



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



METADADOS- DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**INFLUÊNCIA DA ANEXINA A1 NA REGULAÇÃO DA
PRODUÇÃO DE IL-1 β EM PACIENTES COM
LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *L.(V.) braziliensis***

Docente: Camila Pimentel Santos

Orientador: Dr. Lucas Carvalho

Coorientador: Mauricio Nascimento

I. RESUMO:

Introdução: A leishmaniose cutânea (LC) é caracterizada pela presença de lesões cutâneas ulceradas. Nas lesões de pacientes com LC são observados produção elevada de TNF e IL-1 β , aumento da frequência de linfócitos e fagócitos mononucleares e baixa carga parasitária. A anexina A1 (ANXA1) é uma proteína pertencente à superfamília das anexinas ligadoras de fosfolipídios dependentes de cálcio, induzida por glicocorticóides e capaz de regular a produção de mediadores inflamatórios. Os efeitos anti-inflamatórios do ANXA1 são mediados em sua maior parte pela ligação ao receptor 2 do peptídeo formil (FPR2), resultando no controle da resposta inflamatória. **Objetivos:** Nosso objetivo foi avaliar a influência da ANXA1 na produção de IL-1 β por macrófagos infectados por *L. braziliensis*. **Materiais e Métodos:** Biópsias e fragmentos de pele, sangue total e soro foram obtidos de pacientes com LC e indivíduos saudáveis (IS). A expressão gênica (IL1B, ANXA1, FPR2, NLRP3, CASP1 e PYCARD) foi determinada por RNAseq em biópsias e fragmentos de pele e sangue total. Macrófagos derivados de monócitos de IS foram infectados com *L. braziliensis* (na proporção 5:1) na presença ou ausência de rANXA1 ou WRW4 (inibidor seletivo do receptor FPR2) e cultivados por 4 e 48 horas. Os níveis de ANXA1 e IL-1 β foram determinados no soro e nos sobrenadantes da cultura. **Resultados:** Observamos que os genes descritos acima estavam aumentados nas lesões de LC. Observamos também que os genes da via do inflamassoma NLRP3 foram positivamente correlacionados com FPR2 e ANXA1 na lesão, enquanto no sangue apenas o gene NLRP3 foi negativamente correlacionado com ANXA1. Além disso, descobrimos que pacientes com LC apresentaram níveis séricos mais elevados de ANXA1 e IL-1 β quando comparados aos IS. Macrófagos infectados por *Leishmania* produziram altos níveis de ANXA1 e IL-1 β . Finalmente, descobrimos que o enriquecimento de culturas de macrófagos infectados com ANXA1 diminuiu os níveis de IL-1 β sem alterar a carga parasitária. **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que o aumento de ANXA1 regula negativamente a produção de IL-1 β sem afetar a capacidade dos macrófagos de matar *L. braziliensis*.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea, Anexina A1 e IL-1 β .

ABSTRACT

Background: Cutaneous leishmaniasis (CL) is characterized by the presence of skin-ulcerated lesions. CL lesions present high levels of TNF and IL-1 β increased frequency of lymphocytes and mononuclear phagocytes and few parasites. Annexin A1 (ANXA1) is a protein belonging to the calcium-dependent phospholipid-binding annexin's superfamilies that is induced by glucocorticoids and are capable of regulating the production of inflammatory mediators. The anti-inflammatory effects of ANXA1 are mediated for the most part through binding to the formyl peptide receptor 2 (FPR2) resulting in control of the inflammatory response. Our aim was to evaluate the influence of ANXA1 in IL-1 β production by *L. braziliensis*-infected macrophages.

Materials and Methods: Skin biopsies, whole blood and serum were obtained from CL patients and healthy subjects (HS). Gene expression (*IL1B*, *ANXA1*, *FPR2*, *NLRP3*, *CASP1* and *PYCARD*) were determined by RNAseq in skin biopsies and whole blood. Monocyte-derived macrophages from HS were infected with *L. braziliensis* (in a 5:1 ratio) in presence or absence of rANXA1 or WRW4 (Selective FPR2 receptor inhibitor) and cultured for 4 and 48h. Levels of ANXA1 and IL-1B were determined in serum and supernatants of culture. **Results:** We observed that the genes described above were increased in CL lesions. We also observed that genes from NLRP3 inflammasome pathway were positively correlated with FPR2 and ANXA1 at lesion, while in blood only the NLRP3 gene was negatively correlated with ANXA1. In addition, we found that CL patients presented higher serum levels of ANXA1 and IL-1B when compared to HS. *Leishmania*-infected macrophages produced high levels of ANXA1 and IL-1 β . Finally, we found that enrichment of ANXA1-infected macrophage cultures decreased IL-1 β levels without altering the parasite load. **Conclusion:** Our results suggest that the increase in ANXA1 downregulates IL-1 β production without affecting the ability of macrophages to kill *L. braziliensis*.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, Annexin A1 and IL-1 β .

