



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE TREM-1
NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA HUMANA**

MARIANA ROSA AMPUERO

**Salvador - Bahia
2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE TREM-1
NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA HUMANA**

MARIANA ROSA AMPUERO

Orientadora: Natalia Machado Tavares

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-graduação em Patologia
Humana para a obtenção do grau
de Mestre.

**Salvador - Bahia
2019**

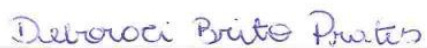
"AVALIAÇÃO DO PAPEL DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE TREM – 1 NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA HUMANA".

Mariana Rosa Ampuero

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 05 de julho de 2019.

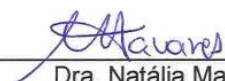
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Debóraci Brito Prates
Professora
UFBA



Dr. Lucas Pedreira de Carvalho
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dra. Natália Machado Tavares
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Antônia Rosa, por todo apoio, amor incondicional e exemplo de força e determinação.

A Rafael, por todo companheirismo e exemplo de determinação e resiliência.

À Dra. Natalia Tavares, pelas suas contribuições na minha formação durante esses 5 anos e por me nortear em todos os passos deste estudo.

À Sara Nunes, por toda ajuda com experimentos, apresentações e organizações gerais. Além de apoio e amizade.

Ao Grupo NT, de forma geral, Sara, Icaro e Reinan, pelo companheirismo, apoio e sugestões.

Aos amigos da Fiocruz: Camila Andrade, Ana Luisa, Rafael Tibúrcio, Ivaneia Valeriano, Elaine Carvalho, Jéssica Lobo, Mariana Khouri, Priscila Valera, Leon Dimitri, Pedro Brito, Filipe Lima, Livia Coelho, pela agradável convivência, apoio e preciosas contribuições.

À biblioteca do IGM, em especial à bibliotecária Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio por todo suporte.

Aos funcionários do IGM por toda prestatividade.

AMPUERO, Mariana Rosa. Avaliação do papel da via de sinalização de TREM-1 na Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) humana. 2019. 63 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose permanece como uma das doenças tropicais mais negligenciadas do mundo. A resposta imune do hospedeiro contra *Leishmania* tem um papel crítico em promover a morte do parasita, mas também em gerar inflamação e a gravidade da doença. *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells* (TREM) foi recentemente identificado como um amplificador da resposta imune, que atua sinergicamente com os receptores Toll-like (TLRs) na produção de mediadores pró-inflamatórios. TREM-1 é expresso em células de linhagem mieloide, principalmente neutrófilos. Sua via de sinalização depende da proteína adaptadora DAP12, que resulta na ativação de NFκB e na expressão de genes inflamatórios, bem como na degranulação, produção de ROS e citocinas. **OBJETIVO:** Com base nisso, o objetivo deste estudo foi investigar o papel de TREM-1 durante infecção por *L. braziliensis*. **MATERIAL E MÉTODOS:** Inicialmente, dados públicos de transcriptomas de lesões de pacientes infectados com *L. braziliensis* em comparação com pele não infectada foram obtidos a partir do GEODataSets. Posteriormente, os resultados desses dados foram validados por PCR em tempo real com novas amostras. Por fim, foram investigados os mecanismos subjacentes à ativação de TREM-1 durante a infecção de neutrófilos humanos in vitro. **RESULTADOS:** A análise de dados de transcriptoma revelou um aumento na expressão da via TREM-1, incluindo todos os fatores de sinalização envolvidos nessa via. Em seguida, confirmou-se, por RT-qPCR e imunohistoquímica, o aumento da expressão dessas moléculas nas lesões de pacientes infectados. Por outro lado, a regulação negativa na expressão de RNA mensageiro de TREM-1, DAP12, TLR2 e TLR4 foi observada nos neutrófilos circulantes desses pacientes. Além disso, a exposição a *L. braziliensis* aumentou a expressão de TREM-1 na superfície de neutrófilos humanos, levando à degranulação de Metaloproteinase de Matriz 9. Por fim, TREM-1 e TLR2 sinergizam na degranulação neutrófilica, mas não na internalização da *L. braziliensis*. **CONCLUSÃO:** Esses resultados sugerem que TREM-1 pode ser um potencial alvo para regulação da resposta inflamatória observada na LCL, mantendo as capacidades leishmanicidas dos neutrófilos.

Palavras-chave: TREM; TLR; *Leishmania braziliensis*; Leishmaniose Cutânea Localizada; Neutrófilos humanos.

AMPUERO, Mariana Rosa. Evaluation of the role of the trem-1 signaling in the human cutaneous leishmaniasis (CL). 2019. 63 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Leishmaniasis remains one of the most neglected tropical diseases in the world. The immune response of the host against *Leishmania* plays a critical role in promoting parasite death and also promotes the severity of the disease. The Myeloid Cell Expression Receptor (TREM) has recently been identified as an immune response amplifier, which acts synergistically with Toll-like receptors (TLRs) in the production of pro-inflammatory mediators. TREM-1 is expressed strictly in myeloid lineage cells, mainly neutrophils. Its signaling form depends on the adaptive protein DAP12, which results in the activation of NF κ B and the expression of reference genes, as well as in the degranulation, production of ROS and cytokines. **OBJECTIVE:** Based on this, the present study investigated the role of TREM-1 during *L. braziliensis* infection. **MATERIAL AND METHODS:** First, public transcriptome data of lesions from patients infected by *L. braziliensis* compared to not infected skin obtained from GEODataSets. After, the results were validated by real-time PCR with new samples. Finally, the mechanisms of activation of TREM-1 during human neutrophil infection in vitro were investigated. **RESULTS:** The transcriptome data analysis demonstrated an increase in TREM-1 expression, including all signaling molecules. These results were confirmed by RT-qPCR and immunohistochemistry in new samples. On the other hand, a negative correlation of messenger RNA of TREM-1, DAP12, TLR2 and TLR4 was observed on the circulating neutrophils of these patients. In addition, exposure to *L. braziliensis* increased the expression of TREM-1 on the surface of human neutrophils, leading to the degranulation of matrix metalloproteinase 9. Finally, TREM-1 and TLR2 are synergists in neutrophil degeneration but not in internalization of *L. brasiliensis*. **CONCLUSION:** TREM-1 may be a potential target for modulation of inflammatory response in LCL, remaining the ability of neutrophil to kill *Leishmania*.

Key-Words: TREM; TLR; *Leishmania braziliensis*; Localized Cutaneous Leishmaniasis; Human neutrophils.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação esquemática da busca dos transcriptomas públicos utilizados 21
- Figura 2** Vias canônicas da Imunidade Inata mais significativamente moduladas durante a LCL humana 27
- Figura 3** Análise de agrupamento entre LCL e controle saudáveis de acordo com as diferenças de expressões para os mRNAs envolvidos na via de sinalização do TREM-1 29
- Figura 4** Análise de Componente Principal (PCA) definindo agrupamento entre amostras de LCL comparadas com controles 30
- Figura 5** Valores de FC de transcritos envolvidos na via de sinalização do TREM-1 durante a infecção por *L. braziliensis* em pacientes de diferentes áreas endêmicas obtidos a partir de dados de expressão gênica global publicamente disponíveis 31
- Figura 6** Aumento da expressão de RNAm de DEFBA4, DAP12, TREM-1 e TLR4 em biópsias de pacientes com LCL 32
- Figura 7** Aumento da expressão proteica de Def β 2, DAP12, TREM-1, TLR2 e TLR4 em biópsias de pacientes com LCL 33
- Figura 8** Defensina β 2 é um produto inespecífico liberado em doenças inflamatórias de pele enquanto a expressão de TREM-1 está aumentada apenas em LCL 36
- Figura 9** Expressão de RNAm de TREM-1, TREM-2, DAP12, TLR2 e TLR4 não é regulada durante LCL em CMSP humanas 37
- Figura 10** Expressão de RNAm de TREM-1, DAP12, TLR2 e TLR4 é regulada negativamente durante LCL em PMN humanos 38
- Figura 11** Expressão de RNAm de TREM-1, DAP12, TLR2 e TLR4 não é regulada em PMN de doadores saudáveis 39
- Figura 12** Exposição de neutrófilos humanos a *L. braziliensis* promove aumento transiente de TREM-1 40
- Figura 13** Neutralização de TLR2, mas não de TREM-1, interfere na internalização de *L. braziliensis* 41
- Figura 14** Neutralização de TREM-1 e TLR2 diminui a liberação de MMP9 de neutrófilos infectados com *L. braziliensis* 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	Célula Dendrítica
CD200R3	<i>Cell surface glycoprotein CD200 Receptor 3</i>
DAP12	Proteína Adaptadora DNAX de 12 kDa
GFP	<i>Green Fluorescence Protein</i>
IL	Interleucina
KIRs	<i>Killer cell Immunoglobulin-like Receptor</i>
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LD	Leishmaniose Disseminada
LM	Leishmaniose Mucosa
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MMP9	Metaloproteinase de Matriz 9
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Factor 88</i>
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
PAMP	Padrões Moleculares Associados aos Patógenos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TIRAP	<i>TIR Domain Containing Adaptor Protein</i>
TH1	Linfócitos T auxiliar Tipo 1
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
<i>Tollip</i>	<i>Toll-interacting protein</i>
TRAM	<i>TRIF-Related Adaptor Molecule</i>
TRIF	<i>TIR Domain Containing Adaptor Protein Inducing Interferon γ</i>
TREM	<i>Triggering Receptors Expressed on Myeloid cells</i>

LISTA DE URLS

Gene *Expression Omnibus* (GEO) – <http://ncbi.nlm.nih.gov/geo>

Ingenuity Pathways Analysis – <http://ingenuity.com>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	LEISHMANIOSES	10
1.2	IMUNOPATOGENESE DA LCL	11
1.3	O PAPEL DOS NEUTRÓFILOS	11
1.4	RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE PADRÕES NA LCL	12
1.5	<i>TOLL LIKE RECEPTORS</i>	13
1.6	<i>TRIGGERING RECEPTORS EXPRESSED ON MYELOID CELLS 1</i> <i>(TREM-1)</i>	13
1.6.1	LIGANTES DE TREM-1	14
1.6.2	VIA DE SINALIZAÇÃO TREM-1	14
1.6.3	CONSEQUÊNCIAS DA ATIVAÇÃO DE TREM-1	15
1.6.4	CONSEQUÊNCIAS DO BLOQUEIO DE TREM-1	16
1.6.5	FORMA SOLÚVEL DE TREM-1	17
1.6.6	INTERAÇÃO ENTRE TREM-1 E TLR	17
1.6.7	TREM-1 E HOMEOSTASIA	18
2	JUSTIFICATIVA	19
3	HIPÓTESE	20
4	OBJETIVOS	20
4.1	OBJETIVO GERAL	20
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5	MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1	ANÁLISE DE DADOS PÚBLICOS DE TRANSCRIPTOMAS	21
5.2	ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO	22
5.3	LOCAL DE ESTUDO/PACIENTES	22
5.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	22
5.5	IMUNOHISTOQUÍMICA	23
5.6	PCR EM TEMPO REAL	23
5.7	OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (CMSP)	24
5.8	OBTENÇÃO DE CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES (PMN)	24
5.9	PARASITAS	24
5.10	INFECÇÕES <i>IN VITRO</i>	25

5.11	ESTÍMULOS	25
5.12	CITOMETRIA DE FLUXO	25
5.13	DETERMINAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	25
5.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
6	RESULTADOS	27
6.1	LESÕES DE LCL EM HUMANOS CAUSADA POR <i>L. BRAZILIENSIS</i> APRESENTAM AUMENTO NA EXPRESSÃO DA VIA TREM-1	27
6.2	DEFENSINA B2 PARECE SER UM PRODUTO INESPECÍFICO LIBERADO EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS DE PELE ENQUANTO TREM-1 ESTÁ AUMENTADO DE FORMA ESPECÍFICA NA LCL	35
6.3	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA DE SINALIZAÇÃO DE TREM-1 EM LEUCÓCITOS HUMANOS DE PACIENTES COM LCL	36
6.4	AVALIAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE TREM-1 EM NEUTRÓFILOS HUMANOS INFECTADOS IN VITRO COM <i>L. BRAZILIENSIS</i>	38
7	DISCUSSÃO	43
8	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXOS	65

1. INTRODUÇÃO

1.1. LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um complexo de doenças que permanecem negligenciadas no mundo e que afetam, principalmente, as populações mais pobres. Estima-se que cerca de 350 milhões de indivíduos vivem sob o risco de adquirir essa enfermidade e cerca de 2 milhões de novos casos são reportados anualmente. Essas doenças são causadas pelo parasito protozoário do gênero *Leishmania*, prevalente em áreas tropicais e subtropicais, onde cerca de 80 países são afetados (WHO, 2016). A *Leishmania* é um parasito intracelular transmitido para humanos e outros vertebrados através de um vetor hematófago. Estes vetores pertencem ao gênero *Lutzomyia*, no novo mundo, e *Phlebotomus*, no velho mundo (KAUFER et al., 2017). Durante o repasto sanguíneo do vetor, o parasito é depositado por regurgitação na pele do hospedeiro, onde ocorre a laceração de vasos e formação de lago sanguíneo. Isso promove a interação entre a *Leishmania* e diversos tipos celulares, como macrófagos, células dendríticas (CD) e neutrófilos. Essas células são capazes de fagocitar o parasito, que no ambiente intracelular, se diferencia para a forma amastigota. Forma essa sem flagelo, intracelular obrigatória e capaz de resistir ao ambiente ácido do fagolisossomo (SCOTT; NOVAIS, 2016).

As leishmanioses compreendem uma ampla gama de manifestações clínicas com diferentes graus de gravidade que dependem da espécie de *Leishmania* envolvida e da resposta imune do hospedeiro (TORRES-GUERRERO et al., 2017). A Leishmaniose Visceral (LV) é a forma mais grave e sistêmica. A mesma ocorre com disseminação do parasito para órgãos internos, como o fígado, baço e medula óssea, causando febre, hepatoesplenomegalia, perda de peso, tosse, diarreia e dor abdominal como principais sintomas (KAYE; SCOTT, 2011; SACHDEVA; SHARMA, 2016; TORRES-GUERRERO et al., 2017). Já a leishmaniose tegumentar (LT) compreende as formas cutâneas da doença e apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões do país (BRASIL, 2017).

A LT se subclassifica de acordo com seus aspectos clínicos, imunológicos e patológicos. A forma difusa (LCD) apresenta lesões múltiplas nodulares e não ulceradas em todo o corpo, com alta carga parasitária e imunossupressão. Na disseminada (LD), ocorrem múltiplas lesões cutâneas graças a disseminação hematogênica ou linfática. A leishmaniose mucosa (LM) é caracterizada por lesões destrutivas do septo nasal, lábios e palato, e é causada por uma forte resposta imunopatológica (TORRES-GUERRERO et al., 2017; BURZA et al., 2018). Já a forma Cutânea Localizada (LCL) é a manifestação clínica mais frequente da LT. A mesma é caracterizada pela presença de lesões únicas ou em pequeno número, ulceradas, com fundo granular e bordas elevadas. Geralmente, a doença é de cura espontânea, mas pode demorar até meses para cicatrizar, levar a uma deformação significativa e uma estigmatização social (DAVID; CRAFT, 2009; TORRES-GUERRERO et al., 2017). No Brasil, a principal espécie causadora da LCL é a *Leishmania braziliensis* (BRASIL, 2017; KAYE; SCOTT, 2011).

1.2. IMUNOPATOGENESE DA LCL

Diferentes tipos celulares são expostos a *Leishmania* nos momentos iniciais de infecção, tais como macrófagos, neutrófilos e CDs. As CDs infectadas migram para os linfonodos drenantes, onde orquestram uma resposta imune antígeno-específica. As CDs agem, principalmente, na produção de IL-12 que induz a diferenciação de linfócitos T CD4+ em *T helper 1* (Th1) que produzem IFN- γ . Essa citocina, por sua vez, induz a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células fagocíticas, principalmente macrófagos, o que leva à destruição do parasita e controle da infecção (MURRAY et al., 2005; TRIPATHI et al., 2007; SCOTT; NOVAIS, 2016). Sendo assim, a resposta imune inata contra a *Leishmania* é fundamental para o controle da infecção, mas uma resposta pró-inflamatória exagerada leva também ao dano tecidual e desenvolvimento da úlcera na LCL (CARVALHO et al., 2012).

