 g / 25°C. Após a centrifugação, duas bandas são detectáveis: a primeira constituída de células mononucleares e a segunda banda enriquecida por PMN, caracteristicamente neutrófilos (aproximadamente 94% de pureza). Os neutrófilos foram recolhidos e lavados três vezes com salina a 4°C / 304 g / 10 minutos. Em seguida, foi realizada a contagem das células em câmara de 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  $5 \times 10^5$  células por poço, em placa de 96 poços.

## 5.6 Exposição dos neutrófilos à *L. infantum*

Os neutrófilos foram expostos à promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária, com uma taxa de infecção de 1, 5 ou 10 parasitos por neutrófilo, durante 30 minutos, 3, 6 ou 9 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. A taxa de infecção e o tempo de exposição foi de acordo com o objetivo e padronização prévia de cada experimento.

## 5.7 Citometria de fluxo

Para os experimentos de citometria de fluxo, os parasitos foram previamente marcados com uma sonda fluorescente, CellTracker™ Violeta BMQC (Life Technologies™), para posterior exposição aos neutrófilos e detecção do TREM-1 na superfície das células. A metodologia das referidas etapas serão descritas abaixo:

### 5.7.1 Marcação dos parasitos

Os parasitos foram marcados previamente com a sonda CellTracker™, seguindo o protocolo descrito na literatura (DAGLEY et al., 2015). Resumidamente,  $3 \times 10^7$  células de *Leishmania* foram ressuspensas em 1 mL de RPMI puro contendo 5 µM de CellTracker™ e incubadas durante 30 minutos / 27°C. Em seguida, as células foram centrifugadas à 1000 g / 10 minutos / 4°C, ressuspensas em RPMI completo (suplementado com 10% de soro bovino fetal) e incubadas novamente durante 30 minutos / 27°C. Após esse período, as células foram centrifugadas, lavadas com PBS e ressuspensas no meio de cultura a ser usado nos experimentos com neutrófilos (RPMI).

A marcação dos parasitos com o CellTracker™ permitiu a identificação por citometria de fluxo das populações de neutrófilos que estavam infectados ou não com *Leishmania*. Esta sonda fluorescente atravessa livremente através da membrana das células. Após a conversão, a sonda se torna fluorescente, fica retida nas células vivas através de várias gerações, onde são transferidas para células filhas. Esta sonda é lida no canal do AmCyan-A (405 nm).

### 5.7.2 Detecção de TREM-1 de superfície

Após o tempo de exposição, a placa foi centrifugada para lavagem das células com PBS e remoção dos parasitos não internalizados (405 g / 4°C / 10 minutos). Em seguida, ocorreu a incubação das células com soro Fc Block (solução bloqueio - 50% de soro fetal de cabra, 50% de soro bovino fetal) na ausência de luz, durante 30 minutos / 4°C /. Este soro serve para bloquear ligações inespecíficas e aumentar a especificidade do teste. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo de superfície TREM-1-PE (Biolegend®) na ausência de luz / 4°C / 30 minutos. Logo após, as células foram lavadas novamente e ressuspensas em PBS para realização da leitura por citometria de fluxo.

### 5.7.3 Análise dos dados de citometria de fluxo

A leitura dos experimentos de citometria de fluxo foi realizada 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 população de neutrófilos foi definida 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 e a frequência total de neutrófilos TREM-1+. Foi criada também subpopulações (infectados: Leish+ e não infectados: Leish-) para avaliar onde ocorria a maior e menor expressão de TREM-1. Além disso, 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 uma maior expressão de moléculas na superfície celular. A fim de integrar as duas medidas de avaliação (frequência e MFI), foi empregada também a intensidade de fluorescência integrada (iMFI), que é obtida através da multiplicação da frequência de células pela intensidade média de fluorescência: **iMFI= frequência de células X MFI**.

## 5.8 Expressão gênica- qPCR em Tempo Real

Para os experimentos que avaliaram a expressão dos genes, inicialmente ocorreu a extração do RNA total das células, síntese de DNA complementar (cDNA) e posteriormente PCR quantitativa (qPCR). As metodologias das referidas etapas serão descritas abaixo:

### 5.8.1 Extração de RNA

Após o tempo de infecção, a placa foi centrifugada a 405 g / 4°C / 10 minutos. Em seguida, ocorreu a remoção do sobrenadante da cultura (armazenado em freezer -20°C), e o pellet contendo as células foi ressuscitado no reagente Trizol (Life Technologies™) e armazenado em freezer -80°C, para posterior extração do RNA, de acordo com as instruções do fabricante.

### 5.8.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para 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 o *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), cujas etapas de incubação foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante.

### 5.8.3 PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR)

As amplificações por PCR foram realizadas através do sistema TaqMan (ThermoScientific™), que consiste na utilização de sondas e *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) específicos para cada gene avaliado. As reações foram preparadas com reagentes padronizados para PCR em Tempo Real (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems), que foi adicionado aos conjuntos de *primers* específicos para cada gene avaliado. As condições da reação foram: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos e 40 repetições de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) a cada ciclo de

amplificação e, posteriormente, analisados pelo Software v2.3 (Applied Biosystems). Como controle endógeno das amostras foi utilizado o gene GAPDH, que é constitutivamente expresso na célula, essencial na via da glicólise e da glicogênese. Os níveis de expressão do gene alvo transcrito em cada amostra foram calculados pelo método do Ct comparativo (fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) após a normalização com o gene endógeno. Essa análise foi realizada pelos seguintes cálculos: ( $\Delta Ct = Ct_{\text{gene de interesse}} - Ct_{\text{gene endógeno}}$ ) seguido do cálculo ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{da amostra teste}} - \Delta Ct_{\text{amostra controle}}$ ). Os resultados foram expressos como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## 5.9 Curva ROC

A capacidade de distinção dos níveis séricos de sTREM-1 entre as formas clínicas e a presença / ausência da doença foi avaliada através da comparação dos níveis de admissão (D0) entre pacientes com leishmaniose visceral grave e os demais grupos. Para isso, foi utilizada a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) como uma ferramenta de análise que permite buscar um ponto de corte que resume os níveis plasmáticos em uma resposta dicotômica, de forma que um indivíduo com mensurações iguais ou menores ao ponto de corte (cut off), nesse caso, é classificado como “paciente não grave” e, de maneira análoga, um indivíduo com uma resposta ao teste maior que o ponto de corte é classificado como paciente grave (MARTINEZ, E. Z. LOUZADA-NETO, F. PEREIRA, 2003). Esta análise foi feita por meio de um método gráfico simples e robusto, que avalia a variação da sensibilidade e especificidade para diferentes valores de corte. A área abaixo da curva ROC (AUC) está associada ao poder discriminante do teste (MARTINEZ; LOUZADA-NETO; PEREIRA, 2003). A construção da curva foi realizada através do programa GraphPad Prism 6, cujo cut off foi determinado a partir da escolha entre o ponto onde ambas a sensibilidade e especificidade apresentavam valores mais elevados.

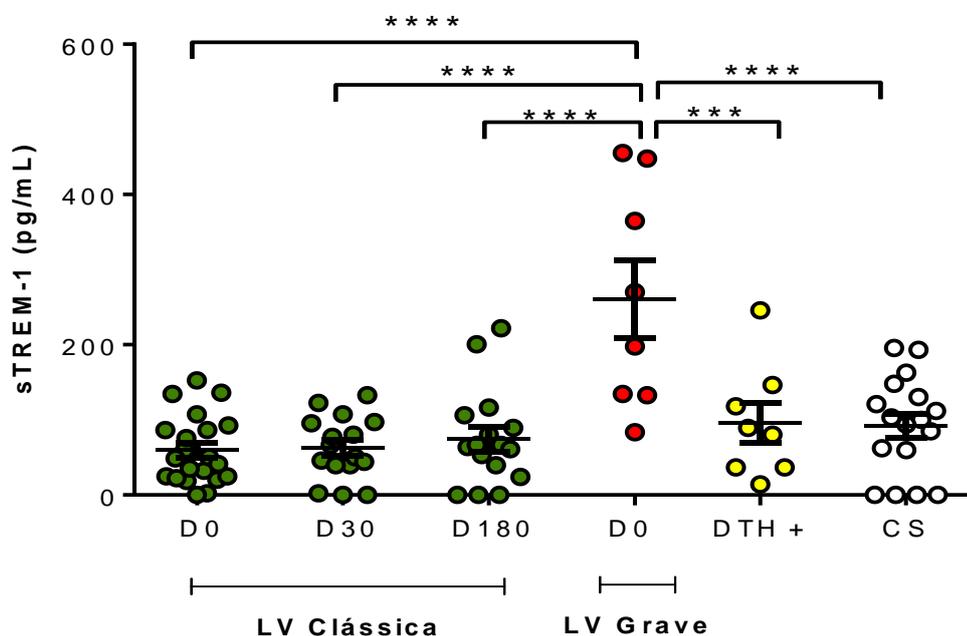
## 5.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos resultados obtidos foram feitas pelo programa GraphPad Prism 6. Todos os dados foram testados para avaliar seu perfil de normalidade através do teste Kolmogorov-Smirnov. Para os dados que apresentaram mais de um grupo e distribuição normal, foi aplicada a análise de

