

miRNAS ALTERADOS EM MACRÓFAGOS DERIVADOS DE THP-1 INFECTADOS POR *Leishmania amazonensis* PODEM ESTAR ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE L-ARGININA

Juliane Cristina Ribeiro Fernandes^{1*}, Sandra Marcia Muxel², Ricardo Andrade Zampieri², Lucile Maria Floeter-Winter³

1. Graduada em Ciências Biomédicas pelo Instituto de Ciências Biomédicas da USP

2. Pesquisador(a) no Instituto de Biociências da USP

3. Professora Titular do Instituto de Biociências da USP / Orientadora

Resumo:

O aminoácido L-arginina é substrato comum da óxido nítrico sintase 2 (NOS2) e da arginase 1, na produção de óxido nítrico (NO) ou ornitina, substrato da via de poliaminas, respectivamente. Durante a infecção por *Leishmania* essas vias metabólicas são importantes no desfecho da infecção, visto que a produção de NO leva à morte dos parasitas e poliaminas são essenciais para sua replicação.

Sabe-se que a infecção por *Leishmania* é capaz de alterar o perfil de miRNAs nos macrófagos levando a uma regulação pós-transcricional de genes envolvidos em diversas vias metabólicas. O objetivo do trabalho foi determinar se miRNAs estão envolvidos na regulação do metabolismo de L-arginina. Para isso, nós quantificamos miRNAs e mRNAs de macrófagos infectados por *L. amazonensis* selvagem (*La-WT*) ou por mutante nocaute para arginase (*La-arg*), focando em RNAs envolvidos na resposta imune e nas vias de transporte e metabolismo de L-arginina. Por ferramentas *in silico*, foi possível correlacionar a interação de mRNAs alvo e seus possíveis miRNAs moduladores.

Palavras-chave: óxido nítrico; arginase; poliaminas.

Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo.

Introdução:

Leishmania (ROSS, 1903) é um gênero de protozoários unicelulares flagelados da família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida. O parasita é dimórfico, apresentando-se na forma promastigota no vetor invertebrado, e forma amastigota, intracelular obrigatória, no hospedeiro mamífero. O macrófago é a principal célula hospedeira no mamífero, no qual a forma amastigota é encontrada no interior do fagolisossomo, organela formada pela fusão do fagossomo com o lisossomo. Essa organela se apresenta como um ambiente hostil aos patógenos intracelulares, pois ali ocorre a resposta efetora do macrófago (CARNEIRO et al., 2016; ROMA et al., 2016). Por outro lado, é sabido que o parasita é capaz de atuar de diversas formas na subversão da resposta à infecção, o que leva ao estabelecimento da infecção pela multiplicação das amastigotas (KANE; MOSSER, 2000).

O metabolismo de L-arginina, substrato comum das enzimas óxido nítrico sintase 2, na produção de óxido nítrico (NO) e da arginase 1, na produção de ornitina, substrato para a via de poliaminas, influencia diretamente a sobrevivência do amastigota no fagolisossomo (WANASEN; SOONG, 2008). Nesse sentido, NO é a principal molécula efetora que leva à morte dos parasitas (LIEW et al., 1990), enquanto as poliaminas são essenciais para a replicação da *Leishmania* (INIESTA et al., 2002). Ainda, o parasita é capaz de realizar a síntese de poliaminas *de novo*, mas não de L-arginina, dependendo, portanto, da tomada desse aminoácido a partir da célula hospedeira (AOKI et al., 2017). A utilização do modelo *L. amazonensis* nocaute para arginase demonstrou que a enzima é essencial para a sobrevivência do parasita e que sua atividade auxilia na modulação da resposta do hospedeiro.

Os microRNAs (miRNAs) são RNAs não codificadores pequenos (aproximadamente 21 nucleotídeos quando maduros) que atuam como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica. Essas moléculas apresentam complementariedade (total ou parcial) à sequência da região 3'UTR de RNAs mensageiros (mRNAs), promovendo o silenciamento desse alvo por: a) deadenilação ou decapeamento do mRNA alvo, que pode ser degradado ou armazenado nos *P bodies*, b) repressão da tradução, por bloqueio do 5'cap ou do acoplamento das subunidades ribossomais, c) bloqueio da junção de novos aminoácidos do peptídeo em formação ou d) proteólise (FILIPOWICZ; BHATTACHARYYA; SONENBERG, 2008; PEREIRA, 2015).

