PESQUISA DE HIF-1α EM QUERATINÓCITOS HUMANOS ESTIMULADOS PELO PRODUTO DA INFECÇÃO POR LEISHMANIA EM CÉLULAS MONONUCLEARES

Maria Carolina Mota dos Santos (PIBIC/CNPq), Camila Alves Mota (Coorientadora), Thaís Gomes Verzignassi Silveira (Orientadora), e-mail: carolesmota20@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Área: Ciências da Saúde, Subárea: Imunologia.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar, PCR em tempo real, queratinócitos.

Resumo:

A leishmaniose tegumentar (LT) é causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. O curso da LT depende da interação: parasito, resposta imune e microambiente de infecção. A hipóxia é comum em infecções e o fator de transcrição HIF-1α é regulador da adaptação celular nessa condição. Investigou-se a expressão gênica do HIF-1α com a técnica de qPCR em queratinócitos estimulados pelo produto da infecção de PBMCs por espécies de *Leishmania*. Em normóxia, a amostra de queratinócitos estimulados com sobrenadante de infecção de PBMCs com *L. (V). braziliensis* teve menor expressão do fator alvo. Em hipóxia, a amostra infectada pela *L. (V). lainsoni* teve maior expressão do HIF-1α. Todas as amostras tiveram maior expressão de HIF-1α em hipóxia. Existem diferenças no comportamento celular frente à infecção por distintas espécies de leishmania e às condições do tecido infectado. Tal variabilidade pode ser explorada no entendimento de processos moleculares que possam ser alvo de medidas terapêuticas.

Introdução

A leishmaniose tegumentar (LT) é causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. No Brasil, encontram-se dois principais subgêneros: *Leishmania Viannia* (L.V.) e *Leishmania Leishmania* (L.L.). Após a infecção, o curso da LT depende da interação: parasito, resposta imune e microambiente de infecção. A hipóxia é comum em infecções e o fator de transcrição HIF-1 α é o regulador da adaptação celular nessa condição. Tal fator promove a expressão de NO sintase-2 em macrófagos, de ação leishmanicida, e já foi encontrado expresso em biópsias de pele de pacientes com LT (Schatz et al, 2016; Rocha et al, 2018). Também presentes no microambiente de infecção pela *Leishmania*, estão os queratinócitos, participantes da resposta imunológica da pele. A investigação sobre o papel do HIF-1α em diferentes contextos de infecção pela *Leishmania* pode proporcionar alternativas ao controle da doença. Desse modo, este projeto investigou a expressão gênica do HIF-1α através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) em queratinócitos (HaCat) estimulados pelo produto da infecção de células polimorfonucleares do sangue periférico (PBMCs) por diferentes espécies de *Leishmania*.

Materiais e Métodos

Obtenção de células polimorfonucleares (PBMCs) e células HaCat

Em tubo cônico, adicionou-se 5 mL de *Histopaque* 10771 e 5 mL de sangue venoso de doadores saudáveis. Após centrifugação, a camada de PBMCs foi transferida para meio RPMI/DMEM. As HaCats foram cultivadas em DMEM (10% de SBF, 1% de anfotericina e estreptomicina), em estufa (37ºC, 5% de CO_2) com subcultivos de 48h. Preparou-se culturas com $1x10^5$ células e 5 mL de meio após 5 dias.

Cultivo de cepas de Leishmania e infecção de PBMCs

Promastigotas das cepas *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/1987/11272, *L. (V.) lainsoni* MHOM/BR/8I/M6424 e *L. (V.) naiffi* MDAS/BR/79/M5533 foram cultivadas RPMI-1640. Partiu-se de $1x10^6$ parasitos/mL com ampliação da cultura até 20 mL. A suspensão de *Leishmania* foi preparada a partir de 3,6 x 10^7 parasitos por placa, 20% de SBF e 36 mL de meio. As PBMCs foram suspendidas a partir do volume com 3,6 x 10^7 células/placa. Adicionou-se 3 mL por poço, fez-se incubação por 2h (37ºC, 5% de CO2). Após o período de aderência, lavou-se as PBMCs com tampão fosfato-salino e adicionou-se 3 mL do inóculo de *Leishmania*. Os poços de controle negativo continham apenas 3 mL de meio RPMI/DMEM (com 20% SBF). Em alguns poços, adicionou-se 3 mL de lipopolissacarídeo (LPS) a 5 µg/mL. As placas foram incubadas por 7 dias em estufa BOD (37ºC, 5% de CO_2).

