

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

ORLANDO RAUL SEVILLANO ACUÑA

**Contribuição da expressão do fator de crescimento insulina-símile I  
(IGF-I) e do seu receptor no parasitismo de macrófagos humanos por  
*Leishmania (L.) infantum***

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Medicina Tropical de São Paulo da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Doenças Tropicais e  
Saúde Internacional.

Orientadora: Profa. Dra. Hiro Goto

**São Paulo**

**2018**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da  
Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Sevillano Acuña, Orlando Raúl

Contribuição da expressão do fator de crescimento insulina-símile I (IGF-I) e do seu receptor no parasitismo de macrófagos humanos por *Leishmania (L.) infantum* / Orlando Raúl Sevillano Acuña. – São Paulo, 2017.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Hiro Goto

Descritores: 1. LEISHMANIOSE VISCERAL. 2. FATORES DE CRESCIMENTO. 3. MACRÓFAGOS. 4. LEISHMANIA INFANTUM. 5. CITOCINAS. 6. FATOR DE CRESCIMENTO INSULIN-LIKE I.

**USP/IMTSP/BIB-27/2017.**

## RESUMO

**SEVILLANO, OR.** Contribuição da expressão do fator de crescimento insulina-símile I (IGF-I) e do seu receptor no parasitismo de macrófagos humanos por *Leishmania (L.) infantum*. (Dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2018.

Leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada, no Brasil, por *Leishmania (Leishmania) infantum*. Na infecção ao lado da resposta imune específica, fatores inespecíficos do hospedeiro podem desempenhar um papel importante. Em trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo observou-se na infecção in vitro de macrófagos murinos por *L. (L.) major* o papel de IGF-I como efetor da resposta a citocina IL-4, demonstrando que o IGF-I é um fator importante envolvido na interação parasito-hospedeiro no modelo de *Leishmania (L.) major*. Uma vez que os fatores envolvidos na interação mudam dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, avaliamos o papel do IL-4 e sua relação com o IGF-I na infecção de macrófagos humanos THP-1 por *L. (L.) infantum*. Macrófagos THP-1 foram infectados com *L. (L.) infantum*, sob o estímulo de IL-4 e IGF-I recombinante. Após 24 e 48 horas de incubação, não foi observado aumento no parasitismo no grupo estimulado com IL-4. Em contrapartida, após 72 horas de incubação foi observado um aumento do parasitismo. Nos grupos estimulados com IGF-I não foi observado aumento do parasitismo em 24 e 72 horas. No entanto, em 48 horas observamos uma diminuição do parasitismo. A produção de NO e a atividade da arginase se mantiveram constantes em todos os períodos avaliados. Observamos um aumento na expressão do mRNA de arginase 1 e IGF-I na infecção quando comparado apenas com a célula. No entanto, estímulos com IL-4 e IGF-I não tem efeito sobre essa expressão. Já a expressão do mRNA do receptor foi observado uma diminuição durante a infecção nos tempos avaliados. Considerando os nossos achados, onde a infecção de macrófago humano por *L. (L.) infantum* não estimulou a produção de NO e nem a atividade da arginase e os estímulos de IL-4 e IGF-I nas células infectadas não provocou um aumento significativo da atividade da arginase, os dados sugerem que a arginase tanto da célula quanto do parasito não sejam fundamentais para o desenvolvimento do parasito e a produção de NO na célula não seja danosa para o parasito.

**Descritores:** Leishmaniose visceral, Fatores de crescimento, Macrófagos humanos, *Leishmania (L.) infantum*, Citocinas, Fator de crescimento insulina-símile I.

## ABSTRACT

**SEVILLANO, OR.** Contribution of insulin-like growth factor I (IGF-I) expression and its receptor in the parasitism of human macrophages by *Leishmania (L.) infantum*. (MS Dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, 2018.

Visceral leishmaniasis (VL) is a disease caused by *Leishmania (Leishmania) infantum* in Brazil. During infection, altogether with specific immune response, nonspecific host factors may play an important role. In studies developed by our group we have observed the role of IGF-I as an effector of the IL-4 response in the in vitro infection of murine macrophages by *L. (L.) major*, demonstrating that IGF-I is an important factor involved in the parasite-host interaction in the *Leishmania (L.) major* model. It was noticed that the factors involved in the interaction depend on the species of *Leishmania* involved in the infection. Thus, we have analyzed the role of IL-4 and its relationship with IGF-I in human THP-1 macrophages infected with *L. (L.) infantum*. THP-1 macrophages were infected with *L. (L.) infantum* under stimulation of IL-4 and IGF-I recombinant. After 24 and 48 hours of incubation, it was not observed parasitism increasement in the group stimulated with IL-4. On the other hand, after 72 hours of incubation we have noticed an increase in the parasitism. In the groups stimulated with IGF-I we have not observed an increase in the parasitism in 24 and 72 hours. However, in 48 hours, it was noticed a parasitism decrease. NO production and arginase activity remained constant at all evaluated periods. We have observed an increase in the arginase 1 mRNA expression in the infection when compared it just to the cell. However, stimuli with IL-4 and IGF-I have no effect over that expression. The expression of mRNA receptor showed a decrease during infection at the times evaluated. Considering our findings, where human macrophage infection by *L. (L.) infantum* did not stimulate NO production and neither arginase activity or the IL-4 and IGF-I stimuli in infected cells did not induce a significant increase of the arginase activity, the data suggest that cell or parasite arginase are not fundamental for the development of the parasite and the NO production in the cell is not harmful to the parasite.

