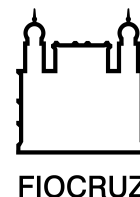




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Perfil de transcrição gênica de células humanas estimuladas com a
saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu. longipalpis*, vetores das
leishmanioses no Brasil**

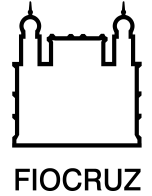
REBECCA PEREIRA CURVELO

Salvador-Bahia-Brasil

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

Perfil de transcrição gênica de células humanas estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu. longipalpis*, vetores das leishmanioses no Brasil

REBECCA PEREIRA CURVELO

Orientadora: Dra. Camila Indiani de Oliveira

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós Graduação em Patologia da Universidade Federal da Bahia para obtenção do grau de Mestre.

Salvador-Bahia-Brasil

2015

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

C981p Curvelo, Rebecca Pereira
Perfil de transcrição gênica de células humanas estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu. longipalis*, vetores das leishmanioses no Brasil / Rebecca Pereira Curvelo. - 2015.
58 f.; 30 cm

Orientadora: Dra. Camila Indiani de Oliveira, Laboratório de Imunoparasitologia.

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Pós-Graduação, 2015.

1. Leishmaniose. 2. Vetores de Doenças. 3. Saliva. 4. Phlebotomus. 5. Isoformas de RNA. I.Título.

CDU 616.993.161

**“PERFIL DE TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE CÉLULAS HUMANAS ESTIMULADAS COM A SALIVA DE
LU. INTERMEDIA OU DE LU. LONGIPALPIS, VETORES DAS LEISHMANIOSES NO BRASIL”**

REBECCA PEREIRA CURVELO

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Vanessa Carregaro Pereira
Professora
FMRP-USP



Dra. Dalila Lucíola Zanette
Pesquisadora
CPqGM/FIOCRUZ



Dra. Camila Indiani de Oliveira
Pesquisadora
CPqGM/FIOCRUZ

À Deus, pela vida.

À Ricardo e Selene Curvelo, meus pais, pelo amor incondicional, apoio e dedicação.

À Diogo e Victor Curvelo, meus irmãos mais que queridos, pelos conselhos e incentivos.

À Camila e Marialice Curvelo, minhas cunhadas, pela força e carinho.

À Murilo Moura, pelo companheirismo, paciência e incentivo.

Aos meus familiares, pelo afeto e por torcerem sempre por mim.

Aos meus amigos pelas lágrimas, sorrisos, ajuda e apoio.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

À Dra Camila Indiani de Oliveira pela paciência, dedicação, confiança, ensinamentos, questionamentos e orientação.

À Dra. Anamaria A. Camargo, Pedro Galante e Andrei Rozanski, do Centro de Oncologia Molecular, Hospital Sírio Libanês - SP, pelas corridas de RNASeq e análise de bioinformática.

Ao Dr. Helder Nakaya e Matheus Carvalho Burger, da Universidade de São Paulo e Pablo Ramos pelo auxílio com as análises de bioinformática.

Ao Dr. José Carlos Miranda pela coleta de insetos.

Aos amigos e colegas do lab, em especial à Fabiana Celes, Vinícius Costa, Sayonara Melo e Juqueline Cristal pela força, incentivo e companheirismo ao longo desses anos.

Aos amigos, colegas e pesquisadores do LIP/LIMI por multiplicarem conhecimentos, pelo apoio, carinho e incentivo.

À Andrezza Kariny e Elaine Rocha, secretárias do LIP/LIMI, pelo apoio e dedicação.

Às agências financiadoras, pelos recursos concedidos para a realização desse trabalho.

CURVELO, Rebecca Pereira. Perfil de transcrição gênica de células humanas estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu. longipalpis*, vetores das leishmanioses no Brasil 58 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

A saliva dos flebotomíneos transmissores do parasita *Leishmania* possui uma variedade de agentes farmacológicos, como anticoagulantes, vasodilatadores além de moléculas imunomoduladoras e anti-inflamatórias. A saliva de *Lu. intermedia* e de *Lu. longipalpis* provocam o aumentam da infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, em modelos experimentais. Entretanto a pré-exposição à saliva de *Lu. longipalpis* confere proteção a infecção, enquanto a pré-exposição à saliva de *Lu. intermedia* causa exacerbação da doença. Neste trabalho estimulamos as células do sangue de voluntários sadios com a saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu. longipalpis* e, posteriormente, o RNA foi extraído e utilizado no sequenciamento em larga escala (RNAseq). O estudo demonstrou que a saliva de *Lu. intermedia* e de *Lu. longipalpis* modula a expressão de uma série de genes e os processos biológicos mais frequentes são semelhantes após a estimulação com as duas diferentes salivas. Identificamos seis processos biológicos comuns às salivas dos dois flebotomíneos: *Taxis*, *Chemotaxis*, *Locomotory behavior*, *Positive regulation of immune system process*, *Regulation of cytokine production* e *Regulation of cell activation*. Dentre os genes que caracterizam esses seis processos, detectamos genes que codificam quimiocinas, citocinas além de moléculas de superfície tais como *CCL19*, *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*, *CD80*, *CD83*, *IL10*, *IL1B*, *IL4*, *IL6*. Definimos um conjunto de genes encontrados exclusivamente na amostra estimulada com a saliva de *Lu. intermedia* (*ADA*, *CCL23*, *CCL3*, *CCL3L1*, *CXCL11*, *PDGFB*, *PDPN*, *PLAU* e *TNFSF15*). Da mesma forma, encontramos um outro conjunto de genes expresso exclusivamente em células estimuladas com a saliva de *Lu. longipalpis* (*ENPP2*, *EREG*, *IDO1*, *IL1A* e *VEGFA*). Essas diferenças podem fornecer pistas para o desenvolvimento da leishmaniose em indivíduos continuamente expostos à saliva de *Lu. intermedia*.

Palavras – chave: leishmaniose, vetor, saliva, RNAseq, enriquecimento funcional

CURVELO, Rebecca Pereira. Transcriptomic profile of human cells stimulated with saliva from *Lu. intermedia* or from *Lu. longipalpis*, vectors of leishmaniasis in Brazil58f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

ABSTRACT

The saliva of sand flies, vectors of leishmania parasite, has a variety of pharmacological agents, such as anticoagulants, vasodilators as well as immunomodulatory and anti-inflammatory molecules. *Lu. intermedia* and *Lu. longipalpis* increase the infection by different species of leishmania in experimental models. However, the pre-exposure to *Lu. longipalpis* saliva provides protection to infection, while the pre-exposure *Lu. intermedia* saliva causes exacerbation of the disease. In this work, we stimulated peripheral blood cells from healthy volunteers with salivary glands from *Lu. intermedia* or *Lu. longipalpis* and later RNA was extracted and used in large-scale sequencing (RNAseq). This study demonstrated that *Lu. intermedia* and *Lu. longipalpis* saliva modulate the expression of a number of genes and the most frequent biological processes are similar in cells stimulated with both saliva. We identified six biological processes commonly upregulated following stimulation with saliva of the two sand flies: taxis, chemotaxis, locomotory behavior, positive regulation of immune system process, regulation of cytokine production and regulation of cell activation. Among the genes that characterize these six biological processes, we detected genes encoding chemokines, cytokines plus surface molecules such as: *CCL19*, *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*, *CD80*, *CD83*, *IL10*, *IL1B*, *IL4* and *IL6*. We found a set of genes upregulated exclusively in cells stimulated with *Lu. intermedia* saliva (*ADA*, *CCL23*, *CCL3*, *CCL3L1*, *CXCL11*, *PDGFB*, *PDPN*, *PLAU* and *TNFSF15*). Similarly, another set of genes was expressed only in cells stimulated *Lu. longipalpis* saliva (*ENPP2*, *EREG*, *IDO1*, *IL1A* and *VEGFA*). These differences may provide clues for the development of leishmaniasis in individuals continuously exposed to *Lu. intermedia* saliva.

Key words: leishmaniasis, saliva, sand fly, RNAseq, functional enrichment analysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Expressão de IL-8 e de CCL2 em células humanas estimuladas com a saliva de <i>Lu intermedia</i>	23
Figura 2. Agrupamento hierárquico dos genes diferencialmente expressos em células estimuladas com a saliva de <i>Lu. intermedia</i> ou de <i>Lu. longipalpis</i> , em diferentes tempos, e das células controle.....	26
Figura 3. Número de genes diferencialmente expressos (DEGs) em células estimuladas com a saliva de <i>Lu. intermedia</i> ou de <i>Lu. longipalpis</i> , em diferentes tempos..	27
Figura 4. Análise de enriquecimento funcional a partir do perfil de expressão gênica de células estimuladas com a saliva de <i>Lu. intermedia</i> por 6 horas.	32
Figura 5. Análise de enriquecimento funcional a partir do perfil de expressão gênica de células estimuladas com a saliva de <i>Lu. longipalpis</i> por 6 horas.	33
Figura 6. Genes presentes nos processos biológicos mais representativos e compartilhados pelo transcriptoma de células estimuladas com a saliva de <i>Lu. intermedia</i> ou com a saliva de <i>Lu. longipalpis</i>	35
Figura 7. Agrupamento hierárquico dos genes modulados pela saliva de ambos flebotomíneos presentes nas seis vias comuns (<i>Taxis, Chemotaxis, Locomotory behavior, Positive regulation of immune system process, Regulation of cytokine production e Regulation of cell activation</i>)..	36
Figura 8. Valor de expressão gênica de genes encontrados no transcriptoma de células estimuladas com a saliva de <i>Lu. intermedia</i> ou de <i>Lu. longipalpis</i>	37
Figura 9. Valores de expressão (Log2FoldChange) dos genes exclusivamente encontrados no enriquecimento funcional de <i>Lu intermedia</i> (barra cinza) ou de <i>Lu. longipalpis</i> (barra branca).	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Leishmania</i> , formas clínicas e principais vetores.	13
Tabela 2. Sequências geradas e alinhadas com o genoma de referência humano.	24
Tabela 3. Número de processos biológicos e de funções moleculares enriquecidos em células estimuladas com a saliva de <i>Lu. intermedia</i> ou de <i>Lu. longipalpis</i> , em diferentes tempos.....	28
Tabela 4. Os dez principais processos biológicos encontrados em células estimuladas com a saliva de <i>Lu. intermedia</i> após 6 horas.	29
Tabela 5. As dez principais vias de processos biológicos encontrados em células estimuladas com a saliva de <i>Lu. longipalpis</i> após 6 horas.	30
Tabela 6. Processos biológicos encontrados somente em células estimuladas com a saliva de <i>Lu. intermedia</i> após 6 horas de estimulação.....	39
Tabela 7. Processos biológicos encontrados somente em células estimuladas com a saliva de <i>Lu. longipalpis</i> após 6 horas de estimulação.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTH	do inglês <i>Delay type Hypersensitivity</i> (Teste de hipersensibilidade tardia)
FC	Fold Change
FDR	do inglês <i>False Discovery Rate</i>
IFN-γ	Interferon γ
IL-10	Interleucina 10
IL-12p70	Interleucina 12p70
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
LC	Leishmaniose Cutânea
LD	Leishmaniose Disseminada
LM	Leishmaniose Mucosa
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
NK	Células matadoras naturais
PCR	Reação de polimerização em cadeia
RNA	Ácido ribonucléico
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
SGS	Sonicado de glândula salivar
TNF-α	do inglês <i>Tumor Necrosis Factor α</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO GERAL	17
2.1. Objetivos específicos.....	17
3. DESENHO EXPERIMENTAL	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
Sujeitos da pesquisa	19
Obtenção do sonicado de glândula salivar	19
Obtenção, estímulo e cultura de leucócitos totais	19
Extração de RNA	20
PCR em tempo real para determinação da expressão de IL-8 e CCL2	20
Construção das bibliotecas de cDNA e sequenciamento por ligação	21
Análises de expressão diferencial e assinatura gênica	21
Análise de enriquecimento dos dados	22
5. RESULTADOS	23
Cinética de expressão de IL-8 e CCL2 em células humanas estimuladas com a saliva de <i>Lu. intermedia</i>	23
Mapeamento e alinhamento das sequências obtidas após a estimulação de sangue total com a saliva de <i>Lu. intermedia</i> ou de <i>Lu. longipalpis</i>	24
Quantificação de genes diferencialmente expressos em células humanas estimuladas com a saliva de <i>Lu. intermedia</i> ou de <i>Lu. longipalpis</i>	25
Análise funcional de genes modulados em células humanas estimuladas com a saliva de <i>Lu. intermedia</i> ou de <i>Lu. longipalpis</i>	28
Genes diferencialmente expressos em células estimuladas com a saliva de <i>Lu. intermedia</i> ou de <i>Lu. longipalpis</i>	34
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXO	57

1. INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são um complexo de doenças causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. As Leishmanioses estão presentes em diversos países, estima-se que 350 milhões de pessoas estão sob risco de contrair a doença e que a incidência anual está em torno de 1,5-2 milhões de casos novos (ALVAR et al., 2012). Entre as formas clínicas de Leishmaniose, podemos destacar a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV). A principal espécie que causa a LT no Brasil é a *Leishmania braziliensis* que é transmitida principalmente pelo vetor *Lutzomyia intermedia* enquanto a LV é causada pela *Leishmania infantum-chagasi* cujo vetor é o *Lutzomyia longipalpis*. É sabido que fatores relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro desempenham um papel central na patogênese das leishmanioses.

A *Leishmania* possui um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores. A transmissão da *Leishmania* ocorre através do repasto sanguíneo de flebotomos fêmeas, momento no qual a forma infectante do parasita, promastigota metacíclica, é injetada no hospedeiro vertebrado juntamente com a saliva do vetor. Essas formas promastigotas irão infectar as células do sistema monocítico fagocitário onde irão se diferenciar nas formas amastigotas que se multiplicam obrigatoriamente dentro dessas células. Os flebotomíneos transmissores da *Leishmania* pertencem à ordem Diptera e existem dois gêneros de importância médica, *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de *Leishmania*, formas clínicas e principais vetores. Adaptado de Oliveira e colaboradores (2013).