1- Genes da *ANXA1*, *CASP1* E *PYCARD* estão mais expressos no sangue de pacientes LC do que em IS.

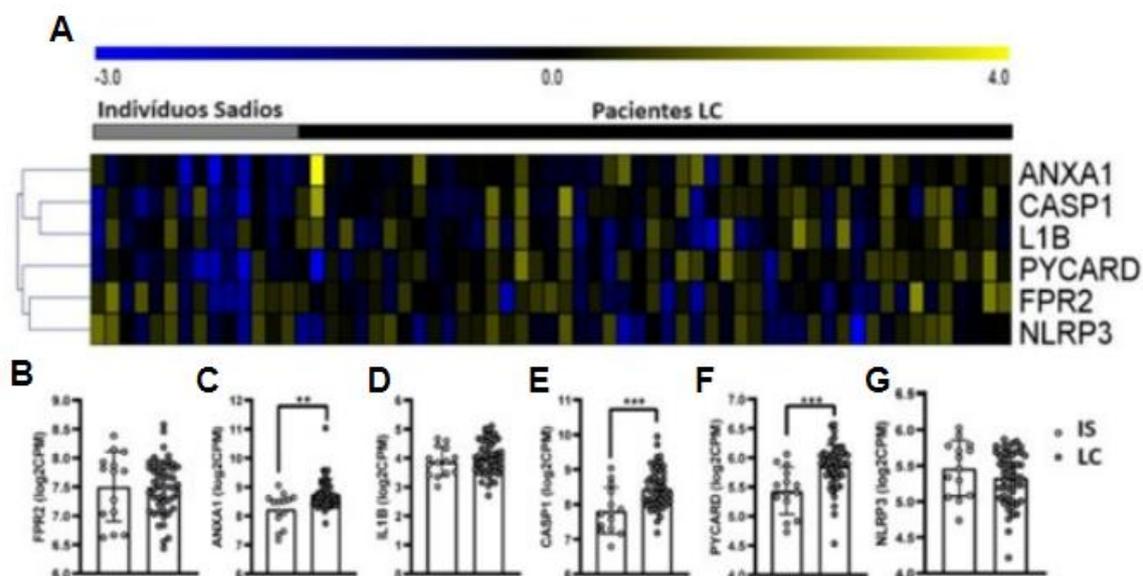


Figura 2. A: Análise transcriptômica dos genes *PYCARD*, *CASP1*, *IL-1B*, *ANXA1*, *FPR2* e *NLRP3* em IS (n= 14) e pacientes LC (n= 50) Estão apresentadas no mapa de calor, agrupados por similaridade apresentadas pelo dendrograma acima de mapa de calor. De acordo com a escala de temperatura, os azuis representam baixa expressão e o amarelo alta expressão figura 2. B, C, D, E, F e G. gráficos mostrando a diferença de expressão entre LC e IS de cada gene.

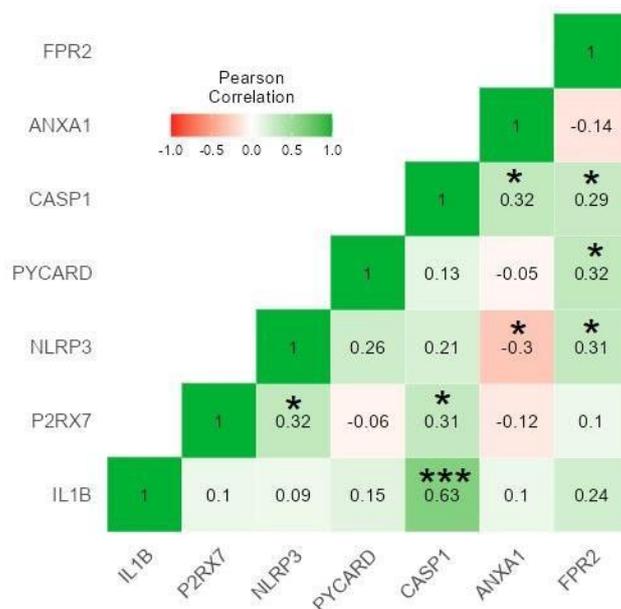


Figura 3. Matriz de correlação entre os genes *PYCARD*, *CASP1*, *IL-1B*, *ANXA1*, *FPR2* e *NLRP3* no sangue de pacientes LC (n=50). Em verde as correlações positivas e em vermelho as correlações negativas.