**Key words:** Visceral leishmaniasis, Growth factors, Human macrophages, *Leishmania (L.) infantum*, Cytokines, Insulin-like growth factor I.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Analisar a contribuição da expressão do fator de crescimento insulina-símile I (IGF-I) e do seu receptor no parasitismo de monócitos humanos por *Leishmania (L.) infantum* sob estímulos de IL-4 e IGF-I.

### **Objetivos específicos**

Em macrófagos derivados da linhagem monocítica humana THP-1 infectados por *L. (L.) infantum*:

- Avaliar o efeito de IL-4 no parasitismo, na produção de óxido nítrico (NO), atividade da arginase e expressão de mRNA de Arginase 1, de IGF-I e de IGF-IR.
- Avaliar o efeito de IGF-I no parasitismo, na produção de óxido nítrico (NO), atividade da arginase e expressão de mRNA de Arginase 1, de IGF-I e de IGF-IR.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Animais**

Hamsteres (*Mesocricetus auratus*) machos, não isogênicos (45 a 60 dias), foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil).

O uso de animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT-USP), sob o número 2015/295A (Anexo).

Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo em ambiente com temperatura controlada, água e ração (Purina Brasil) à vontade.

### **Células THP-1**

Foi utilizada a linhagem celular de monócitos humanos THP-1 (TIB-202 – ATCC – The Global Bioresource Center, USA) (34). As células foram cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, GIBCO, Life Technologies, Brasil) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO, Invitrogen, Life Technologies, Brasil) inativado a 56 °C por 30 minutos. A cultura foi realizada a temperatura de 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub> e o meio de cultura foi renovado a cada três dias.

### **Diferenciação de monócitos THP-1**

Macrófagos THP-1 foram obtidos incubando os monócitos com *Phorbol Myristate Acetate* (PMA) 20 ng/mL (Sigma, Brasil) em meio RPMI 1640 com 2% SFB, foram cultivados em placas de cultura de 24 poços (JetBioFil, China) durante 24 horas. Na sequência, o meio RPMI 1640 com 2% SFB inativado foi renovado e incubado por 48 horas para completar a sua adesão aos poços de cultura. A cultura foi realizada em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

## **Parasitos**

Nos experimentos, foi utilizada a cepa *Leishmania (Leishmania) infantum* MHOM/BR/72/LD.

Parasitos foram obtidos a partir de homogeneizado de baço de hamsters infectados. Cultivados em meio 199 (Invitrogen, USA) com penicilina (100UI/mL), gentamicina (10µg/mL), L-glutamina (2mM), Hepes (10 mM) e Hemina (20mg/mL), suplementado com 10% de SFB inativado (GIBCO, Invitrogen, Life Technologies, Brasil), e 5% de urina humana. As culturas foram mantidas a 26°C.

Promastigotas em fase estacionária de crescimento foram utilizadas nos ensaios de infecção de macrófago.

## **Manutenção da cepa de *Leishmania (L.) infantum***

Para manter a capacidade infectiva dos parasitos, hamsteres foram inoculados (no peritônio) com uma suspensão do homogeneizado de baço de hamster infectado (a presença de amastigotas no tecido foi avaliada por microscopia de luz). O procedimento foi realizado a cada 3 – 4 meses.

Os animais foram anestesiados com isoflurano (BaxterHealthcare, USA), por via inalatória (concentração alveolar mínima de 1,5%), para realização do procedimento.

## **Infecção de macrófagos THP-1 *in vitro***

Macrófagos THP-1 cultivados em placas de cultura de 24 poços foram lavados uma vez com Phosphate-buffered saline (PBS) 0,01M, PH 7,0 a 37 °C para retirar as células não aderidas. Suspensão de promastigotas em meio RPMI 1640 com 2% SFB inativado foi adicionada na proporção de 8 parasitos/macrófago e as placas foram incubadas em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 6 horas. A seguir, os poços foram lavados duas vezes com PBS a 37 °C para retirar as promastigotas não internalizadas e o meio foi renovado e os cultivos mantidos por 24, 48 e 72 horas.