Espécies de <i>Leishmania</i>	Forma clínica	Espécies de flebotomíneos
<i>Leishmania infantum chagasi</i>	LV	<i>Lutzomyia longipalpis</i> <i>Lu. evansi</i>
<i>Leishmania infantum</i>	LV, LC	<i>Phlebotomus perniciosus</i> , <i>Ph. ariasi</i> , <i>Ph. tobbi</i> , <i>Ph. neglectus</i>
<i>Leishmania donovani</i>	LV	<i>Ph. argentipes</i> , <i>Ph. orientalis</i> , <i>Ph. martini</i>
<i>Leishmania tropica</i>	LC	<i>Ph. sergenti</i>
<i>Leishmania major</i>	LC	<i>Ph. papatasi</i> , <i>Ph. duboscqi</i> , <i>Ph. salehi</i> , <i>Ph. bergeroti</i>
<i>Leishmania braziliensis</i>	LC, LM ^a	<i>Lu. intermedia</i> , <i>Lu. whitmani</i> , <i>Lu. migonei</i> , <i>Lu. wellcomei</i> , <i>Lu. ovallesi</i> ,
<i>Leishmania amazonensis</i>	LC, LCD ^b	<i>Lu. flaviscutellata</i>
<i>Leishmania guyanensis</i>	LC, LM	<i>Lu. umbratilis</i> , <i>Lu. anduzei</i> , <i>Lu. whitmani</i>
<i>Leishmania mexicana</i>	LC, LCD	<i>Lu. olmeca olmeca</i> , <i>Lu. shannoni</i> , <i>Lu. diabolica</i>

^aleishmaniose mucosa, ^bleishmaniose cutâneo-difusa

A saliva dos flebotomíneos possui uma variedade de componentes com atividade farmacológica que ajudam esses insetos a vencer os processos homeostáticos dos hospedeiros vertebrados. A hemostasia do hospedeiro vertebrado é altamente eficiente e inclui uma variedade de vias redundantes para evitar a perda sangüínea nos sítios de lesão, sendo estas vasoconstricção, agregação plaquetária e formação de coágulo (RIBEIRO, 1987; RIBEIRO; SCHNEIDER; GUIMARAES, 1995). Para superar estes obstáculos, artrópodos hematófagos desenvolveram uma variedade de moléculas com propriedades anticoagulante, vasodilatadoras e com atividade anti-agregação plaquetária, as quais estão presentes na saliva (REV em SACKS & KAMHAWI, 2001). O crescimento no interesse do estudo da saliva do vetor ocorreu após documentação de que a infecção por *L. major* é exacerbada pela

presença da saliva de *Lu. longipalpis*(TITUS & RIBEIRO, 1988). Neste trabalho clássico, foi visto que a co-inoculação de *L. major* juntamente com SGS de *Lu. longipalpis* induz um aumento significativo da lesão e da carga parasitária(TITUS & RIBEIRO, 1988).Posteriormente foi documentado também que a co-inoculação de *L. major* juntamente com o SGS de *P. papatasi* favorece a progressão da doença em camundongos C57BL/6 (THEODOS; RIBEIRO; TITUS, 1991; BELKAID et al., 1998). Em adição, o SGS de *P. papatasi* também exacerba a lesão por *L. major* em camundongos CBA e a exacerbação da doença foi correlacionada com a inibição da produção de IFN- γ , IL-12 e da enzima óxido nítrico sintase induzível além de um aumento da produção de IL-4 (MBOW et al., 1998). Em outro trabalho, observou-se que a saliva de *Lu. longipalpis* aumenta a infecção por *L. amazonensis*, induzindo lesões maiores e uma carga parasitária mais elevada (NORSWORTHY et al., 2004). Nesse caso, camundongos co-inoculados com o parasita e o SGS apresentaram expressão de IL-10 mais elevada no tecido além de um aumento da frequência de células T CD4+ e T CD8+ expressando IL-10 no linfonodo drenante (NORSWORTHY et al., 2004). Também foi mostrado que o SGS de *Lu. longipalpis*(SAMUELSON et al., 1991) e de *Lu. whitmani*(BEZERRA; TEIXEIRA, 2001) induzem um aumento da infecção por *L. braziliensis*.

Após a observação de que a inoculação do parasita junto com a saliva do vetor exacerba a infecção, formulou-se a hipótese de que a prévia exposição à saliva pudesse controlar uma infecção subsequente com *Leishmania*(BELKAID et al., 1998). De fato, foi mostrado que a sensibilização com o SGS de *P. papatasi* protege camundongos BALB/c ou C57BL/6 contra um desafio subsequente com *L. major*(BELKAID et al., 1998). Posteriormente, foi mostrado que a exposição a picadas de *P. papatasi* não infectados também confere proteção contra *L. major* e essa proteção foi associada com o aparecimento de uma forte reação de DTH para antígenos salivares e com a produção de IFN- γ após estímulo com SGS(KAMHAWI et al., 2000). A partir deste momento, uma maior atenção foi dada às moléculas da saliva, uma vez que elas poderiam ser possíveis candidatas a uma vacina contra a doença.Foi relatado que camundongos imunizados com um plasmídeo de DNA que codifica a proteína PpSP15 (presente na saliva de *P. papatasi*) foram protegidos contra o desafio com *L. major*(VALENZUELA et al., 2001). Além disso, foi mostrado nesse trabalho que camundongos deficientes de células B também foram protegidos, estabelecendo a resposta imune celular como mecanismo responsável pela proteção(VALENZUELA et al., 2001). De maneira similar, a pré-exposição à proteína LJM19, presente na saliva de *Lu. longipalpis*, foi capaz de conferir proteção contra *L. infantum-chagasi*(GOMES et al., 2008), em modelo

experimental de LV. Adicionalmente, em outro trabalho foi mostrado que a imunização com o SGS de *Lu. longipalpis* ou com a proteína LJM19 também confere proteção contra um desafio composto por *L. braziliensis* + saliva de *Lu. intermedia*, sugerindo a possibilidade do uso de um componente da saliva de um vetor em uma vacina contra diversas espécies de *Leishmania* (TAVARES et al., 2011). A imunização com plasmídeos de DNA que codificam duas proteínas da saliva de *Lu. longipalpis* (LJM17 e LJM143) ou a imunização com as respectivas proteínas recombinantes resultou em uma forte resposta Th1, com grande produção de IFN- γ *in vitro* e *in situ*, em modelo canino (COLLIN et al., 2009). Além disso, macrófagos infectados com *L. infantum-chagasi* eliminaram o parasita de maneira eficiente, quando colocados em cultura com linfócitos autólogos de animais imunizados com LJM17 e LJM143 (COLLIN et al., 2009). Em um estudo recente, camundongos imunizados com LJM11 não desenvolveram lesão após desafio com flebótomos infectados com *L. major* e os autores mostraram que a proteção se correlaciona com a produção aumentada de IFN- γ (GOMES et al., 2012). Mais recentemente, foi mostrado que macacos expostos à picada de *P. duboscqi* ou imunizados com PdSP15 apresentaram uma redução na doença e na carga parasitária após o desafio com insetos infectados (OLIVEIRA et al., 2015).

De maneira diferente das outras interações parasita/vetor, a prévia inoculação de SGS de *Lu. intermedia* levou ao aumento da infecção por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c (DE MOURA et al., 2007). Além disso, animais imunizados com a saliva de *Lu. intermedia* apresentaram uma resposta imune celular mista, com presença de células CD4⁺ e CD8⁺ expressando IFN- γ , IL-4 e IL-10 (DE MOURA et al., 2007). Contudo, como a saliva do vetor possui diversas proteínas, é possível que cada proteína induza um perfil de resposta imune. Nesse contexto, camundongos imunizados com plasmídeo de DNA codificando para a proteína Linb11 (proteína da saliva de *Lu. intermedia*) e desafiados com a *L. braziliensis*, apresentaram uma redução da carga parasitária correlacionada com aumento na produção de IFN- γ (DE MOURA et al., 2013). Assim, os estudos em modelos experimentais mostram que a saliva de *Lu. intermedia* e de *Lu. longipalpis* promovem exacerbação da infecção pela leishmania e a pré exposição à saliva de *Lu. longipalpis* confere proteção quando desafiado com *L. chagasi* enquanto a pré exposição à saliva de *Lu. intermedia* não conferiu proteção quando desafiado com *L. braziliensis*.

Embora esses estudos tenham sido realizados em modelos experimentais, alguns trabalhos em humanos demonstraram resultados que corroboram esses achados. Crianças residentes em área endêmica para LV em São Luiz (Maranhão) apresentaram conversão para DTH⁺ associada à soro conversão positiva contra a saliva de *Lu. longipalpis* (GOMES et al.,

2002). Outros dois trabalhos mostraram que a resposta imune humoral contra saliva de *Lu. intermedia* pode ser um marcador de doença já que os pacientes com LC ativa apresentam títulos anti-saliva significativamente mais elevados em comparação com os indivíduos DTH+ e DTH-, expostos mas sem sintomatologia (DE MOURA et al., 2007; CARVALHO et al., 2015).

As etapas iniciais do encontro das células do hospedeiro com o parasita são elementares para a compreensão de etapas posteriores, e podem contribuir para o desenvolvimento da doença. Sabe-se que a presença da saliva do flebótomo no lago sanguíneo, onde ocorre o encontro de células do hospedeiro e do parasita, influencia no desenvolvimento e na função de várias células. Em monócitos humanos, o sonicação de glândula salivar (SGS) de *Lu. longipalpis* modulou positivamente a secreção de várias citocinas e alterou a expressão de moléculas co-estimuladoras. Nesse sistema, foi observada uma diminuição de TNF- α e interleucina 10 (IL-10) e um aumento de níveis de interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e IL-12p40 (COSTA et al., 2004). Análogo a saliva total, o maxadilan inibiu a liberação de TNF- α e aumentou a produção de IL-6 em monócitos humanos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) (ROGERS & TITUS, 2003). Menezes e colaboradores mostraram que o pré-tratamento de monócitos humanos com SGS de *Lu. intermedia* seguido pelo estímulo de LPS diminuiu a secreção de IL-10 e aumentou a expressão das moléculas CD86, CD80, e HLA-DR (MENEZES et al., 2008). A partir desses dados podemos especular que o efeito modulador da saliva na produção de citocinas e expressão de moléculas co-estimulatórias em células apresentadoras de antígenos pode alterar a ativação de células T e favorecer o estabelecimento do parasita. Entretanto essas observações foram baseadas na análise de populações isoladas de células na presença de saliva, não levando em consideração todas as células presentes no "lago sanguíneo", no qual os parasitas são injetados juntamente com a saliva do vetor. A nossa hipótese é que as interações iniciais entre as moléculas da saliva e as células sanguíneas humanas modulam a resposta imune inata e influenciam nos efeitos mais tardios, na resposta adquirida, e possivelmente, no estabelecimento da infecção.

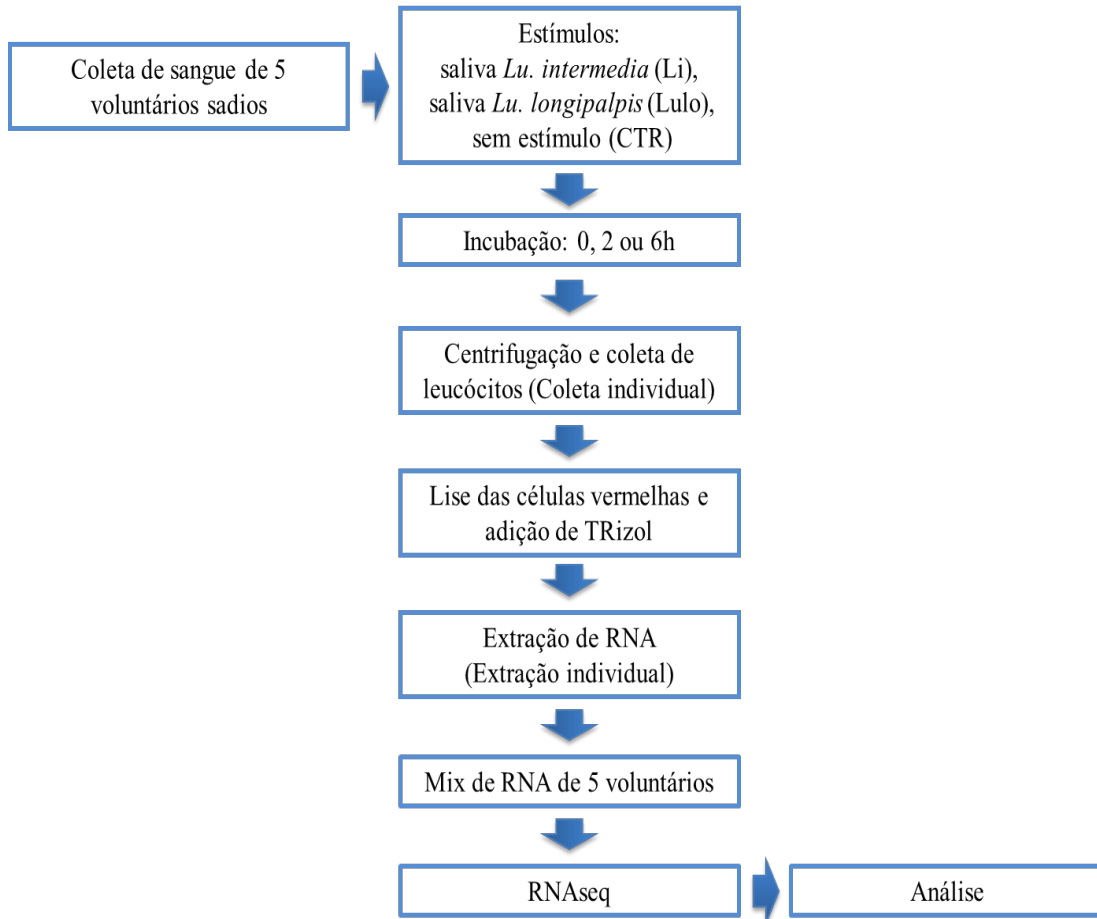
2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil de transcrição gênica de células do sangue humano, após a exposição in vitro à saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu. longipalpis*.

2.1. Objetivos específicos

- 1) Estimular células do sangue humano com a saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu. longipalpis* e descrever o perfil transcriptômico, por RNAseq.
- 2) Avaliar as vias biológicas moduladas por meio de análise de enriquecimento funcional.
- 3) Formular hipóteses que possam explicar os efeitos biológicos diferentes, decorrentes da exposição natural às duas espécies de vetores.

3. DESENHO EXPERIMENTAL



4. MATERIAIS E MÉTODOS

Sujeitos da pesquisa

A casuística foi composta por cinco doadores voluntários de sangue, adultos, recebidos no LIP (CPqGM/FIOCRUZ). Como critérios de inclusão no estudo foram consideradas a aptidão para a doação voluntária de sangue e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Como critérios de exclusão foram considerados a não aplicação às exigências acima e/ou a não assinatura do TCLE, residência em área endêmica para leishmaniose; história de leishmaniose; presença de sinais de infecção aguda; relato e/ou diagnóstico de doença crônica infecciosa e/ou degenerativa; utilização de medicamentos nas 24 horas anteriores à doação de sangue; tratamento atual com corticóides; uso de imunossupressores; transplantados; usuários de drogas endovenosas; alcoolistas; gestação suspeita ou confirmada. O trabalho foi desenvolvido sob os critérios da Regulamentação da Bioética no Brasil, Resolução 196/96 de 10 de Outubro de 1996 e resoluções complementares do Conselho Nacional de Saúde, o qual determina as diretrizes a serem adotadas nas pesquisas que envolvem seres humanos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA (Parecer N° 986.408);

Obtenção do sonicado de glândula salivar

Flebótomos adultos fêmeas da espécie *Lu. intermedia* e *Lu. longipalpis* foram capturados em Cavunge, Bahia e foram usados para dissecação das glândulas salivares. As glândulas dissecadas foram transferidas para tubos eppendorf de 1,5 mL contendo geralmente 20 pares de glândulas em 20 μ L de HEPES 10 mM pH 7.0, NaCl 0,15 mM e mantidas a – 70° C até momento do uso. No dia dos experimentos, as glândulas foram sonicadas 20 vezes por quarenta segundos a uma frequência de dois Hertz e potência de 90 Watts através de um sonicador Branson Sonifier 450 (Branson Danbury, CT, USA). Os sonicados salivares foram centrifugados a 10.000g por 5 minutos e os sobrenadantes foram usados para realização dos experimentos.