2- Níveis de ANXA1 E IL-1 β estão aumentados no soro de pacientes LC.

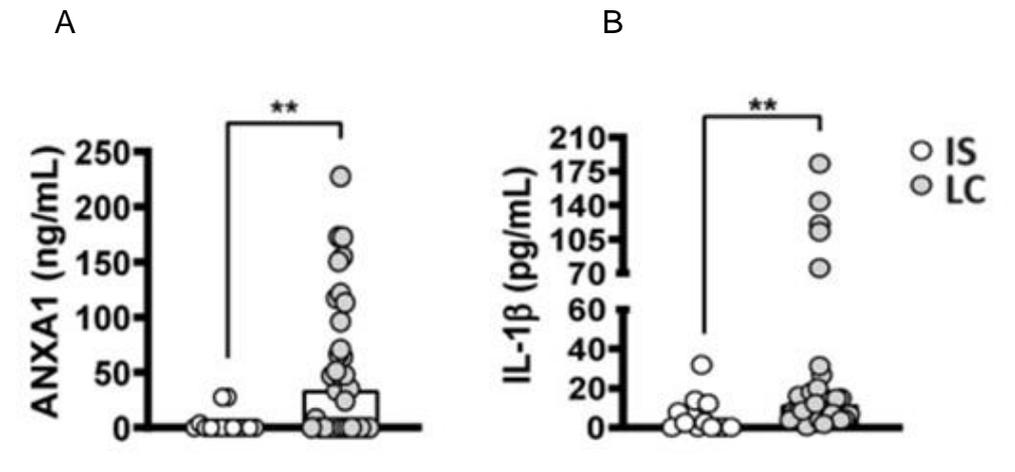


Figura 4 A. Níveis séricos de ANXA1 e figura 4B. níveis séricos de IL-1 β , ambos em pacientes LC (n=34) e IS (n=14). As análises estatísticas foram realizadas por mediana utilizando o teste T pareado * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

3- Os genes PYCARD, CASP1, NLRP3, IL1B, ANXA1 e FPR2 estão aumentados na lesão de pacientes LC em comparação a pele de IS

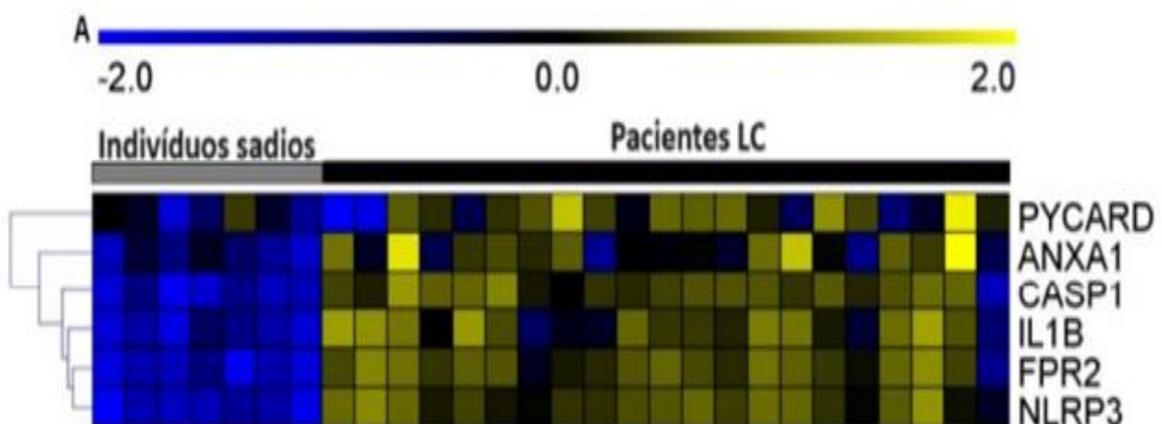


Figura 5. Expressão gênica na pele de IS (n=7) e na e lesões de pacientes LC (n=21) Mapa de calor mostrando expressão dos genes PYCARD, CASP1, IL-1B, ANXA1, FPR2 e NLRP3 na lesão LC e pele de IS. Estão apresentadas no mapa de calor, agrupadas por similaridade apresentadas pelo dendrograma acima de mapa de calor. De acordo com a escala de temperatura, os azuis representam baixa expressão e o amarelo alta expressão