1.3. O PAPEL DOS NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos são células cruciais para a defesa inicial do sistema imune contra infecções. Os mesmos são recrutados rapidamente para o sítio de infecção da *Leishmania*, sendo o principal tipo celular no infiltrado inflamatório inicial

(PETERS et al., 2008; SCOTT; NOVAIS, 2016; SCORZA et al., 2017). Essas células são capazes de fagocitar o parasito e exercerem atividade microbicida direta através da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS), liberação de enzimas, tais como elastase neutrofílica (NE), mieloperoxidase (MPO) e metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9) e também com a liberação de armadilhas extracelulares (NETs) (GUIMARAES-COSTA et al., 2009; RITTER et al., 2009; RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012; TAVARES et al., 2014; CARLSEN et al., 2015). Essa última funciona como uma rede composta de proteínas citosólicas e granulares montadas em um suporte de cromatina descondensada, que captura e neutraliza microrganismos, fornecendo uma alta concentração local de moléculas antimicrobianas (GUIMARAES-COSTA et al., 2009; PAPAYANNOPOULOS, 2017). Sabe-se ainda que os neutrófilos podem contribuir para o controle da *Leishmania* via ativação de macrófagos. Isso pode ocorrer de forma dependente de contato (NOVAIS et al., 2009), de modo que a interação entre essas células gera ativação dos macrófagos e liberação de TNF α e superóxido, ou ainda, de forma independente de contato com a ativação de macrófagos via enzimas neutrofílicas, gerando maior produção de TNF α e Leucotrieno B4 (LTB4) (TAVARES et al., 2016). Além do controle da infecção, os neutrófilos podem ainda produzir citocinas e quimiocinas que atuam no recrutamento e ativação de outras células, induzindo e mantendo uma resposta inflamatória no local da infecção (PRATES et al., 2011; CARLSEN et al., 2015).

1.4. RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE PADRÕES NA LCL

A superfície externa da membrana de *Leishmania* é coberta por estruturas conservadas denominadas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Dentre eles, os mais estudados em *Leishmania* são os membros da família de fosfolipídios de glicoinositol (GIPL) e lipofosfoglicano (LPG). Essas moléculas são elementos chave tanto para a sobrevivência no vetor, como para modular a resposta imune do hospedeiro durante a infecção (TUON et al., 2008; ASSIS et al., 2012). Esses PAMPs expressos pela *Leishmania* são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) capazes de diferenciar moléculas próprias de não-próprias. Existem 4 principais famílias de PRRs que

podem ser classificadas em proteínas transmembrana, como os *Toll Like Receptors* (TLRs) e *C-type lectin receptors* (CLRs) ou em proteínas citoplasmáticas, como os *Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors* (RLRs) e *NOD-like receptors* (NLRs) (TRINCHIERI; SHER, 2007; TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

1.5 TOLL LIKE RECEPTORS

Dentre as principais famílias de PRRs, a dos TLRs é a mais estudada. Esses receptores são subdivididos em 10 famílias em humanos (TLR1 a TLR10) e 12 famílias em camundongos (TLR1 a TLR9 e TLR11 a TLR13), sendo TLR-1, 2, 4, 5, 6, 10, 11 e 12 receptores de membrana celular, enquanto TLR-3, 7, 8, 9 e 13 são intracelulares, expressos na membrana endossômica (KAWASAKI; KAWAI, 2014; CHAUHAN et al., 2017). A ligação de PAMPs ao ectodomínio de TLR gera alterações conformacionais nos domínios citoplasmáticos que recrutam moléculas adaptadoras. Os TLRs sinalizam através de quatro principais proteínas adaptadoras: *Myeloid Differentiation Factor 88* (MyD88), *TIR Domain Containing Adaptor Protein* (TIRAP), *TIR Domain Containing Adaptor Protein Inducing Interferon γ* (TRIF) ou *TRIF-Related Adaptor Molecule* (TRAM). Essas adaptadoras recrutam cinases que levam à fosforilação e degradação da molécula inibidora I κ B, levando à liberação de dímeros do fator nuclear kappa B (NF- κ B). Este último é um fator de transcrição que transloca para o núcleo e promove a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (TRINCHIERI; SHER, 2007; KAWASAKI; KAWAI, 2014; CHAUHAN et al., 2017). Deste modo, o reconhecimento via TLRs é importante para iniciar e direcionar a resposta imune contra a *Leishmania*.

1.6 TRIGGERING RECEPTORS EXPRESSED ON MYELOID CELLS 1 (TREM-1)

Os receptores de ativação expressos em células mielóides (do inglês *Triggering Receptors Expressed on Myeloid cells* – TREM) são uma família de receptores de superfície celular que pertence à superfamília das imunoglobulinas. Os mesmos são bem conservados evolutivamente e se destacam como importantes

moduladores da intensidade da resposta imune. Já foram descritos TREM-1 e TREM-2 em humanos, além do TREM-3 em camundongos, porém o TREM-1 foi o primeiro identificado e melhor caracterizado até o momento (ALLCOCK et al., 2003; KLESNEY-TAIT et al., 2006; FORD; MCVICAR, 2009). Diferentemente de outros PRR, como os TLRs, que são expressos de forma ubíqua, a expressão de TREM é observada principalmente em células da linhagem mielóide, mas também em megacariócitos, plaquetas, células endoteliais e queratinócitos (TU et al.; SHARIF; KNAPP, 2008; JOLLY et al., 2017). TREM-1 é expresso de modo constitutivo em neutrófilos, além de subtipos de monócitos e macrófagos e sua expressão é aumentada após estímulo com PAMPs (BOUCHON et al., 2000; RAI; AGRAWAL, 2017).

1.6.1 LIGANTES TREM-1

A identificação dos ligantes de um receptor é fundamental para estabelecer a associação entre sua sinalização e a patogenia de doenças. Neste sentido, já foram propostos diferentes ligantes para os receptores da família TREM, desde moléculas presentes na superfície de plaquetas (HASELMAYER et al., 2007) até ligantes solúveis presentes no plasma de pacientes com sepse (WONG-BAEZA et al., 2006). Também já foi demonstrada a ligação de TREM-1 com CD177 (“Screening, therapy and diagnosis,” 2008), receptor envolvido com a migração de neutrófilos (SACHS et al., 2007), com padrões moleculares associados ao dano (PMAD) como *High-mobility group box 1* (HMGB1) e *70 kilodalton heat shock proteins* (HSP70) (MEZAYEN, EL et al., 2007; WU et al., 2012), e PAMPs (MOHAMADZADEH et al., 2006; BUCKLAND et al., 2011). Em conjunto, estes achados indicam que TREM-1 pode atuar como PRR de capacidade similar aos TLRs através do reconhecimento de padrões moleculares. No entanto, TREM-1 pode não ter um ligante único, como a maioria dos receptores de ativação, mas sim reconhecer epítomos múltiplos.

1.6.2 VIA DE SINALIZAÇÃO TREM-1

A sinalização intracelular induzida através do receptor TREM-1 depende da proteína adaptadora DNAX de 12 kDa (DAP12) (BOUCHON et al., 2000; TESSARZ; CERWENKA, 2008b). A sinalização via TREM-1 é iniciada após associação e fosforilação da DAP12 por cinases da família Src que resulta no recrutamento e ativação da tirosina cinase *Spleen tyrosine kinase* (Syk). Esta, por sua vez, ativa moléculas de sinalização tais como *Phosphoinositide 3-kinase* (PI3k), *Phospholipase C* (PLC), *Extracellular Signal-Related Kinase* (ERK1/2) e *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPs) que regulam a ativação do fator de transcrição NFκB e a consequente expressão de genes relacionados à resposta inflamatória, tais como citocinas e quimiocinas (BOUCHON et al., 2000; TESSARZ; CERWENKA, 2008b; FORD; MCVICAR, 2009).

1.6.3 CONSEQUÊNCIAS DA ATIVAÇÃO DE TREM-1

O reconhecimento do ligante pelo receptor TREM-1 induz a ativação da sua via de sinalização intracelular através da DAP12, resultando em diferentes respostas celulares envolvidas na inflamação. Diversos trabalhos mostram que a ativação de TREM-1 em monócitos levou ao aumento da fagocitose, produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, tais como: *Monocyte chemoattractant protein 1* e 3 (MCP-1 e MCP-3) que recrutam monócitos, *Chemokine C-C motif ligand 3* (CCL3) que recruta monócitos e linfócitos e Interleukin 8 (IL-8), um quimiotático potente para neutrófilos, além das citocinas *Tumor necrosis factor α* (TNF- α) e Interleukin 1β (IL-1β) (BOUCHON et al., 2000; BLEHARSKI et al., 2003; TESSARZ; CERWENKA, 2008a; DUBAR et al., 2018). Em neutrófilos, já foi demonstrado que a ativação de TREM-1 leva ao aumento da fagocitose, degranulação de enzimas, como MPO, explosão respiratória com produção de radicais livres de oxigênio (ROS) e produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, como IL-8 (BOUCHON et al., 2001; RADSACK et al., 2004; TESSARZ; CERWENKA, 2008a).

Por outro lado, a ativação de DAP12 via TREM-2, em diversos tipos celulares, promove a redução da produção de citocinas inflamatórias, como TNF-α, IL-1β e IL-6 e aumento de anti-inflamatórias, como IL-10 e TGFβ. (SUGIMOTO et al., 2014; GENUA et al., 2014; PELHAM et al., 2014; YAO et al., 2016; LI et al.,

2019). Sendo assim, TREM-2 é relatado na literatura por promover efeitos anti-inflamatórios e contrários ao TREM-1

Em conjunto, estes achados indicam que TREM-1 atua como potencializador da resposta inflamatória, enquanto TREM-2 regula este efeito, balanceando a intensidade da inflamação através da produção de mediadores anti-inflamatórios.

1.6.4 CONSEQUÊNCIAS DO BLOQUEIO DE TREM-1

Em virtude do papel exacerbador da inflamação de TREM-1, diversos estudos em modelos de doenças inflamatórias avaliaram o bloqueio desse receptor e suas consequências patológicas. A inibição farmacológica de TREM-1 atenuou o desenvolvimento da doença e preveniu a morte em diferentes modelos de choque séptico (BOUCHON et al., 2001; GIBOT et al., 2006; SHI et al., 2017). Adicionalmente, estudos clínicos de fase I já foram realizados para avaliar os efeitos de um inibidor do TREM-1, o Nangibotide, administrado por via intravenosa, como potencial ferramenta terapêutica para imunomodulação. O mesmo demonstrou segurança e tolerabilidade em humanos nas concentrações e métodos de entrega do fármaco avaliados neste estudo (CUVIER et al., 2018). Contudo, em animais com deficiência de TREM-1/3 em diferentes modelos de infecções, observou-se aumento no crescimento de bactérias das espécies *Streptococcus pneumoniae* e *Klebsiella pneumoniae*, além da disseminação da infecção para outros órgãos e conseqüentemente maior letalidade (LIN et al., 2014; HOMMES et al., 2014), indicando que o bloqueio de TREM-1 não favoreceu um bom desfecho da doença. Por outro lado, em modelo experimental de infecção por *L. major*, que induz a forma cutânea da leishmaniose, os animais deficientes em TREM-1 apresentaram sinais clínicos mais atenuados, tais como diminuição do tamanho da lesão. Isso foi associado à redução do infiltrado inflamatório no local da lesão e expressão reduzida de citocinas inflamatórias, mas sem alterar a eliminação do patógeno, ou seja, esses animais resolveram a infecção de modo tão eficiente quanto os animais selvagens (WEBER et al., 2014). Sendo assim, esses estudos demonstram que, para cada condição patológica avaliada, o papel do TREM-1 se dá de modo específico. Portanto, sua inibição pode atuar na melhora ou piora no desfecho da doença, dependendo

das condições em que a inibição do TREM-1 é induzida e da fisiopatologia da doença testada.

1.6.5 FORMA SOLÚVEL DE TREM-1

Embora os membros da família TREM sejam receptores associados à membrana, já foram descritas formas solúveis destes receptores em amostras de pacientes com diferentes condições inflamatórias (SU et al., 2012; KLESNEY-TAIT et al., 2013; FENG et al., 2018; WANG et al., 2018; JEDYNAK et al., 2018). A forma solúvel do TREM-1 (sTREM-1) é um peptídeo glicosilado, produzido através da clivagem do domínio extracelular pela MMP-9 (WEISS et al., 2016). Além disso, foi identificada uma isoforma de sTREM-1 presente em grânulos de neutrófilos, com capacidade de inibir a resposta inflamatória induzida pelo receptor TREM-1 (POPE et al., 2015). Até o momento, a função do sTREM não foi claramente descrita, mas, com base nestes achados e também nos mecanismos reguladores de outros receptores em forma solúvel (WANG et al., 2017; FAILLA et al., 2018), sugere-se que sTREM-1 regula negativamente a sinalização TREM-1 através da neutralização de seus ligantes. Ademais, recentemente foi descrito que altos níveis circulantes de sTREM-1 correlacionam-se diretamente com a gravidade da LV, além de também estarem significativamente mais elevados em pacientes com LV que vieram a óbito (BOMFIM et al., 2017). Sendo assim, o sTREM-1 parece funcionar também como biomarcador.

1.6.6 Interação entre TREM-1 e TLR

Foi demonstrado que a estimulação simultânea de TREM-1 e TLR aumenta, de modo sinérgico, a produção de mediadores inflamatórios, degranulação e explosão respiratória (RADSAK et al., 2004; ARTS et al., 2013). TREM-1 funciona, portanto, como um amplificador da sinalização TLR e da resposta inflamatória. Esse sinergismo ocorre devido a um aumento da expressão do TREM-1 resultante da ativação de TLRs. (BLEHARSKI et al., 2003; ZENG et al., 2007; ZHENG et al., 2010; BUCKLAND et al., 2011). Adicionalmente, a ativação de TREM-1 por agonistas leva a uma redução significativa de reguladores

negativos de sinalização TLRs como IRAK-M e *Toll-interacting protein* (Tollip). Além disso, já foi demonstrado que, após estimulação com LPS ou agonistas de TREM-1, ocorre a associação deste receptor com TLR4 numa mesma balsa lipídica. Sabe-se que essas balsas funcionam como uma plataforma para a transdução de sinal. Sendo assim, este dado sugere que as duas vias podem agir sinergicamente através de uma sinalização inflamatória mais efetiva e assim desencadear uma resposta imune mais intensa (FORTIN et al., 2006). Adicionalmente, estudos mostraram que o silenciamento do TREM-1, via antagonista ou RNA de interferência, não altera a expressão de TLR4, mas reduz a expressão da proteína adaptadora MyD88 e citocinas como IL1 β e IL-10. Isso indica que a regulação da expressão de moléculas mais abaixo na cascata de sinalização também pode ser um mecanismo de interação entre TREM/TLR (ORNATOWSKA et al., 2007; HU et al., 2014).

1.6.7 TREM-1 E HOMEOSTASIA

Após a indução da resposta inflamatória, o balanço anti-inflamatório é fundamental para o retorno da homeostasia no tecido inflamado com consequente cicatrização. Um dos fatores que determina o equilíbrio entre a eliminação do patógeno e o dano tecidual é a cinética em que ocorre a indução de moléculas anti-inflamatórias e cicatrizantes. Já foi demonstrado que o tratamento sinérgico de monócitos humanos com TGF- β e IL10 exógenos reduz a expressão de TREM-1 na superfície dessas células (SCHENK et al., 2005). Dessa forma, TREM-1 pode atuar como alvo a ser regulado por citocinas reguladoras. Ademais, essas citocinas possuem um papel dicotômico durante a cicatrização de feridas na LC, pois podem suprimir a reação inflamatória necessária para a eliminação do parasita, mas também são importantes para indução da cicatrização (ABDOLI et al., 2017). Sendo assim, se faz necessária uma regulação ideal para atingir a eliminação do parasito com dano mínimo no tecido. Isto posto, os mecanismos para atenuar a inflamação induzida por TREM-1 também podem participar da supressão da resposta inflamatória e da cicatrização.

2 JUSTIFICATIVA

A família de receptores TREM foi descrita recentemente e rapidamente emergiu como regulador de diversas funções celulares, incluindo a amplificação da inflamação. Porém, a maioria dos estudos sobre TREM aborda infecções virais e doenças autoimunes. Dentre os poucos estudos em doenças parasitárias, foi demonstrado aumento na expressão de TREM-1 em células CD11b+ no baço de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* (CHENG et al., 2011). Um outro estudo abordou a resposta de camundongos deficientes em TREM-1 em diferentes modelos experimentais de infecções, onde a *L. major* é utilizada como comparativo entre o vírus influenza e a bactéria *Legionella pneumophila*. Os resultados mostraram que em todas as enfermidades avaliadas, a ausência de TREM-1 reduz a gravidade da doença, por atenuar a patologia mediada pela resposta imune, enquanto o controle destes patógenos se mantém inalterado (WEBER et al., 2014). Além disso, foi estudada a resposta celular inicial de macrófagos de camundongos resistentes à infecção por *L. major* e foi observado um aumento na expressão de TREM-1 nas células infectadas, mas o estudo não explorou o papel dessa via durante a infecção (FILARDY, ALESSANDRA A. et al., 2014).

Diante do exposto, é evidente a grande lacuna no conhecimento descrito sobre o papel do TREM nas doenças parasitárias em humanos, em especial aquelas que acometem o Brasil e principalmente a Bahia, como a LTA causada por *L. braziliensis*. É de fundamental importância, portanto, aprofundar os conhecimentos acerca do papel de TREM-1 na leishmaniose, uma vez que seu potencial como novo alvo terapêutico já foi sugerido em estudos sobre infecções bacterianas e sepse. Um melhor entendimento desta via pode representar um avanço para o equilíbrio entre inflamação e controle parasitário. Neste sentido, o presente estudo investigou o papel do TREM durante a infecção por *L. braziliensis* em humanos.