Obtenção, estímulo e cultura de leucócitos totais

O sangue periférico (20 ml) foi coletado por punção venosa em tubos com heparina e posteriormente aliquotado em cinco tubos Falcon de 50 mL. Cada tubo recebeu 4 mL de sangue e 16 mL de meio RPMI incompleto. A condição controle não recebeu estímulo, enquanto as demais condições teste receberam 6 pares (1,5p por mL de sangue) de SGS de *Lu. intermedia* ou *Lu. longipalpis*. As amostras foram incubadas por 0, 2 e 6 horas em estufa a 37°C, 5%CO₂. Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas a 1811g por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida o anel de leucócitos totais foi coletado e transferido para um novo tubo Falcon de 15mL onde foi realizada a lise de hemácias. Aproximadamente 2 vezes o volume obtido na coleta de leucócitos é adicionado do tampão de lise (ACK). As amostras são então centrifugadas a 400g por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a lise, 1mL de Trizol (Life Technologies) é adicionado a cada amostra.

Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada com Trizol (Life Technologies), seguindo as especificações do fabricante. A quantificação dos RNAs foi feita no espectrofotômetro Nanodrop e a qualidade dos RNAs será avaliada no aparelho Bioanalyzer. Para eliminar a contaminação com DNA genômico, o RNA utilizado na construção das bibliotecas foi tratado com DNase (Promega), seguindo-se as recomendações do fabricante.

PCR em tempo real para determinação da expressão de IL-8 e CCL2

Após a estimulação do sangue total com SGS de *Lu. intermedia* por duas, quatro, seis ou doze horas, o RNA total dos leucócitos foi isolado empregando-se Trizol® (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. Cerca de um µg de RNA total foi utilizado para a síntese do cDNA (ImProm-II, Promega), conforme instruções do fabricante.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços, utilizando o reagente “SYBR-Green PCR Master MIX” (Applied Biosystems) e o equipamento “Perkin-Elmer ABI Prism 7500 Sequence Detection System”. A reação foi realizada em 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C, de acordo com o manual do fabricante ABI PRISM 7500. Cada amostra e controle negativo foram amplificados em triplicata, empregando iniciadores específicos. O método comparativo foi utilizado para determinação da expressão gênica (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001), sendo os níveis de expressão dos genes de interesse normalizados conforme o gene endógeno. Os valores foram obtidos utilizando o cálculo do

$\Delta\Delta Ct$ onde $\Delta Ct = Ct_{(\text{gene alvo})} - Ct_{(\text{HPRT gene})}$. O aumento ou diminuição na expressão gênica de células do sangue total estimuladas com saliva foi determinado por $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{alvo})} - \Delta Ct_{(\text{controle})}$. Os resultados foram expressos como o número de vezes em que os níveis de expressão gênica das células do sangue total estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* foram maiores em relação a expressão nas células não estimuladas (controle). Os primers utilizados foram: GAPDH (Forward: 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCT-3'; Reverse: 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTGA-3'); IL-8 (Forward: 5'-CTGGCCGTGGCTCTCTTG-3'; Reverse: 5'-CCTTGGCAAACACTGCACCTT-3') e CCL2 (Forward: 5'-CAAGCAGAAGTGGGTTTCAGGAT-3'; Reverse: 5'-TCTTCGGAGTTTGGGTTTGC-3'). Os primers foram desenhados utilizando o Software Primer Express (Applied Biosystems).

Construção das bibliotecas de cDNA e sequenciamento por ligação

O SOLiD™ Total RNA-Seq Kit (Applied Biosystems) foi utilizado para a construção das bibliotecas de cDNA, seguindo as especificações do fornecedor. Resumidamente, o RNA total obtido após 0, 2 e 6 horas de estimulação, livre de contaminação com DNA genômico, foi depletado de RNA ribossômico através da utilização do Ribominus kit (Invitrogen). Em seguida o RNA purificado foi fragmentado por digestão com RNaseIII. Ao RNA fragmentado foram ligados adaptadores, e esse material foi utilizado em reação de transcrição reversa. O cDNA obtido foi fracionado em gel denaturante de poliacrilamida, para a purificação de fragmentos com tamanho entre 100 e 200pb. O material purificado foi utilizado como molde em reação de PCR, utilizando iniciadores específicos para os adaptadores empregados na construção das bibliotecas. Após amplificação, o produto de PCR foi purificado e quantificado com o auxílio do fluorômetro Qubit (Invitrogen) e utilizado no PCR em emulsão automatizado. Para tanto, a solução contendo os fragmentos de PCR, beads recobertas com sequências complementares aos adaptadores utilizados na construção da biblioteca de cDNA e reagentes para amplificação dos fragmentos por PCR foi homogeneizada na presença de óleo sob agitação constante. Ao final, foi obtida uma emulsão com micro bolhas (microrreatores) contendo uma bead, uma molécula molde de cDNA e reagentes para a amplificação desta molécula por PCR. A emulsão foi então submetida à amplificação em um termociclador convencional. Após a amplificação, os beads recobertos por milhares de cópias de uma mesma molécula foram recuperados e submetidos ao sequenciamento por ligação na plataforma SOLiD V4.0 gerando sequências de 50-75pb.

Análises de expressão diferencial e assinatura gênica

Foram geradas aproximadamente 200 milhões de seqüências de cada uma das bibliotecas de cDNA. As seqüências foram mapeadas na seqüência referência do genoma humano (Hg19) utilizando o programa Bioscope (Applied Biosystems). Após o mapeamento, seqüências pertencentes a um mesmo gene foram agrupadas levando em consideração a direção/fita e as coordenadas do mapeamento. A expressão dos genes foi estimada pelo número de seqüências obtidas em cada amostra, considerando-se apenas as seqüências mapeadas nos exons dos mesmos. Estes valores foram normalizados pelo número total de seqüências obtidas para cada amostra e pelo tamanho da região transcrita do gene gerando um valor de RPKM (*reads per kilobase of transcript model per million mapped reads*). Para a identificação de genes com expressão diferencial entre os dois grupos foi utilizado o programa Cuffdiff. Em seguida foram utilizadas ferramentas de clusterização e análises estatísticas para a identificação de uma assinatura gênica.

Análise de enriquecimento dos dados

Para análise de enriquecimento funcional dos dados foi utilizada a plataforma DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), a qual incorpora as bases de dados Reactome, Biocarta, Gene Ontology (GO) e KEGG (DENNIS et al., 2003). Como conjunto de entrada foram utilizados os genes cuja modulação positivamente foi $\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 2$ e os genes modulados negativamente cuja expressão foi $\text{Log}_2\text{FoldChange} \leq -2$. Foram considerados apenas termos funcionais significativamente enriquecidos ($\text{FDR} \leq 0,05$) oriundos da base de dados GO. Para as análises realizadas os valores de expressão foram transformados em escala logarítmica (base 2), os quais proveem uma estimativa mais acurada da variação gênica, aproximando-se à uma distribuição normal. Scripts em R (<http://www.r-project.org/>) foram usados para sumarizar e gerar figuras para visualização dos dados, utilizando a biblioteca ggplot2 (<http://ggplot2.org/>).

5. RESULTADOS

Cinética de expressão de IL-8 e CCL2 em células humanas estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia*.

Inicialmente, realizamos alguns experimentos para determinar a cinética de expressão de duas citocinas (IL-8 e CCL2) em células do sangue total estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia*. Nesses experimentos, as células foram estimuladas por duas, quatro, seis ou doze horas. Em seguida, o RNA total foi extraído e utilizado em ensaio de RT-PCR. Os resultados mostraram que a expressão tanto de IL-8 quanto de CCL2 aumentou gradativamente a partir de 2 horas de incubação, atingindo o platô de expressão com o tempo de seis horas (Figura 1). Em seguida observamos uma redução da expressão gênica com doze horas de estimulação.

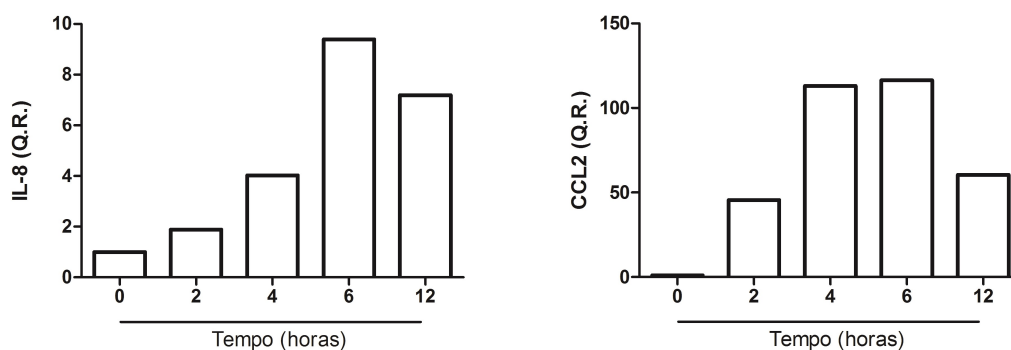


Figura 1. Expressão de IL-8 e de CCL2 em células humanas estimuladas com a saliva de *Lu intermedia*. O sangue total foi estimulado com a saliva de *Lu intermedia* por zero, duas, quatro, seis ou doze horas, o RNA total foi extraído e utilizado para quantificar a expressão gênica por RT-PCR.

Com base nesses dados, escolhemos os tempos de duas e seis horas para avaliar o perfil de expressão gênica de células humanas estimuladas com saliva. Isto porque, com duas horas de estimulação observamos o início do aumento da expressão gênica das moléculas avaliadas e com seis horas observamos o alcance do nível máximo de expressão.

Mapeamento e alinhamento das sequências obtidas após a estimulação de sangue total com a saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu. longipalpis*

Um vez determinados os tempos de coleta de RNA, partimos para experimentos com um maior número de voluntários. Assim, o sangue total de cinco voluntários foi estimulado com a saliva de *Lu. intermedia* (Li), o principal vetor de *L. braziliensis* (agente etiológico da LT) ou com a saliva de *Lu. longipalpis* (Lulo), o principal vetor da *L. infantum-chagasi* (agente etiológico da LV). A estimulação foi feita por 2 ou 6h e a amostra controle consistiu de células cultivadas na ausência de qualquer estímulo. Em seguida, o RNA total foi extraído e esse foi submetido ao sequenciamento em larga escala. Inicialmente, analisamos o número de sequências lidas e alinhadas com o genoma humano de referência (Tabela 2), nas diferentes condições. O número de sequências lidas variou entre 149 e 247 milhões, nas diferentes condições. Ao alinharmos essas sequências com o genoma humano de referência, cerca de 25,8% das sequências lidas (média entre os diferentes grupos) foram alinhadas com o genoma humano de referência. Já o número de nucleotídeos lidos variou entre 7 e 12 bilhões, nas diferentes condições, sendo que, aproximadamente 2,5 bilhões, foram alinhados. Apenas as sequências com mapeamento confiável foram quantificadas.

Tabela 2. Sequências geradas e alinhadas com o genoma de referência humano.

Amostras	Número de sequências	Sequências alinhadas	Número de nucleotídeos	Nucleotídeos alinhados
Controle	210.184.317	51.796.022	10.509.215.850	2.589.801.100
Li_2h ^a	206.300.926	55.054.337	10.315.046.300	2.752.716.850
Li_6h	247.552.507	62.363.358	12.377625.350	3.118.167.900
Lulo_2h ^b	213.844.794	48.154.514	10.692239.700	2.407.725.700
Lulo_6h	149.589.875	45.996.091	7.479.493.750	2.299.804.550

^aCélulas estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* por 2h.

^bCélulas estimuladas com a saliva de *Lu. longipalpis* por 2h.

Quantificação de genes diferencialmente expressos em células humanas estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu. longipalpis*

Uma vez realizado o alinhamento das sequências lidas, verificamos quantos genes foram modulados (positiva ou negativamente), nas diferentes condições. Comparando as amostras estimuladas com saliva com a amostra controle, identificamos a presença de 1818 genes diferencialmente expressos ($Fold\ Change \geq 2, \leq -2$; $False\ discovery\ rate < 5\%$; $Counts\ per\ million \geq 1$) (Figura 2). Porém, aclusterização hierárquica baseada na correlação de Pearson não mostrou a presença de grupos (clusters) majoritários de genes modulados positiva ou negativamente, nas diferentes condições. Observamos também uma maior similaridade entre as amostras “Lulo_2h” e “Lulo_6h” assim como “Li_2h” e “Li_6h”, sugerindo que os genes diferencialmente expressos em 2h também aparecem em 6h.

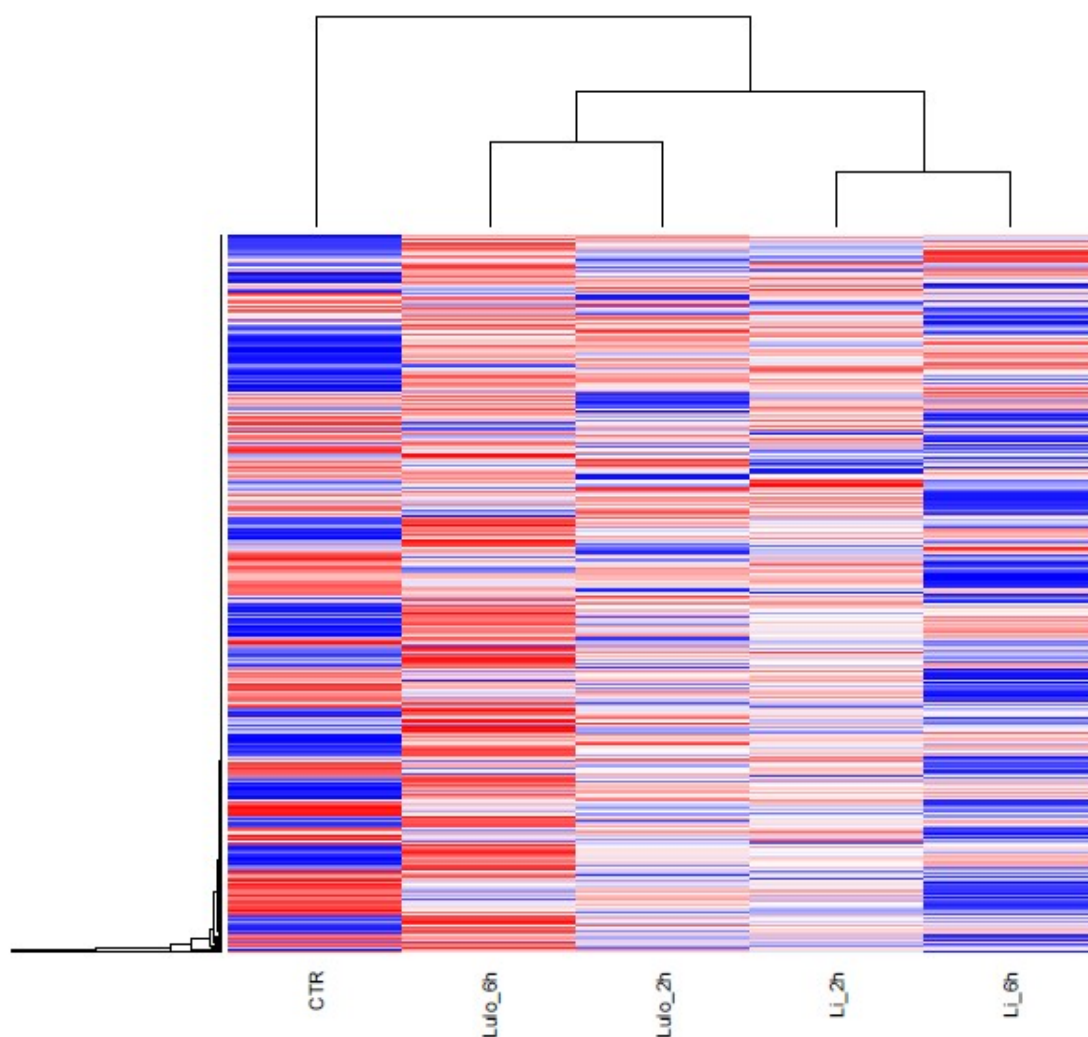


Figura 2. Agrupamento hierárquico dos genes diferencialmente expressos em células estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu. longipalpis*, em diferentes tempos, e das células controle. O sangue total de voluntários sadios foi estimulado com a saliva das duas espécies de vetores (Li- *Lu. intermedia* ou Lulo- *Lu. longipalpis*) por 2h ou 6h. Em seguida, o RNA total foi submetido ao sequenciamento em larga escala. As colunas representam as amostras enquanto as linhas representam os genes individuais. A coloração indica o nível de expressão baseado no escore de Z, no qual a cor vermelha representa aumento (≥ 2 fold) enquanto a cor azul representa redução (≤ -2 fold) da expressão gênica.