Para avaliar atividade de arginase e PCR quantitativo foram utilizados 10<sup>6</sup> macrófagos em poços sem lamínulas. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

### **Tratamento de IGF-I nas infecções**

Em alguns experimentos, os macrófagos THP-1 infectados por *Leishmania (L.) infantum* foram tratados com IGF-I recombinante humano (50 ng/mL) (R&D Systems, USA) em RPMI 1640 com 2% SFB inativado e mantidas por 24, 48 e 72 horas para avaliar seu efeito sobre o parasitismo, a produção de nitrito, atividade de arginase e a expressão dos genes Arginase 1, IGF-I e IGF-IR.

### **Tratamento de IL4 nas infecções**

Em alguns experimentos, os macrófagos THP-1 infectados por *Leishmania (L.) infantum* foram tratados com IL-4 recombinante humano (20 ng/mL) (Preprotech, USA) em meio RPMI 1640 com 2% SFB inativado e mantidas por 24, 48 e 72 horas para avaliar seu efeito sobre o parasitismo, a produção de nitrito, atividade de arginase e a expressão dos genes Arginase 1, IGF-I e IGF-IR.

### **Atividade da arginase**

Atividade da arginase foi medida pela produção de ureia, produto da hidrólise da L-arginina causada pela enzima arginase presente nos macrófagos infectados (35).

Placas de cultivo foram retiradas da estufa e imediatamente foram coletados e guardados os sobrenadantes, macrófagos infectados e não infectados no número de  $10^6$  células/poço, foram lisados com 100 $\mu$ L de Triton-100 ao 0.01% com inibidor de proteases (Protease Inhibitor Mix G 39101, Serva) 10 $\mu$ L/mL.

Para ativação da enzima arginase, 50 $\mu$ L dos lisados foram misturados com 50  $\mu$ L de MnCl<sub>2</sub> 10 mM e Tris-Cl 50 mM pH 7,4 e incubados a 55 °C por 10 minutos.

Após a ativação da enzima, acrescentaram-se 25  $\mu$ L de L-arginina (Sigma, Brasil) 0,5 M pH 9,7 e incubados a 37 °C por 45 minutos. A reação foi parada com adição de 400 $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O (1/3/7 v/v/v).

Foram acrescentados 25  $\mu$ L de  $\alpha$ -isonitrosopropiophenone (ISPF) (Sigma, Brasil) 9% diluído em etanol 100% e incubado a 95 °C por 45 minutos. A concentração de ureia foi avaliada por espectrofotometria a 540 nm (Multiskan MCC/340 P versão 2,20 Labsystems, Finlândia), onde uma unidade da atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que forma 1  $\mu$ mol de ureia por minuto.



### **Dosagem de óxido nítrico**

A produção do óxido nítrico foi avaliada pela concentração de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) presente nos sobrenadantes dos cultivos de  $10^6$  células/poço (36). As concentrações foram determinadas por ensaio em placas de poliestireno (Nunclon, Denmark) de 96 poços. As amostras ( $50\mu\text{L}$ ) foram distribuídas nos poços, em triplicatas, e adicionados  $50\mu\text{L}$  do reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de diamino naftaleno diidroclorado e 2% de ácido fosfórico em água bidestilada), incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos protegidos da luz. Foi utilizado nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) em meio RPMI 1640 como referência. As amostras foram avaliadas por espectrofotometria a 540 nm (Multiskan MCC/340 P versão 2,20 Labsystems, Finlândia).

### **Parasitismo**

Para avaliação do parasitismo foram utilizadas lamínulas circulares de 13mm (Knittel Glasser, Germany) sobre as quais foram colocados  $5 \times 10^5$  macrófagos/poço e infectados na proporção de 8:1 parasitos / célula. Foi avaliado após 24, 48 e 72 horas por microscopia óptica. Lamínulas foram coradas utilizando Panótico rápido (New Prov, Brasil), fixadas em lâminas com Permunt (Fisher Scientific, USA). Foram contadas 900 células por experimento (300 células por lamínula), o resultado foi expresso em número de amastigotas por 100 células.

### **Extração do RNA**

RNA total foi extraído de  $10^6$  células/poço utilizando 1mL de TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Ambion, Life technologies, USA), foi adicionado  $200\mu\text{L}$  de clorofórmio. Centrifugou-se a  $12000g$  por 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , a fase aquosa foi separada e se adicionaram  $500\mu\text{L}$  de isopropanol. A mistura foi mantida por 30 minutos a temperatura ambiente, centrifugada à  $14000g$  por 15 minutos para obter o pellet.