3 HIPÓTESE

TREM-1 participa na indução da inflamação observada na LCL causada pela *L. braziliensis*, sem interferir na eliminação do patógeno.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Identificar o perfil de expressão do TREM-1 durante a LCL humana, descrevendo seu papel na resposta imune inata, bem como sua interação com TLRs para o controle da infecção e da resposta inflamatória.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Identificar o perfil de transcritos da via de sinalização TREM-1 em biopsias de pacientes acometidos por LCL causada por *L. braziliensis*;
- 2- Avaliar a expressão proteica da via de sinalização TREM-1 em biopsias de pacientes acometidos por LCL causadas por *L. braziliensis*;
- 3- Descrever o papel de TREM-1 em neutrófilos humanos infectados in vitro com *L. braziliensis*, além da sua interação com TLRs.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANÁLISE DE DADOS PÚBLICOS DE TRANSCRIPTOMAS

Para identificar vias de sinalização intracelulares envolvidas na indução de resposta inflamatória pela imunidade inata durante a infecção por *L. braziliensis*, foram pesquisados dados publicados em repositórios públicos (GEO – Gene expression Omnibus - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Dois transcriptomas de biópsias de pacientes comparadas com amostras de pele saudável foram encontrados: GSE55664 (Plataforma Illumina) e GSE63931 (Plataforma Agilent). O primeiro comparou 25 lesões de LCL (8 iniciais e 17 tardias) com 10 peles normais. O segundo utilizou 8 lesões (tratadas recentemente) e 8 controles. Os transcriptomas foram analisados no software Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®) com os filtros: “experimentalmente observado”, “altamente confiável” (**Figura 1**). Para comparar a especificidade dos resultados encontrados, foram analisados, da mesma forma, 2 conjuntos de dados de outras doenças inflamatórias de pele. Foram eles: GSE53431 (Psoríase) e GSE72535 (Lúpus).

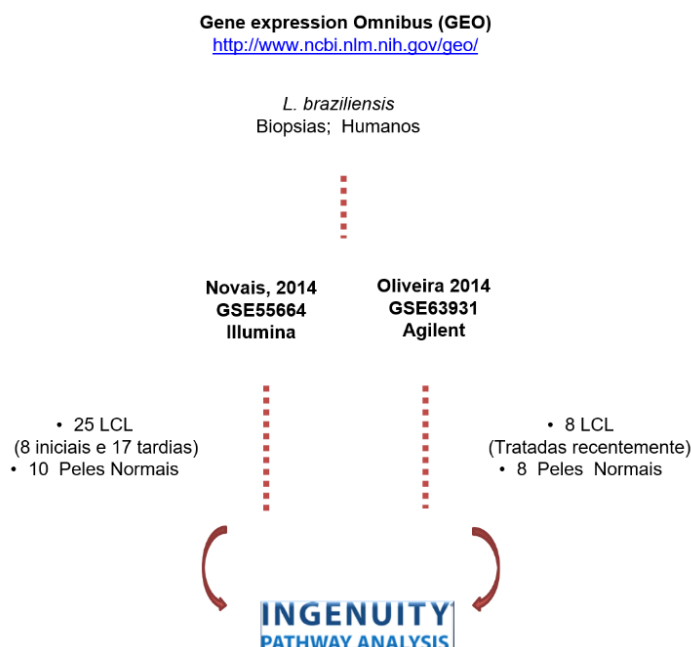


Figura 1. Representação esquemática da busca dos transcriptomas públicos utilizados. Foi pesquisado no GEO, repositório de dados públicos, por “*Leishmania braziliensis*” e biópsias de humanos. Os transcriptomas encontrados, foram analisados no software IPA.

5.2 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO

Os dados de expressão foram analisados utilizando *Multi Experiment Viewer* (MeV) (www.tm4.org/mev.html). A significância de expressão foi determinada com base na variância entre os dois grupos (valores em log de base 2), além disso, para análise de agrupamento hierárquico, a distância entre as amostras foi determinada pela distância euclidiana e pela ligação média (*average-linkage*). Foram confeccionados mapas de calor para representar a expressão das sondas através da intensidade do sinal. Adicionalmente, foi realizada análise de componentes principais (CP) para avaliar o agrupamento das amostras com base na expressão para a via do TREM. Para avaliar a diferença de expressão dos transcritos nas amostras de LCL em comparação com amostras controle foi considerado *Fold Change* (FC) ≤ -2 e ≥ 2 , com valor corrigido de $p < 0,05$ como critério para identificar mRNAs diferencialmente expressos.

5.3 LOCAL DE ESTUDO/ PACIENTES

Amostras de biopsias e sangue foram obtidas de pacientes do município de Jiquiriça (Bahia), onde as leishmanioses são endêmicas. Jiquiriça situa-se no sudoeste do estado (a 13°15' de latitude sul e 39°35' de longitude oeste), distando 258km de Salvador. Essas amostras foram utilizadas em Imuno-histoquímica e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para validar os resultados obtidos na bioinformática.

5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Foram incluídos neste estudo, amostras de pacientes com LCL. Estes casos são provenientes do Centro de Referência em Leishmaniose do Vale do Jiquiriça, onde são atendidos, pela nossa equipe, cerca de 5 novos casos de LCL mensalmente. Foram utilizados critérios clínicos e epidemiológicos, associados à um ou mais exames laboratoriais para a confirmação da LTA. Como aspectos clínico e epidemiológicos sugestivos de LCL foram considerados, além da procedência da área endêmica, de lesões cutâneas tipo úlcera únicas ou múltiplas, bem delimitadas e com fundo granuloso. Além dos critérios clínicos e epidemiológicos, foram considerados teste cutâneo intra-dérmico de Montenegro

(IDRM) e sorologia anti Leishmania positivos e/ou presença de Leishmania nas biópsias detectada por imuno-histoquímica (IHQ) ou PCR. Como critério de inclusão no estudo, foram considerados os indivíduos maiores de idade e que consentiram em doar sangue periférico e/ou fragmento do tecido obtido por biópsia após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O presente estudo foi desenvolvido sob os critérios da Regulamentação da Bioética no Brasil com aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (**Anexo A**).

5.5 IMUNOHISTOQUÍMICA

A técnica foi utilizada para a detecção da expressão de TREM-1, Def β 2, Dap12 TLR4 e TLR2 em biópsias de lesão de pacientes com LCL e em amostras de pele de pacientes saudáveis obtidos de cirurgia plástica. Foram feitas secções das amostras em parafina para lâminas ImunoSlide. Para a marcação, foram utilizados anticorpos monoclonais anti-TREM-1, anti-TLR4 (ambos abcam), Dap12 (abcam), Def β 2 (Biorbyt) e TLR-2 (Millipore) de acordo com as instruções dos respectivos fabricantes. Após a IHQ, foram obtidas imagens digitais, capturadas utilizando microscópio Nikon E600 e câmara digital Q-Color 1 Olympus. Posteriormente, foi quantificada a área marcada utilizando o software Image-J e o resultado expresso em média da % área marcada/campo \pm desvio padrão.

5.6 PCR EM TEMPO REAL

O RNA total das amostras de biópsias e PBMC e PMN foi extraído com o kit RNeasy (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Os cDNAs foram sintetizados com o kit ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega). A expressão relativa dos mRNAs foi obtida por qRT-PCR, onde os ensaios foram realizados em duplicata, com SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) no equipamento 7900 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

5.7 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (CMSP)

Aproximadamente 20mL de sangue foi coletado de cada paciente ou de controles de bolsas de sangue adquiridas através de parceria com a Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA). O sangue foi depositado sobre um gradiente de Ficoll-Hypaque que permite a obtenção de CMSP por gradiente de centrifugação.

5.8 OBTENÇÃO DE CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES (PMN)

O sangue, obtido da mesma forma que em CMSP, foi depositado sobre um gradiente de Polymorphprep (Axis-Shield, Oslo, Noruega) na proporção 1:1, de modo que a camada de meio fica abaixo da camada de sangue. Os tubos foram centrifugados, o plasma foi retirado e a camada de células PMN coletada. Essa camada foi lavada três vezes por centrifugação a 370g, 4°C por 10 min, com solução salina estéril para retirada do meio residual. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em meio RPMI completo e contadas em câmara de Neubauer, utilizando Azul de Trypan para avaliar a viabilidade. Foram plaqueadas 5×10^5 células por poço.

5.9 PARASITAS

A cepa MHOM/BR/01/BA788 foi isolada da úlcera de um paciente com leishmaniose cutânea localizada, do estado da Bahia. O isolado foi identificado como *L. braziliensis* por PCR e anticorpos monoclonais. Os promastigotas foram mantidos em meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (SBF) (Cripion Biotecologia, Sao Paulo, Brasil), L-glutamina 2mM, penicilina 100U/ml e estreptomicina 100µl/ml (todos da Sigma-Aldrich). Após 7 dias de cultura, o meio contendo as formas promastigotas, em fase estacionária, foi coletado e centrifugado a 81g por 4 min a 20°C. O sobrenadante foi coletado e lavado 2 vezes por centrifugação a 1482g por 10 min em solução salina estéril. A concentração de promastigotas obtida foi ajustada em meio RPMI 1640 (GibcoInvitrogen Corporation, Carlsband, CA, USA) suplementado com 10% de

soro AB RH+ inativado (BD PharMingen, San Diego, CA, USA), L-glutamina 2mM, penicilina 100U/ml e estreptomicina 100µl/ml (todos da Sigma-Aldrich), denominado RPMI completo, após contagem em câmara de Neubauer.

5.10 INFECÇÕES *IN VITRO*

As células foram infectadas ou não com os parasitos, na proporção de 1:10, por 3 horas ou 30 minutos. A taxa de infecção foi avaliada por microscopia ótica após coloração com hematoxilina-eosina (HE).

5.11 ESTÍMULOS

Os Neutrófilos foram incubados com 100ng/mL de LPS durante 30 minutos ou 1µg/mL do agonista de TREM-1 (MAB1278, R&D Systems) por 30 minutos ou 1µg/mL do anticorpo neutralizante do TREM-1 (ab90808, abcam), bem como seu isotipo por 15 minutos, ou 100ng/mL do anticorpo TLR2 (maba2-htlr2, Invitrogen) e seu isotipo por 15 minutos.

5.12 CITOMETRIA DE FLUXO

As células foram marcadas com anticorpos anti-TREM (Biolegend), anti-CD11b e anti-HLADR (BD) ligados à cromógenos para aquisição em citômetro, onde o mínimo de 100.000 eventos foram avaliados pelo FACS Aria. Os resultados foram analisados através do software *Flow Jo*.

5.13 DETERMINAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

Os sobrenadantes das culturas dos neutrófilos, estimulados ou não, foram coletados após os tempos de estímulo e os níveis de mediadores inflamatórios foram avaliados por ELISA de acordo as instruções do fabricante (R&D Systems).

5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, foi utilizado o programa GraphPad- Prism (GraphPad software, San Diego, CA-USA). Os resultados foram representados como valores das medianas obtidas em cada condição. As comparações entre dois grupos foram feitas utilizando-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney e as análises com mais de dois grupos foram realizadas utilizando-se o teste de

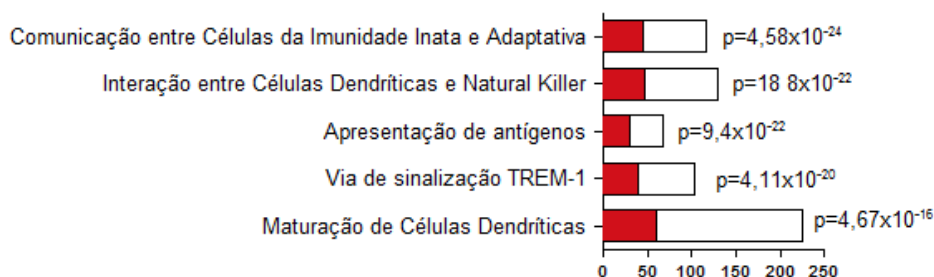
Kruskal–Wallis ou Friedman seguido do pós-teste de Dunn's. Os valores com $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

6 RESULTADOS

6.1 LESÕES DE LCL EM HUMANOS CAUSADA POR *L. BRAZILIENSIS* APRESENTAM AUMENTO NA EXPRESSÃO DA VIA TREM-1

Inicialmente, foram utilizados dados públicos de transcriptomas de biópsias obtidas de pacientes com lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* para análise da expressão gênica em comparação com amostras de pele saudável. Foram encontrados 2 conjuntos de dados com esses critérios (GSE55664 e GSE63931) e os valores brutos de expressão gênica foram analisados no software Ingenuity Pathway Analysis (IPA), onde a via de sinalização do receptor TREM-1 destacou-se entre as vias de sinalização da imunidade inata significativamente moduladas. Dentre as vias canônicas identificadas, o programa classifica as mais significantes de acordo com o número de transcritos modulados além da relevância estatística (valor de p). Nesta classificação, a via de sinalização TREM-1 ficou na 4^a colocação em ambos transcriptomas, sugerindo a importância desta via na LCL. (**Figura 2 A e B**).

A)



B)

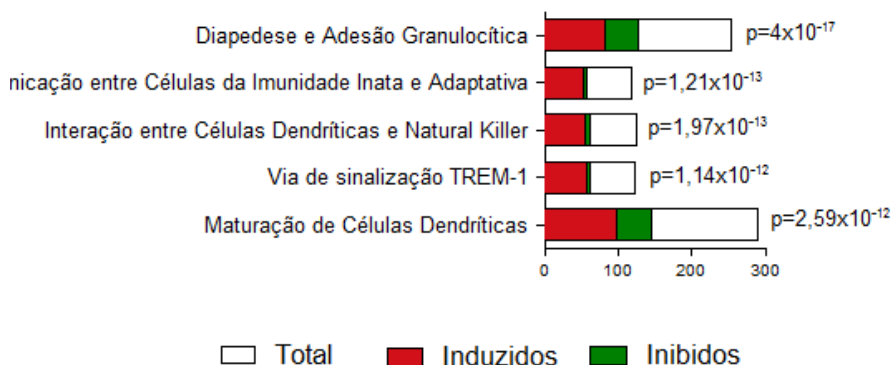
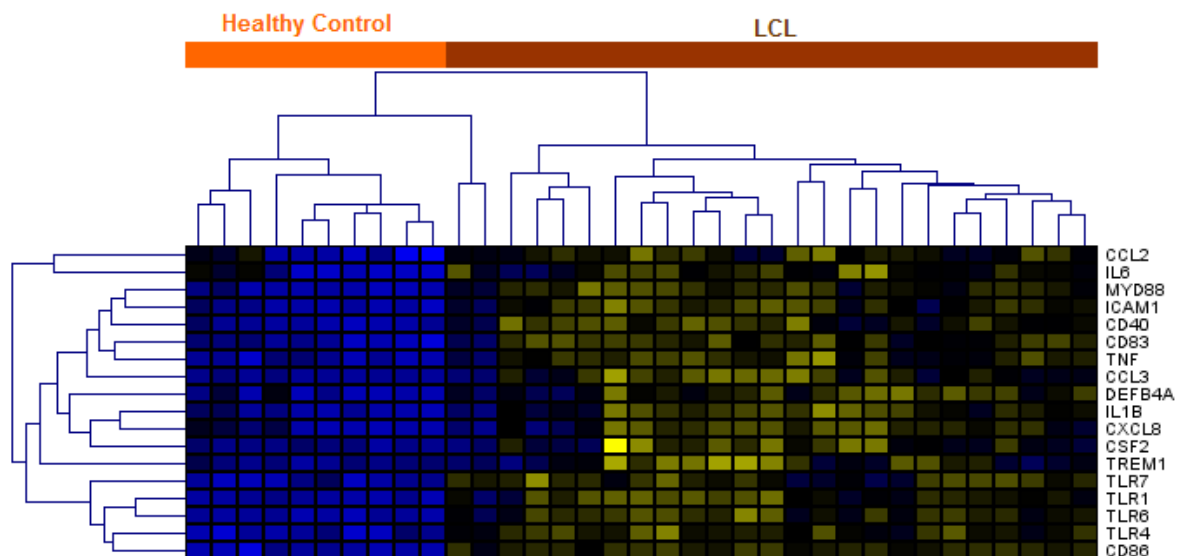


Figura 2. Vias canônicas da Imunidade Inata mais significativamente moduladas durante a LCL humana. Número absoluto de transcritos modulados ($FC \leq -2$ e ≥ 2 e valor de $p < 0,05$) envolvidos nas 5 vias de Imunidade Inata mais significantes na LCL. Análise de dados públicos dos transcriptomas GSE55664 (A) e GSE63931 (B) utilizando o software IPA comparando biópsias de lesões de LCL causadas por *L. braziliensis* em comparação com amostras de pele saudável. Total de moléculas das vias representadas pela cor branca das barras. Moléculas induzidas em vermelho e inibidas em verde (valores de p de modulação indicados em suas respectivas barras).