variância One-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Para aqueles que não apresentam distribuição normal, foi feito o teste não paramétrico Kruskal-Wallis para amostras não-pareadas e Friedman para amostras pareadas. Para dados normais que apresentaram apenas dois grupos a serem comparados, foi aplicado o teste T Student. Para aqueles que não apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste Mann-Whitney para amostras não-pareadas e Wilcoxon para amostras pareadas. Para as análises de correlação, foi utilizada a correlação de Pearson quando a distribuição de dados foi normal, e a correlação de Spearman quando a distribuição de dados não foi normal. Todos os valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 6.1 Níveis séricos de sTREM-1 associado à gravidade da LV

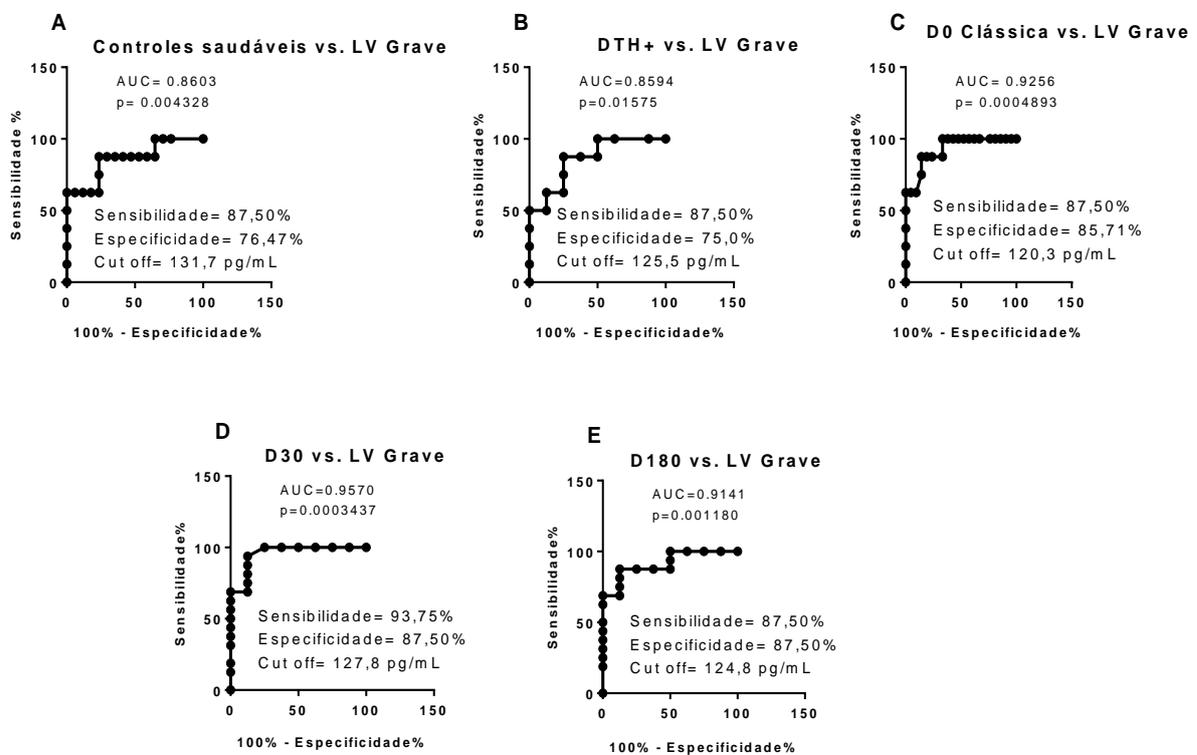
Para avaliar os níveis séricos de sTREM-1, soros de pacientes com LV, indivíduos DTH+ e controles saudáveis (CS) foram selecionados e quantificados por ELISA. O grupo de pacientes com LV antes do tratamento (D0) foi composto por pacientes com as formas clínicas clássica (D0 clássica) e grave (D0 grave) (Figura 2).



**Figura 2-** Níveis séricos de sTREM-1 dos pacientes com LV antes (D0) e pós-tratamento (D30 e D180), LV grave, indivíduos DTH+ e grupo controle, mensurados por ELISA. Cada ponto no gráfico representa um doador e as barras representam a média  $\pm$  erro padrão (SE). Dados analisados pelo teste paramétrico ANOVA com múltiplas comparações e pós-teste de Bonferroni (\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001).

Foi observado que os pacientes graves apresentaram níveis elevados de sTREM-1 em comparação com todos os demais grupos, apresentando uma diferença significativa ( $p>0,0001$ ). A média do nível de sTREM-1 ( $\pm$  SE) entre os pacientes com LV grave ( $260,8 \pm 51,99$ ) foi 4 vezes maior do que entre os pacientes com LV clássica D0 ( $59,59 \pm 9,87$ ) e D30 ( $62,61 \pm 10,54$ ), e cerca de 3 vezes maior que os pacientes D180 ( $74,38 \pm 16,07$ ), DTH+ ( $95,98 \pm 26,57$ ) e controle ( $92,92 \pm 15,80$ ).

Diante desse achado significativo, foi avaliado a utilidade prognóstica desta molécula plasmática comparando os níveis de admissão (D0) entre pacientes com leishmaniose visceral grave e os demais grupos, sendo calculada a área abaixo da curva ROC (AUC), o cut off (ponto de corte) e a sensibilidade e especificidade (Figura 3). Os níveis séricos de sTREM-1 foram capazes de discriminar a forma grave das formas clássicas, DTH+ e ausência da doença. Foi observada uma AUC acima de 0,8 com valor de  $p \leq 0,01$  em todas as curvas ROC. O melhor poder de discriminação foi entre LV grave de LV clássica D30 com uma sensibilidade de 93,75% e especificidade de 87,50%.



**Figura 3-** Curvas ROC dos níveis séricos de sTREM-1 em pacientes com LV grave comparado com os controles saudáveis (A), indivíduos DTH+ (B), LV clássica D0 (C), D30 (D) e D180 (E). A área sob a curva ROC (AUC) é exibida com intervalo de confiança de 95%, e o valor de  $p$  significativo.

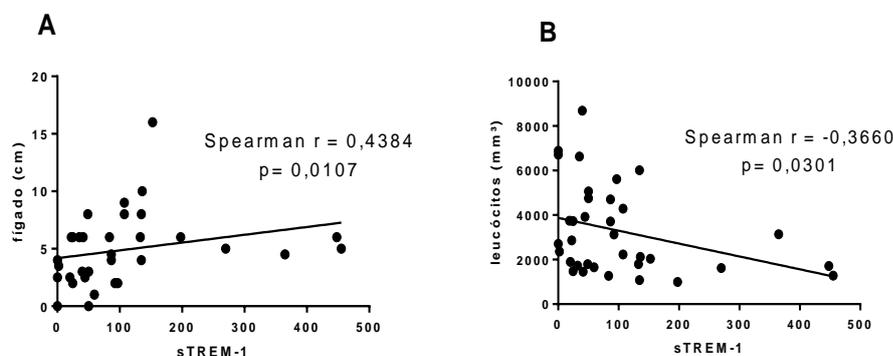
## 6.2 Dados clínicos dos pacientes com LV clássica e LV grave

Os parâmetros clínicos dos pacientes com LV grave e LV clássica antes do tratamento (D0) foram comparados (Tabela 2). Dentre os parâmetros avaliados, foi observada uma diminuição no número de leucócitos e neutrófilos nos pacientes graves.

**Tabela 2-** Dados clínicos dos pacientes com LV na fase de pré-tratamento. Os valores expressam a média  $\pm$  desvio padrão. O valor de p expressa a diferença estatística para os desfechos clínicos entre os dois grupos de pacientes com LV, analisadas através do teste T de Student para dados paramétricos e teste Mann-Whitney para dados não-paramétricos. O asterisco indica diferença significativa entre os grupos (\*  $p < 0,05$ ).