Em seguida, analisamos o número de genes diferencialmente expressos, nas diferentes condições, em relação ao controle (Figura 3). A saliva das duas espécies de vetores da *Leishmania*, *Lu. intermedia* e *Lu. longipalpis*, promoveu a modulação de aproximadamente 200 genes após 2 horas de estimulação. Esse número aumentou para cerca de 370 genes após 6 horas de incubação das amostras. Existe uma prevalência de genes modulados

positivamente na presença da saliva de *Lu. intermedia* enquanto que a saliva de *Lu. longipalpis* parece induzir uma maior supressão nos genes, especialmente com 6 horas. Esses resultados sugerem que a saliva de *Lu. intermedia* pode ter um papel maior na estimulação (modulação positiva) de determinados genes enquanto a saliva de *Lu. longipalpis* parece possuir uma função mais supressora (modulação negativa), comparando os tempos de 2 e 6 horas.

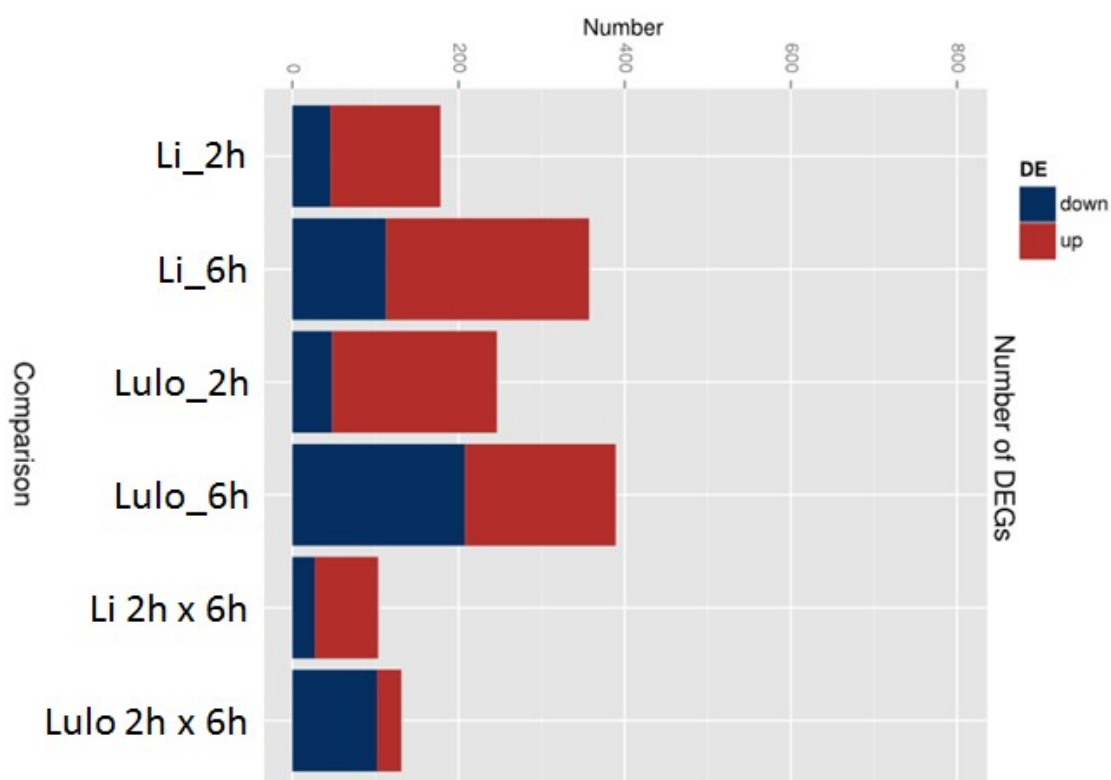


Figura 3. Número de genes diferencialmente expressos (DEGs) em células estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu. longipalpis*, em diferentes tempos. O sangue total de voluntários sadios foi estimulado com a saliva das duas espécies de vetores (*Li- Lu. intermedia* ou *Lulo- Lu. longipalpis*) por 2h ou 6h. Em seguida, o RNA total foi submetido ao sequenciamento em larga escala. A cor azul representa o número de genes modulados negativamente e a cor vermelha ilustra o número de genes modulados positivamente.

Análise funcional de genes modulados em células humanas estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu. longipalpis*

Sabendo quais são os genes diferencialmente expressos nas diferentes condições, selecionamos a classificação baseada na ontologia gênica, GO (*Gene Ontology*), para a análise funcional dos dados, avaliando os “Processos biológicos” (em verde) e as “Funções moleculares” (em azul) (Tabela 3). Esse enriquecimento funcional é feito comparando o perfil de genes expressos nas diferentes condições com o perfil de genes expressos na condição controle.

Tabela 3. Número de processos biológicos e de funções moleculares enriquecidos em células estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu. longipalpis*, em diferentes tempos

	Controle	Li_2h	Li_6h	Lulo_2h	Lulo_6h
Controle		86	147	109	102
Li_2h ^a	5		7	0	0
Li_6h	12	5		0	0
Lulo_2h ^b	4	0	3		0
Lulo_6h	12	1	4	0	

^aCélulas estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* por 2h.

^bCélulas estimuladas com a saliva de *Lu. longipalpis* por 2h.

Notamos o aumento no número de processos biológicos após estimulação com a saliva de *Lu. intermedia*, comparando 2h (86) e 6h (147). O mesmo não foi observado após a estimulação com a saliva de *Lu. longipalpis*. Nesse caso, houve uma redução no número de processos identificados (109 processos em 2h x 102 processos em 6h). Já na classificação ontológica relacionada às funções moleculares, a estimulação das células com a saliva das duas espécies induziu um aumento no número de funções moleculares identificadas após 2 e 6 horas. Esse resultado sugere que existe um aumento no número total de genes modulados (Figura 3), e também um aumento no número de vias relacionadas aos processos biológicos e às funções moleculares. Com base nos resultados apresentados até o momento, observamos

que a modulação gênica, em função do número de genes diferencialmente expressos (Figura 2) e do número de processos biológicos ou de funções moleculares (Tabela 3), foi maior após 6 horas. Assim, as análises subsequentes foram realizadas com os dados obtidos apenas no tempo de 6h.

A Tabela 4 mostra os dez processos biológicos mais representados nas amostras estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia*. No processo *response to wounding*, encontramos 51 genes com modulação significativa. Observamos que outros processos também foram significativamente representados tais como *inflammatory response*, *defense response*, *chemotaxis*, *taxis*, *locomotor behavior*, etc., embora o número de genes com modulação significativa é bastante reduzido.

Tabela 4. Os dez principais processos biológicos encontrados em células estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* após 6 horas.

GO Pathway	Número de Genes	Valor de <i>p</i>
<i>Response to wounding</i>	51	6.77x 10 ⁻²⁰
<i>Inflammatory response</i>	40	5.61x 10 ⁻¹⁸
<i>Defense response</i>	50	6.47x10 ⁻¹⁷
<i>Chemotaxis</i>	29	8.82x10 ⁻¹⁶
<i>Taxis</i>	29	8.82x10 ⁻¹⁶
<i>Locomotory behavior</i>	32	4.89x10 ⁻¹⁴
<i>Behavior</i>	38	4.07x10 ⁻¹⁴
<i>Cell-cell signaling</i>	32	1.68x10 ⁻⁹
<i>Immune response</i>	42	2.40x10 ⁻⁸
<i>Regulation of response to external stimulus</i>	18	7.29x10 ⁻⁸

O mesmo tipo de análise foi feito para as células estimuladas com a saliva de *Lu. longipalpis* (Tabela 5). De maneira similar ao mostrado na Tabela 4, a saliva de *Lu. longipalpis* modula os mesmos processos encontrados após a estimulação com a saliva de *Lu. intermedia*. O

processo mais significativamente modulado também foi *response to wounding* seguido de *defense response*, *inflammatory response*, *taxis*, *chemotaxis*, etc.

Tabela 5. As dez principais vias de processos biológicos encontrados em células estimuladas com a saliva de *Lu. longipalpis* após 6 horas.

GO Pathway	Número de Genes	Valor de <i>p</i>
<i>Response to wounding</i>	48	6.75x10 ⁻¹⁶
<i>Defense response</i>	49	1.61x10 ⁻¹⁴
<i>Inflammatory response</i>	37	2.79x10 ⁻¹⁴
<i>Taxis</i>	27	7.74x10 ⁻¹³
<i>Chemotaxis</i>	27	7.74x10 ⁻¹³
<i>Cell-cell signaling</i>	35	1.29x10 ⁻¹⁰
<i>Locomotory behavior</i>	28	7.48x10 ⁻¹⁰
<i>Immune response</i>	45	6.89x10 ⁻⁹
<i>Behavior</i>	32	1.37x10 ⁻⁸
<i>Cell surface receptor linked signal transduction</i>	55	1.50x10 ⁻⁶

Assim, de maneira geral, a saliva das duas espécies de flebótomos modulou os mesmos processos biológicos. O que difere entre elas é o número de genes significativamente modulados e o valor de *p*. Em seguida, os dados de expressão gênica foram analisados utilizando filtros mais estridentes. Nesta nova etapa, mantivemos o valor de *Fold Change* em ≥ 2 e ≤ -2 e mantivemos também o False Discovery Rate em $< 5\%$. Porém, aumentamos o número de cópias de RNA por milhão de ≥ 1 para ≥ 5 e definimos o valor de *hits* como < 300 .

A partir dessa nova análise, observamos que o processo *Locomotory behavior* foi aquele no qual o maior número de genes modulados, após a estimulação com a saliva de *Lu. intermedia*, foi agrupado (Figura 4). A análise integrada dos termos GO enriquecidos na condição de sobre-expressão permite identificar genes cuja expressão deve desempenhar importante papel na resposta à saliva de *Lu. intermedia*, tais como àqueles relacionados a

respostas contra estímulos externos, migração celular, vias de sinalização celular e coagulação. Estes processos biológicos gerais englobam, de fato, etapas comuns à exposição do hospedeiro pela saliva do vetor, uma cadeia complexa que se inicia com o estímulo do agente externo (saliva), seguido de migração de tipos celulares específicos para o sítio da lesão (tais como neutrófilos e células dendríticas), o que é mediado por citocinas que orquestram a resposta imune inicial, seguido de uma resposta para controlar a lesão, a qual acontece através de processos coagulatórios (SCHNEIDER et al., 2010). De fato, os resultados da análise de enriquecimento são um reflexo destes processos biológicos gerais. É importante salientar que muitos genes podem ser compartilhados entre processos biológicos.

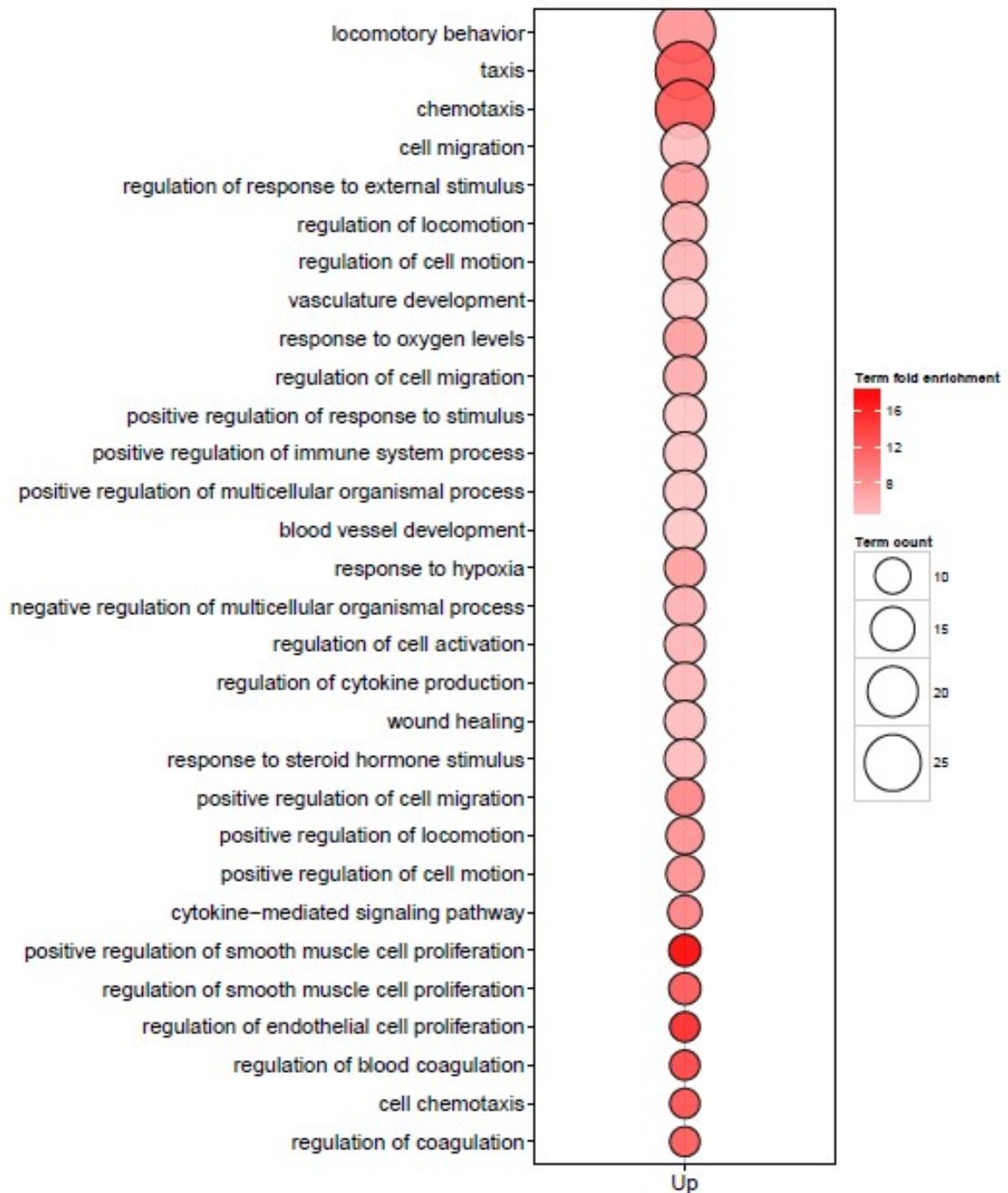


Figura 4 Análise de enriquecimento funcional a partir do perfil de expressão gênica de células estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* por 6 horas. São apresentados os termos GO enriquecidos relacionados a processos biológicos na condição de sobre-expressão ($FC \geq 2$). A intensidade da cor indica a grandeza de enriquecimento do termo, enquanto o tamanho dos círculos é proporcional ao número de genes modulados pertencentes a um dado termo GO.