Posteriormente, foi construído um mapa de calor, indicando os valores de intensidade de expressão, utilizando os transcritos envolvidos na via do TREM-1, com valores de *fold change* ≤ 2 e ≥ -2 e valor de $p < 0,05$. No transcriptoma GSE55664, pode-se observar uma separação entre o grupo de controles e pacientes com LCL, de acordo com a análise de agrupamento entre amostras (**Figura 3A**). Com a exceção de dois pacientes que foram agrupados mais proximamente ao grupo controle nesta análise, há uma predominância de mínima intensidade de sinal para os genes constituintes da via do TREM-1 nos controles (cor azul), e o inverso é observado na pele lesionada (cor amarela). Ademais, dados clínicos publicamente disponíveis destes pacientes (NOVAIS et al., 2015) indicam que os dois indivíduos que mais se aproximam dos doadores saudáveis apresentam maior tempo de doença (considerada LCL tardia), o que pode indicar um maior controle homeostático da lesão, fazendo com que estes pacientes apresentem um perfil de expressão do TREM-1 mais próximo aos doadores saudáveis.

Para confirmar esses resultados, as mesmas análises foram realizadas no transcriptoma GSE63931, onde a via do TREM-1 também demonstrou estar modulada na lesão causada por *L. braziliensis*. Adicionalmente, foi confirmada a separação entre grupos controle e LCL devido a essa diferença de expressão na via TREM-1 (**Figura 3B**). Em seguida, a análise de componente principal (PCA) confirmou o mesmo padrão de separação entre pacientes (marrom) e controles (laranja) (**Figura 4 A e B**). Em conjunto, estes dados reforçam a ativação da via TREM-1 durante a LCL ativa em pacientes de diferentes áreas endêmicas para *L. braziliensis*.

A)



B)

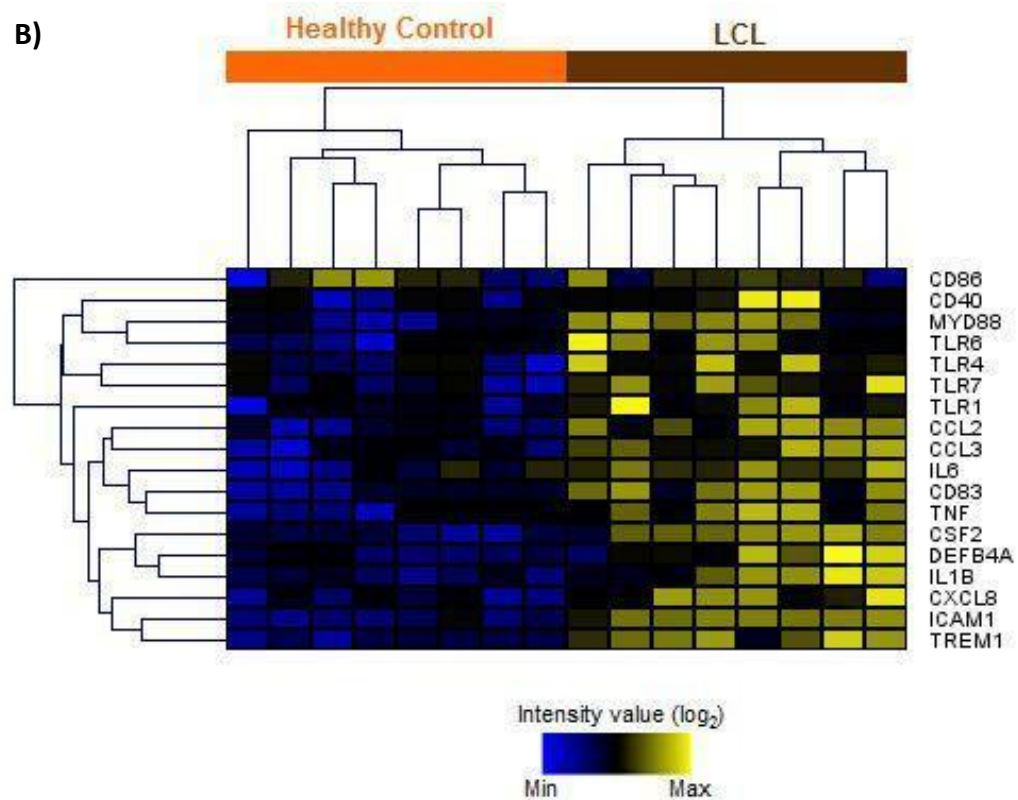
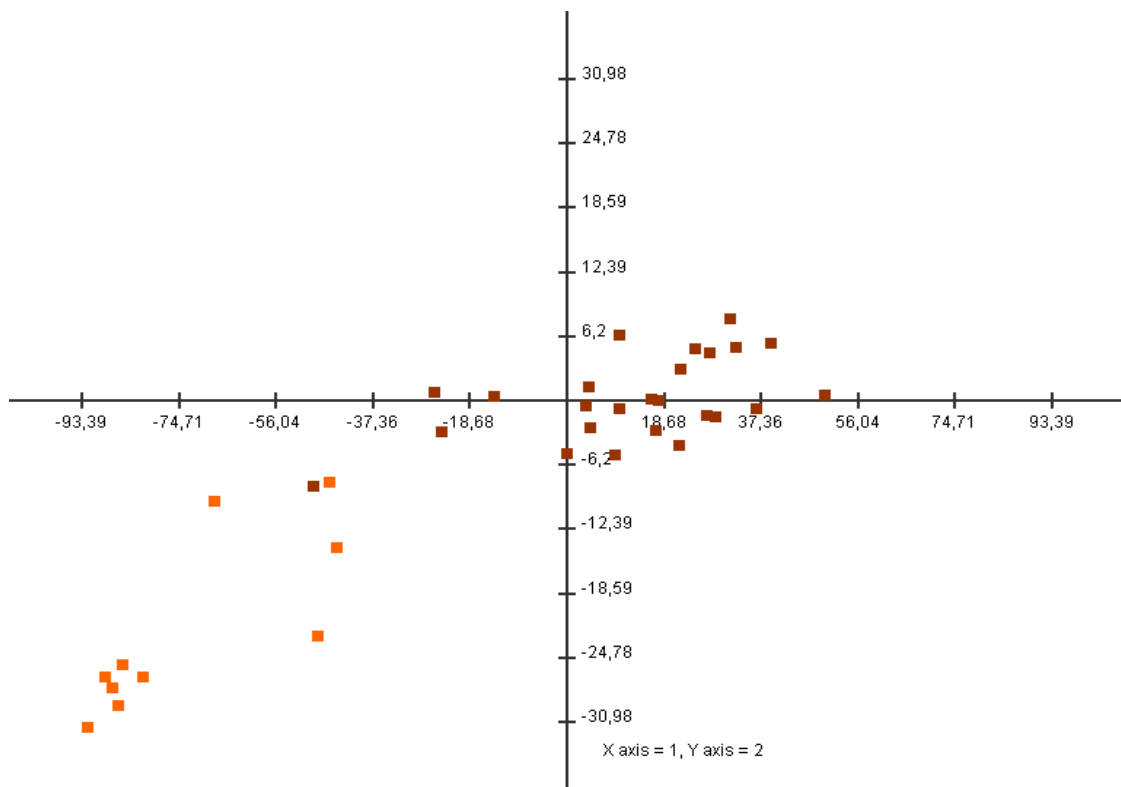


Figura 3. Análise de agrupamento entre LCL e controle saudáveis de acordo com as diferenças de expressões para os mRNAs envolvidos na via de sinalização do TREM-1. Mapa de calor com valores de intensidade de fluorescência para os transcritos modulados significativamente ($FC \leq 2$ e ≥ -2 e valor de $p < 0,05$) da via de sinalização do TREM-1 a partir de dados públicos de transcriptomas **A)** GSE55664 e **B)** GSE63931.

A)



B)

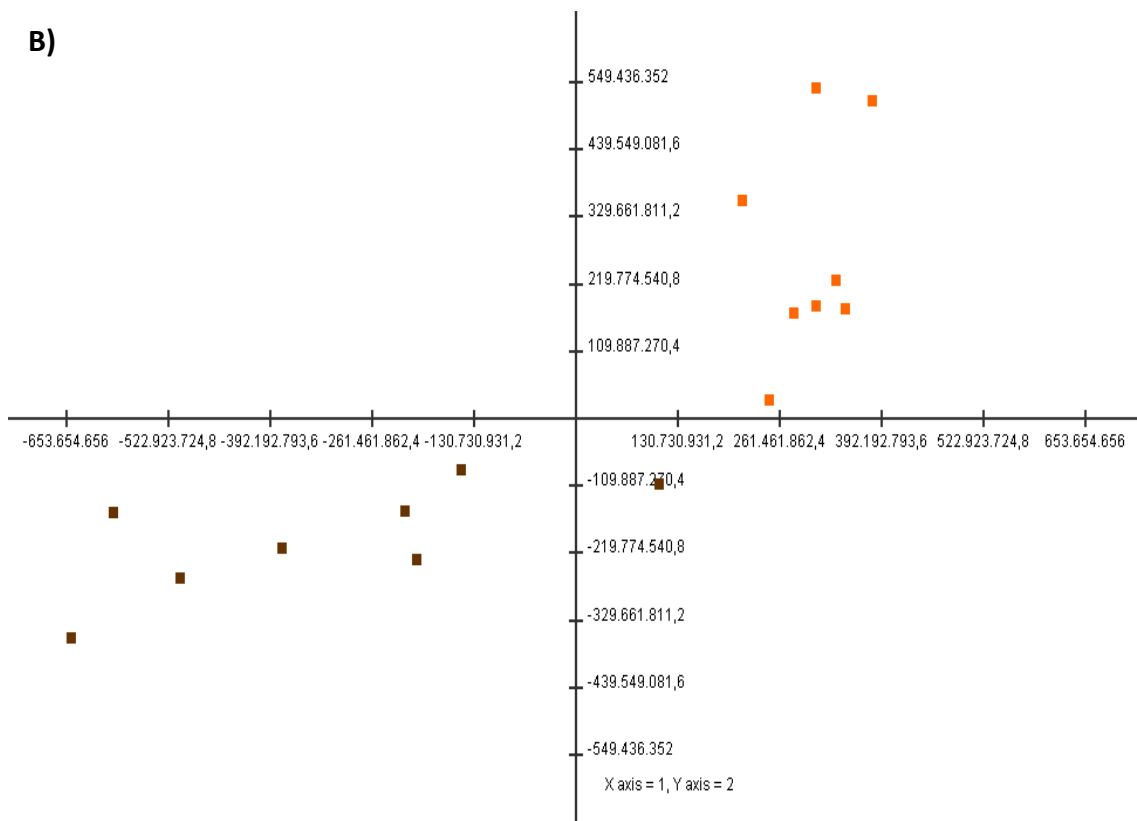


Figura 4. Análise de Componente Principal (PCA) definindo agrupamento entre amostras de LCL comparadas com controles. Amostras de pele obtidas da lesão de pacientes com LCL (marrom) ou de indivíduos saudáveis (laranja) de acordo com as diferenças de expressão para os RNAs envolvidos na via de sinalização do TREM-1. Foram considerados os transcritos envolvidos na via de sinalização TREM-1 modulados significativamente ($FC \leq -2$ e ≥ 2 e valor de $p < 0,05$) a partir de dados públicos de transcriptomas **A) GSE55664** e **B) GSE63931**.

Para validar esses achados de expressão gênica global (transcriptomas), foram obtidas novas amostras de biópsias das lesões de pacientes com LCL e foi realizado PCR em tempo real de transcritos-alvos envolvidos na via TREM-1, em comparação com amostras de pele saudável. Para essa análise, foram selecionados *primers* para transcritos-alvos da via de sinalização TREM-1 definidos de acordo com sua posição, mais acima ou abaixo da molécula iniciadora, representados em valores FC em dados públicos. Dentre os selecionados estão: TREM-1, TREM-2, DEFBA4, TYROBP (DAP12), TLR2 e TLR4 (**Figura 5 A e B**).

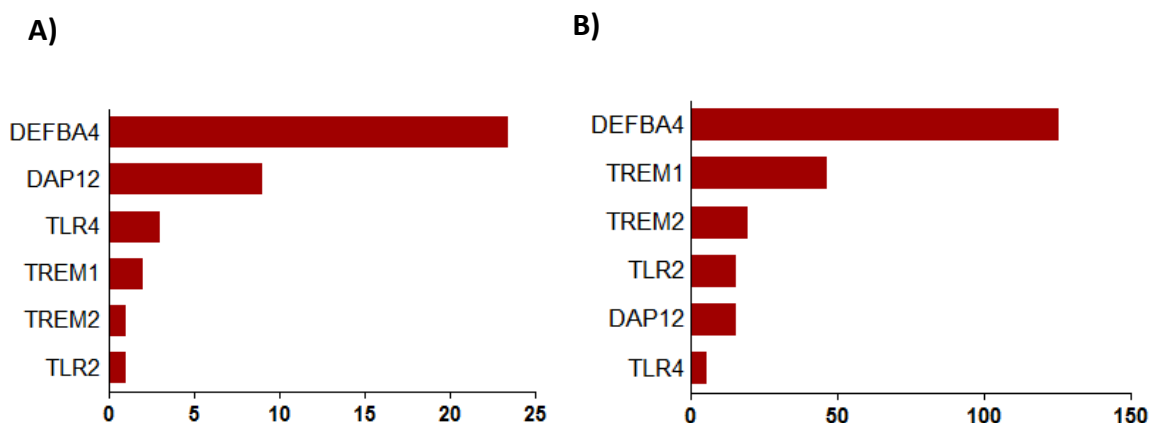


Figura 5. Valores de FC de transcritos envolvidos na via de sinalização do TREM-1 durante a infecção por *L. braziliensis* em pacientes de diferentes áreas endêmicas obtidos a partir de dados de expressão gênica global publicamente disponíveis. Valores de FC dos transcritos selecionados para validação nos grupos de dados de transcriptoma **A) GSE55664** e **B) GSE63931**.

Os dados de validação por PCR em tempo real com novas amostras de pele das lesões de pacientes de outra área endêmica mostram que a expressão dos RNAm de DEFBA4, DAP12, TREM-1 e TLR4 apresentaram-se significativamente aumentados nas biópsias de LCL (**Figura 6**). No entanto, não foi observada diferença estatística na expressão de TLR2 entre a pele sadia e a

lesionada, diferentemente do resultado observado com os dados públicos (**Figura 5**). Essa diferença provavelmente se dá devido às variações intrínsecas das amostras, em especial pacientes e doadores saudáveis que não são isogênicos. Adicionalmente, a expressão de TREM-2, receptor que desencadeia uma resposta anti-inflamatória desta via, não foi detectada em ambos os grupos (**Figura 6**).