Variáveis	Pacientes com LV clássica (D0) (n=21)	Pacientes com LV Grave (D0) (n=8)	Valor de p
Sexo (M/F)	11/10	7/1	-
Idade	17,43 $\pm$ 16,77	27,25 $\pm$ 21,33	0,2016
Baço (cm)	8,094 $\pm$ 3,908	8,438 $\pm$ 3,267	0,7970
Fígado (cm)	5,417 $\pm$ 3,611	5,813 $\pm$ 1,067	0,2718
Leucócitos/mm <sup>3</sup>	3155 $\pm$ 1542	1613 $\pm$ 682,9	0,0120*
Neutrófilos/mm <sup>3</sup>	1059 $\pm$ 614,0	477,8 $\pm$ 259,4	0,0164*
Eosinófilos/mm <sup>3</sup>	19,49 $\pm$ 39,04	2,125 $\pm$ 5,617	0,0829
Linfócitos/mm <sup>3</sup>	1763 $\pm$ 1362	886,8 $\pm$ 629,0	0,0857
Monócitos/mm <sup>3</sup>	288,0 $\pm$ 233,4	207,6 $\pm$ 124,4	0,3967
Hemoglobina (g/dL)	8,603 $\pm$ 1,821	7,551 $\pm$ 1,112	0,1420
Hematócrito (%)	26,83 $\pm$ 5,398	23,46 $\pm$ 3,642	0,0643
Plaquetas/mm <sup>3</sup>	123995 $\pm$ 83215	96250 $\pm$ 56883	0,4310
AST (U/L)	142,4 $\pm$ 123,2	162 $\pm$ 142,6	0,8924
ALT (U/L)	85,5 $\pm$ 79,90	1350 $\pm$ 3688	0,5097

Ao fazer análise de correlação, nenhum parâmetro clínico dos pacientes graves foi correlacionado com os níveis séricos de sTREM-1. No entanto, ao correlacionar com os dados clínicos dos pacientes com LV incluídos no estudo (D0 clássica, D0 grave e D30), foi observada uma correlação positiva de sTREM-1 ( $r = 0,4384$ ;  $p = 0,0107$ ) com o tamanho do fígado e uma correlação negativa de sTREM-1 com número de leucócitos ( $r = -0,3660$ ;  $p = 0,0301$ ) (Figura 4).

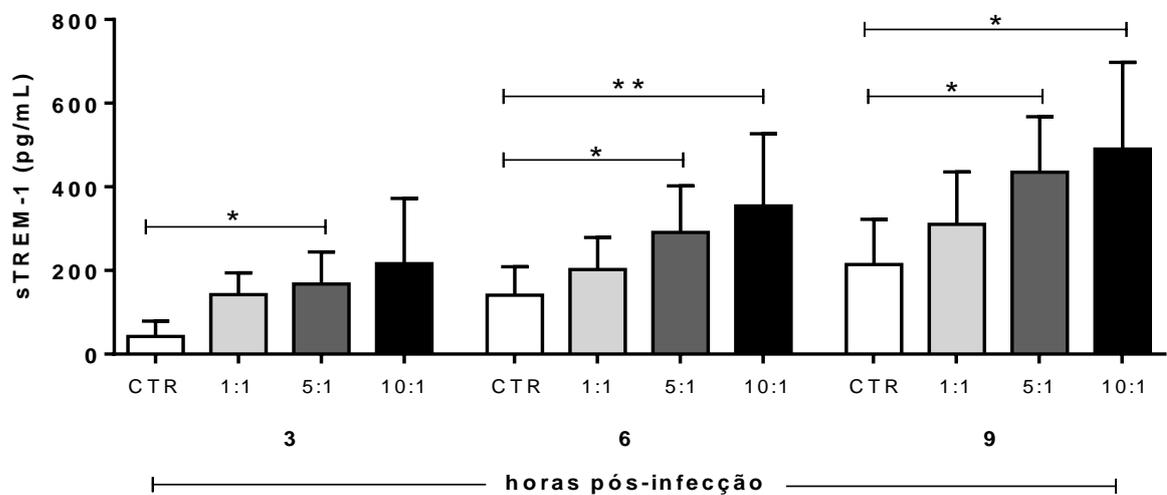


**Figura 4-** Correlação entre os níveis séricos de sTREM-1 com tamanho do fígado (A) e leucócitos (B) dos pacientes com LV (D0 clássica, D0 grave D30). Os dados foram analisados

através do teste de correlação de Spearman. O valor de p expressa a diferença estatística para os desfechos clínicos.

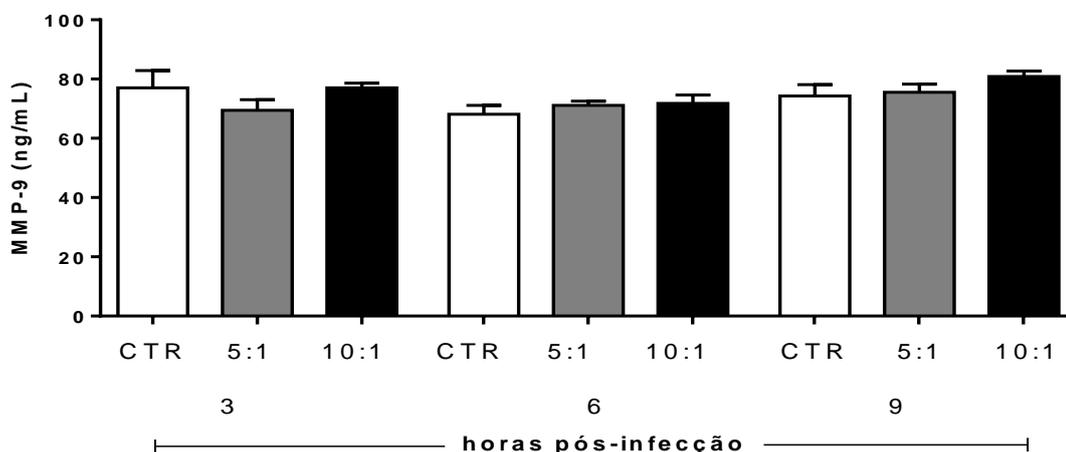
### 6.3 Liberação de sTREM-1 em neutrófilos expostos à *L. infantum* está associada a um aumento da taxa de parasitos

Para investigar se sTREM-1 estava sendo liberado mediante a exposição *in vitro* de neutrófilos com *L. infantum*, neutrófilos foram expostos à *L. infantum*, com uma taxa de parasitos de 1:1, 5:1 e 10:1 (parasitos:neutrófilo) durante 3, 6 e 9 horas. Como resultado, foi observado que a exposição de neutrófilos com *L. infantum* leva a uma maior liberação de sTREM-1 em comparação com o grupo controle (neutrófilos não infectados) em todos os tempos. Embora, não haja diferença estatística entre as taxas de 5:1 e 10:1, foi observada a tendência de uma maior liberação de sTREM-1 mediante à um aumento na taxa de parasitos, e essa liberação era tempo-dependente (Figura 5).