Este projeto teve como objetivo avaliar se a infecção de macrófagos humanos derivados da linhagem monocítica THP-1 por *L. amazonensis* selvagem (*La-WT*) ou nocaute de arginase (*La-arg*) altera o perfil de expressão de miRNAs, quando comparados aos macrófagos não infectados, e se essa alteração modula genes envolvidos no transporte e metabolismo de L-arginina.

Metodologia:

Os macrófagos foram obtidos por diferenciação da linhagem monocítica THP-1 induzida por 30ng/mL de acetato miristato de forbol (PMA) durante 72 horas, seguidas de mais 72 horas com meio RPMI fresco, em estufa a 34°C e 5% CO₂. Depois da diferenciação, os macrófagos foram incubados com promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) selvagem (*La-WT*) ou nocaute para arginase (*La-arg*) (MOI 5:1) por 4 horas a 34°C/5% CO₂ quando os parasitas não fagocitados foram lavados. A infecção foi ainda acompanhada por 24 horas e 48 horas..

Nos experimentos para contagem de infecção os parasitas foram previamente marcados com CFSE 10µM (Invitrogen Molecular Probes), incubados por 30 minutos a 25°C e lavados com RPMI/SFB (soro fetal bovino). No ensaio de determinação do índice de infecção, as células foram deaderidas com PBS/EDTA 1mM, fixadas com PBS/paraformaldeído (PFA) 4% e ressuscendidas em PBS 1X no momento da contagem. Pelo citômetro de fluxo com imagem FlowSight®, foi determinada a porcentagem de macrófagos infectados (CFSE+) e, utilizando a ferramenta *Wizard Spot Count*, a média de amastigotas por macrófago infectado. O índice de infecção é o resultado da multiplicação dos dois parâmetros.

A extração do RNA total foi feita com os reagentes e segundo as recomendações do “*miRNeasy Mini Kit*” (Qiagen) a partir de macrófagos ressuscendidos em tampão de lise “Qiazol”.

A transcrição reversa para obtenção do cDNA a partir de miRNAs maduros foi feita com o “*miScript II RT Kit*” (Qiagen), segundo as orientações do fabricante. O perfil da expressão dos miRNAs foi feito por RT-qPCR utilizando-se o “*Human Inflammatory Response & Autoimmunity miRNA PCR Array: MIHS-105Z*” e o “*miScript SYBR PCR Kit*” (Qiagen). Ainda, os miRNAs que apareceram modulados foram estudados no banco de dados microrna.org quanto a possíveis alvos por análise de complementaridade de sequência à região 3'UTR de RNAs mensageiros relacionados às vias de poliaminas/NO.

A quantificação dos mRNA foi feita a partir de cDNA obtido do RNA total utilizando a RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). A reação de qPCR foi feita com 10µL de SYBER Green PCR Master Mix, 20 µM de oligonucleotídeos (Tabela 1) e 5µL do cDNA molde (diluído 10x).

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores de genes envolvidos nas vias de transporte e metabolismo de L-arginina e controle endógeno B2M para a normalização da reação de qPCR. Abreviaturas

Alvo	Forward oligo	Reverse oligo
NOS2	5' AAGCCTACCCCTCCAGATGA 3'	5' CTTTGTTACCGCTTCCACCC 3'
ARG1	5' AAGGATTATGGGGACCTGCC 3'	5' CGCTTGCTTTTCCACAGAC 3'
CAT1	5' CTCATTTAAGGTTCCCTTCTGC 3'	5' CAGCATCCACACAGCAAAC 3'
CAT2	5' CCTTATGGCTTTACGGGAACG 3'	5' TTCTGGGGATTCCGAATTCTT 3'
ODC1	5' GACCACGCACATGTAAGCC 3'	5' CAATCCGATCGAGGCCATCA 3'
AMD1	5' GAGTGAGCTTGACCCAGCAG 3'	5' TCACGAATTCCTACTCTCACGA 3'
SpdS	5' ACAGCCCTCAAGGAAGATGGT 3'	5' GGAACAGGGACTGGCAGAACT 3'
SpmS	5' CGAAAAACGTGTGGCGATGT 3'	5' TCCCTTCTTTGGCGTACCTC 3'
B2M	5' CACCCCACTGAAAAAGATGAG 3'	5' GCTTACATGTCTCGATCCCACTT 3'

A significância estatística foi avaliada com o teste de t Student bicaudal não paramétrico utilizando o GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Os experimentos foram realizados, no mínimo, em triplicatas. Os valores de p < 0,05 foram considerados significativos e estão indicados com um asterisco (*) em cada resultado.