Em células estimuladas com *Lu. longipalpis* (Figura 5), observamos primeiramente que o número de vias enriquecidas foi menor do que o obtido com *Lu. intermedia* (Figura 4). Além disso, os processos biológicos *taxis* e *chemotaxis* foram aqueles nas quais um maior número de genes foi agrupado, similar ao obtido com *Lu. intermedia* (Figura 4). Novamente a via *Regulation of endothelial cell proliferation* também foi aquela cujo enriquecimento foi mais robusto.

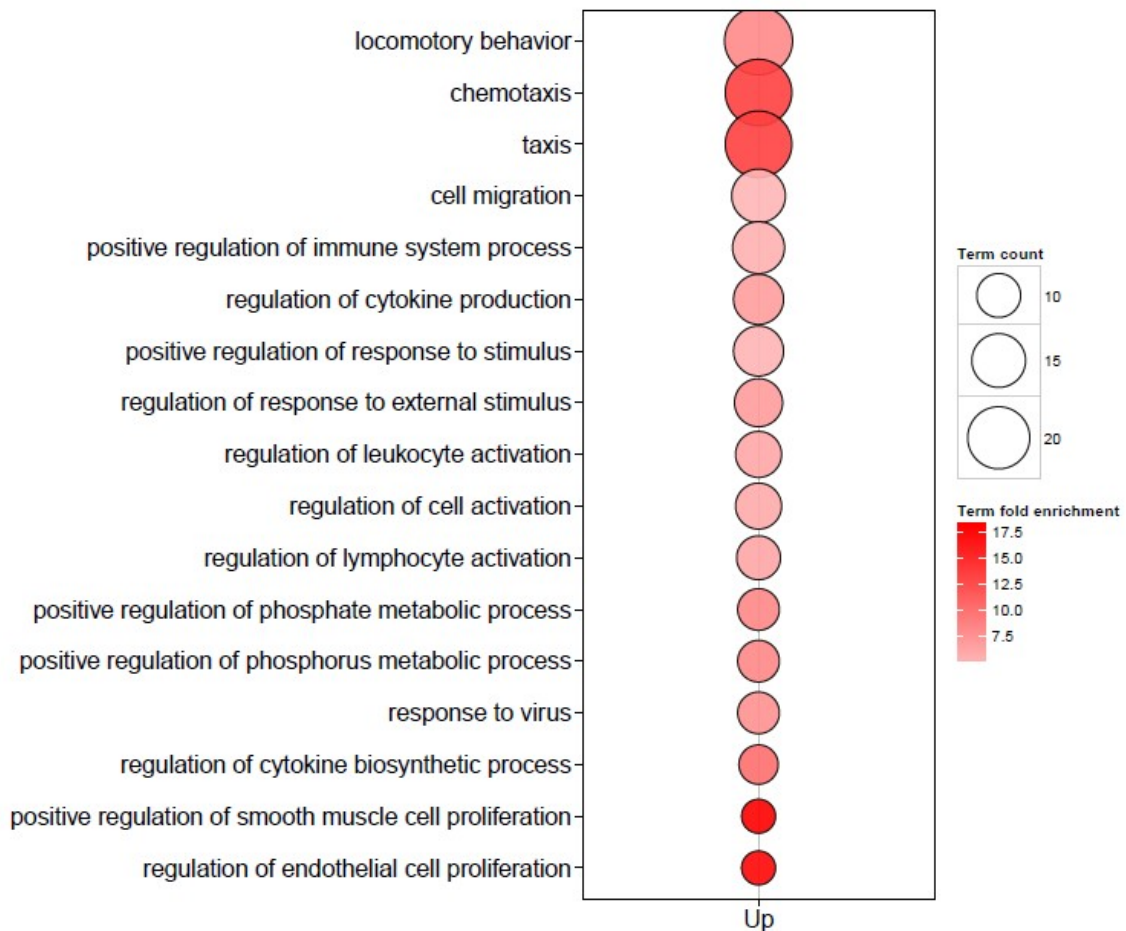


Figura 5 Análise de enriquecimento funcional a partir do perfil de expressão gênica de células estimuladas com a saliva de *Lu. longipalpis* por 6 horas. São apresentados os termos GO enriquecidos relacionados a processos biológicos na condição de sobre-expressão ($FC \geq 2$). A intensidade da cor indica a grandeza de enriquecimento do termo, enquanto o tamanho dos círculos é proporcional ao número de genes modulados pertencentes a um dado termo GO.

Com base nos dados ilustrados nas Figuras 4 e 5, observamos que o perfil de expressão gênica obtido em células estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu.*

longipalpsi está associado com vias similares tais como *taxis* e *chemotaxis*. Esses dados corroboram os achados obtidos nas Tabelas 3 e 4, nas quais observamos uma série de processos biológicos compartilhados pelas células estimuladas com as salivas das duas espécies de flebotomíneos.

Genes diferencialmente expressos em células estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu. longipalpis*

A partir da análise de enriquecimento funcional, observamos que há seis processos biológicos (*Taxis*, *Chemotaxis*, *Locomotory behavior*, *Positive regulation of immune system process*, *Regulation of cytokine production* e *Regulation of cell activation*) presentes no transcriptoma das células estimuladas tanto com a saliva de *Lu. intermedia* quanto a de *Lu. longipalpis* (Figuras 4 e 5). Entre esses genes, destacamos genes que codificam citocinas e quimiocinas, além de genes que codificam moléculas de superfície. No entanto, também percebemos que alguns genes foram detectados em um transcriptoma e não em outro (áreas externas dos círculos, Figura 6). Assim, os genes modulados apenas após a estimulação com a saliva de *Lu. intermedia* foram *ADA* (*Adenosine Deaminase*), *CCL23*, *CCL3*, *CCL3L1*, *CXCL11*, *PDGF β* (*Platelet-Derived Growth Factor beta*) e *PLAU* (*Plasminogen activator*), *PDPN* (*Podoplanin*), *TNFSF15* (*Tumor Necrosis Factor (ligand) superfamily, member 15*). Por outro lado, *ENPP2* (*Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 2*), *EREG* (*Epiregulin*), *IDO1* (*Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1*), *IL-1 α* e *VEGFA* (*Vascular Endothelial Growth Factor alpha*) foram modulados apenas após a estimulação com a saliva de *Lu. longipalpis*.

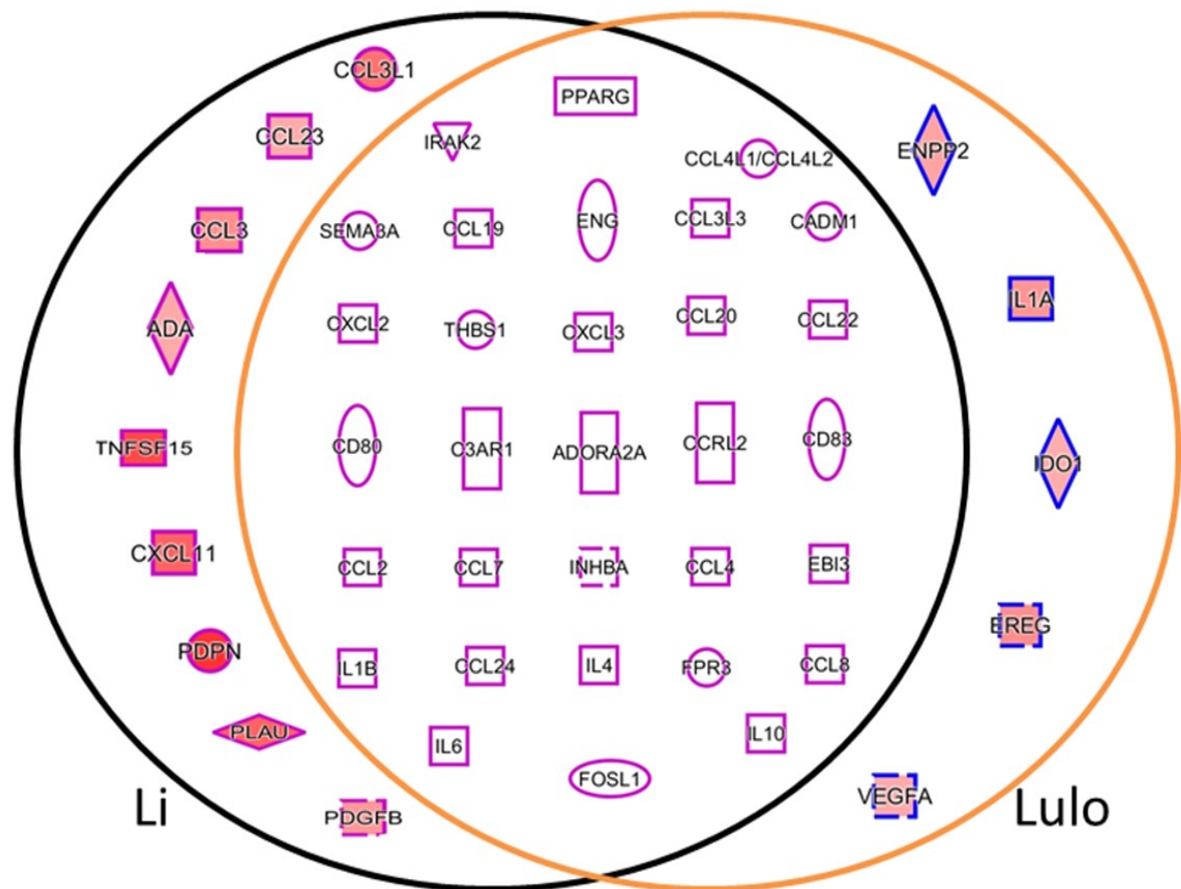


Figura 6. Genes presentes nos processos biológicos mais representativos e compartilhados pelo transcriptoma de células estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* ou com a saliva de *Lu. longipalpis*. Os genes mostrados foram encontrados nas vias *taxis*, *chemotaxis*, *locomotory behavior*, *regulation of cell activation*, *regulation of cytokine production* e *positive regulation of immune system process*, as quais foram enriquecidas em ambos transcriptomas. A figura geométrica atribuída a cada molécula está relacionada com a sua função, os quadrados com linha contínua são empregados para a identificação de citocinas e quimiocinas, os quadrados com linha não contínua classificam os fatores de crescimento, os círculos ovais classificam as moléculas de superfícies, enquanto os losangos classificam as enzimas, por exemplo. Li, *Lu. intermedia*. Lulo, *Lu. longipalpis*.

Em relação à magnitude de modulação ($\text{Log}_2\text{Fold Change}$) desses genes, observamos que existe um grupo de genes cuja modulação foi semelhante (Figura 7, áreas com coloração semelhante, comparando Li e Lulo), enquanto que para alguns genes, essa modulação foi diferente (Figura 7, áreas com coloração distinta, comparando Li e Lulo).

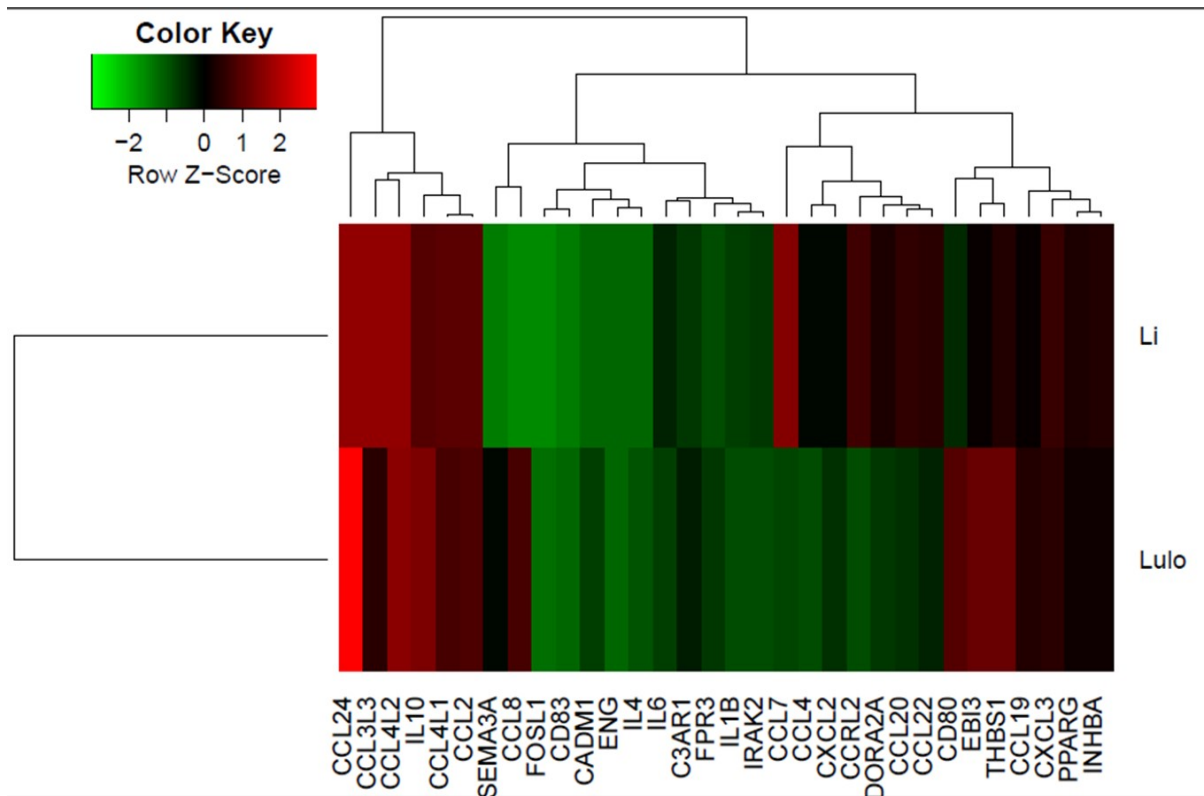


Figura 7. Agrupamento hierárquico dos genes modulados pela saliva de ambos flebotomíneos presentes nas seis vias comuns (*Taxis*, *Chemotaxis*, *Locomotory behavior*, *Positive regulation of immune system process*, *Regulation of cytokine production* e *Regulation of cell activation*). As colunas representam os genes modulados enquanto as linhas representam as amostras. A coloração indica o nível de expressão baseado no escore de Z onde a cor vermelha representa um maior aumento enquanto a cor verde representa um aumento menor na expressão gênica. ($FC \geq 2$ e $FDR \leq 0,05$). Li, *Lu. intermedia*. Lulo, *Lu. longipalpis*.