Estímulo da cultura de HaCat pelo produto da infecção de PBMCs

Após a incubação, o sobrenadante da infecção das PBMCs com *Leishmania* foi retirado e adicionado aos poços de queratinócitos diluído 1:1 com meio e 10% de SBF, em normóxia. Para hipóxia, adicionou-se $CoCl_2$ (400µM). As placas passaram por incubação por 4 h (37ºC, 5% de CO_2), foram centrifugadas e ao *pellet* adicionou-se 400 µl de *TRIzol® Reagent* (*Thermo Fisher Scientific*) para extração de RNA.

Extração de RNA, síntese de cDNA e execução da qPCR

O RNA total dos lisados celulares foi obtido e a concentração medida em fluorímetro Qubit 2.0. A reação de transcriptase reversa para síntese de cDNA teve volume de 20 µL conforme *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biossystems*), sendo que 10 µL foram de RNA (50 ng/µL), e foi realizada em termociclador *Veriti®* (*Applied Biosystems*). Depois, usou-se iniciador específico para quantificação do mRNA do HIF-1α. Foram testadas concentrações diferentes do iniciador, com o objetivo de escolher a que gerasse menor Ct e maior slope (ΔRn). A reação de qPCR (10 µL) continha 1x *SYBR Green Select Master Mix* e 1 µL de cDNA, e foi realizada em termociclador *StepOnePlus™* (*Applied Biosystems*). A quantificação relativa do gene foi obtida pelo método de ΔΔCT. A análise estatística

foi feita no *software* Past 4.10. Para múltiplos dados foi feita ANOVA seguido de *Tukey post hoc Test*. *T-test* foi usado para avaliação de pares.

Aspectos éticos

Este trabalho fez parte de um projeto de doutorado aprovado (Parecer 2.392.327) pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEM.

Resultados e Discussão

A construção da curva-padrão do HIF-1α e da β-actina, gene endógeno de referência, se deu com a concentração de 400 nM para os iniciadores. Realizou-se diluição seriada (1:5) da amostra de cDNA, em 6 pontos, partindo de 50 ng/µL. Os parâmetros de avaliação da curva são: coeficiente de correlação (R^2), que reflete a linearidade da curva, sendo ideal quanto mais próximo de 1; e, *slope* (ΔRn), relacionado à eficiência (Eff%) da reação (eficiência próxima a 100% equivale a um *slope* próximo de -3,32). Neste trabalho, os parâmetros obtidos foram: ΔRn de -3.584, R^2 de 0,992 e Eff de 90,11% para o HIF-1α; e, para a β-actina, ΔRn de -3419, R^2 de 0,998 e Eff de 96.11%. A qPCR foi realizada com amostras em triplicata e a expressão relativa (**Figura 1**) do HIF-1α foi obtida pelo método de ΔΔCt.