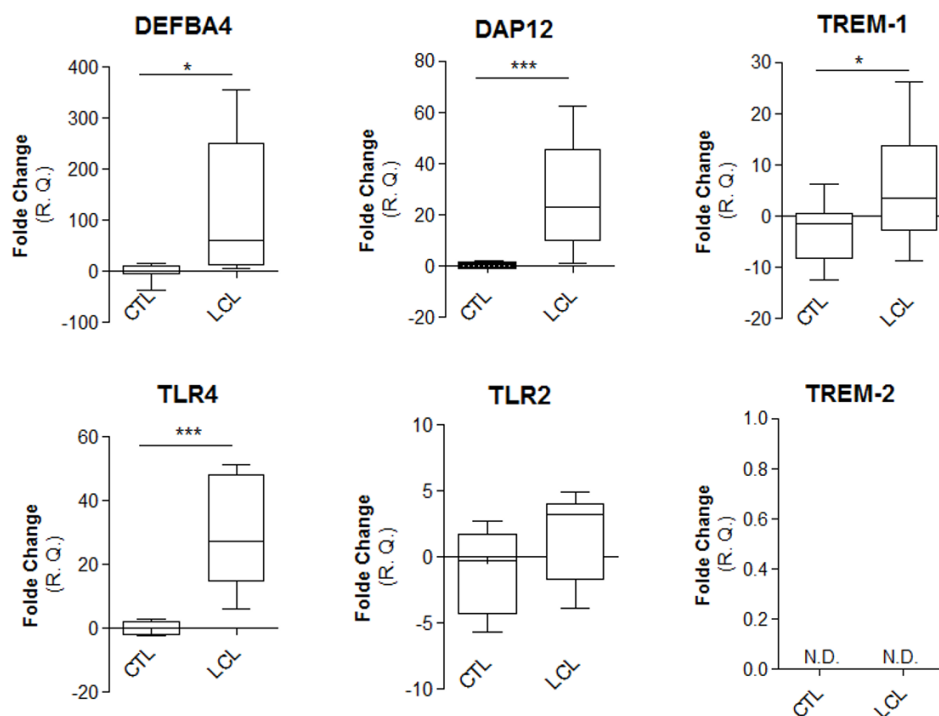
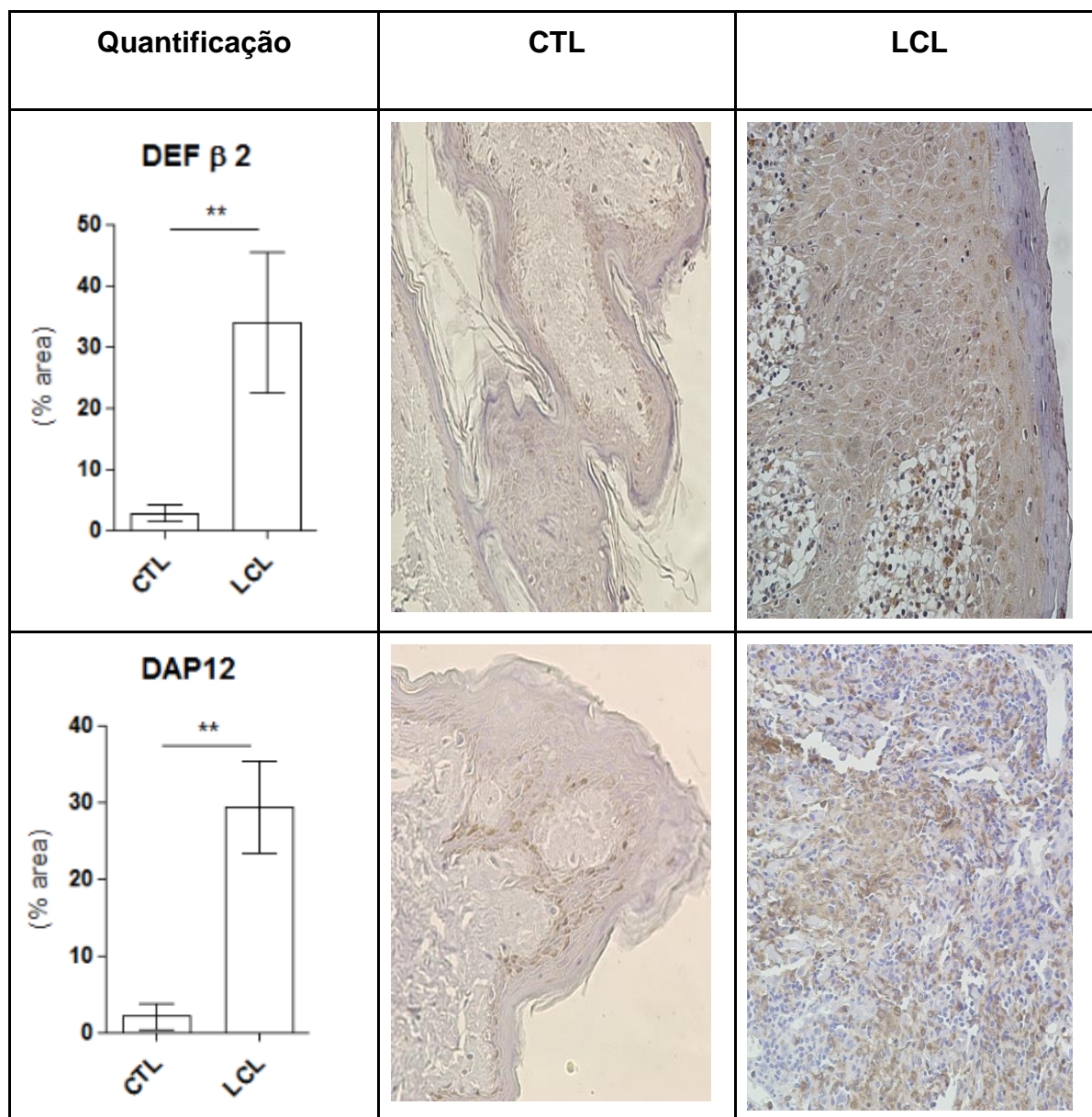


Figura 6. Aumento da expressão de RNAm de DEFBA4, DAP12, TREM-1 e TLR4 em biópsias de pacientes com LCL. Quantificação relativa por PCR em tempo real de RNA mensageiro de moléculas-alvo envolvidas na via de sinalização TREM-1 em biópsias de pacientes com lesões ativas por *L. braziliensis* comparada com amostras de pele saudável (n=10). Foram considerados significativos, valores de $p \leq 0,05^*$; $p < 0,001^{***}$.

Em seguida, foi feita a confirmação da tradução dos transcritos em proteínas através de IHQ para estas moléculas no tecido da lesão. A quantificação das proteínas da via do TREM-1 presentes no tecido demonstrou um aumento significativo na expressão de Def $\beta 2$, DAP12, TREM-1, TLR2 e TLR4 nas biópsias de pacientes com LCL comparadas à pele sadia (**Figura 7**). O receptor TREM-2 não foi avaliado por IHQ uma vez que seu RNAm não foi detectado nas biópsias testadas. Em conjunto, estes resultados confirmam a ativação da via de

sinalização TREM-1 encontrada em dados de transcriptoma e validada a nível proteico.



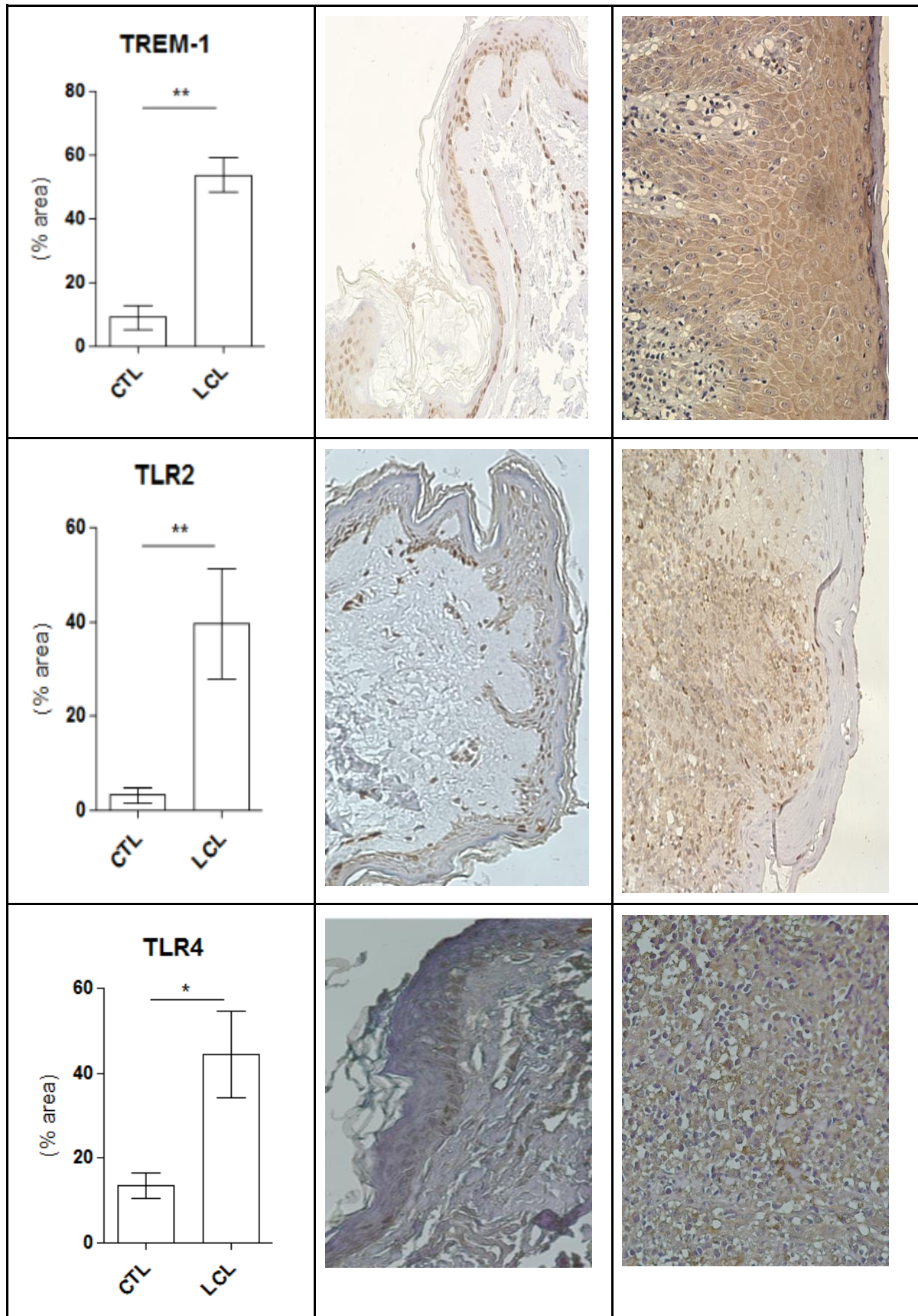


Figura 7. Aumento da expressão proteica de Def β 2, DAP12, TREM-1, TLR2 e TLR4 em biópsias de pacientes com LCL. Quantificação da expressão proteica das moléculas envolvidas na via do TREM-1 no software Image J. Imagens representativas de Imunohistoquímica das biópsias de pacientes com lesões ativas por *L. braziliensis* comparada com amostras de pele saudável coradas com Hematoxilina de Harris (40x). Foram considerados significativos, valores de $p \leq 0,05^*$ e $p < 0,01^{**}$ (n=6).

6.2 DEFENSINA B2 PARECE SER UM PRODUTO INESPECÍFICO LIBERADO EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS DE PELE ENQUANTO TREM-1 ESTÁ AUMENTADO DE FORMA ESPECÍFICA NA LCL

Diante desses resultados que confirmam o perfil de ativação de todas as moléculas da via de sinalização TREM-1 que foram avaliadas, decidimos investigar a especificidade desta ativação em outras doenças inflamatórias de pele. Para isso, foram avaliados os valores de FC dessas moléculas em outros dados públicos de transcriptoma com amostras de pacientes em comparação com pele saudável. Foram obtidos transcriptomas de biópsias de Psoríase e Lúpus, além dos outros 2 grupos de dados de LCL anteriormente avaliados.

Os resultados de FC dos transcriptomas demonstram que a expressão de Def β 2 está aumentada, do modo inespecífico, em todas as doenças de pele avaliadas. Por outro lado, a expressão do receptor TREM-1 é aumentada apenas nas amostras dos pacientes com LCL, quando considerado $FC \leq -2$ e ≥ 2 , sugerindo a especificidade da ativação da via de sinalização TREM-1 na Leishmaniose (**Figura 8**).

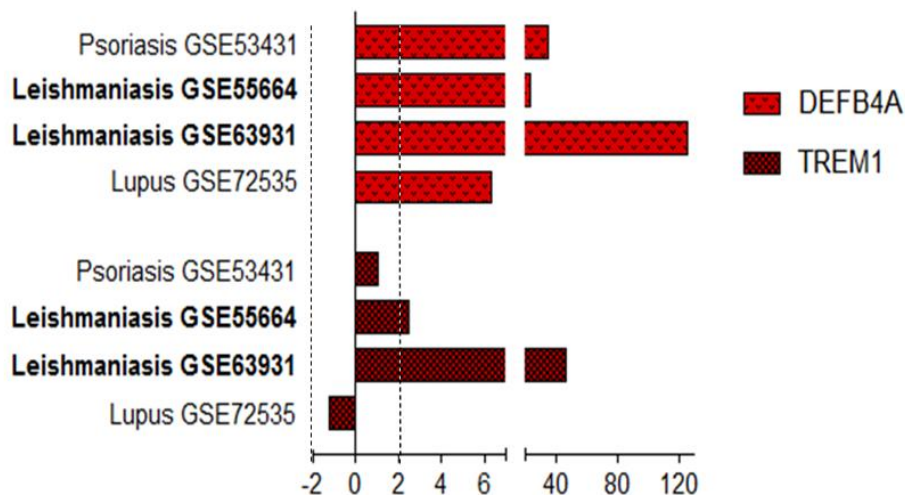


Figura 8. Defensina $\beta 2$ é um produto inespecífico liberado em doenças inflamatórias de pele enquanto a expressão de TREM-1 está aumentada apenas em LCL. Valores de *fold change* de TREM-1 e Def. $\beta 2$ de dados públicos de transcriptomas de biópsias de lesões cutâneas causadas por doenças inflamatórias, tais como LCL, Lupus e Psoríasis.

6.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE TREM-1 EM LEUCÓCITOS HUMANOS DE PACIENTES COM LCL

Uma vez que a via de sinalização do TREM-1 tem sido relatada na literatura como um importante fator para a ativação de leucócitos, procedemos com a avaliação da expressão de RNAs mensageiros da via em CMSP e PMNs de pacientes em comparação com doadores saudáveis como controles. Contudo, não foram observadas alterações no perfil de expressão de moléculas da via de sinalização TREM-1 em CMSP de pacientes quando comparados às células de doadores saudáveis (**Figura 9**). Este resultado era esperado, uma vez que TREM-1 é estritamente expresso em células de origem mielóide e as CMSP são, em sua maioria, de origem linfoide.

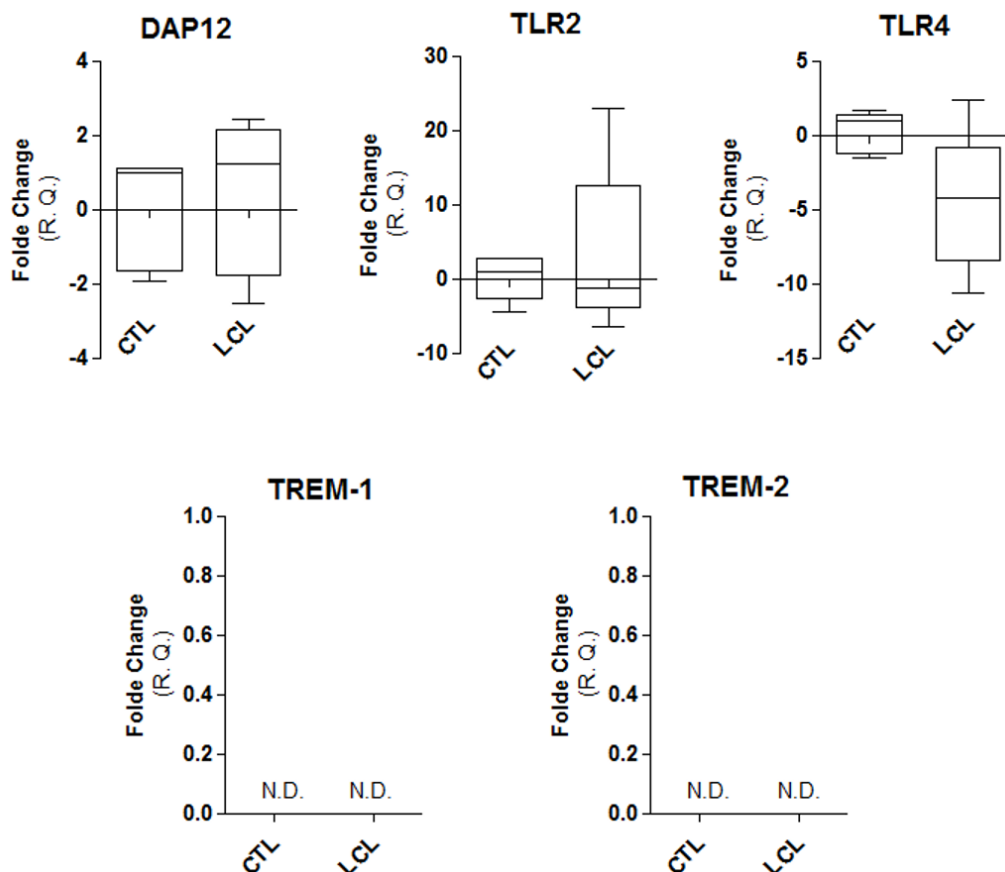


Figura 9. Expressão de RNAm de TREM-1, TREM-2, DAP12, TLR2 e TLR4 não é regulada durante LCL em CMSP humanas. Quantificação relativa por PCR em tempo real de RNA mensageiro em CMSP de pacientes com LCL por *L. braziliensis* comparada com voluntários sadios (n=5).

Ao avaliar a expressão desses mRNAs nos neutrófilos dos pacientes, obtidos do sangue periférico, onde a célula encontra-se em estado de repouso, observou-se uma regulação negativa de TREM-1, DAP12, TLR2 e TLR4 em comparação aos neutrófilos dos controles (**Figura 10**). Além disso, a expressão do RNAm de TREM-2 também não foi detectada em nenhuma dessas amostras celulares (**Figura 7 e 8**). Estes achados podem indicar um momento/ponto de regulação negativa na cinética do envolvimento dos neutrófilos na doença.