Na Figura 8 mostramos o valor de expressão de cada um desses genes, comparando células estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* e de *Lu. longipalpis*. Observamos que para a maioria dos genes, o valor de expressão (*Log2Fold Change*) em células estimuladas com *Lu. intermedia* foi maior do que o encontrado em *Lu. longipalpis*, sobretudo para genes que codificam quimiocinas.

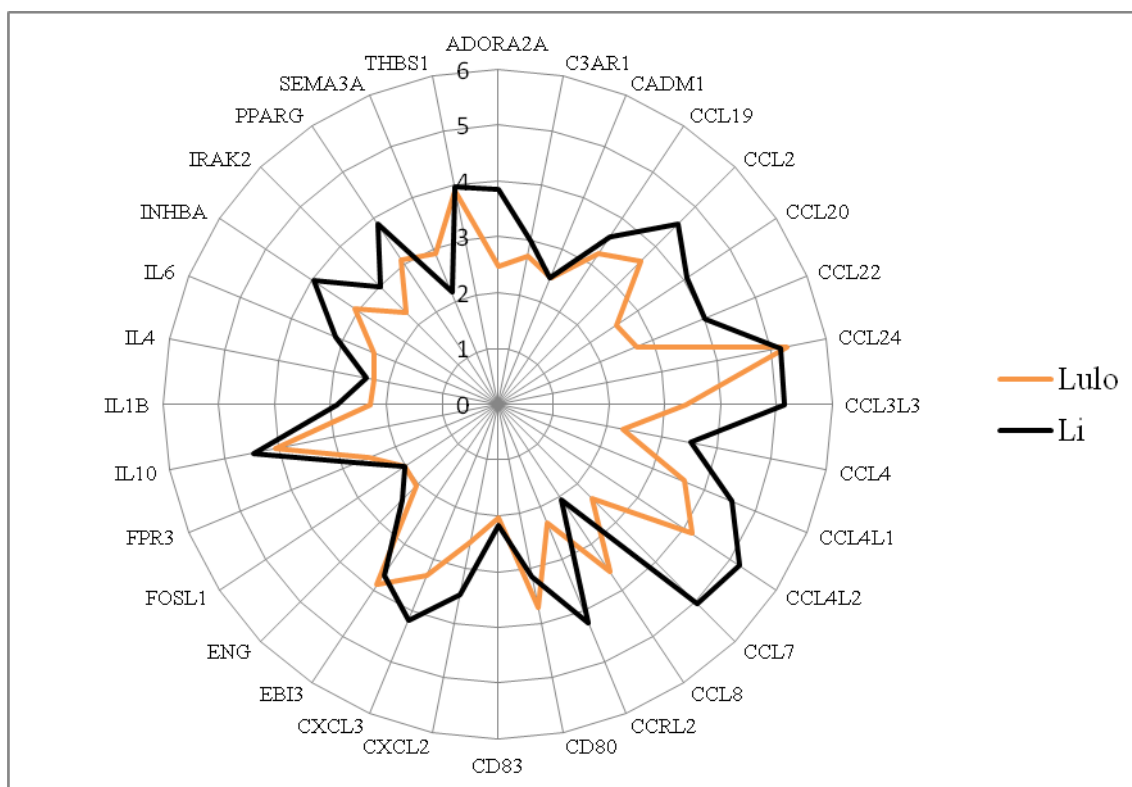


Figura 8. Valor de expressão gênica de genes encontrados no transcriptoma de células estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu. longipalpis*. Os números na vertical representam o número de vezes a mais que determinado gene foi expresso em relação ao controle (*Log2FoldChange*).

Com relação aos genes encontrados exclusivamente nos enriquecimentos funcionais (Figura 6), também avaliamos os níveis de expressão dos mesmos. Assim, observamos que, no transcriptoma de *Lu. intermedia*, os genes cuja modulação foi mais intensa foram: *PDPN* (*Podoplanin*), *TNFSF15* (*Tumor Necrosis Factor (ligand) superfamily, member 15*), *PLAU* (*Plasminogen activator*), seguidos por *CXCL11* e *CCL3L1*. No transcriptoma de *Lu. longipalpis* observamos que a modulação geral não foi tão intensa quanto a encontrada para os genes exclusivos de *Lu. intermedia*. Os genes com maior modulação foram *EREG* (*Epiregulin*) e *IL-1A*.

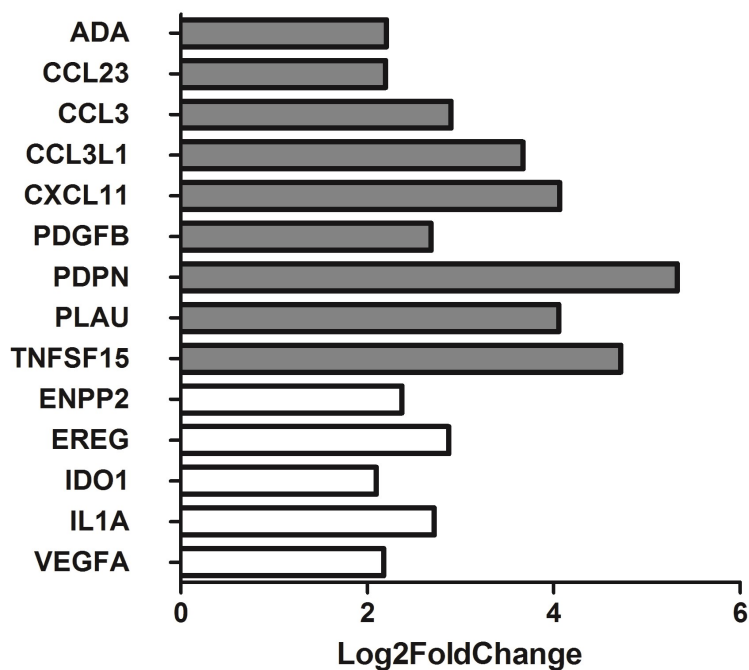


Figura 9. Valores de expressão (Log2FoldChange) dos genes exclusivamente encontrados no enriquecimento funcional de *Lu intermedia* (barra cinza) ou de *Lu longipalpis* (barra branca).

Finalmente, detectamos também processos biológicos enriquecidos somente no transcriptoma de *Lu. intermedia*, por exemplo. Como mostrado na Tabela 6, esses processos estão relacionados a *Response to oxygen levels*, *Response to hypoxia*, *Regulation of coagulation* e *Wound healing*.

Tabela 6. Processos biológicos encontrados somente em células estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* após 6 horas de estimulação.

<i>GO Pathway</i>	Genes	Valor de <i>p</i>
<i>Response to oxygen levels</i>	14	5.80 ⁻⁸
<i>Response to hypoxia</i>	13	2.63 ⁻⁷
<i>Regulation of coagulation</i>	7	1.71 ⁻⁵
<i>Wound healing</i>	13	1.10 ⁻⁵

Já os processos biológicos enriquecidos apenas no transcriptoma de *Lu. longipalpis* foram: *Positive regulation of phosphate metabolic process*, *Positive regulation of phosphorus metabolic process* e *Response to vírus*(Tabela 7). Esses processos únicos, assim como os genes associados a eles, podem estar relacionados às diferenças dos componentes salivares dos dois flebotomíneos. Além disso, as diferentes modulações provocadas na resposta imune do hospedeiro podem estar relacionadas também com as distintas formas clínicas das Leishmanioses.

Tabela 7. Processos biológicos encontrados somente em células estimuladas com a saliva de *Lu. longipalpis* após 6 horas de estimulação.

<i>GO Pathway</i>	Genes	Valor de <i>p</i>
<i>Positive regulation of phosphate metabolic process</i>	9	1.11 ⁻⁵
<i>Response to virus</i>	10	2.08 ⁻⁵

6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o contínuo aperfeiçoamento técnico e a redução do custo de tecnologias de sequenciamento vêm contribuindo para tornar o sequenciamento de RNA (RNA-seq), uma escolha mais acessível e atrativa para estudos de expressão gênica. Tais métodos baseados no estudo das sequências têm revolucionado o transcriptoma. Além de permitir uma vasta gama de novas aplicações, o RNAseq está sendo também uma alternativa interessante para os microarrays quanto à identificação de genes expressos diferencialmente entre várias condições ou tecidos, uma vez que permite uma cobertura elevada do genoma e permite a detecção de genes expressos fracamente (DILLIES et al., 2013). Assim, o presente trabalho consistiu em avaliar o perfil transcriptômico de células presentes no sangue periférico humano, após a estimulação das mesmas com a saliva de *Lu. intermedia* e de *Lu. longipalpis*, os principais vetores da LT e da LV no Brasil.

No momento do repasto sanguíneo, a saliva é injetada pelas fêmeas dos flebotomíneos na derme do hospedeiro vertebrado. É sabido que a saliva dos vetores possui diversas funções tais como vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e inibição da homeostasia. Essas funções farmacológicas da saliva facilitam a alimentação e propiciam a maturação dos ovos nos vetores, porém existem moléculas que também modulam a resposta imune do hospedeiro vertebrado. Entre essas funções imunomoduladoras estão o aumento na expressão de moléculas co-estimuladoras, aumento na produção de citocinas e aumento na produção de mediadores lipídicos, por exemplo (REV em PRATES et al., 2012). No entanto, na maioria dos casos, o estudo das propriedades imunomoduladoras da saliva foi realizado com células isoladas, tais como macrófagos (TEIXEIRA et al., 2005), monócitos (COSTA et al., 2004; MENEZES et al., 2008) e também estavam direcionados ao estudo de determinados alvos como citocinas ou quimiocinas. Nesse contexto, o trabalho buscou uma análise abrangente dos efeitos da saliva dos vetores sobre o sangue humano total, na tentativa de simular o lago sanguíneo formado.

Inicialmente observamos que a saliva de *Lu. intermedia* e de *Lu. longipalpis* são capazes de promover a modulação na expressão de diversos genes e essa modulação causada foi amplificada com o passar do tempo, ou seja, de 2 para 6h. A partir da análise de enriquecimento funcional baseada no *Gene Ontology* (GO), observamos uma modulação expressiva em determinados processos biológicos tais como *Response to wounding*, *Inflammatory response* e *Defense response*. Além disso, alguns processos biológicos foram

identificados tanto em células estimuladas com a saliva *Lu. intermedia* quanto com a saliva de *Lu. longipalpis*, sugerindo que a saliva de flebotômíneos pode induzir processos comuns em células humanas, de maneira geral. De fato, estudos realizados desde a década de 80 reportaram a modulação do sistema imune do hospedeiro vertebrado por moléculas da saliva do vetor. Titus e Ribeiro mostraram que a saliva de *Lu. longipalpis* é capaz de promover o aumento da lesão na pata de camundongos infectados com *L. major*, assim como o aumento do número de parasitas no local da lesão (TITUS & RIBEIRO, 1988). Outro estudo revelou que a saliva de *P. duboscqi* também induz a atração de monócitos murinos *in vitro* (ANJILI et al., 1995).

A modulação de vias comuns, após a estimulação das células humanas com a saliva de *Lu. intermedia* e de *Lu. longipalpis*, pode ser ocasionada pela presença das mesmas moléculas na composição da saliva dos dois vetores. Nas últimas duas décadas um número crescente de proteínas salivares vem sendo identificado em diversos vetores de leishmanioses. Entre essas estão as apirases, endonucleases, proteínas relacionadas ao antígeno 5, proteínas salivares D7 e proteínas yellow, por exemplo (REV. em OLIVEIRA; DE CARVALHO; DE OLIVEIRA, 2013). Maxadilan foi a primeira molécula a ser descrita na saliva de flebotômíneos, é um potente vasodilatador que, juntamente com hyaluronidase, é encontrado na saliva de *Lu. longipalpis* e parece estar ausente na saliva de *Lu. intermedia* (LERNER et al., 1991; CERNÁ; MIKES; VOLF, 2002). Em um estudo comparativo, Anderson e colaboradores cruzaram as informações das bibliotecas de cDNA da saliva de *P. argentipes*, *P. perniciosus*, *P. ariasi* e *Lu. longipalpis*. Os autores encontraram proteínas exclusivas de cada flebotômo mas também encontraram moléculas comuns entre as quatro espécies de flebotômíneos pertencentes a dois gêneros diferentes (*Phlebotomus* e *Lutzomyia*) (ANDERSON et al., 2006). Esses achados reforçam a idéia de que as salivas das duas espécies aqui estudadas modulam processos biológicos semelhantes. No entanto, entre os processos biológicos que apareceram após a estimulação com a saliva das duas espécies, observamos que a significância da identificação não foi similar. Isso sugere que dentro de um mesmo processo biológico, induzido pela estimulação com a saliva das duas espécies, o número de genes modulados foi diferente, além da variação na magnitude de modulação gênica ter uma importância relevante.

Em seguida, analisamos os dados empregando métodos mais estridentes, na tentativa de identificar processos biológicos induzidos especificamente por uma saliva ou outra. No entanto, os novos achados corroboraram o que já havíamos encontrado: a estimulação das células com a saliva de ambos vetores induziu a expressão de genes relacionados aos mesmos e principais processos biológicos: *taxis*, *chemotaxis*, *locomotory behavior*, *regulation of cell*

activation, regulation of cytokine production e positive regulation of immune system process. De fato, já foi demonstrado que tanto a saliva de *Lu. Longipalpis* (TEIXEIRA et al., 2005) quanto à saliva de *Lu. intermedia* (DE MOURA et al., 2010), induzem o recrutamento de células. Quanto à ativação celular, também foi demonstrado que a saliva de *Lu. longipalpis* induz um aumento na produção de citocinas como IL-6, IL-8 e IL-12p40 por macrófagos e monócitos humanos (COSTA et al., 2004). Células do linfonodo de drenagem de camundongos co-inoculados com *L. amazonensis* e a saliva de *Lu. longipalpis* têm maior produção de IL-10 *in vitro* (NORSWORTHY et al., 2004). Mais recentemente, também foi demonstrado que a saliva de *Lu. longipalpis* induz a produção de Prostaglandina E₂ e de Leucotrieno B₄ em um modelo de inflamação murino (ARAÚJO-SANTOS et al., 2014). Com relação a *Lu. intermedia*, trabalhos também mostraram que a saliva desse vetor modula a produção de citocinas tanto em células humanas (MENEZES et al., 2008), quanto em camundongos (DE MOURA et al., 2010).