**Figura 5-** Liberação de sTREM-1 por neutrófilos, em resposta à exposição por *L. infantum*. Neutrófilos de doadores saudáveis foram isolados do sangue periférico e expostos à *L. infantum* com uma taxa de 1:1, 5:1 e 10:1 (parasitos:neutrófilo). Após 3, 6 e 9 horas de exposição, a liberação de sTREM-1 no sobrenadante da cultura foi mensurado por ELISA. As barras representam a média ± erro padrão de 5 doadores, com cada experimento realizado em triplicata. O asterisco representa a diferença estatística pelo teste não-paramétrico de Friedman com pós-teste de Bonferroni (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

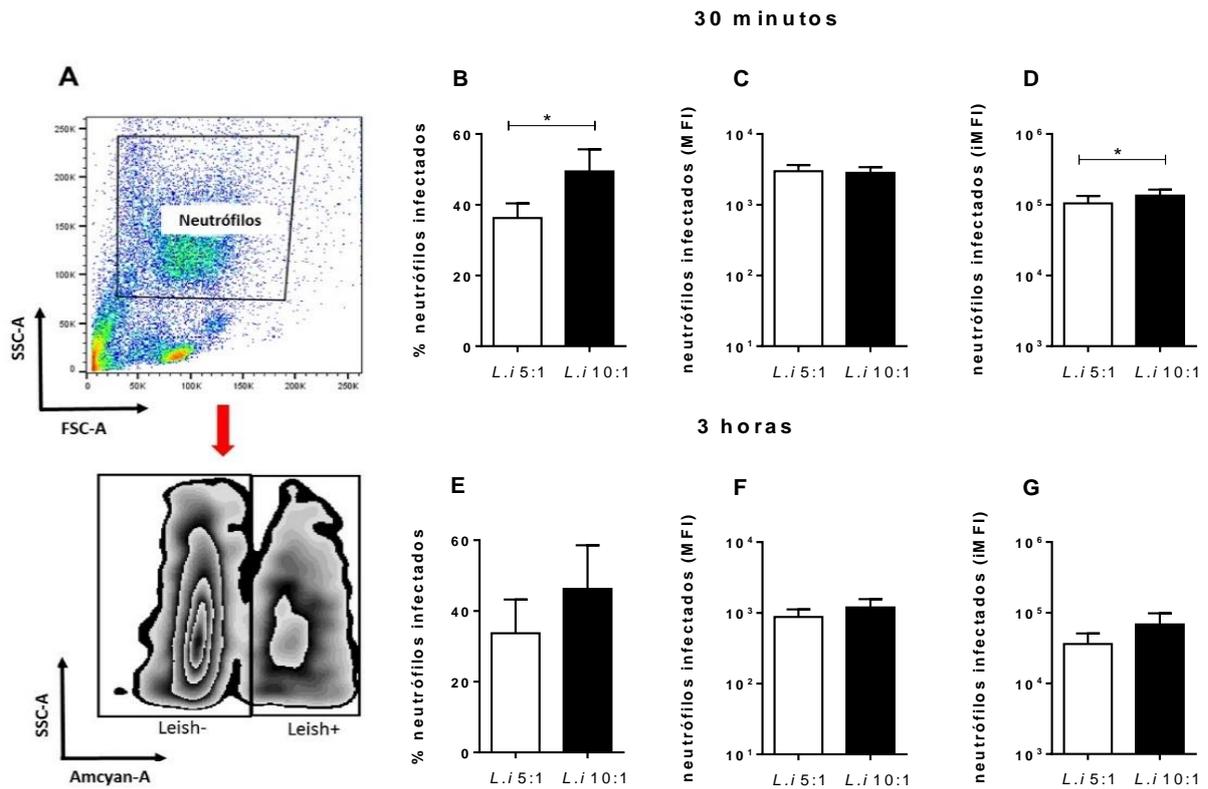
Os níveis de MMP-9 foram quantificados nesses sobrenadantes para investigar se a liberação da forma solúvel de TREM-1 era oriunda da clivagem por essa enzima. Foi observado que não houve diferença nas concentrações MMP-9 entre os grupos (Figura 6).



**Figura 6-** Dosagem de MMP-9 no sobrenadante de neutrófilos expostos à *L. infantum*. Neutrófilos de doadores saudáveis foram isolados do sangue periférico e expostos à *L. infantum* com uma taxa de 5:1 e 10:1 (parasitos:neutrófilo). Após 3, 6 e 9 horas de exposição foi realizada a dosagem de MMP-9 no sobrenadante da cultura por ELISA. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão de 5 doadores.

#### 6.4 *Leishmania infantum* modula a expressão de TREM-1 na superfície de neutrófilos

Neutrófilos foram expostos à *L. infantum* por 30 minutos ou 3 horas, e a frequência de células infectadas, a MFI e iMFI das células foram calculadas. Como descrito na metodologia, a população de neutrófilos foi definida a partir dos parâmetros FSC versus SSC, e dentro dessa população foi realizada a análise para a população infectada (Leish+) e não infectada (Leish-). Foi observado nos tempos de 30 minutos uma maior porcentagem de infecção e uma maior iMFI nos neutrófilos expostos a uma taxa de 10:1 ( $p < 0,0163$ ,  $p < 0,0144$ , respectivamente), embora, após 3 horas a porcentagem, MFI e iMFI seja maior nos neutrófilos expostos a uma taxa de 10:1, não houve diferença (Figura 7).

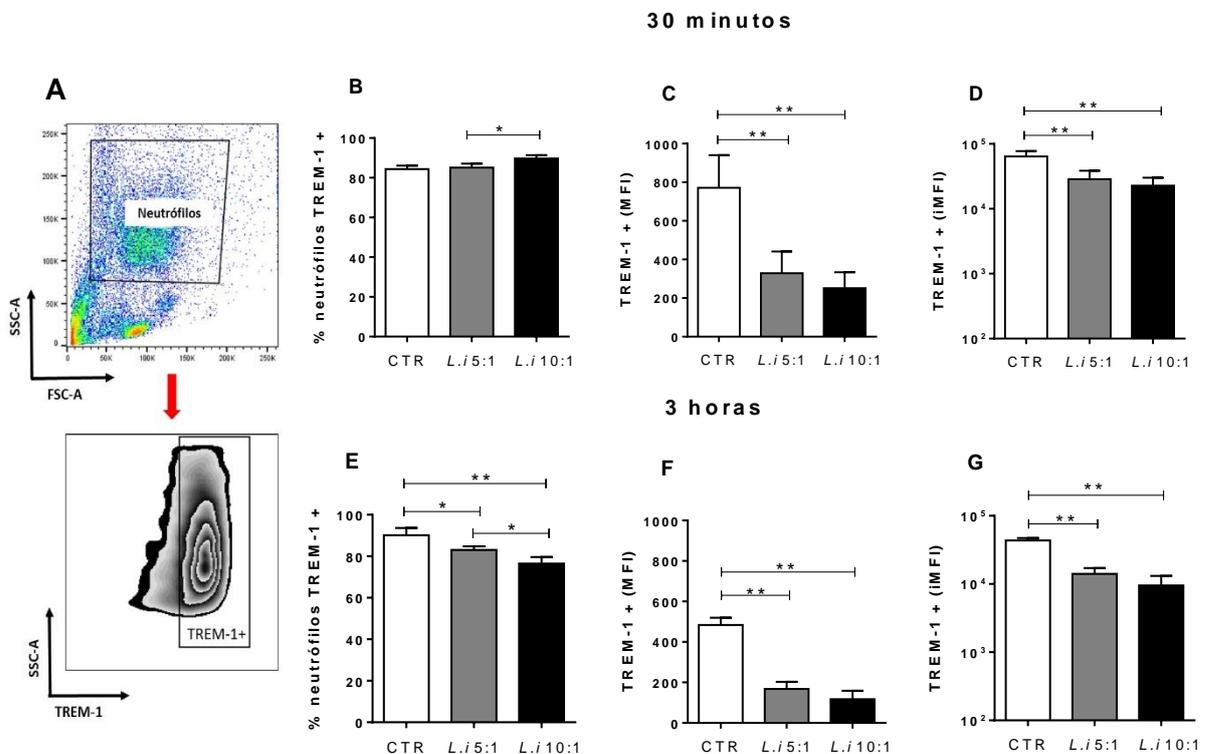


**Figura 7-** Infecção de neutrófilos expostos à *L. infantum*. Painel ilustrativo mostrando os parâmetros FSC-A versus SSC-A para a seleção da população com características de neutrófilos. Dentro desta população foi avaliada os neutrófilos infectados (Leish+) e não infectados (Leish-) (A). Neutrófilos de doadores saudáveis foram isolados do sangue periférico e expostos à *L. infantum* (previamente marcada com CellTracker™) com uma taxa de 5:1 e 10:1 (parasitos:neutrófilo). Após 30 minutos (B, C e D) e 3 horas (E, F e G) de exposição, a frequência (B e E), MFI (C e F) e iMFI (D e G) dos neutrófilos infectados foi detectada pela fluorescência do CellTracker™. As barras representam a média ± erro padrão de 5 doadores (tempo de 30 minutos) e 6 doadores (tempo de 3 horas). O asterisco representa a diferença estatística pelo teste paramétrico T Student (\*p<0,05). CTR- grupo controle (neutrófilos não expostos à *L. infantum*); *L.i* – *Leishmania infantum*.