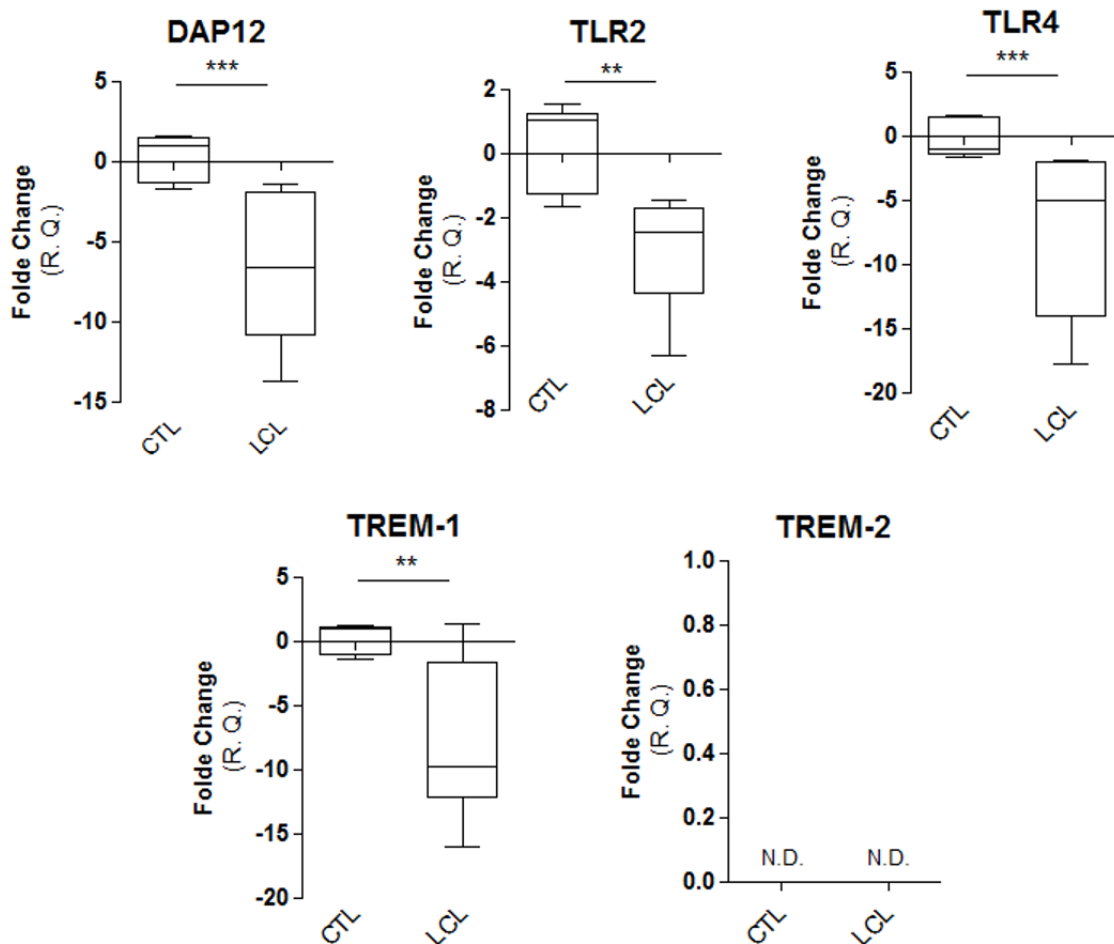


Figura 10. Expressão de RNAm de TREM-1, DAP12, TLR2 e TLR4 é regulada negativamente durante LCL em PMN humanos. Quantificação relativa por Real-Time PCR de RNA mensageiro em PMN de pacientes com LCL por *L. braziliensis* comparada com voluntários sadios (n=5). Foram considerados significativos, valores de $p \leq 0,05$.

Para avaliar se essa modulação negativa poderia ser artefato das condições de coleta, armazenamento e transporte das amostras entre a área endêmica e o laboratório, um novo experimento foi realizado com neutrófilos obtidos de doadores saudáveis expostos às estas mesmas condições. Nos tempos de 0h (amostras frescas, recém coletadas) e 12h (correspondente, em média, ao período de coleta, armazenamento e transporte das amostras da área endêmica até o laboratório) não foram observadas alterações significantes na expressão das moléculas da via de sinalização TREM-1 (**Figura 11**).

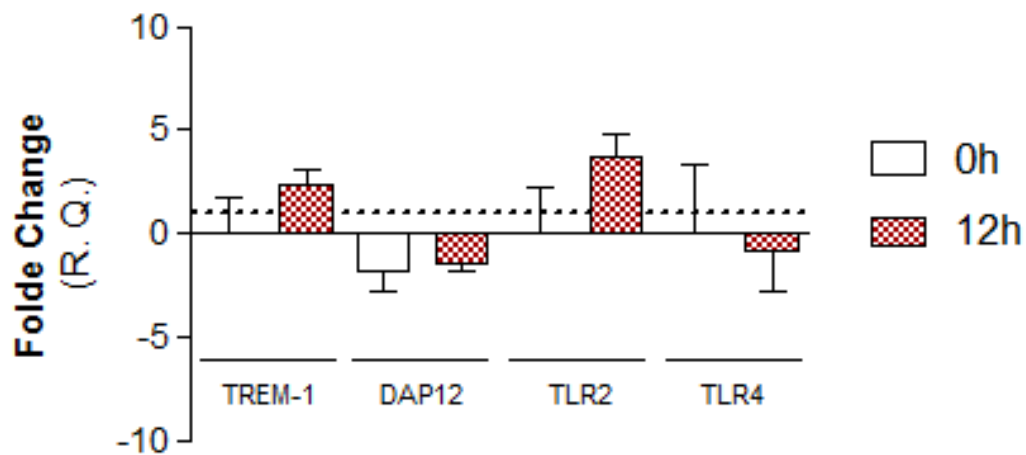


Figura 11. Expressão de RNAm de TREM-1, DAP12, TLR2 e TLR4 não é regulada em PMN de doadores saudáveis. Quantificação relativa por PCR em tempo real de RNA mensageiro em neutrófilos de doadores sadios logo após o momento da coleta (0h) ou após de 12 horas (n=5).

6.4 AVALIAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE TREM-1 EM NEUTRÓFILOS HUMANOS INFECTADOS IN VITRO COM *L. BRAZILIENSIS*

Posteriormente, os neutrófilos foram selecionados para ensaios *in vitro* por terem apresentado uma maior modulação em todos os RNAs avaliados, além de expressarem TREM-1 de modo constitutivo. Foram realizados então, experimentos por citometria de fluxo para avaliar a Intensidade média de Fluorescência (MFI) de TREM-1 durante a infecção por *L. braziliensis* em neutrófilos humanos obtidos de doadores saudáveis (**Figura 12 A**). A exposição à *L. braziliensis* aumenta significativamente o MFI de TREM-1 em neutrófilos infectados (GFP+) e também naqueles *bystander* (GFP-), que estão cultivados em presença do parasito, mas não estão infectados, sugerindo que fatores solúveis estão envolvidos na expressão do TREM-1 em neutrófilos. Ademais, o aumento do MFI ocorre somente nos momentos iniciais da infecção, sendo observado apenas em 30 minutos após a exposição (**Figura 12 B**). Em tempos mais tardios de exposição a *L. braziliensis*, como 1 ou 2 horas, este aumento não é mais observado. (**Figura 12 C**). Desse modo, os dados indicam que a *L. braziliensis* induz uma expressão transiente do TREM-1 em neutrófilos.

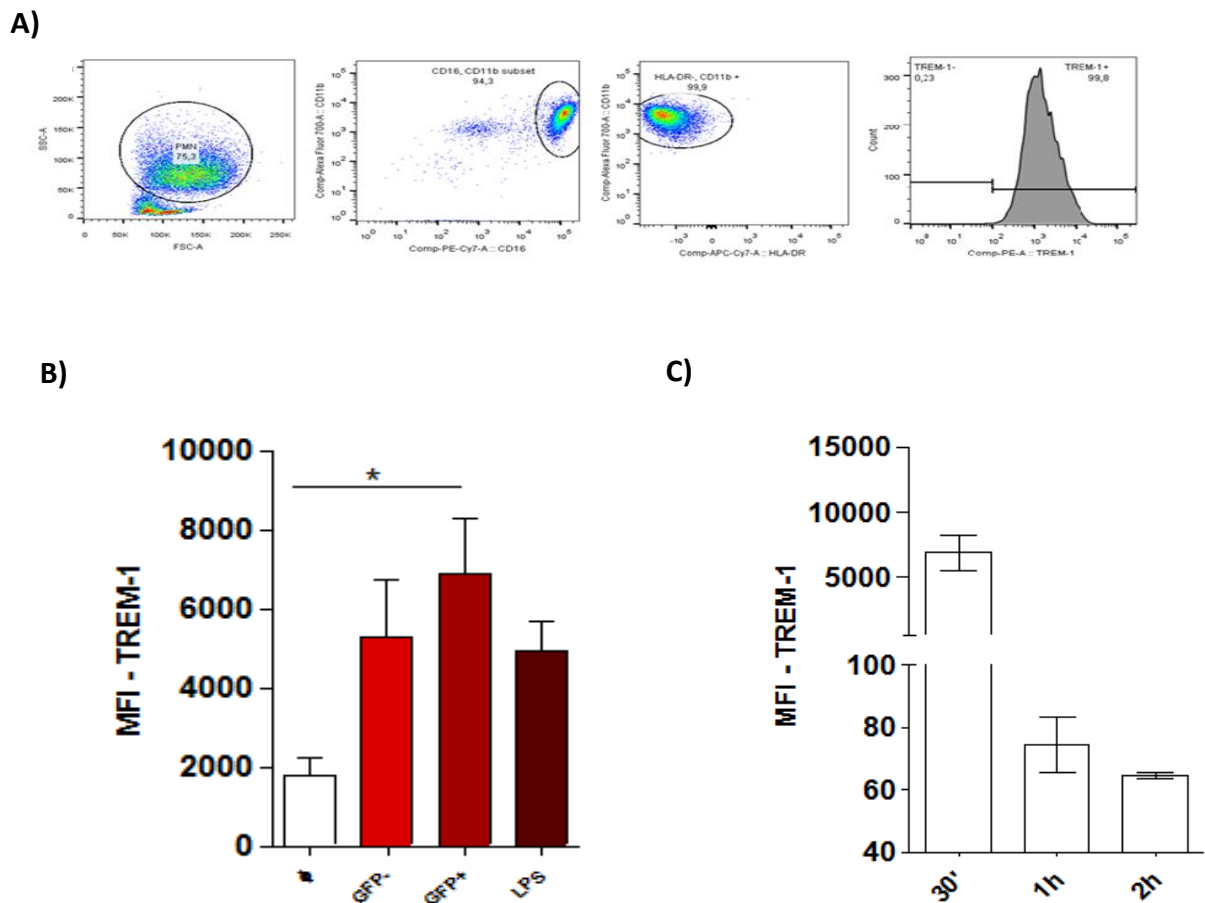
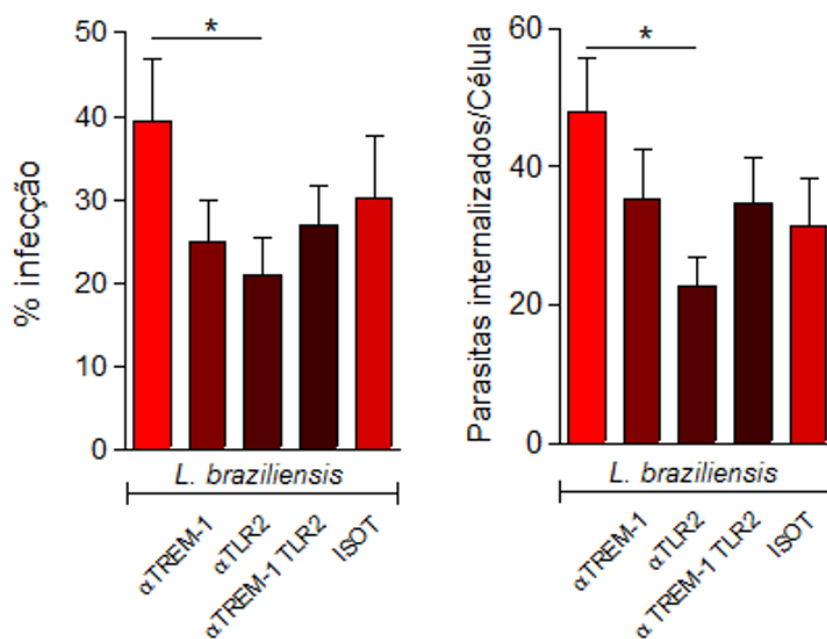


Figura 12. Exposição de neutrófilos humanos a *L. braziliensis* promove aumento transiente de TREM-1. Neutrófilos humanos foram infectados ou não com *L. braziliensis*-GFP por 30 minutos e a *Mean fluorescence intensity* (MFI) de TREM-1 foi comparado entre neutrófilos não expostos (\emptyset), infectados com *L. braziliensis*-GFP (GFP+), e expostos a *L. braziliensis*, mas não infectados (GFP-). LPS foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram obtidos por citometria de fluxo e analisados pelo software FlowJow ($n=8$). A) Representativo da estratégia para definição da população dos neutrófilos. B) MFI de TREM-1 após 30 minutos de exposição a *L. braziliensis*. C) MFI de neutrófilos GFP+ em 30 minutos, 1 hora e 2 horas de infecção ($n=3$). Foram considerados significativos, valores de $p \leq 0,05$.

Posteriormente, ensaios de neutralização do TREM-1 *in vitro* com neutrófilos humanos obtidos de doadores saudáveis e, em seguida, expostos a *L. braziliensis*, indicaram que a inibição de TREM-1 não interfere na porcentagem de células infectadas e também na quantidade de parasitas internalizados nos tempos de 30 minutos (**Figura 13 A**) e 3 horas (**Figura 13 B**). Por outro lado, a neutralização de TLR2 diminui ambos processos no tempo inicial de 30 minutos (**Figura 13 A**), enquanto essa diferença não é observada após 3 horas de infecção (**Figura 13 B**). Além disso, não foi observada sinergia entre TREM-1 e TLR2 na capacidade fagocítica ou na quantidade de parasitas internalizados.

Esses dados sugerem que apenas TLR2 deve participar do processo de internalização da *L. braziliensis*.

A)



B)

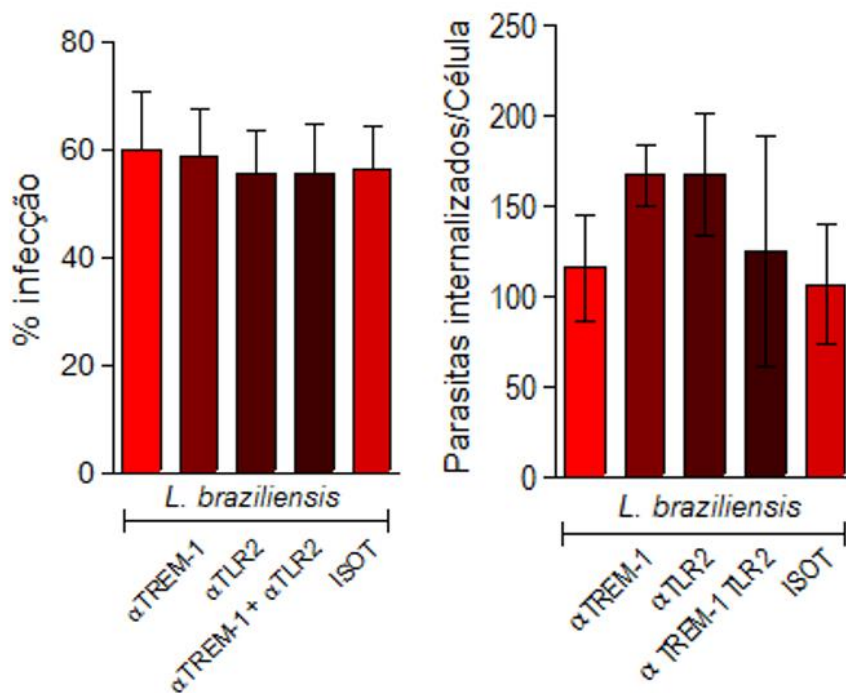


Figura 13. Neutralização de TLR2, mas não de TREM-1, interfere na internalização de *L. braziliensis*. Neutrófilos humanos foram cultivados na presença de anticorpos neutralizantes para TREM-1 e/ou TLR2. A porcentagem de infecção foi determinada por contagem em microscopia óptica (n=7) após 30 minutos de infecção (A) ou 3 horas (B). Foram considerados significativos, valores de $p \leq 0,05$.

Considerando o papel da sinalização TREM-1 para indução de resposta inflamatória, a produção de diferentes mediadores foi avaliada no sobrenadante das culturas de neutrófilos expostos a *L. braziliensis*, tratados ou não com inibidores da via TREM-1/TLR. Os resultados mostram que a neutralização de TREM-1 e TLR2, individualmente ou em conjunto, diminui a degranulação de MMP9 (**Figura 14**). No entanto, não foram observadas diferenças na produção de IL-6, IL-8, IL-12, IL-1 β , TNF α e MPO (dados não mostrados) entre neutrófilos infectados por 30 minutos ou 3 horas e tratados ou não com inibidores da referida via. Estes dados sugerem que TREM-1 pode participar no controle da migração de neutrófilos mediada por MMP-9 durante a LCL.