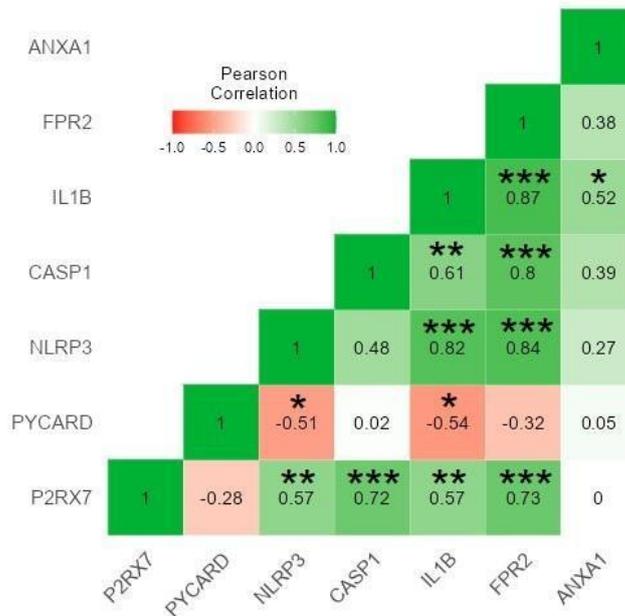


Figura 6. Matriz de correlação entre os genes PYCARD, CASP1, IL-1B, ANXA1, FPR2 e NLRP3 na lesão de pacientes LC.

4- Os níveis de IL-1β aumentam em macrófagos infectados por *L. braziliensis*.

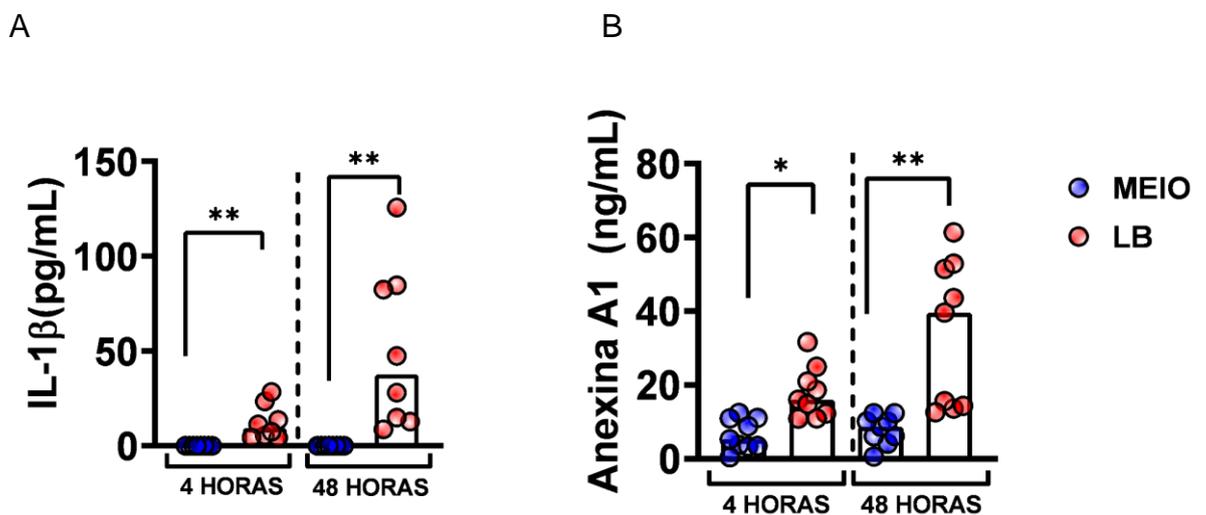


Figura 7: 7A: Níveis de de IL-β e figura 7 B níveis ANXA1 em macrófagos de IS (n=9) foram infectados com *L. braziliensis* por 4 e 48h. Os níveis de Anexina A1 e de IL-1β foram determinados no sobrenadante das culturas por ELISA. Os resultados estão apresentados em mediana e os valores de p foram obtidos através do teste de wilcoxon *p<0,05 e **p<0,01.