Para investigar se a exposição por *L. infantum* modula a expressão de TREM-1 na superfície de neutrófilos, os níveis de TREM-1 foram quantificados por citometria de fluxo após 30 minutos e 3 horas de exposição (Figura 8). No tempo de 30 minutos a frequência de células TREM-1+ nos neutrófilos expostos a uma taxa de 10:1 foi maior que em neutrófilos expostos a uma taxa de 5:1 (89,72% ± 1,661 versus 85,10% ± 2,043; p= 0,0317, respectivamente). Os neutrófilos expostos a *Leishmania* apresentaram uma menor MFI e iMFI de TREM-1+ comparados ao grupo controle. Além disso, quanto maior a taxa de infecção menor o MFI e iMFI, sugerindo que já nos tempos iniciais de exposição a presença da

*Leishmania* leva a uma diminuição na intensidade de brilho de células TREM-1+ (Figura 8 B, C e D).

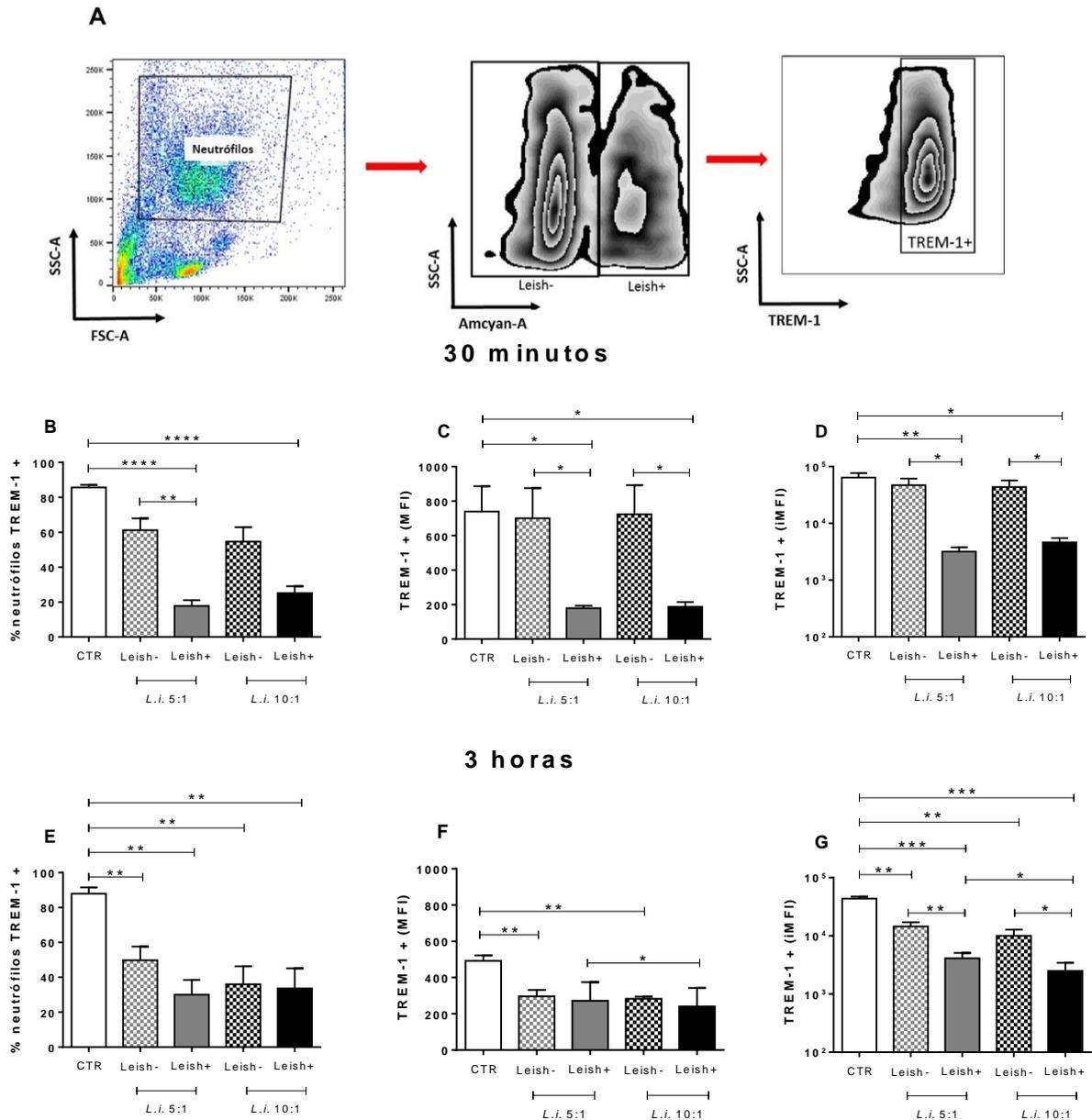
Já no tempo de 3 horas, foi observado uma redução na porcentagem de células expressando TREM-1+ nos grupos expostos a *Leishmania* comparados ao grupo controle, e essa redução foi mais expressiva quanto maior a taxa infecção. Semelhante ao tempo de 30 minutos, a MFI e iMFI foram menores nos neutrófilos expostos a *L. Infantum*. Foi observada uma redução na MFI dos neutrófilos expostos a uma taxa de 5:1 e nos neutrófilos expostos a uma taxa de 10:1 comparados ao controle ( $p=0,0038$  e  $p=0,0045$ , respectivamente). Em relação a iMFI foi observada uma redução nos neutrófilos expostos a uma taxa de 5:1 e 10:1, comparados ao grupo controle ( $p=0,0022$  e  $p=0,0030$ , respectivamente) (Figura 8 E, F e G).



**Figura 8-** Expressão de TREM-1 de superfície em neutrófilos expostos e não expostos à *L. infantum*. Paineil ilustrativo mostrando os parâmetros FSC-A versus SSC-A para a seleção da população com características de neutrófilos. Dentro desta população foi avaliado os neutrófilos TREM-1+ (A). Neutrófilos de doadores saudáveis foram isolados do sangue periférico e expostos à *L. infantum* (previamente marcada com CellTracker™) com uma taxa de 5:1 e 10:1 (parasitos:neutrófilo). Após 30 minutos (B, C e D) e 3 horas (E, F e G) de exposição, a frequência (B e E), MFI (C e F) e iMFI (D e G) de TREM-1 na superfície celular foi detectada pela fluorescência com anti-TREM-1-PE. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão de 5 (30 minutos) e 6 doadores (3 horas). O asterisco representa a diferença estatística pelo teste paramétrico T Student (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). CTR- grupo controle (neutrófilos não expostos à *L. infantum*); *Li* – *Leishmania infantum*.

Posteriormente, em neutrófilos expostos à *Leishmania*, mas que não foram infectados (Leish-), e nos neutrófilos que foram expostos à *Leishmania* e que foram infectados (Leish+), foi avaliada a frequência, MFI e iMFI de TREM-1+ (Figura 9). Após 30 minutos de exposição, a frequência de neutrófilos TREM-1+ foi menor nas células que foram infectadas (Leish+) comparadas com grupo controle ( $p < 0,0001$ ). Além disso, na exposição com 5:1 a frequência de neutrófilos TREM-1+ foi menor no grupo Leish+ comparado com o Leish- (Figura 9 B). Semelhante a esse achado, a MFI das células que foram infectadas (Leish+) também é menor comparada ao grupo de células que foram expostas, mas não foram infectadas (Leish-), como também, foi menor que a MFI do grupo controle (Figura 10 C). Essa diferença também é percebida ao avaliar a iMFI das células que foram infectadas (Leish+), que foi menor em comparação aos neutrófilos expostos e não infectados (Leish-) a uma taxa de 5:1 e 10:1 (Figura 9 D).