Removido o sobrenadante, foi adicionado 1 mL de etanol 75% à  $4^\circ\text{C}$  e centrifugado à  $7600g$  por 10 minutos, após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado. O pellet deixado a temperatura ambiente por 10 minutos foi ressuscitado em água livre de RNase (DEPC) (Invitrogen, USA)  $20\mu\text{L}$  e dosado e analisado por espectrofotometria a 260/280 nm em espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington,DE), valores de 1,8 - 2,0 foram considerados aceitáveis.

## Obtenção do cDNA

Foi utilizado o reagente High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA), foi utilizado 1µg de RNA na obtenção de cDNA.

## Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Foram misturados 4 µL de cDNA com 4 µL do reagente 5X HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Estonia), 0.5 µL de cada primer a 10µM (sequencias dos primers em Tabela 1), e 12 µL de água MilliQ autoclavada. As amplificações foram realizadas no equipamento StepOne (Applied Biosystems, USA), descrição dos ciclos na Tabela 1.

A quantificação relativa da expressão do RNA mensageiro foi mensurada utilizando a comparação do Threshold cycle ( $C_T$ ) dos genes alvo (IGF-I, IGF-IR e Arginase 1) com o gene constitutivo GAPDH. Para a análise da expressão normalizamos os resultados, descontando o  $C_T$  obtido do gene constitutivo do  $C_T$  do gene alvo de cada amostra ( $\Delta C_T$ ). Para as comparações dos resultados entre os diferentes grupos, calculamos em relação ao valor de  $\Delta C_T$  da célula sem infecção e sem estímulo ( $\Delta\Delta C_T$ ) e o valor final foi obtido da equação:  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (37).

**Tabela 1.-** Sequências de iniciadores, utilizados na qPCR

Sequências		Ciclos: 40
IGF-I humano		
Forward	5` CTG AGC TGG TGG ATG CTC TTC A 3`	
Reward	5` GAC TGC TGG AGC CAT ACC CTG T 3`	95°C – 15 seg
IGF-IR humano		
Forward	5`GGT CTC TGA GGC CAG AAA TGG A 3`	58°C – 30 seg
Reward	5` CAG CAA GGT CTC TGT GGA CGA A 3`	72°C – 30 seg
GAPDH humano		
Forward	5` GTC GGA GTC AAC GGA TTT GGT C 3`	
Reward	5` TGC CAT GGG TGG AAT CAT ATT G 3`	
Arginase 1 humano		
Forward	5` ACC CTG GGG AAC ACT ACA TTT TGA 3`	
Reward	5` CCA TCA CCT TGC CAA TTC CTA GTC 3`	

### **Tratamento de IGF-I sobre os promastigotas**

Promastigotas no número de  $5 \times 10^5$  por mL foram tratados com IGF-I recombinante humano (R&D Systems, USA) nas concentrações 25, 50 ou 100 ng/mL. As culturas foram mantidas por 11 dias e as contagens foram realizadas a cada 24 horas.

### **Análise estatística**

Todos os resultados apresentados representam tres experimentos independentes com triplicatas em cada experimento. A análise estatística foi realizada empregando-se os testes ANOVA e Tukey e todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Foi realizada uma análise descritiva dos resultados e a apresentação das variáveis mensuradas foi feita em tabelas e gráficos utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, Inc., San Diego, CA, USA).

## REFERÊNCIAS

1. Goto H, Lauletta Lindoso JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infectious disease clinics of North America*. 2012;26(2):293-307. Epub 2012/05/29.
2. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2004;27(5):305-18. Epub 2004/07/01.
3. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*. 2012;7(5):e35671. Epub 2012/06/14.
4. WHO WHO. Visceral leishmaniasis rapid diagnostic test performance 2011 [cited 2018].
5. Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in parasitology*. 2007;64:1-109. Epub 2007/05/15.
6. Ministério da Saúde SdVeS, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral 2014.
7. Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in dermatology*. 1999;17(3):279-89. Epub 1999/06/29.
8. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? *Trends in parasitology*. 2006;22(9):439-45. Epub 2006/07/18.
9. Larson EE, Marsden PD. The origin of espundia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1987;81(5):880. Epub 1987/01/01.
10. Murray HW. Susceptibility of Leishmania to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. *The Journal of experimental medicine*. 1981;153(5):1302-15. Epub 1981/05/01.
11. Real F, Florentino PT, Reis LC, Ramos-Sanchez EM, Veras PS, Goto H, et al. Cell-to-cell transfer of Leishmania amazonensis amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. *Cellular microbiology*. 2014;16(10):1549-64. Epub 2014/05/16.
12. Goto H, Prianti M. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2009;51(5):241-6. Epub 2009/11/07.
13. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(11):845-58. Epub 2002/11/05.