5 Os níveis de IL-1 β aumentam na cultura infectada e decaem com estímulo de rAnexina-A1 sem afetar a capacidade do macrófago matar o parasito.

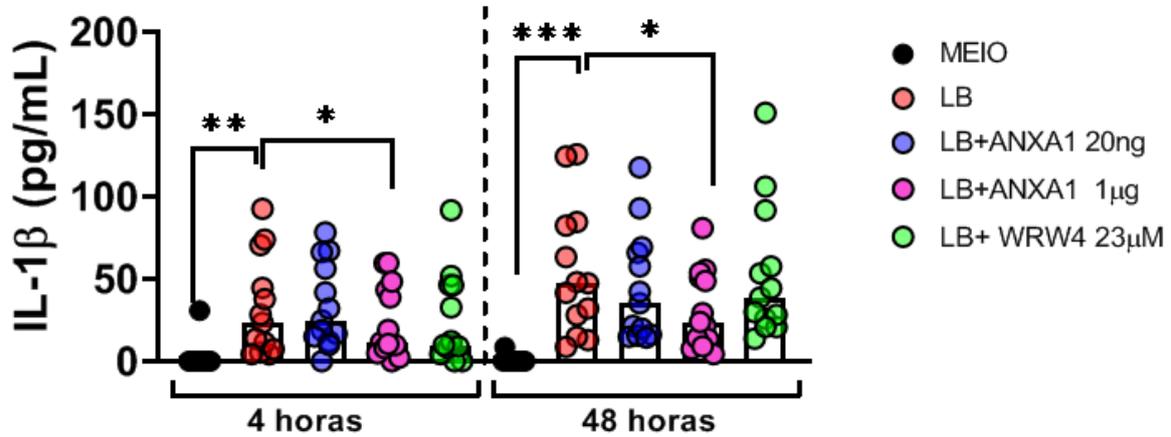


FIGURA 8 Níveis de IL- β em macrófagos de IS (n=13) foram infectados com *L. braziliensis* e estimulados com rAnexina-A1 e WRW4, por 4 e 48h. Os níveis de IL- β foram determinados no sobrenadante das culturas por ELISA. Os resultados estão apresentados em mediana e os valores de p foram obtidos através do teste de wilcoxon *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.

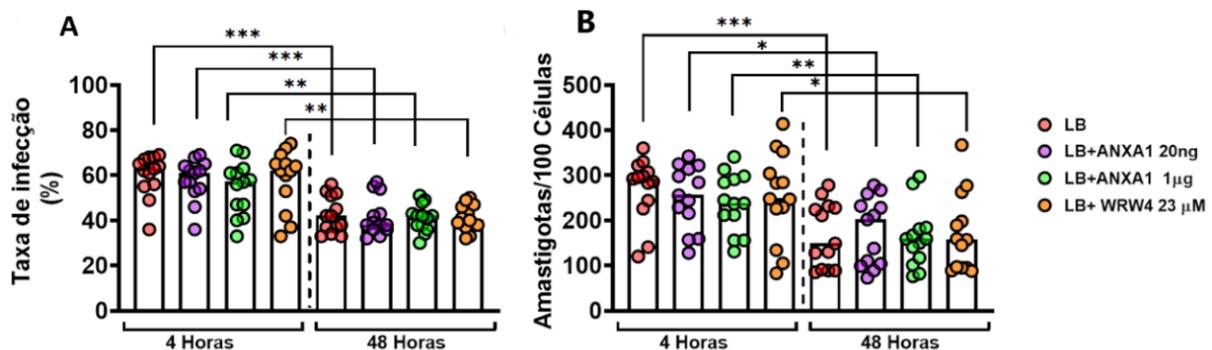


Figura 9: 9 A. O número de amastigotas a cada 100 células e figura 9 B. A taxa de infecção, e níveis de IL-1 β Macrófagos de IS (n=13) foram infectados com *L. braziliensis* (5:1) por 4 e 48 horas. A taxa de infecção e o número de amastigotas foram determinados por 3 observadores diferentes por microscopia óptica. Os resultados são apresentados em mediana e os valores de p foram obtidos através do teste de mann-whitney. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.