No tempo de 3 horas é observada uma redução na frequência de neutrófilos TREM-1+ em todos os grupos expostos a *Leishmania* comparados ao grupo controle (Figura 9 E). A MFI dos neutrófilos infectados (Leish+) a uma taxa de 10:1 foi menor que a dos infectados a uma taxa de 5:1 ( $240,2 \pm 103,0$ ;  $272,0 \pm 102,4$ ; respectivamente,  $p = 0,0316$ ) (Figura 9 F). Isso foi corroborado com a iMFI, que na taxa de 10:1 foi menor que a iMFI da taxa de 5:1. Ao comparar a iMFI dos neutrófilos Leish+ com o grupo controle, foi observada uma redução nos grupos 5:1 e 10:1 (Figura 9 G). Além disso, ao compararmos a iMFI de TREM-1+ nas taxas de 5:1 e 10:1, foi observado que a iMFI do grupo Leish+ foi menor que a do grupo Leish-

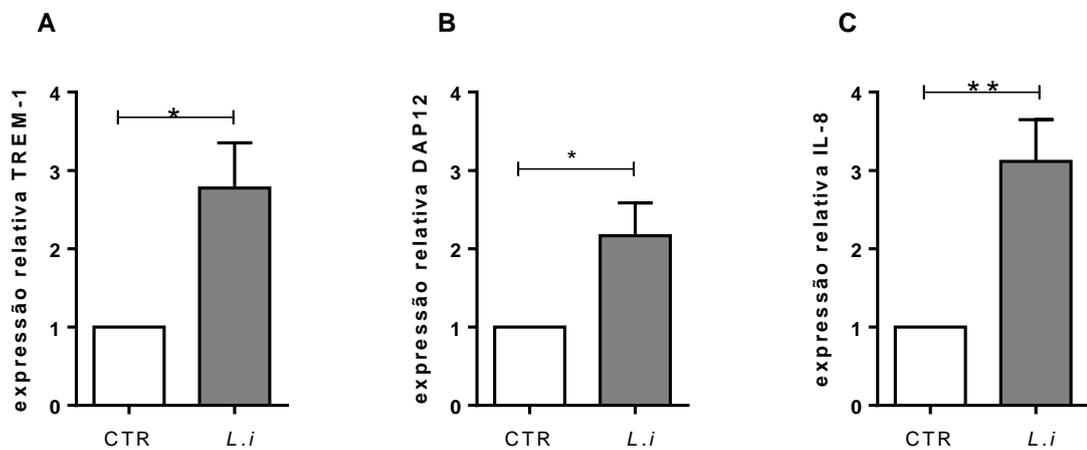


**Figura 9-** Expressão de TREM-1 de superfície em neutrófilos infectados e não infectados com *L. infantum*. Painel ilustrativo mostrando os parâmetros FSC-A versus SSC-A para a seleção da população com características de neutrófilos. Dentro desta população foi avaliada os níveis de TREM-1+ nos neutrófilos infectados (Leish+) e não-infectados (Leish-) (A). Neutrófilos de doadores saudáveis foram isolados do sangue periférico e expostos à *L. infantum* (previamente marcada com CellTracker) com uma taxa de 5:1 e 10:1 (parasitos:neutrófilo). Após 30 minutos (B, C e D) e 3 horas (E, F e G) de exposição, a frequência (B e E), MFI (C e F) e iMFI (D e G) de TREM-1 na superfície celular foi detectada pela fluorescência com anti-TREM-1-PE. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão de 5 doadores. O asterisco representa a diferença estatística pelo teste paramétrico T Student (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). CTR- grupo controle (neutrófilos não expostos à *L. infantum*); *L.i.* – *Leishmania infantum*.

### 6.5 Expressão gênica de TREM-1, DAP12 e IL-8 é aumentada nos neutrófilos expostos à *L. infantum*

O último passo do estudo foi avaliar como ocorre a expressão gênica de TREM-1, DAP12 e IL-8 em neutrófilos expostos à *L. infantum*. Para isso, foi utilizada a taxa de parasitos de 5:1 (parasitos:neutrófilo), pois conforme os resultados anteriores, ambas as taxas foram capazes de provocar alterações nas células.

Foi observado em 30 minutos após a exposição que a *Leishmania* induz um aumento na expressão de TREM-1 ( $p=0,0221$ ), DAP12 ( $p=0,0322$ ) e IL-8 ( $p=0,0074$ ) (Figura 10).



**Figura 10-** Expressão gênica de neutrófilos mediante exposição à *L. infantum*. Neutrófilos humanos foram purificados do sangue periférico e expostos à *L. infantum* (taxa de infecção 5 parasitos: 1 neutrófilo). Após 30 minutos de exposição, a expressão relativa do gene de interesse foi determinada pelo valor do  $\Delta Ct$ , relativo ao gene constitutivo GAPDH. A diferença na quantidade relativa entre os grupos foi determinada pela equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , usando como calibrador o grupo CTR (neutrófilos não infectados). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão de 7 doadores. O asterisco representa a diferença estatística pelo teste paramétrico T Student (\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ ); *L.i* – *Leishmania infantum*.

A LV é uma doença caracterizada por uma intensa resposta inflamatória e altos níveis séricos de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias tem sido relado na literatura. TREM-1 é um receptor de superfície celular que medeia a resposta inflamatória. A forma solúvel desse receptor, sTREM-1, vem sendo descrita em infecções e doenças inflamatórias não-infecciosas (GIBOT et al., 2004b). No presente estudo, foi descrito pela primeira vez a presença do sTREM-1 sérico em pacientes com LV e elevados níveis dessa molécula foram associados à forma grave da doença. Foi observado, também que a infecção por *L. infantum* modula a expressão de TREM-1 na superfície, bem como, a expressão gênica de TREM-1, DAP12 e IL-8 em neutrófilos.

Pacientes com a forma grave de LV apresentaram altos níveis de TREM-1, até o presente momento, em doenças causadas por parasitos, a associação de elevados níveis séricos de sTREM-1 com a gravidade da doença, foi descrita apenas na malária. Erdman et al. (2011) demonstraram que elevados níveis no soro de sTREM-1 se associavam a gravidade da doença em crianças com malária. Na sepse e outras doenças níveis elevados de sTREM-1 foram associados a citocinas e quimiciocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-8 (FORD; MCVICAR, 2010). Na LV há uma liberação de múltiplas citocinas descrita na literatura como “tempestade de citocinas” (PERUHYPE-MAGALHAES et al., 2005; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006), que pode ser considerada como a causa para algumas manifestações clínicas da doença.

Recentemente, Dos Santos et al. (2016) observaram que níveis elevados de IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6, IL-27 e TNF- $\alpha$  em soros de pacientes com LV estavam relacionados ao perfil clínico dos pacientes. Estes mesmos autores observaram que o aumento do baço e do fígado (manifestação clássica da LV), estava fortemente e positivamente correlacionado com os níveis circulantes de IL-10, IL-6, IL-27 e TNF- $\alpha$  (todos com  $p \leq 0,0005$ ). Similarmente, os níveis séricos de ALT e AST, que também são considerados marcadores de gravidade da doença, estavam correlacionados positivamente com TNF- $\alpha$ , IL-27 e IL-10 (DOS SANTOS et al., 2016). Aqui, foi observado uma correlação positiva entre os níveis séricos de sTREM-1 e o tamanho do fígado dos pacientes e uma correlação negativa com o número de leucócitos, e com a curva ROC observamos que os níveis séricos de sTREM-1 podem distinguir o paciente grave das demais formas clínicas, embora seja mais expressivo quando comparado ao grupo de pacientes ao final do tratamento. Nos pacientes com LV grave, nenhuma correlação significativa foi observada, provavelmente pelo limitado tamanho amostral, uma vez que esses

parâmetros variam muito entre os indivíduos, ou então os níveis séricos poderiam estar correlacionados à outros fatores não avaliados no estudo, como as citocinas.

O próximo passo deste trabalho foi avaliar se o sTREM-1 observado no soro dos pacientes poderia ser proveniente de neutrófilos expostos a *L. infantum*, já que este grupo celular constitui uma fonte principal de TREM-1 (BOSTANCI et al., 2013). De fato, a exposição favoreceu a liberação de TREM-1, uma vez que, os níveis de sTREM-1 liberado no sobrenadante da cultura de células foram significativamente maiores no grupo de células que foram expostas ao parasito. Rejeitamos a possibilidade da liberação da forma solúvel ser oriunda da clivagem pela metaloproteinase-9 (MMP-9), já que observamos que todos grupos experimentais (expostos e não expostos) possuíam do mesmo modo níveis de MMP-9 no sobrenadante. É possível que outras proteinases possam estar envolvidas nesse processo, como por exemplo a MMP-8, típica de neutrófilo (LIN et al., 2008). Além disso, fatores da *Leishmania* (MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004) poderiam estimular a liberação de TREM-1 presente em grânulos (BARUAH et al., 2015). Outra possível explicação seria a clivagem do TREM-1 da superfície do neutrófilo, por proteinases liberadas pela *Leishmania*. De fato, experimentos *in vitro* com a bactéria gram-negativa *Porphyromonas gingivalis*, causadora de periodontites, demonstraram a capacidade de uma molécula do patógeno, a cisteína-proteinase lisina-gingipaína, em degradar TREM-1 (BOSTANCI et al., 2013). Em *Leishmania*, as cisteínas-proteinases, ocorrem em grandes quantidades em volumosos lisossomas, que são particularmente abundantes na forma amastigota, mas podem também ser encontradas em outros compartimentos intracelulares (UEDA-NAKAMURA; ATTIAS; DE SOUZA, 2001). Estas enzimas proteolíticas desempenham importantes funções na *Leishmania* como virulência, manutenção da viabilidade e da morfologia do parasito, invasão do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro e a modulação da sua resposta imune (MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004; SELZER et al., 1999), constituindo atrativos alvos quimioterápicos no tratamento das leishmanioses (SILVA-LÓPEZ, 2010)