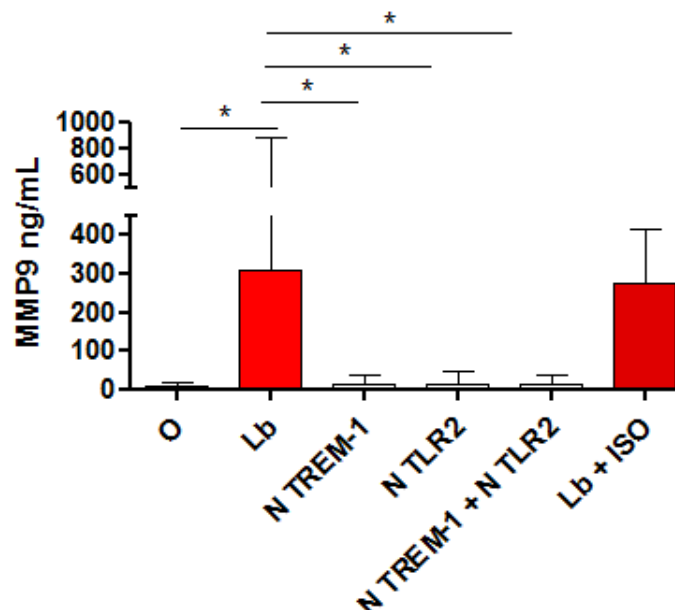


Figura 14. Neutralização de TREM-1 e TLR2 diminui a liberação de MMP9 de neutrófilos infectados com *L. braziliensis*. Neutrófilos humanos foram cultivados na presença de anticorpos neutralizantes para TREM-1 e/ou TLR2. A determinação de MMP9 foi realizada após 30 minutos de infecção pelo método de ELISA (n=7). Foram considerados significativos, valores de $p \leq 0,05$.

7 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo indicam a alta expressão da via de sinalização TREM-1 nas lesões cutâneas de pacientes acometidos por LCL causada por *L. braziliensis*. Estes achados foram validados em novas biópsias, confirmando que, mesmo provenientes de diferentes áreas endêmicas, este perfil está presente nos pacientes com LCL. Ademais, ensaios funcionais *in vitro* foram realizados com neutrófilos humanos de doadores saudáveis para identificar os mecanismos de ação da via TREM-1 durante a infecção por *L. braziliensis*. Nossos achados mostram que o aumento na expressão de TREM-1 é rápido e transiente, com aumento significativo após 30 minutos de infecção. Após 1 hora de cultura na presença do parasito, este aumento já não é mais observado. Além disso, nossos resultados mostram que TREM-1 tem influência direta na liberação da MMP-9, uma metaloproteinase envolvida na migração celular, sugerindo que esta via pode regular a capacidade migratória de neutrófilos na LCL. Por fim, TREM-1 demonstrou sinergismo com TLR2 na degranulação de MMP-9, mas não interferiu na internalização da *L. braziliensis*.

Este aumento na expressão de TREM-1 também já foi identificado entre as principais vias moduladas em CMSP de doadores saudáveis que apresentaram alta produção de INF γ após estímulo com *L. braziliensis* (CARNEIRO et al., 2016). Contudo, nossos resultados de expressão da via do TREM-1 em CMSP não demonstraram diferença estatística, porém, nossos pacientes não foram estratificados em baixo e alto respondedores.

No mapa de calor construído com base na expressão das moléculas da via TREM-1 do conjunto de dados GSE55664, é possível observar a separação entre o grupo de controles e de pacientes com LCL. No entanto, 2 pacientes, considerados de lesões tardias pelos autores (NOVAIS et al., 2015), foram alocados entre os grupos, sendo considerados mais próximos dos indivíduos controles. Isso ocorreu, provavelmente, por estes pacientes apresentarem maior homeostasia cutânea e um padrão de expressão gênica mais similar aos controles. No conjunto GSE63931, foi observada uma separação entre grupos controle e LCL ainda mais clara, provavelmente devido a uma maior

homogeneidade no tempo de lesão dos pacientes participantes dessa coorte (OLIVEIRA et al., 2015). Em conjunto, estes resultados indicam o potencial da via TREM-1 como biomarcador de LCL inicial.

Os resultados de FC das moléculas analisados demonstram ativação da via do TREM-1 em ambos os transcriptomas. Contudo, foi observada uma diferença na intensidade de modulação entre os dois. Provavelmente, isso se deve às diferenças na normalização dos dados. Além disso, há também uma variação populacional, pois, as amostras são provenientes de pacientes de áreas endêmicas diferentes.

A validação desses resultados por PCR em tempo real em novas amostras confirmou o aumento da expressão da via de TREM-1 em biópsias de LCL. Adicionalmente, a análise proteica dessas moléculas também confirma esse aumento, sendo este o primeiro estudo a marcar as proteínas da via do TREM-1 em lesões de LCL em humanos. Ademais, dados semelhantes foram encontrados na literatura, onde a via de sinalização TREM-1 demonstrou expressão significativamente aumentada em outras doenças inflamatórias de pele, como psoríase e melanoma (HYDER et al., 2013; NGUYEN et al., 2015). Também foi demonstrado que a exposição de neutrófilos *in vitro* à *L. infantum* aumenta a expressão gênica de TREM-1 e sua molécula adaptadora, DAP12 (BOMFIM et al., 2017). Em modelo de *L. major*, também foi demonstrado um aumento na expressão de TREM-1 em macrófagos de camundongos resistentes à infecção (FILARDY, ALESSANDRA A et al., 2014).

É importante salientar que dentre as moléculas avaliadas, Dap12 não é exclusiva da via do TREM-1. A mesma também é adaptadora de outros receptores envolvidos na ativação de células NK, como receptores da família *Killer cell Immunoglobulin-like Receptor* (KIRs), e na ativação de células mielóides, como *Signal-regulatory protein beta-1* (SIRP β 1), *Cell surface glycoprotein CD200 Receptor 3* (CD200R3), dentre outros (LANIER, 2009). Sua expressão, portanto, pode ter influência da ativação de outros receptores durante a LCL, além de TREM-1.

Os resultados de FC dos transcriptomas demonstram ainda que a expressão de Def β 2 está aumentada em todas as doenças inflamatórias de pele avaliadas,

tais como Psoríase e Lupus. Por outro lado, a expressão do receptor TREM-1 está aumentada significativamente apenas nos pacientes de LCL. Esse dado sugere que Def β 2 seja um produto inespecífico liberado em doenças de pele, como resultado da lesão cutânea, enquanto TREM-1 deve atuar de modo mais específico em doenças infecciosas, tal como a LCL. As defensinas são peptídeos com atividade antimicrobiana, mas pouco se sabe sobre sua função em doenças parasitárias. Foi descrito que a Def β 2 possui atividade quimiotática para monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas imaturas e estimula a migração de células endoteliais (JARCZAK et al., 2013; MARCINKIEWICZ; MAJEWSKI, 2016). Contudo, seu papel na via do TREM-1 ainda é controverso. Enquanto a ativação de TREM-1 em células epiteliais humanas levou ao aumento de expressão de Def β 2 (RIGO et al., 2012), o bloqueio do receptor TREM-1 em camundongos, também levou a um aumento de Def β 2 na córnea desses animais (WU et al., 2011). Desse modo, mais estudos são necessários para elucidar o papel da interação entre TREM-1 e defensina nesta via.

Diversos trabalhos mostram a expressão de TREM-1 em células circulantes, como monócitos e neutrófilos (SHARIF; KNAPP, 2008; TESSARZ; CERWENKA, 2008b). Contudo, ao avaliarmos as expressões dos RNAs mensageiros da via do TREM-1 em CMSP de pacientes, nenhuma diferença estatística foi observada quando comparado às células de doadores saudáveis. Além disso, conforme esperado, não foi possível detectar a expressão de TREM-1 e 2 nestas amostras, uma vez que a maioria das CMSP é composta por linfócitos e apenas células de origem mieloide expressam TREM. Por outro lado, a expressão dessas moléculas nos neutrófilos provenientes do sangue periférico dos pacientes com LCL apresentaram-se negativamente reguladas. Isso sugere que essas células estão saindo da medula óssea, uma vez que os neutrófilos são constitutivamente produzidos, com regulação negativa para a via do TREM-1, provavelmente, como mecanismo de homeostasia. Isso porque neutrófilos ativados chegando no tecido podem causar mais dano tecidual através da liberação de, por exemplo, proteinases, hidrolases e agentes oxidantes (GINSBURG et al., 2019). Todavia, essa regulação necessita ser investigada mais a fundo, visto que uma diminuição da expressão de TREM-1 pode diminuir a ativação dessas células e assim favorecer infecções secundárias nas lesões. Isso é importante, uma vez que a

LCL apresenta lesões ulceradas, expondo o tecido cutâneo à infecções secundárias por espécies bacterianas ou fúngicas (SCORZA et al., 2017).

Com base nestes achados, decidimos investigar os mecanismos de ação da via TREM-1, *in vitro*, em neutrófilos humanos obtidos de doadores saudáveis após infecção por *L. braziliensis*. Os resultados demonstram um aumento transiente na expressão de TREM-1 após infecção por 30 minutos. Foi demonstrado que a perda do TREM-1 na superfície dos neutrófilos pode ocorrer devido sua clivagem pela Matriz Metaloproteína 9 (MMP9), o que gera a liberação de TREM-1 solúvel (WEISS et al., 2016). A liberação de sTREM-1 pode ser favorável no contexto da LCL, uma vez que o mesmo se liga aos prováveis ligantes do TREM-1 e assim poderia impedir uma exacerbada ativação da via inflamatória. Além disso, foi observada uma diminuição da degranulação dessa enzima após neutralização de TREM-1 e TLR2 em neutrófilos. A enzima MMP9 está envolvida em diversos processos fisiológicos, como na reprodução, angiogênese, remodelamento vascular, desenvolvimento e remodelamento ósseo, regeneração epitelial, migração celular, manutenção de tecidos, entre outros (VANDOOREN et al., 2013). Adicionalmente, MMP-9 está envolvida em processos patológicos, por causar dano tecidual devido a sua ação direta na degradação de proteínas da matriz extracelular (GARG et al., 2009; DAVEY et al., 2011). Seu papel na LCL ainda não está claro, mas já foi relatada a expressão desta enzima em áreas com dano tecidual em lesões humanas de LM (BOAVENTURA et al., 2010) e em formas de LT (FRAGA et al., 2012), sugerindo que a MMP-9 pode atuar na imunopatogênese da doença.

Posteriormente, também avaliamos se o TREM-1 pode influenciar em mecanismos leishmanicidas dos neutrófilos, bem como na capacidade fagocítica. Foi observado que a neutralização de TREM-1 não interferiu na porcentagem de infecção e na quantidade de parasitas internalizados nos tempos de 30 minutos e 3 horas. Estes resultados indicam que os mecanismos de ação do TREM-1 se dão especificamente nos grânulos terciários dos neutrófilos, sem interferir nos processos de reconhecimento e eliminação da *L. braziliensis*. De modo similar, já foi descrito em diferentes modelos de infecção, como por protozoário (*Leishmania major*), vírus (Influenza) e bactéria (*Legionella*

pneumophila), que o bloqueio de TREM-1 contribui para a atenuação da inflamação excessiva sem prejudicar a eliminação dos patógenos (WEBER, 2014). Em conjunto, essas evidências mostram que a atuação do TREM-1 é importante para regular a indução de resposta inflamatória, sem alterar a capacidade de controlar infecções. Em contrapartida, a neutralização de TLR2 diminuiu tanto a porcentagem de infecção quanto a quantidade de parasitas internalizados no tempo inicial de 30 minutos, o que indica que apenas TLR2 deve participar do processo de internalização da *L. braziliensis*. Este dado corrobora com a literatura, onde a neutralização de TLR2 em neutrófilos infectados com *L. amazonensis* também reduziu a internalização da *Leishmania* (TAVARES et al., 2014), confirmando a influência dos receptores TLRs na fagocitose. Além disso, na literatura, TLR2 demonstra estar envolvido no processo de internalização de diversos patógenos, como *Mycobacterium abscessus*, *Neisseria meningitidis* e *Staphylococcus aureus* (SHIN et al., 2008; FANG et al., 2014; TOUSSI et al., 2016). Ao avaliar a internalização após inibição de ambos receptores (TREM-1 e TLR2 simultaneamente), nenhum sinergismo foi demonstrado, uma vez que não houve alteração da capacidade fagocítica ou da quantidade de parasitas internalizados. Na literatura, foi demonstrado que estímulo de TREM-1 e TLR2, TLR4 e TLR7/8 aumentou de maneira sinérgica a degranulação de neutrófilos, mas não na fagocitose de microesferas de poliestireno (RADSAK et al., 2004). Associadamente, esses resultados sugerem que TREM-1 sinergiza com TLR2 na produção de mediadores inflamatórios, mas não na internalização de patógenos.

Em resumo, este é o primeiro estudo que avaliou a expressão da via de TREM-1 em biópsias de LCL causada por *L. brasiliensis* e os mecanismos de sua ativação em neutrófilos humanos infectados *in vitro*. Foi demonstrado que o aumento da expressão desse receptor na superfície de neutrófilos gerou um aumento na liberação de MMP-9, mas não interferiu na internalização do parasita. Adicionalmente, TLR2, influenciou na internalização da *L. braziliensis* e atuou em sinergismo com TREM-1 na indução da liberação de MMP-9. Esses resultados sugerem que TREM-1 e TLR2 podem ter um papel importante no dano tecidual induzido pela enzima gelatinase e internalização de parasitas na LCL.

8 CONCLUSÃO

- ✓ TREM-1 participa da indução da inflamação observada na LCL causada pela *L. braziliensis*, sem interferir na internalização do patógeno.

REFERÊNCIAS

- ABDOLI, A.; MASPI, N.; GHAFARIFAR, F. Wound healing in cutaneous leishmaniasis: A double edged sword of IL-10 and TGF- β . **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 51, p. 15–26, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014795711730010>. Acesso em: 15 maio 2019.
- ALLCOCK, R. J. N. *et al.* The human TREM gene cluster at 6p21.1 encodes both activating and inhibitory single IgV domain receptors and includes NKp44. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 2, p. 567–577, 2003. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/immu.200310033>. Acesso em: 5 mar. 2019.
- ARTS, R. J. W. *et al.* TREM-1: intracellular signaling pathways and interaction with pattern recognition receptors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, p. 209–215, 2013.
- ASSIS, R. R. *et al.* Glycoinositolphospholipids from leishmania braziliensis and L. infantum: Modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. 1–11, 2012.
- BLEHARSKI, J. R. *et al.* A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. **Journal of Immunology**, Baltimore, Md, v. 170, n. 7, p. 3812–8, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12646648>. Acesso em: 18 mar. 2019.
- BOAVENTURA, V. S. *et al.* Human mucosal leishmaniasis: Neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 10, p. 2830–2836, 2010. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.200940115>. Acesso em: 1 mar. 2019.
- BOMFIM, L. G. S. *et al.* Leishmania infantum Induces the Release of sTREM-1 in Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2265, 2017. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02265/full>. Acesso em: 19 mar. 2019.
- BOUCHON, A.; DIETRICH, J.; COLONNA, M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. **Journal of Immunology**, Baltimore, Md., v. 164, n. 10, p. 4991–5, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10799849>. Acesso em: 5 mar. 2019.

BOUCHON, A.; FACCHETTI, F.; WEIGAND, M. A.; COLONNA, M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1103–7, 2001. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/35074114>. Acesso em: 13 mar. 2019.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. 2017.

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, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21592044>. Acesso em: 18 mar. 2019.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30126638>. Acesso em: 19 fev. 2019.

CARLSEN, E. D. *et al.* Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 182, n. 2, p. 109–118, 2015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/cei.12674>. Acesso em: 27 fev. 2019.

CARNEIRO, M. W. *et al.* Gene Expression Profile of High IFN- γ Producers Stimulated with *Leishmania braziliensis* Identifies Genes Associated with Cutaneous Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. e0005116, 2016. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005116>.

CARVALHO, L. P.; PASSOS, S.; SCHRIEFER, A.; CARVALHO, E. M. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 301, 2012. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00301/abstract>. Acesso em: 20 abr. 2019.

CHAUHAN, P.; SHUKLA, D.; CHATTOPADHYAY, D.; SAHA, B. Redundant and regulatory roles for Toll-like receptors in *Leishmania* infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 190, n. 2, p. 167–186, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28708252>. Acesso em: 2 maio 2019.

CHENG, P.-C. *et al.* Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-1 participates in *Schistosoma mansoni* inflammatory responses. **Parasite Immunology**, v. 33, n. 5, p. 276–286, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21332515>. Acesso em: 17 maio 2019.