Após identificarmos os processos biológicos comumente modulados pela saliva das duas espécies, partimos para analisar os genes encontrados nessas vias, os quais foram significativamente modulados. Entre os genes diferencialmente modulados tanto pela saliva de *Lu. intermedia* quanto pela saliva de *Lu. longipalpis*, encontramos uma série de quimiocinas, o que novamente corrobora o achado de que os principais processos biológicos encontrados no transcriptoma estão relacionados ao recrutamento celular. Além de quimiocinas, também notamos a presença de genes que codificam citocinas e moléculas co-estimuladoras.

As quimiocinas compreendem uma família de citocinas estruturalmente homólogas com peso molecular entre 8 e 10 kDa, as quais são classificadas em quatro grupos de acordo com a posição das duas primeiras cisteínas. Essa família de citocinas é constituída pelas quimiocinas das classes -CXC, -CC, -C e CX₃C, as quais estimulam a migração dirigida principalmente de leucócitos. É sabido que a classe -CXC age principalmente sobre neutrófilos enquanto a classe -CC age sobre um grupo de células que incluem monócitos, eosinófilos e linfócitos (REV. em BALKWILL, 2004). Entre as quimiocinas comumente moduladas pela saliva de *Lu. intermedia* e de *Lu. longipalpis*, destacamos: CCL2, relacionada ao recrutamento de monócitos; CXCL2 e CXCL3, relacionados ao recrutamento de neutrófilos. Teixeira e colaboradores descreveram que a saliva de *Lu. longipalpis* é capaz de modular a quimiotaxia celular, aumentando o recrutamento de macrófagos e eosinófilos para o sítio de inoculação através do aumento da expressão de CCL2 (TEIXEIRA et al., 2005). De maneira semelhante, camundongos BALB/c imunizados com a saliva de *Lu.*

intermedia apresentaram um aumento significativo no recrutamento de macrófagos e neutrófilos e na expressão de *CCL2* (DE MOURA et al., 2010). Uma vez que a quimiocina *CCL2* está associada com o recrutamento de macrófagos, sugerimos que a *Leishmania* pode explorar esse efeito, induzido pela saliva do vetor, para estabelecer a infecção no hospedeiro vertebrado. *CXCL2* e *CXCL3* estão relacionadas à quimiotaxia de neutrófilos. Animais inoculados com a saliva de *Lu. longipalpis* apresentaram recrutamento de diferentes leucócitos, incluindo macrófagos e neutrófilos (CARREGARO et al., 2013). Prates e colaboradores demonstraram também que a saliva de *Lu. longipalpis* induz a apoptose de neutrófilos *in vitro*, favorecendo a sobrevivência e desenvolvimento da infecção pela *Leishmania* (PRATES et al., 2011). Camundongos naturalmente expostos à saliva de *Lu. longipalpis* também apresentaram recrutamento de neutrófilos e macrófagos no sítio da picada (SILVA et al., 2005). Assim, é possível que um maior recrutamento de neutrófilos, induzido pela saliva do vetor, esteja sendo explorado pela *Leishmania* para assegurar a infecção.

CCL19 está envolvida na quimiotaxia de monócitos e de células NK. Animais expostos naturalmente à picada de *P. papatasi* e depois desafiados com insetos infectados apresentam a expressão de quimiocinas relacionadas ao recrutamento de diversos leucócitos, incluindo uma frequência de células NK aumentada (TEIXEIRA et al., 2014). Além disso, os autores também observaram um maior número de células NK produtoras de IFN- γ nesses animais. Assim, foi sugerido o maior recrutamento de células NK, por exemplo, pode criar um ambiente inóspito ao estabelecimento da *Leishmania*, em animais expostos. Na LC, há estudos mostrando uma função protetora das células NK (REV em BOGDAN, 2012). Acredita-se que esse papel seja baseado na forte produção de IFN- γ pelas células NK com consequente ativação de macrófagos. Por outro lado, as células NK também podem exercer funções citotóxicas, possivelmente contribuindo para o desenvolvimento da doença.

CCL4 é uma quimiocina responsável pela atração de células T $CD4^+CD25^+$, marcadores de células T reguladoras (BYSTRY et al., 2001). O nosso grupo demonstrou que indivíduos naturalmente expostos à picada de *Lu. intermedia* tem uma frequência aumentada de células T $CD4^+$ e $CD25^+$, além de um risco maior de desenvolver LC (CARVALHO et al., 2015). Portanto, os efeitos que vimos aqui após uma única estimulação podem ser amplificados na natureza, favorecendo o desenvolvimento da leishmaniose.

Já as citocinas compreendem um grupo de proteínas produzidas por diversos tipos celulares que medeiam as reações imunes e inflamatórias além de serem responsáveis pela comunicação entre as células do sistema imune. Costa e colaboradores avaliaram a produção de citocinas em monócitos humanos tratados com a saliva de *Lu. longipalpis* tratados com

LPS. Foi demonstrado nesse estudo que a saliva induz o aumento na produção de IL-6, IL-12p40 e IL-8 por monócitos humanos (COSTA et al., 2004). De forma semelhante, foi reportado que células mononucleares obtidas de indivíduos expostos à *Lu. intermedia* apresentam maior produção de IL-10 quando comparado a indivíduos controle (CARVALHO et al., 2015). Esses estudos corroboram nossos achados pois também observamos um aumento na expressão de *IL-6*, *IL-4* e *IL-10* nas células estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* e de *Lu. longipalpis*.

É sabido que moléculas co-estimulatórias desempenham um papel essencial na ativação e manutenção da resposta de células T. Monócitos humanos estimulados com a saliva de *Lu. intermedia* apresentaram aumento na expressão de CD80 (MENEZES et al., 2008), também corroborando nossos achados. Entretanto a saliva de *Lu. longipalpis* diminuiu a expressão de CD80 na superfície celular de monócitos e macrófagos humanos, pré-tratados com a saliva do flebotomíneo e estimulado com LPS (COSTA et al., 2004). Esse achado difere dos dados aqui apresentados pois observamos que a saliva de *Lu. longipalpis* aumentou a expressão de CD80. Isso pode ser explicado por diferenças metodológicas: enquanto Costa e colaboradores avaliaram a modulação da saliva sobre um tipo celular específico (monócitos humanos), o nosso estudo avaliou esse efeito em um contexto mais complexo, onde estavam presentes todos os tipos celulares do sangue assim como as proteínas plasmáticas.

Além dos genes comumente expressos após a estimulação com as duas salivas, também identificamos alguns genes que foram modulados após a estimulação com uma das salivas apenas. Destacamos os seguintes genes, modulados apenas em células estimuladas com *Lu. intermedia*: *CCL3L1*, *CCL23*, *CCL3*, *ADA*, *TNFSF15*, *CXCL11*, *PDPN*, *PLAU* e *PDGFβ*. *CCL3* e *CCL3L1* têm um papel importante na quimiotaxia de linfócitos T CD8⁺. Esses linfócitos participam na patogênese da LC pois migram para o local da lesão, exercendo citotoxicidade e contribuindo para a destruição tecidual (NOVAIS et al., 2013; SANTOS et al., 2013). Em indivíduos subclínicos, infectados mas sem sintomatologia, as células T CD8⁺ são a fonte principal de IFN- γ , enquanto que em indivíduos com LC ativa, as células T CD8⁺ produzem mais Granzima B e têm maior atividade citotóxica (CARDOSO et al., 2015). Esses achados sugerem que a saliva de *Lu. intermedia* pode estimular uma migração das células T CD8⁺ para o sítio de inoculação, contribuindo para a patogênese da LC.

A saliva de *P. papatasi* contém ADO (*Adenosine*) e AMP (*Adenosine monophosphate*) (RIBEIRO et al., 1999). ADO inibe a produção de NO (KATZ et al., 2000) e de IL-12 (HASKO et al., 2000). Já foi descrito que a saliva de *P. papatasi* é capaz de atenuar a inflamação em um modelo de artrite (CARREGARO et al., 2011). Mais recentemente, o

mesmo grupo demonstrou que a injeção de ADO + AMP aumentou a lesão e a carga parasitária em animais infectados com *L. major* (CARREGARO et al., 2015). Após a estimulação com a saliva de *Lu. intermedia*, observamos uma modulação significativa de ADA, a enzima responsável por hidrolisar ADO em inosina, a qual tem um papel anti-inflamatório pois suprime a produção de TNF, IFN- γ e IL-12 (HASKO et al., 2000). Esse cenário, por sua vez, pode favorecer a infecção pela leishmania.

Destacamos os seguintes genes, modulados apenas em células estimuladas com *Lu. longipalpis*: *ENP2*; *IL1A*; *IDO*; *EREG* e *VEGFA*. Estes apresentaram aumento na expressão gênica entre 2 e 3 vezes, em relação ao controle. Gangneux e colaboradores avaliaram os níveis de IDO, enzima envolvida no metabolismo do triptofano, em pacientes com LV e em voluntários saudáveis. O estudo observou que os níveis estavam aumentados nos pacientes com LV se comparados com os indivíduos saudáveis. Além de relatar que, após o tratamento, os níveis de IDO foram reduzidos e isso foi associado à melhora clínica (GANGNEUX et al., 2013). Já que foi mostrado que IDO pode induzir tolerância e favorecer infecções crônicas por meio da supressão da proliferação de células T, resultando na anergia ou morte dos linfócitos T mediada por triptofano ou metabólitos tóxicos (REV em MELLOR; MUNN, 2004). Na infecção por *L. major*, também foi demonstrado que ocorre aumento na expressão de IDO nos linfonodos (MAKALA et al., 2011). Isso acarretou em atenuação na função estimuladora de células dendríticas e supressão da resposta de linfócitos T. Novamente, o aumento na expressão de IDO, em células humanas estimuladas com a saliva de *Lu. longipalpis* pode ter efeitos importantes sobre o desenvolvimento da LV.

Além das vias comuns, observamos que existem vias presentes apenas em uma das condições. As vias descritas como únicas à condição em que as células do sangue total foram estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* são: *Response to oxygen*, *Response to hypoxia*, *Regulation of coagulation* e *wound healing*. Já em células que foram estimuladas com a saliva de *Lu. longipalpis* encontramos os módulos: *Positive regulation of phosphate metabolic process*, *Positive regulation of phosphorus metabolic process* e *Response to virus*.

Os dados do nosso trabalho indicam que a saliva dos dois principais vetores da LT e da LV no Brasil, *Lu. intermedia* e *Lu. longipalpis*, respectivamente, possuem em sua composição moléculas que promovem a modulação de diversos processos biológicos semelhantes. Entretanto a magnitude de modulação desses processos varia de um vetor para o outro o que pode determinar a montagem de uma resposta imune diferente. Somado às diferenças na magnitude de modulação estão os processos biológicos encontrados apenas nas células estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu. longipalpis*. Essas diferenças

podem determinar juntamente com a *Leishmania* o desenvolvimento ou não da infecção assim como a forma clínica e complexidade da infecção.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho caracterizamos o transcriptoma de células humanas estimuladas com saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu. longipalpis*. As vias biológicas encontradas foram semelhantes nas células estimuladas com as duas salivas mas identificamos um conjunto de genes que caracteriza células estimuladas com uma ou outra saliva. Acreditamos que esses perfis de expressão gênica distintos devem ser mais explorados a fim determinarmos se seus produtos influenciam no desfecho da infecção.

REFERÊNCIAS

- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, jan. 2012.
- ANDERSON, J. M.; OLIVEIRA, F.; KAMHAWI, S.; MANS, B. J.; REYNOSO, D.; SEITZ, A. E.; LAWYER, P.; GARFIELD, M.; PHAM, M.; VALENZUELA, J. G. Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. **BMC genomics**, v. 7, p. 52, jan. 2006.
- ANJILI, C. O.; MBATI, P. a.; MWANGI, R. W.; GITHURE, J. I.; OLOBO, J. O.; ROBERT, L. L.; KOECH, D. K. The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (diptera: psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. **Acta Tropica**, v. 60, n. 2, p. 97–100, out. 1995.
- ARAÚJO-SANTOS, T.; PRATES, D. B.; FRANÇA-COSTA, J.; LUZ, N. F.; ANDRADE, B. B.; MIRANDA, J. C.; BRODSKYN, C. I.; BARRAL, A.; BOZZA, P. T.; BORGES, V. M. Prostaglandin E2/Leukotriene B4 balance induced by *Lutzomyia longipalpis* saliva favors *Leishmania infantum* infection. **Parasites & vectors**, v. 7, p. 601, jan. 2014.
- BALKWILL, F. Cancer and the chemokine network. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 7, p. 540–50, jul. 2004.
- BELKAID, Y.; KAMHAWI, S.; MODI, G.; VALENZUELA, J.; NOBEN-TRAUTH, N.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J.; SACKS, D. L. Development of a Natural Model of Cutaneous Leishmaniasis: Powerful Effects of Vector Saliva and Saliva Preexposure on the Long-Term Outcome of *Leishmania major* Infection in the Mouse Ear Dermis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 10, p. 1941–1953, 16 nov. 1998.
- BEZERRA, H. S.; TEIXEIRA, M. J. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 349–51, abr. 2001.
- BOGDAN, C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. May, p. 69, jan. 2012.

BYSTRY, R. S.; ALUVIHARE, V.; WELCH, K. a; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, a G. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. **Nature immunology**, v. 2, n. 12, p. 1126–32, dez. 2001.

CARDOSO, T. M.; MACHADO, Á.; COSTA, D. L.; CARVALHO, L. P.; QUEIROZ, A.; MACHADO, P.; SCOTT, P.; CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O. Protective and pathological functions of CD8⁺ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. **Infection and immunity**, v. 83, n. 3, p. 898–906, mar. 2015.

CARREGARO, V.; COSTA, D. L.; BRODSKYN, C.; BARRAL, A. M.; BARRAL-NETTO, M.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Dual effect of *Lutzomyia longipalpis* saliva on *Leishmania braziliensis* infection is mediated by distinct saliva-induced cellular recruitment into BALB/c mice ear. **BMC microbiology**, v. 13, p. 102, jan. 2013.

CARREGARO, V.; RIBEIRO, J. M.; VALENZUELA, J. G.; SOUZA-JÚNIOR, D. L.; COSTA, D. L.; OLIVEIRA, C. J. F.; SACRAMENTO, L. a; NASCIMENTO, M. S. L.; MILANEZI, C. M.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nucleosides present on phlebotomine saliva induce immunosuppression and promote the infection establishment. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003600, abr. 2015.

CARREGARO, V.; SÁ-NUNES, A.; CUNHA, T. M.; GRESPAN, R.; OLIVEIRA, C. J. F.; LIMA-JUNIOR, D. S.; COSTA, D. L.; VERRI, W. A.; MILANEZI, C. M.; PHAM, V. M.; BRAND, D. D.; VALENZUELA, J. G.; SILVA, J. S.; RIBEIRO, J. M. C.; CUNHA, F. Q. Nucleosides from *Phlebotomus papatasi* salivary gland ameliorate murine collagen-induced arthritis by impairing dendritic cell functions. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 187, n. 8, p. 4347–59, 15 out. 2011.

CARVALHO, A. M.; CRISTAL, J. R.; MUNIZ, A. C.; CARVALHO, L. P.; GOMES, R.; MIRANDA, J. C.; BARRAL, A.; CARVALHO, E. M.; DE OLIVEIRA, C. I. Interleukin 10-Dominant Immune Response and Increased Risk of Cutaneous Leishmaniasis After Natural Exposure to *Lutzomyia intermedia* Sand Flies. **The Journal of infectious diseases**, p. 1–9, 16 jan. 2015.