Resultados e Discussão:

Os valores do índice de infecção para *La-WT* variam de 2 a 4, enquanto para *La-arg* a variação foi de 1 a 2,9. A menor infectividade de *La-arg*, no qual a atividade de arginase está ausente, já era esperada, uma vez que essa enzima é essencial para a síntese de poliaminas *de novo* pela *Leishmania*. Nesse parasita, a replicação depende exclusivamente da tomada de poliaminas produzidas pelo macrófago.

Foram quantificados 84 microRNAs envolvidos na regulação da resposta imune em humanos e observamos que a infecção por *La-WT* ou *La-arg* apresenta modulação de diferentes miRNAs ao longo do tempo, sugerindo que o metabolismo de L-arginina pode influenciar nos padrões de expressão dessas moléculas. A infecção promoveu a regulação de 37% dos miRNAs testados nos períodos de 4 horas de infecção por *La-WT* e 18% na infecção por *La-arg*. No período de 24 horas de infecção essa modulação caiu para 7% em *La-WT* e permanece relativamente estável com 11% de modulação em *La-arg*. Nas 48 horas após a infecção 22,6% dos miRNAs testados apareceram modulados na infecção por *La-WT* e apenas 3,6% em *La-arg*.

Alguns dos miRNAs modulados durante a infecção por *L. amazonensis*, com expressão aumentada (miR-202, miR-381, miR-302, miR-372 ou miR-520d) ou reduzida (miR-29a, miR-29b, miR-29c e miR-340) nos modelos *La-WT* e/ou *La-arg* foram também observados em macrófagos THP-1 infectados por *L. braziliensis* (miR-29, miR-381, miR-29c, miR520d, miR-302 e miR-372) e *L. infantum* (miR-29, miR-202, miR-381, miR-372, miR-340, miR-548 e miR-302), após 6 ou 24 h em trabalhos desenvolvidos em parceria com nosso grupo. Além disso, as análises parciais a partir de predições de interação por complementariedade de sequência indicam que esses miRNAs são capazes de regular genes envolvidos nas vias de transporte e metabolismo de L-arginina

O número de cópias de mRNAs de transportadores e enzimas envolvidas na conversão de L-arginina em NO ou poliaminas apareceu modulada na infecção, corroborando com a hipótese que a *Leishmania* é capaz de controlar a utilização desse substrato. No geral, observou-se aumento do número de cópias de mRNAs de enzimas envolvidas na via de produção de poliaminas. Uma vez que ambos mRNAs *Nos2* e *Arg1* aparecem aumentados nas 4 horas de infecção, a regulação direta do metabolismo de L-arginina via utilização do substrato por NOS2 ou ARG1 pode ser dependente da regulação do nível proteico (a ser determinado por *Western Blot*) e/ou atividade enzimática. Na literatura, foi observado o aumento da atividade de ARG 1 na infecção de macrófagos humanos derivados da linhagem monocítica THP-1 e derivados de monócitos humanos primários (do inglês, hMDM) infectados por *L. donovani* (MANDAL et al., 2017). De maneira interessante, em macrófagos murinos BALB/c, a infecção por *L. amazonensis* aumenta a expressão do mRNA *Arg1* e reduz o mRNA *Nos2* do macrófago por regulação via miR-294 e miR-721, no entanto, a ausência de atividade de arginase no parasita inverte essa condição (MUXEL et al., 2017). A quantificação de mRNAs das demais enzimas envolvidas sugerem um aumento na produção de poliaminas. A via inicia-se com a conversão de L-arginina em ornitina pela ARG1 (aumentada na infecção por *La-WT* e *La-arg*, 4h) e subsequente catalização pela ornitina decarboxilase (ODC) (aumentada na infecção por *La-WT*, 24h) e adição dos radicais aminopropil gerados pela adenosilmetionina decarboxilase (AMD1) (regulada positivamente na infecção por *La-arg*, 4h e 48h) para produzir putrescina. Essa é usada como substrato pela espermidina sintase (SpdS) (aumentada nas 4 e 24h na infecção por *La-arg*- e nas 24h de infecção por *La-WT*) na produção de espermidina, que por sua vez gera espermina via espermina sintase (SpmS) (aumentada nas 4h, 24h e 24h de infecção por *La-WT* e 4h *La-arg*-). O aumento na produção de poliaminas já foi demonstrado no modelo de infecção de THP-1 por *L. donovani* (MANDAL et al., 2017).