- CUVIER, V. *et al.* A first-in-man safety and pharmacokinetics study of nangibotide, a new modulator of innate immune response through TREM-1 receptor inhibition. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 84, n. 10, p. 2270–2279, 2018. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/bcp.13668>. Acesso em: 15 mar. 2019.
- DAVEY, A.; MCAULEY, D. F.; O’KANE, C. M. Matrix metalloproteinases in acute lung injury: mediators of injury and drivers of repair. **The European Respiratory Journal**, v. 38, n. 4, p. 959–70, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21565917>. Acesso em: 21/ mar. 2019.
- DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, n. 6, p. 491–502, 2009. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x>. Acesso em: 20 abr. 2019.
- DUBAR, M.; CARRASCO, K.; GIBOT, S.; BISSON, C. Effects of *Porphyromonas gingivalis* LPS and LR12 peptide on TREM-1 expression by monocytes. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, n. 7, p. 799–805, 2018. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/jcpe.1292>. Acesso em: 5 maio 2019.
- FAILLA, C. M.; CARBO, M.; MOREA, V. Positive and Negative Regulation of Angiogenesis by Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29702562>. Acesso em: 12 mar. 2019.
- FANG, L.; WU, H.-M.; DING, P.-S.; LIU, R.-Y. TLR2 mediates phagocytosis and autophagy through JNK signaling pathway in *Staphylococcus aureus*-stimulated RAW264.7 cells. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 4, p. 806–814, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24412754>. Acesso em: 9 jun. 2019.
- FEIJÓ, D. *et al.* Dendritic Cells and Leishmania Infection: Adding Layers of Complexity to a Complex Disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 3967436, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26904694>. Acesso em: 3 maio 2019.
- FENG, J.-Y. *et al.* Role of TREM-1 in pulmonary tuberculosis patients- analysis of serum soluble TREM-1 levels. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8223, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29844416>. Acesso em: 11 mar. 2019.
- FILARDY, A. A. *et al.* Infection with *Leishmania major* induces a cellular stress response in macrophages. **PloS One**, v. 9, n. 1, p. e85715, 2014. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0085715>. Acesso em: 17 maio 2019.

FORD, J. W.; MCVICAR, D. W. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 1, p. 38–46, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19230638>. Acesso em: 5 mar. 2019.

FORTIN, C. F.; LESUR, O.; FULOP, T. Effects of TREM-1 activation in human neutrophils: activation of signaling pathways, recruitment into lipid rafts and association with TLR4. **International Immunology**, v. 19, n. 1, p. 41–50, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17098818>. Acesso em: 18 mar. 2019.

FRAGA, C. A. DE C. *et al.* Immunohistochemical profile of HIF-1 α , VEGF-A, VEGFR2 and MMP9 proteins in tegumentary leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, n. 5, p. 709–713, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962012000500006&lng=en&tIng=en. Acesso em: 20 mar. 2019.

GARG, P. *et al.* Matrix metalloproteinase-9-mediated tissue injury overrides the protective effect of matrix metalloproteinase-2 during colitis. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 296, n. 2, p. G175–84, 2009. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2643910&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

GENUA, M. *et al.* The triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM) in inflammatory bowel disease pathogenesis. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, p. 293, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25347935>. Acesso em: 11 mar. 2019.

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, 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/506950>. Acesso em: 13 mar. 2019.

GINSBURG, I. *et al.* Pro-inflammatory agents released by pathogens, dying host cells, and neutrophils act synergistically to destroy host tissues: a working hypothesis. **Journal of Inflammation Research**, v. 12, p. 35–47, 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30774411>. Acesso em: 8 jun. 2019.

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, 2009. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0900226106>. Acesso em: 1 maio 2019.

- HASELMAYER, P. *et al.* TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. **Blood**, v. 110, n. 3, p. 1029–1035, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17452516>. Acesso em: 17 mar. 2019.
- HOMMES, T. J. *et al.* Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) improves host defence in pneumococcal pneumonia. **The Journal of Pathology**, v. 233, n. 4, p. 357–367, 2014. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.4361>. Acesso em: 15 mar. 2019.
- HU, L. *et al.* Role of TREM-1 in response to *Aspergillus fumigatus* infection in corneal epithelial cells. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 288–293, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25242387>. Acesso em: 18 mar. 2019.
- HYDER, L. A. *et al.* TREM-1 as a Potential Therapeutic Target in Psoriasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 10, p. 1742–1751, 2013.
- JARCZAK, J.; KOŚCIUCZUK, E. M.; LISOWSKI, P.; *et al.* Defensins: Natural component of human innate immunity. **Human Immunology**, 2013.
- JEDYNAK, M. *et al.* Soluble TREM-1 Serum Level can Early Predict Mortality of Patients with Sepsis, Severe Sepsis and Septic Shock. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 66, n. 4, p. 299–306, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29282483>. Acesso em: 11 mar. 2019.
- JOLLY, L. *et al.* Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1: a new player in platelet aggregation. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 117, n. 09, p. 1772–1781, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28837205>. Acesso em: 4 maio 2019.
- KAUFER, A. *et al.* The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 287, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28595622>. Acesso em: 19 fev. 2019.
- KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 461, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25309543>. Acesso em: 3 maio 2019.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrmicro2608>. Acesso em: 5 mar. 2019.
- KLESNEY-TAIT, J. *et al.* Transepithelial migration of neutrophils into the lung requires TREM-1. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 1, p. 138–49, 2013. Disponível em: <http://www.jci.org/articles/view/64181>. Acesso em: 11

fev. 2019.

KLESNEY-TAIT, J.; TURNBULL, I. R.; COLONNA, M. The TREM receptor family and signal integration. **Nature Immunology**, v. 7, n. 12, p. 1266–1273, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17110943>. Acesso em: 5 mar. 2019.

LANIER, L. L. DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 227, n. 1, p. 150–60, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120482>. Acesso em: 19 maio 2019.

LI, C. *et al.* TREM2 inhibits inflammatory responses in mouse microglia by suppressing the PI3K/NF- κ B signaling. **Cell Biology International**, v. 43, n. 4, p. 360–372, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbin.10975>. Acesso em: 10 jun. 2019.

LIN, Y.-T. *et al.* TREM-1 promotes survival during *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in mice. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 1335–42, 2014. Disponível em: <http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.01347-13>. Acesso em: 15 mar. 2019.

MARCINKIEWICZ, M.; MAJEWSKI, S. The role of antimicrobial peptides in chronic inflammatory skin diseases. **Postepy Dermatologii i Alergologii**, v. 33, n. 1, p. 6–12, 2016.

MEZAYEN, R. EL. *et al.* Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. **Immunology Letters**, v. 111, n. 1, p. 36–44, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17568691>. Acesso em: 18 mar. 2019.

MOHAMADZADEH, M. *et al.* Activation of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 on Human Neutrophils by Marburg and Ebola Viruses. **Journal of Virology**, v. 80, n. 14, p. 7235–7244, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16809329>. Acesso em: 18 mar. 2019.

MURRAY, H. W. *et al.* Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–77, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16257344>. Acesso em: 20 abr. 2019.

NGUYEN, A. H. *et al.* Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells in Cutaneous Melanoma. **Clinical and Translational Science**, v. 8, n. 5, p. 441–444, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26184544>. Acesso em: 18 mar. 2019.

NOVAIS, F. O. *et al.* Genomic Profiling of Human *Leishmania braziliensis*

Lesions Identifies Transcriptional Modules Associated with Cutaneous Immunopathology. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 1, p. 94–101, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25036052>. Acesso em: 5 jun. 2019.

NOVAIS, F. O. *et al.* Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 183, n. 12, p. 8088–98, 2009. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0803720>. Acesso em: 4 mar. 2019.

OLIVEIRA, P. R. S. *et al.* IL2RA genetic variants reduce IL-2-dependent responses and aggravate human cutaneous leishmaniasis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 194, n. 6, p. 2664–72, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25672756>. Acesso em: 5 jun. 2019.

ORNATOWSKA, M. *et al.* Functional genomics of silencing TREM-1 on TLR4 signaling in macrophages. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 293, n. 6, p. L1377–L1384, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17905855>. Acesso em: 18 mar. 2019.

PAPAYANNOPOULOS, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 2, p. 134–147, 2017. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri.2017.105>. Acesso em: 1 maio 2019.

PELHAM, C. J.; PANDYA, A. N.; AGRAWAL, D. K. Triggering receptor expressed on myeloid cells receptor family modulators: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 12, p. 1383–95, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25363248>. Acesso em: 11 mar. 2019.

PETERS, N. C. *et al.* In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18703742>. Acesso em: 3 mar. 2019.

POPE, K.-T. *et al.* Identification of a Novel Splice Variant Identification of a Novel Splice Variant Isoform of TREM-1 in Human Neutrophil Granules. **The Journal of Immunology**, 2015. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/content/early/2015/11/11/jimmunol>.

PRATES, D. B. *et al.* *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 3, p. 575–582, 2011. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.0211105>. Acesso em: 27 fev. 2019.

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, v. 172, n. 8, p. 4956–63, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15067076>. Acesso em: 18 mar. 2019.

RAI, V.; AGRAWAL, D. K. The role of damage- and pathogen-associated molecular patterns in inflammation-mediated vulnerability of atherosclerotic plaques. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 95, n. 10, p. 1245–1253, 2017. Disponível em: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/cjpp-2016-0664>. Acesso em: 5 mar. 2019.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 59, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919650>. Acesso em: 3 mar. 2019.

RIGO, I. *et al.* Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) in airway epithelial cells by 1,25(OH)₂ vitamin D₃. **Innate Immunity**, v. 18, n. 2, p. 250–257, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21690199>. Acesso em: 19 mar. 2019.

RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; ZANDBERGEN, G. VAN. Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites? **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 11, p. 505–10, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19762280>. Acesso em: 3 mar. 2019.

SACHDEVA, H.; SHARMA, M. Clinical manifestations of leishmaniasis: A review. **International Journal of Advanced Research in Science, Engineering and Technology**, v. 3, 2016. Disponível em: www.ijarset.com. Acesso em: 15 abr. 2019.

SACHS, U. J. H. *et al.* The Neutrophil-specific Antigen CD177 Is a Counter-receptor for Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31). **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 32, p. 23603–23612, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17580308>. Acesso em: 17 mar. 2019.

SCHENK, M. *et al.* Macrophages expressing triggering receptor expressed on myeloid cells-1 are underrepresented in the human intestine. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 174, n. 1, p. 517–24, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15611278>. Acesso em: 18 mar. 2019.

SCORZA, B. *et al.* Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1296, 2017. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/6/1296>. Acesso em: 1 mar. 2019.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nri.2016.72>. Acesso em: 1 mar. 2019.

SCREENING, therapy and diagnosis. 2008. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US20100306863A1/en>. Acesso em: 17 mar. 2019.

SHARIF, O.; KNAPP, S. From expression to signaling: Roles of TREM-1 and TREM-2 in innate immunity and bacterial infection. **Immunobiology**, v. 213, n. 9–10, p. 701–713, 2008.

SHI, X. *et al.* Effect of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1 (TREM-1) Blockade in Rats with Cecal Ligation and Puncture (CLP)-Induced Sepsis. **Medical Science Monitor**, v. 23, p. 5049–5055, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29059148>. Acesso em: 5 maio 2019.

SHIN, D.-M. *et al.* *Mycobacterium abscessus* activates the macrophage innate immune response via a physical and functional interaction between TLR2 and dectin-1. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 1608–1621, 2008. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2008.01151.x>. Acesso em: 9 jun. 2019.

SU, L. *et al.* Value of soluble TREM-1, procalcitonin, and C-reactive protein serum levels as biomarkers for detecting bacteremia among sepsis patients with new fever in intensive care units: a prospective cohort study. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, p. 157, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22809118>. Acesso em: 11 mar. 2019.

SUGIMOTO, K. *et al.* Activated microglia in a rat stroke model express NG2 proteoglycan in peri-infarct tissue through the involvement of TGF- β 1. **Glia**, v. 62, n. 2, p. 185–198, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24311432>. Acesso em: 11 mar. 2019.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–20, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303872>.

TAVARES, N. *et al.* Degranulating Neutrophils Promote Leukotriene B4 Production by Infected Macrophages To Kill *Leishmania amazonensis* Parasites. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 4, p. 1865–1873, 2016. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1502224>.

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

666, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24634497>. Acesso em: 3 mar. 2019.

TESSARZ, A. S.; CERWENKA, A. The TREM-1/DAP12 pathway. **Immunology Letters**, v. 116, n. 2, p. 111–116, 2008a. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165247807003227>. Acesso em: 5 mar. 2019.

TIBÚRCIO, R. *et al.* et al. Molecular Aspects of Dendritic Cell Activation in Leishmaniasis: An Immunobiological View. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 227, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.00227/full>. Acesso em: 3 maio 2019.

TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28649370>. Acesso em: 12 fev. 2019.

TOUSSI, D. N.; WETZLER, L. M.; LIU, X.; MASSARI, P. Neisseriae internalization by epithelial cells is enhanced by TLR2 stimulation. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 10, p. 627–638, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27373686>. Acesso em: 9 jun. 2019.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 3, p. 179–190, 2007.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 229–242, 2007. Disponível em: <https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2007.00311.x>. Acesso em: 20 abr. 2019.

TU, C. *et al.* Lipopolysaccharide induces TREM-1-dependent HIF-1 α expression in human keratinocyte cell line. **Cell Biology International ISSN**, p. 1065–6995.

TUON, F. F. *et al.* et al. Toll-like receptors and leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 76, n. 3, p. 866–72, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18070909>. Acesso em: 2 maio 2019.

VANDOOREN, J.; STEEN, P. E. VAN DEN; OPDENAKKER, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 48, n. 3, p. 222–272, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23547785>. Acesso em: 19 mar. 2019.

WANG, Y. *et al.* Multiple Soluble TGF- β Receptors in Addition to Soluble Endoglin Are Elevated in Preeclamptic Serum and They Synergistically Inhibit TGF- β Signaling. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 102, n. 8, p. 3065–3074, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28633389>. Acesso em: 12 mar. 2019.

WANG, Y. K. *et al.* Prognostic Utility of Soluble TREM-1 in Predicting Mortality and Cardiovascular Events in Patients With Acute Myocardial Infarction. **Journal of the American Heart Association**, v. 7, n. 12, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29886421>. Acesso em: 11 mar. 2019.

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

WEISS, G. *et al.* Reversal of TREM-1 ectodomain shedding and improved bacterial clearance by intranasal metalloproteinase inhibitors. **Mucosal immunology**, december, p. 1–10, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/mi.2016.104>.

WHO. What is leishmaniasis? **WHO**, 2016. World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/disease/en/>. Acesso em: 11 fev. 2019.

WONG-BAEZA, I. *et al.* Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) is regulated post-transcriptionally and its ligand is present in the sera of some septic patients. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 145, n. 3, p. 448–55, 2006. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.2006.03158.x>. Acesso em: 17 mar. 2019.

WU, J. *et al.* The Proinflammatory Myeloid Cell Receptor TREM-1 Controls Kupffer Cell Activation and Development of Hepatocellular Carcinoma. **Cancer Research**, v. 72, n. 16, p. 3977–3986, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22719066>. Acesso em: 17 mar. 2019.

WU, M. *et al.* TREM-1 amplifies corneal inflammation after *Pseudomonas aeruginosa* infection by modulating Toll-like receptor signaling and Th1/Th2-type immune responses. **Infection and immunity**, v. 79, n. 7, p. 2709–16, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21555403>. Acesso em: 19 mar. 2019.

YAO, Y. *et al.* TREM-2 serves as a negative immune regulator through Syk pathway in an IL-10 dependent manner in lung cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 20, p. 29620–34, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27102437>. Acesso em: 10 jun. 2019.

ZENG, H. *et al.* TREM-1 expression in macrophages is regulated at transcriptional level by NF- κ B and PU.1. **European Journal of Immunology**, v.

37, n. 8, p. 2300–2308, 2007. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17634956>. Acesso em: 18 mar. 2019.

ZHENG, H. *et al.* MYD88-dependent and -independent activation of TREM-1 via specific TLR ligands. **European Journal of Immunology**, 2010.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

**CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da atividade reguladora de TREM-1 na gravidade da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) humana através de uma abordagem translacional.

Pesquisador: Cláudia Ida Brodskyn

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 42928215.9.0000.0040

Instituição Proponente: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.138.324

Data da Relatoria: 30/07/2015

Apresentação do Projeto:

Conforme o parecer 1.133.716 de 30/07/2015.

Objetivo da Pesquisa:

Conforme o parecer 1.133.716 de 30/07/2015.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme o parecer 1.133.716 de 30/07/2015.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme o parecer 1.133.716 de 30/07/2015.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi anexado o formulário com o regulamento para constituição do biorrepositório, e esclareceu-se que os voluntários controles serão apenas maiores de 18 anos completos.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo está aprovado, porém para a constituição do biorrepositório não será aceito que as informações dos pacientes sejam dissociadas das amostras. Conforme explicitado nos termos de assentimento e consentimento apresentados, o voluntário é livre para se retirar do estudo a

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121
 Bairro: Candeal CEP: 40.296-710
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3176-2327 Fax: (71)3176-2285 E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA



Continuação do Parecer: 1.138.324

qualquer momento, e essa autonomia deve ser garantida em relação ao material armazenado. A proponente deverá submeter através da plataforma Brasil, como notificação, carta ao CEP reafirmando este compromisso, como condição para a execução do projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Res. CNS 466/2012 e norma operacional 001/2013, enviar relatórios semestrais a partir desta data e relatório final em até 30 dias após o final do projeto conforme o cronograma aprovado neste protocolo.

SALVADOR, 04 de Julho de 2015

Assinado por:
THEOLIS COSTA BARBOSA BESSA
(Coordenador)

Endereço: Rua Valdemar Falcão, 121
Bairro: Candeal CEP: 40.296-710
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3178-2327 Fax: (71)3178-2285 E-mail: cep@bahia.fiocruz.br