Os experimentos de citometria de fluxo revelaram que a exposição à *L. infantum* proporciona uma redução na porcentagem de células expressando TREM-1 na superfície. Através da iMFI este achado ficou mais evidente, sendo que a redução foi mais acentuada nas células que foram infectadas. Uma das principais vias de reconhecimento da *Leishmania* é a via TLR 2 (IBRAIM et al., 2013; TAVARES et al., 2014), e o reconhecimento de patógenos por essas vias tem sido descritos como indutores da expressão de TREM-1, que irá desencadear a amplificação da resposta inflamatória (ARTS et al., 2013). Deste modo, na infecção por *L. infantum*, a redução de TREM-1 na superfície dos neutrófilos pode favorecer o estabelecimento

do parasito, uma vez que, a sinalização é importante para a ativação de mecanismos microbicidas. Por outro lado, o aumento da molécula solúvel, que tem efeito anti-inflamatório, pode diminuir a inflamação tão intensa na LV, ou retardar a resposta inflamatória.

Corroborando com a hipótese de que a sinalização do TREM-1 é alterada por *L. infantum*, foi observado um aumento da expressão gênica de TREM-1 nos neutrófilos expostos comparados com o grupo controle, e esse aumento foi concomitante à DAP12, molécula adaptadora da sinalização do TREM-1. Embora haja um aumento na expressão gênica de TREM-1 esse aumento não foi refletido na superfície do neutrófilo, como descrito anteriormente pelos experimentos de citometria, o que poderia posteriormente comprometer a função do neutrófilo, já que inicialmente houve um aumento da expressão gênica da IL-8, uma quimiocina descrita como a principal mediadora da resposta imune inata inicial aos micróbios intracelulares e indutora-chave da imunidade mediada por célula. Já foi demonstrado que a produção de IL-8 por neutrófilos, induzida por *Leishmania*, acelera o recrutamento de neutrófilos para o local de infecção e facilita a captação dos parasitos (HAJILOOI et al., 2015; SCAPINI et al., 2000; VAN ZANDBERGEN et al., 2002).

Este trabalho foi pioneiro para entendimento da via de TREM-1 na LV. Em resumo, observa-se que a infecção de neutrófilos com *L. infantum* aumentou a expressão gênica de TREM-1 e liberação de sTREM-1, que foi associado a gravidade da doença. No entanto, não podemos determinar se essa molécula é um determinante da infecção, ou surgiu como consequência da intensidade de parasitos. Para compreender mais acerca de como esta via atua, reiteramos a importância de mais estudos que objetivem investigar o papel do TREM-1 em diversos contextos da resposta imune na LV, como por exemplo, bloqueio da via e avaliação de sua interferência, avaliação do perfil da expressão de TREM-1 em neutrófilos de pacientes acometidos com a doença, bem como sua interação com células T. Destaca-se também que outras moléculas e diversos fatores interferem na patogênese da LV, onde a junção destes, podem culminar em uma resposta protetora ou imunossupressora.

## 8 CONCLUSÃO

---

- Níveis séricos de sTREM-1 foram associados à forma grave da LV humana;
- A exposição de neutrófilos à *L. infantum* aumenta a liberação de sTREM-1, sendo associada à um aumento da taxa de parasitos;
- A exposição de neutrófilos à *L. infantum* por tempo prolongado leva a uma redução da sinalização de TREM-1 que pode comprometer a resposta imune do hospedeiro.

---

**9 REFERÊNCIAS**

---

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- 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.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to Leishmania infection. **The Indian journal of medical research**, v. 119, n. 6, p. 238–58, jun. 2004.
- BADARÓ, R. et al. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor reverses neutropenia and reduces secondary infections in visceral leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 170, n. 2, p. 413–8, ago. 1994.
- 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.
- BOAKYE, D.A.; WILSON, M.D.; KWEKU, M. A Review of Leishmaniasis in West Africa. **Ghana Medical Journal**, v. 39, n. 3, p. 94–97, fev. 2005.
- BORREGAARD, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657–670, nov. 2010.
- BOSTANCI, N. et al. Porphyromonas gingivalis Regulates TREM-1 in Human Polymorphonuclear Neutrophils via Its Gingipains. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e75784, 4 out. 2013.
- BOUCHON, A. et al. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1103–1107, 26 abr. 2001.
- 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, 15 maio 2000.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica: Leishmaniose visceral.**
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade.** Disponível em: <leishmaniose\_viscerale\_reducao\_letalidade.pdf>. Acesso em: 3 out. 2014a.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde: Relatório de situação: Sergipe.** Disponível em: <http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/sistema\_nacional\_vigilancia\_sau\_se\_5ed.pdf>. Acesso em: 10 set. 2014b.
- BRINKMANN, V. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 5 mar. 2004.
- BUCKLAND, K. F. et al. Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 (TREM-1) Modulates Immune Responses to Aspergillus fumigatus During Fungal Asthma in Mice.

**Immunological Investigations**, v. 40, n. 7–8, p. 692–722, 19 jan. 2011.

CANTONI, C. et al. NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. **The Journal of experimental medicine**, v. 189, n. 5, p. 787–96, 1 mar. 1999.

CARLSEN, E. D. et al. Leishmania amazonensis Amastigotes Trigger Neutrophil Activation but Resist Neutrophil Microbicidal Mechanisms. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 11, p. 3966–3974, 1 nov. 2013.

CARNEIRO, M. W. et al. Gene Expression Profile of High IFN- $\gamma$  Producers Stimulated with Leishmania braziliensis Identifies Genes Associated with Cutaneous Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. e0005116, 21 nov. 2016.

CARVALHO, L.; ARAÚJO, M. I. A S.; CARVALHO, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **An. Bras. Dermatol.**, v. 79, n. 6, p. 647–664, 2004.

CHANCE, M. L. et al. The biochemical and serological taxonomy of Leishmania from the Aethiopian zoogeographical region of Africa. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 72, n. 6, p. 533–42, dez. 1978.

CHEN, L. C. et al. Regulation of TREM expression in hepatic macrophages and endothelial cells during acute endotoxemia. **Experimental and molecular pathology**, v. 84, n. 2, p. 145–55, abr. 2008.

COSTA, D. L. et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. **Pathogens and Global Health**, v. 107, n. 2, p. 78–87, 12 mar. 2013.

D'OLIVEIRA JÚNIOR, A. et al. Asymptomatic Leishmania chagasi Infection in Relatives and Neighbors of Patients with Visceral Leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 1, p. 15–20, jan. 1997.

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.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in Leishmania infectivity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1455, n. 2–3, p. 341–352, out. 1999.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 239–243, 2001.

DETERMANN, R. M. et al. sTREM-1 is a potential useful biomarker for exclusion of ongoing infection in patients with secondary peritonitis. **Cytokine**, v. 46, n. 1, p. 36–42, abr. 2009.

DOS SANTOS, P. L. et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004375, 27 jan. 2016.

DU, Y. et al. Blockade of CD354 (TREM-1) Ameliorates Anti-GBM-Induced Nephritis.

**Inflammation**, v. 39, n. 3, 15 abr. 2016.

ENDRIS, M. et al. Bacterial Sepsis in Patients with Visceral Leishmaniasis in Northwest Ethiopia. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

ERDMAN, L. K. et al. Combinations of Host Biomarkers Predict Mortality among Ugandan Children with Severe Malaria: A Retrospective Case-Control Study. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17440, 25 fev. 2011.

FORD, J. W.; MCVICAR, D. W. TREM and TREM-like Receptors in Inflammation and Disease. **Curr Opin Immunol.**, v. 21, n. 1, p. 38–46, 2010.

GABRIEL, C. et al. Leishmania donovani promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. **BMC Proceedings**, v. 5, n. Suppl 1, p. P40, 2011.

GIBOT, S. et al. Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells and the Diagnosis of Pneumonia. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 5, p. 451–458, 29 jan. 2004a.

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, 6 dez. 2004b.