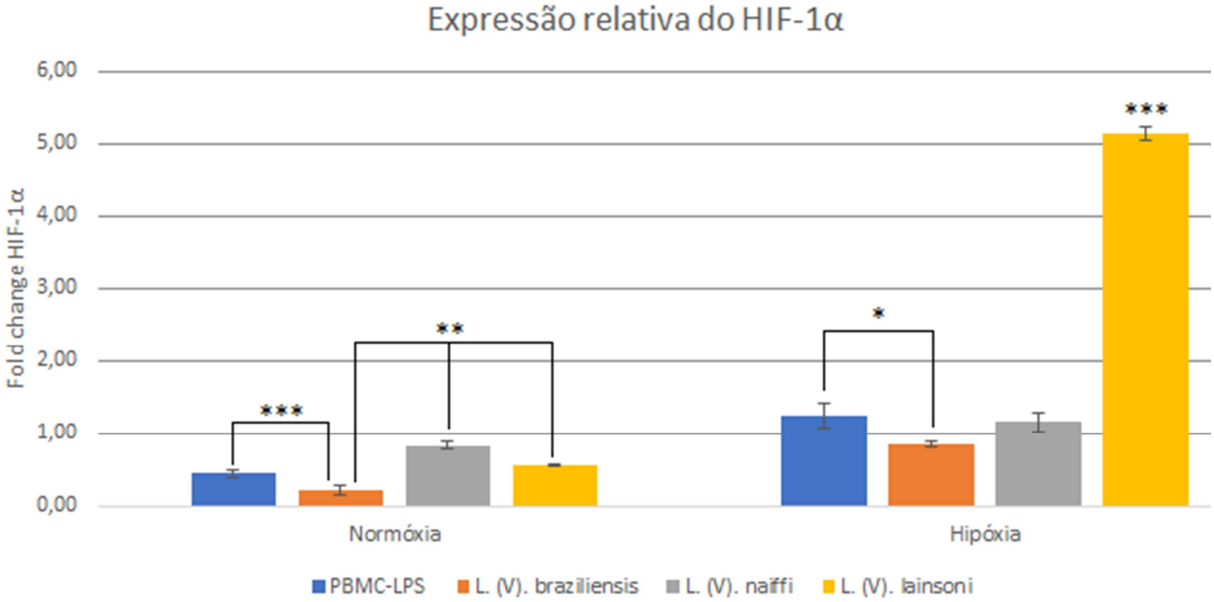

Figura 1 – Perfil da expressão relativa (ΔΔCt) do gene HIF-1α em culturas de células HaCat estimuladas com o produto da infecção de PBMCs por LPS e diferentes espécies de *Leishmania* em condições de normóxia e hipóxia durante 4 horas. As diferenças entre os grupos foram estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***).

Em normóxia, a amostra com a menor expressão de HIF-1α foi a de queratinócitos estimulados com sobrenadante de infecção de PBMCs com *L. (V). braziliensis* ($p < 0,001$), mesmo quando comparada ao controle negativo e às amostras estimuladas por LPS. Em hipóxia, os queratinócitos estimulados com a infecção de PBMCs por *L.*

(V). lainsoni teve maior expressão do HIF-1α ($p < 0,001$). A *L. (V). braziliensis*, mesmo em hipóxia, foi a cepa que menos estimulou a expressão do gene-alvo. Ao comparar as amostras em condições diferentes, encontrou-se que todas tiveram maior expressão de HIF-1α em hipóxia ($p < 0,005$).

São poucos os estudos que avaliaram a expressão do HIF-1α na infecção causada pela Leishmania *(Viannia)*. Em estudos com *Leishmania (Leishmania)*, de modo geral, há respostas celulares diversas quanto à expressão desse gene e as condições de infecção (Schatz et al, 2016; Scorza et al, 2017). Recentemente, nosso grupo de pesquisa realizou um estudo semelhante em hamsters infectados com as mesmas cepas analisadas neste projeto. De forma similar, a expressão gênica de HIF-1α foi baixa nos animais infectados com a *L. (V). braziliensis*, observando-se resposta inflamatória mais agressiva quando comparada a resposta mais controlada nos animais infectados com *L. (V). lainsoni* e *L. (V). naiffi* (Mota et al, 2022).

Conclusões

Nossos resultados corroboram que existem diferenças no comportamento celular frente à infecção por distintas espécies de leishmania. Ainda há mecanismos a serem descritos para compreender como o HIF-1α e a condição tecidual podem influenciar a resposta inflamatória e imunológica à leishmaniose tegumentar. Tal variabilidade pode ser explorada no entendimento de processos moleculares que possam ser alvos de medidas terapêuticas, com o objetivo de controle da progressão da doença.

Agradecimentos

Ao CNPq, pela bolsa concedida. Ao Laboratório de Imunologia Clínica da UEM por proporcionar os recursos de pesquisa.

Referências

MOTA, Camila Alves et al. Low expression of hypoxia-inducible factor-1α and differential expression of immune mediators during experimental infection with Leishmania (Viannia) spp. **Cytokine**, v. 153, p. 155833, 2022.

ROCHA, Francisca Janaina Soares et al. Expression on hypoxia-inducible factor-1α in human tegumentary leishmaniosis caused by Leishmania braziliensis. **Annals of Parasitology**, v. 64, n. 1, 2018.

SCHATZ, Valentin et al. Myeloid cell–derived HIF-1α promotes control of Leishmania major. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 10, p. 4034-4041, 2016.

SCORZA, Breanna M. et al. Differential activation of human keratinocytes by Leishmania species causing localized or disseminated disease. **Journal of investigative dermatology**, v. 137, n. 10, p. 2149-2156, 2017.