Conclusões:

Este estudo mostra que as vias de poliaminas/NO são potencialmente reguladas por mecanismos pós-transcricionais mediados por miRNAs em macrófagos derivados da linhagem THP-1 infectados por *L. amazonensis*.

Inicialmente, mostramos que a expressão de miRNAs é alterada na infecção de macrófagos THP-1 por *L. amazonensis* quando comparado ao controle não infectado. Além disso, a dinâmica do metabolismo de L-arginina influencia o perfil de expressão dessas moléculas, uma vez que a infecção por *La-WT* e *La-arg* é capaz de regular diferentemente os miRNAs da célula hospedeira. Ainda, os miRNAs diferencialmente expressos foram avaliados por ferramentas de bioinformática e foram identificadas possíveis interações por complementariedade à sequência 3'UTR de mRNAs das vias de transporte e metabolismo de L-arginina.

A quantificação dos mRNAs de enzimas envolvidas no metabolismo de L-arginina e seus transportadores nos macrófagos demonstrou aumento no número de cópias dos mRNAs de transportadores de L-arginina durante a infecção, indicando o importante papel desse aminoácido na infecção por *Leishmania*. Ocorre também um aumento do número de cópias de mRNAs de diversas enzimas envolvidas na via de síntese de poliaminas, essenciais para a sobrevivência do parasita.

Sendo assim, este estudo corrobora o estabelecido na literatura, que o metabolismo de arginina no sentido da produção de poliaminas parece ser central na infecção por *Leishmania* e indica que os miRNAs modulados na infecção podem estar relacionados ao controle pós-transcricional na biossíntese de enzimas envolvidas no metabolismo desse aminoácido.

Referências bibliográficas

AOKI, J. et al. L-arginine availability and arginase activity: characterization of amino acid permease 3 in *Leishmania amazonensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases.**, 2017.

CARNEIRO, P. P. et al. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148084, 3 fev. 2016.

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S. N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 2, p. 102–114, 2008.

INIESTA, V. et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. **Parasite immunology**, v. 24, n. 3, p. 113–8, mar. 2002.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Current opinion in hematology**, v. 7, n. 1, p. 26–31, jan. 2000.

LIEW, F. Y. et al. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 144, n. 12, p. 4794–7, 15 jun. 1990.

MANDAL, A. et al. L-Arginine Uptake by Cationic Amino Acid Transporter Promotes Intra-Macrophage Survival of *Leishmania donovani* by Enhancing Arginase-Mediated Polyamine Synthesis. **Frontiers in immunology**, v.

8, p. 839, 2017.

MUXEL, S. M. et al. Leishmania (Leishmania) amazonensis induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. **Scientific Reports**, v. 7, n. September 2016, p. 44141, 2017.

PEREIRA, T. C. **Introdução ao mundo dos microRNAs**. [s.l.] Editora CUBO/Sociedade Brasileira de Genética, 2015.

ROMA, E. H. et al. Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads and inflammation in Leishmania amazonensis infection. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 193, 7 dez. 2016.

ROSS, R. NOTE ON THE BODIES RECENTLY DESCRIBED BY LEISHMAN AND DONOVAN. **BMJ**, v. 2, n. 2237, p. 1261–1262, 14 nov. 1903.

WANASEN, N.; SOONG, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against Leishmania infection. **Immunologic research**, v. 41, n. 1, p. 15–25, 2008.