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, n. 7, p. 975–83, 1 out. 2006.

GÓES, M. A. O.; JERALDO, V. DE L. S.; OLIVEIRA, A. S. Urbanização da leishmaniose visceral: aspectos clínicos e epidemiológicos em Aracaju, Sergipe, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v. 9, n. 31, p. 119, 26 nov. 2013.

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, 15 set. 2007.

GONTIJO, CÉLIA MARIA FERREIRA; MELO, M. NORMA. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338–349, 2004.

GUIMARAES-COSTA, A. B. et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 16, p. 6748–6753, 21 abr. 2009.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. 3'-Nucleotidase / Nuclease Activity Allows Leishmania Parasites To Escape Killing by Neutrophil Extracellular Traps. **Infection and Immunity**, v. 82, p. 1732–1740, 2014.

HAJILOOI, M. et al. Evaluation of interleukin-8 -251 t/a polymorphisms in visceral leishmaniasis. **Journal of research in health sciences**, v. 15, n. 1, p. 59–61, 2015.

IBRAIM, I. C. et al. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from Leishmania braziliensis and Leishmania infantum trigger different innate immune responses in murine macrophages. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 54, 2013.

- KAFETZIS, D. An overview of paediatric leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 49, n. 1, p. 31, 2003.
- KENNEDY, A. D.; DELEO, F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunologic Research**, v. 43, n. 1–3, p. 25–61, 9 mar. 2009.
- KILLICK-KENDRICK, R.; RIOUX, J. A. Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. **Parassitologia**, v. 44, n. 1–2, p. 67–71, jun. 2002.
- KLESNEY-TAIT, J.; TURNBULL, I. R.; COLONNA, M. The TREM receptor family and signal integration. **Nature Immunology**, v. 7, n. 12, p. 1266–1273, dez. 2006.
- LAGLER, H. et al. TREM-1 Activation Alters the Dynamics of Pulmonary IRAK-M Expression In Vivo and Improves Host Defense during Pneumococcal Pneumonia. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 3, p. 2027–2036, 1 ago. 2009.
- LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210–214, maio 2003.
- LIN, M. et al. Matrix Metalloproteinase-8 Facilitates Neutrophil Migration through the Corneal Stromal Matrix by Collagen Degradation and Production of the Chemotactic Peptide Pro-Gly-Pro. **The American Journal of Pathology**, v. 173, n. 1, p. 144–153, jul. 2008.
- MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 519–531, 25 jul. 2011.
- MARTINEZ, E. Z. LOUZADA-NETO, F. PEREIRA, B. B. A curva ROC para testes diagnósticos. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 11, n. 1, p. 7–31, 2003.
- MATESANZ-ISABEL, J. et al. New B-cell CD molecules. **Immunology Letters**, v. 134, n. 2, p. 104–112, 30 jan. 2011.
- MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual review of pathology**, v. 9, p. 181–218, 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. BRASIL. SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO- SINAN. **Leishmaniose visceral. - Notificações Registradas: banco de dados**. Disponível em:  
<<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>>. Acesso em: 1 out. 2016.
- MOLLINEDO, F. et al. Selective Fusion of Azurophilic Granules with Leishmania-containing Phagosomes in Human Neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 45, p. 34528–34536, 5 nov. 2010.
- MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 375–381, ago. 2004.
- MURRAY, H. W. et al. Antagonizing Deactivating Cytokines To Enhance Host Defense and Chemotherapy in Experimental Visceral Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7,

p. 3903–3911, 1 jul. 2005.

NIETO, A. et al. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniosis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 39, 2011.

OKU, R. et al. Cytokine Differential pattern of cell-surface and soluble TREM-1 between sepsis and SIRS. **Cytokine**, v. 61, n. 1, p. 112–117, 2013.

PERUHYPE-MAGALHAES, V. et al. Immune Response in Human Visceral Leishmaniasis: Analysis of the Correlation Between Innate Immunity Cytokine Profile and Disease Outcome. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 62, n. 5, p. 487–495, nov. 2005.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V. et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon- $\gamma$  and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor- $\alpha$  + monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infecti. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, n. 1, p. 124–132, out. 2006.

PILLAY, J. et al. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 20, p. 3813–3827, 20 out. 2013.

POUKOULIDOU, T. et al. TREM-1 expression on neutrophils and monocytes of septic patients: relation to the underlying infection and the implicated pathogen. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 309, 4 dez. 2011.

RADSAK, M. P. et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: differential regulation of activation and survival. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, n. 8, p. 4956–4963, 15 abr. 2004.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Neutrophils Activate Macrophages for Intracellular Killing of *Leishmania major* through Recruitment of TLR4 by Neutrophil Elastase. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 6, p. 3988–3994, 15 set. 2007.

RIGO, I. et al. Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) in airway epithelial cells by 1,25(OH) $_2$  vitamin D $_3$ . **Innate immunity**, v. 18, n. 2, p. 250–7, abr. 2012.

RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 11, p. 505–510, nov. 2009.

RUIZ-PACHECO, J. A. et al. TREM-1 modulation during early stages of dengue virus infection. **Immunology Letters**, v. 158, n. 1–2, p. 183–188, mar. 2014.

SAMPAIO, M. J. A. DE Q. et al. Risk Factors for Death in Children with Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 11, p. e877, 2 nov. 2010.

SANTOS-OLIVEIRA, J. R. et al. Microbial Translocation Induces an Intense Proinflammatory Response in Patients With Visceral Leishmaniasis and HIV Type 1 Coinfection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 1, p. 57–66, 1 jul. 2013.

SCAPINI, P. et al. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunological Reviews**, v. 177, n. 1, p. 195–203, out. 2000.

SELZER, P. M. et al. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 20, p. 11015–22, 28 set. 1999.

SHESHACHALAM, A. et al. Granule Protein Processing and Regulated Secretion in Neutrophils. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. September, p. 1–11, 19 set. 2014.

SILVA-LÓPEZ, R. E. DA. Proteases de Leishmania: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1541–1548, 2010.

SILVA, Í. C. **NEUTRÓFILOS : ASPECTOS CLÁSSICOS , PLASTICIDADE E NOVAS FUNÇÕES IMUNORREGULATÓRIAS**. [s.l: s.n.].

STUART, K. et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1301–1310, 1 abr. 2008.

TACCHINI-COTTIER, F. 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**, v. 165, n. 5, p. 2628–2636, 1 set. 2000.

TAVARES, L. M. S. DE A.; TAVARES, E. D. Incidência, distribuição geográfica e aspectos ambientais das áreas endêmicas da Leishmaniose Visceral em Sergipe. **Informe Epidemiológico do Sus**, v. 8, n. 1, p. 47–52, mar. 1999.

TAVARES, N. M. et al. Understanding the Mechanisms Controlling *Leishmania amazonensis* Infection In Vitro: The Role of LTB4 Derived From Human Neutrophils. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 4, p. 656–666, 15 ago. 2014.

THALHOFER, C. J. et al. Leukocytes Infiltrate the Skin and Draining Lymph Nodes in Response to the Protozoan *Leishmania infantum* chagasi. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 1, p. 108–117, 1 jan. 2011.

UEDA-NAKAMURA, T.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W. Megasome biogenesis in *Leishmania amazonensis* : a morphometric and cytochemical study. **Parasitology Research**, v. 87, n. 2, p. 89–97, 15 jan. 2001.

VAN ZANDBERGEN, G. 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**, v. 70, n. 8, p. 4177–84, ago. 2002.

VERMA, S. et al. Quantification of Parasite Load in Clinical Samples of Leishmaniasis Patients: IL-10 Level Correlates with Parasite Load in Visceral Leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, p. e10107, 9 abr. 2010.

WEBER, B. et al. TREM-1 Deficiency Can Attenuate Disease Severity without Affecting Pathogen Clearance. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, p. e1003900, 16 jan. 2014.

WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de**

**Saúde Pública**, v. 26, n. 4, p. 644–645, abr. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the Leishmaniasis: report of a meeting of the WHO.**

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. **World Health Organization technical report series**, n. 975, p. v–xii, 1-100, 2012.

YIZENGAW, E. et al. Visceral Leishmaniasis Patients Display Altered Composition and Maturity of Neutrophils as well as Impaired Neutrophil Effector Functions. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. November, p. 1–12, 29 nov. 2016.

YUAN, Z. et al. TREM-1-accentuated lung injury via miR-155 is inhibited by LP17 nanomedicine. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 310, n. 5, p. L426–L438, 1 mar. 2016.