CERNÁ, P.; MIKES, L.; VOLF, P. Salivary gland hyaluronidase in various species of phlebotomine sand flies (Diptera: psychodidae). **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 12, p. 1691–7, dez. 2002.

COLLIN, N.; GOMES, R.; TEIXEIRA, C.; CHENG, L.; LAUGHINGHOUSE, A.; WARD, J. M.; ELNAIEM, D.-E.; FISCHER, L.; VALENZUELA, J. G.; KAMHAWI, S. Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 5, p. e1000441, maio 2009.

COSTA, D. J.; CLARE, J.; CONCEIC, V.; MIRANDA, C.; TITUS, R. G.; VALENZUELA, J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. *Lutzomyia longipalpis* Salivary Gland Homogenate Impairs Cytokine Production and Costimulatory Molecule Expression on Human Monocytes and Dendritic Cells. v. 72, n. 3, p. 1298–1305, 2004.

DE MOURA, T. R.; OLIVEIRA, F.; CARNEIRO, M. W.; MIRANDA, J. C.; CLARÊNCIO, J.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.; BARRAL, A.; RIBEIRO, J. M. C.; VALENZUELA, J. G.; DE OLIVEIRA, C. I. Functional transcriptomics of wild-caught *Lutzomyia intermedia* salivary glands: identification of a protective salivary protein against *Leishmania braziliensis* infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 5, p. e2242, jan. 2013.

DE MOURA, T. R.; OLIVEIRA, F.; NOVAIS, F. O.; MIRANDA, J. C.; CLARÊNCIO, J.; FOLLADOR, I.; CARVALHO, E. M.; VALENZUELA, J. G.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C. I. Enhanced *Leishmania braziliensis* infection following pre-exposure to sandfly saliva. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 1, n. 2, p. e84, jan. 2007.

DE MOURA, T. R.; OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, G. C.; CARNEIRO, M. W.; FUKUTANI, K. F.; NOVAIS, F. O.; MIRANDA, J. C.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.; BARRAL, A.; DE OLIVEIRA, C. I. Immunity to *Lutzomyia intermedia* saliva modulates the inflammatory environment induced by *Leishmania braziliensis*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 6, p. e712, jan. 2010.

DENNIS, G.; SHERMAN, B. T.; HOSACK, D. A.; YANG, J.; GAO, W.; LANE, H. C.; LEMPICKI, R. A. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. **Genome biology**, v. 4, n. 5, p. P3, jan. 2003.

DILLIES, M.-A.; RAU, A.; AUBERT, J.; HENNEQUET-ANTIER, C.; JEANMOUGIN, M.; SERVANT, N.; KEIME, C.; MAROT, G.; CASTEL, D.; ESTELLE, J.; GUERNEC, G.;

JAGLA, B.; JOUINEAU, L.; LALOË, D.; LE GALL, C.; SCHAEFFER, B.; LE CROM, S.; GUEDJ, M.; JAFFRÉZIC, F. A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. **Briefings in bioinformatics**, v. 14, n. 6, p. 671–83, nov. 2013.

GANGNEUX, J.-P.; POINSIGNON, Y.; DONAGHY, L.; AMIOT, L.; TARTE, K.; MARY, C.; ROBERT-GANGNEUX, F. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity as a potential biomarker of immune suppression during visceral leishmaniasis. **Innate immunity**, v. 19, n. 6, p. 564–8, dez. 2013.

GOMES, R. B.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C. I.; COSTA, J.; MIRANDA, J. C.; CALDAS, A.; VALENZUELA, J. G.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 10, p. 1530–4, 15 nov. 2002.

GOMES, R.; OLIVEIRA, F.; TEIXEIRA, C.; MENESES, C.; GILMORE, D. C.; ELNAIEM, D.-E.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. Immunity to sand fly salivary protein LJM11 modulates host response to vector-transmitted leishmania conferring ulcer-free protection. **The Journal of investigative dermatology**, v. 132, n. 12, p. 2735–43, dez. 2012.

GOMES, R.; TEIXEIRA, C.; TEIXEIRA, M. J.; OLIVEIRA, F.; MENEZES, M. J.; SILVA, C.; DE OLIVEIRA, C. I.; MIRANDA, J. C.; ELNAIEM, D.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G.; BRODSKYN, C. I. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 22, p. 7845–50, 3 jun. 2008.

HASKO, G.; KUHEL, D. G.; NEMETH, Z. H.; MABLEY, J. G.; STACHLEWITZ, R. F.; VIRAG, L.; LOHINAI, Z.; SOUTHAN, G. J.; SALZMAN, a. L.; SZABO, C. Inosine Inhibits Inflammatory Cytokine Production by a Posttranscriptional Mechanism and Protects Against Endotoxin-Induced Shock. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 2, p. 1013–1019, 15 jan. 2000.

KAMHAWI, S.; BELKAID, Y.; MODI, G.; ROWTON, E.; SACKS, D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science (New York, N.Y.)**, v. 290, n. 5495, p. 1351–4, 17 nov. 2000.

KATZ, O.; WAITUMBI, J. N.; ZER, R.; WARBURG, A. Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 62, n. 1, p. 145–50, jan. 2000.

LERNER, E. A.; RIBEIRO, J. M.; NELSON, R. J.; LERNER, M. R. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 17, p. 11234–6, 15 jun. 1991.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

MAKALA, L. H. C.; BABAN, B.; LEMOS, H.; EL-AWADY, A. R.; CHANDLER, P. R.; HOU, D.-Y.; MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. *Leishmania major* attenuates host immunity by stimulating local indoleamine 2,3-dioxygenase expression. **The Journal of infectious diseases**, v. 203, n. 5, p. 715–25, 1 mar. 2011.

MBOW, M. L.; BLEYENBERG, J. A.; HALL, L. R.; TITUS, R. G. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 161, n. 10, p. 5571–7, 15 nov. 1998.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 10, p. 762–74, out. 2004.

MENEZES, M. J.; COSTA, D. J.; CLARÊNCIO, J.; MIRANDA, J. C.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C. I. Immunomodulation of human monocytes following exposure to *Lutzomyia intermedia* saliva. **BMC immunology**, v. 9, p. 12, jan. 2008.

NORSWORTHY, N. B.; SUN, J.; ELNAIEM, D.; LANZARO, G.; SOONG, L. Sand Fly Saliva Enhances *Leishmania amazonensis* Infection by Modulating Interleukin-10 Production. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1240–1247, 20 fev. 2004.

NOVAIS, F. O.; CARVALHO, L. P.; GRAFF, J. W.; BEITING, D. P.; RUTHEL, G.; ROOS, D. S.; BETTS, M. R.; GOLDSCHMIDT, M. H.; WILSON, M. E.; DE OLIVEIRA, C. I.; SCOTT, P. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 7, p. e1003504, jan. 2013.

OLIVEIRA, F.; DE CARVALHO, A. M.; DE OLIVEIRA, C. I. Sand-fly saliva-leishmania-man: the trigger trio. **Frontiers in immunology**, v. 4, n. November, p. 375, jan. 2013.

OLIVEIRA, F.; ROWTON, E.; ASLAN, H.; GOMES, R.; CASTROVINCI, P. A.; ALVARENGA, P. H.; ABDELADHIM, M.; TEIXEIRA, C.; MENESES, C.; KLEEMAN, L. T.; GUIMARÃES-COSTA, A. B.; ROWLAND, T. E.; GILMORE, D.; DOUMBIA, S.; REED, S. G.; LAWYER, P. G.; ANDERSEN, J. F.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. A sand fly salivary protein vaccine shows efficacy against vector-transmitted cutaneous leishmaniasis in nonhuman primates. **Science translational medicine**, v. 7, n. 290, p. 290ra90, 3 jun. 2015.

PRATES, D. B.; ARAÚJO-SANTOS, T.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BORGES, V. M. New Insights on the Inflammatory Role of *Lutzomyia longipalpis* Saliva in Leishmaniasis. **Journal of parasitology research**, v. 2012, p. 643029, jan. 2012.

PRATES, D. B.; ARAÚJO-SANTOS, T.; LUZ, N. F.; ANDRADE, B. B.; FRANÇA-COSTA, J.; AFONSO, L.; CLARÊNCIO, J.; MIRANDA, J. C.; BOZZA, P. T.; DOSREIS, G. A.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M.; BORGES, V. M.; BORGES, V. de M.; BARRAL, A. *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **Journal of leukocyte biology**, v. 90, n. 3, p. 575–82, set. 2011.

RIBEIRO, J. **Vector salivation and parasite transmission**, 1987. .

RIBEIRO, J. M. C.; SCHNEIDER, M.; GUIMARAES, J. A. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. v. 249, p. 243–249, 1995.

RIBEIRO, J. M.; KATZ, O.; PANNELL, L. K.; WAITUMBI, J.; WARBURG, A. Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. **The Journal of experimental biology**, v. 202, n. Pt 11, p. 1551–9, jun. 1999.

ROGERS, K. A.; TITUS, R. G. Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. **Parasite immunology**, v. 25, n. 3, p. 127–34, mar. 2003.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual review of microbiology**, v. 55, p. 453–83, jan. 2001.

SAMUELSON, J.; LERNER, E.; TESH, R.; TITUS, R. A mouse model of *Leishmania braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. **The Journal of experimental medicine**, v. 173, n. 1, p. 49–54, 1 jan. 1991.

SANTOS, C. D. S.; BOAVENTURA, V.; RIBEIRO CARDOSO, C.; TAVARES, N.; LORDELO, M. J.; NORONHA, A.; COSTA, J.; BORGES, V. M.; DE OLIVEIRA, C. I.; VAN WEYENBERGH, J.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C. I. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN γ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. **The Journal of investigative dermatology**, v. 133, n. 6, p. 1533–40, jun. 2013.

SCHNEIDER, B. S.; SOONG, L.; COFFEY, L. L.; STEVENSON, H. L.; MCGEE, C. E.; HIGGS, S. *Aedes aegypti* saliva alters leukocyte recruitment and cytokine signaling by antigen-presenting cells during West Nile virus infection. **PloS one**, v. 5, n. 7, p. e11704, jan. 2010.

SILVA, F.; GOMES, R.; PRATES, D.; MIRANDA, J. C.; ANDRADE, B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 72, n. 1, p. 94–8, jan. 2005.

TAVARES, N. M.; SILVA, R. A.; COSTA, D. J.; PITOMBO, M. A.; FUKUTANI, K. F.; MIRANDA, J. C.; VALENZUELA, J. G.; BARRAL, A.; DE OLIVEIRA, C. I.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C. *Lutzomyia longipalpis* saliva or salivary protein LJM19

protects against *Leishmania braziliensis* and the saliva of its vector, *Lutzomyia intermedia*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 5, p. e1169, jan. 2011.

TEIXEIRA, C.; GOMES, R.; OLIVEIRA, F.; MENESES, C.; GILMORE, D. C.; ELNAIEM, D.-E. a; VALENZUELA, J. G.; KAMHAWI, S. Characterization of the early inflammatory infiltrate at the feeding site of infected sand flies in mice protected from vector-transmitted *Leishmania major* by exposure to uninfected bites. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 4, p. e2781, abr. 2014.

TEIXEIRA, C. R.; TEIXEIRA, M. J.; GOMES, R. B. B.; SANTOS, C. S.; ANDRADE, B. B.; RAFFAELE-NETTO, I.; SILVA, J. S.; GUGLIELMOTTI, a.; MIRANDA, J. C.; BARRAL, a.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* Induces CC Chemokine Ligand 2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression and Macrophage Recruitment. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 12, p. 8346–8353, 8 dez. 2005.

THEODOS, C. M.; RIBEIRO, J. M. C.; TITUS, R. G. Analysis of Enhancing Effect of Sand Fly Saliva on *Leishmania* Infection in Mice. v. 59, n. 5, p. 1592–1598, 1991.

TITUS, R. G.; RIBEIRO, J. M. C. Salivary Gland Lysates from the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* Enhanced *Leishmania* Infectivity. **Science**, v. 239, p. 1306–1308, 1988.

VALENZUELA, J. G.; BELKAID, Y.; GARFIELD, M. K.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; ROWTON, E. D.; SACKS, D. L.; RIBEIRO, J. M. C. Toward a Defined Anti-*Leishmania* Vaccine Targeting Vector Antigens: Characterization of a Protective Salivary Protein. **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 3, p. 331–342, 6 ago. 2001.

ANEXO

Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido

CONSENTIMENTO INFORMADO

Nome do Projeto: “Perfil de transcrição gênica de células humanas estimuladas com a saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu. longipalpis*, vetores das leishmanioses no Brasil.”

Nome do Doador: _____

Nº no Projeto: _____

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA, parecer Nº 986.408.

Convite e Objetivo: Você está sendo convidado a participar de um estudo que tem como objetivo caracterizar o perfil de transcrição gênica de células do sangue humano, após a exposição in vitro à saliva de *Lu. intermedia* ou de *Lu. longipalpis*. Após lhe ser explicado o que contém neste questionário você pode perguntar tudo sobre o estudo a qualquer pessoa da FIOCRUZ, sua família ou amigos, seu médico ou outro profissional de saúde. Caso decida participar do estudo você será solicitado a assinar este formulário de consentimento.

Participação voluntária: Sua participação é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir da participação no estudo a qualquer momento. Sua recusa em participar ou desistir de participar do estudo, não lhe trará consequência alguma.

Procedimentos: Caso você aceite participar do estudo um questionário será feito para saber onde você mora e se você já teve leishmaniose. Se você concordar em retirar sangue para realização dos estudos, 20 ml de sangue serão colhidos (equivalente a três tubos de coleta usual de sangue) por um profissional capacitado, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada, com outros membros da equipe. Embora os resultados obtidos neste estudo sejam publicados, não haverá na apresentação destes resultados meios que possam identificar os participantes.

Análise de riscos e benefícios: A retirada de sangue pode causar dor no local da punção com a agulha e raramente pode ocorrer sangramento ou formação de hematoma. O melhor conhecimento sobre a leishmaniose poderá contribuir no futuro para medidas de controle da doença.

Custos: Você não terá custos ou receberá pagamento por sua participação no estudo.

Esclarecimentos: Caso tenha alguma pergunta não hesite em contatar a pesquisadora, Camila Indiani de Oliveira na FIOCRUZ, através do telefone: 71-3176-2286. Caso você precise informar de qualquer situação anormal que não pode ser resolvida pelo pesquisador, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, pelo telefone (71) 3176-2285.

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. Uma cópia deste consentimento lhe será entregue. Favor assinalar um dos quadros abaixo para indicar se deseja ou não ter as suas amostras de sangue/células armazenado para estudos futuros aprovados sobre leishmaniose.

ACEITO que amostras de meu sangue sejam armazenadas, para estudos futuros aprovados sobre leishmaniose.

Não ACEITO que amostras de meu sangue sejam armazenadas, para estudos futuros aprovados sobre leishmaniose.

Assinatura ou impressão digital do participante, Data/Hora

Nome/Assinatura do pesquisador, Data/Hora

Nome/Assinatura da testemunha, Data/Hora