

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**ANA CLÁUDIA MARETTI MIRA**

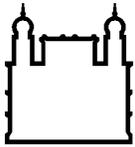
Fatores envolvidos na cronicidade das lesões cutâneas e na progressão da forma cutânea para a forma mucosa tardia da leishmaniose tegumentar americana.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

**Orientadora:** Profa. Dra. Claude Pirmez

**RIO DE JANEIRO**

2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**AUTOR: Ana Cláudia Maretti Mira**

**FATORES ENVOLVIDOS NA CRONICIDADE DAS LESÕES CUTÂNEAS E NA  
PROGRESSÃO DA FORMA CUTÂNEA PARA A FORMA MUCOSA TARDIA DA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.**

**ORIENTADOR (ES): Profa. Dra. Claude Pirmez**

**Aprovada em: 18/03/2011**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Leila Mendonça Lima - Presidente**

**Prof. Dra. Miriam Nacagami Sotto**

**Prof. Dr. Marco Krieger**

**Prof. Dra. Elisa Cupulillo**

**Prof. Dra. Elvira Maria Saraiva Chequer Bou Habib**

Rio de Janeiro, 18 de março de 2011

Dedico esta tese à todos aqueles que encontram  
na pesquisa científica sua motivação de vida.

## AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa concluída! Apesar de meu empenho pessoal, eu sei que não teria condições de chegar aqui sozinha. Seja pelo apoio intelectual, financeiro ou emocional, todos foram muito importantes para mim, pois a pressão de concluir o grau de doutorado é grande.

Meus agradecimentos começam por Deus, por me oferecer tão grandes oportunidades de aprendizado dentro das dificuldades encontradas no caminho. Graças a Ele, consegui manter minha visão ampla e clara e não perder as chances oferecidas a mim.

Minha família desempenhou papel determinante! Minha mãe e irmãos me estimularam constantemente para que eu não desistisse de deixar meu país e minhas raízes para crescer um pouco mais indo para os Estados Unidos. Mami, Clau e Paulo, amo muito vocês três!!! Também agradeço à minha tia Margareti e madrinha Sandra por todo o suporte e apoio.

Obrigada meus queridos amigos Flavinha, Joannita e Josélio pelas horas de lazer. Patty, Rodrigo, Marcia, Kat, Paula, Pat, Cesar, Dani e Amanda, obrigada pelas boas risadas! Aos queridos amigos que fiz no lab da Fiocruz desde que ingressei no grupo em 2000, Marcinha, Rosi, Pat, Tônico, Rejane, Káris e outros tantos que entraram e saíram do lab, muito obrigada por tudo!

Agradeço à minha querida mentora Dra. Claude Pirmez. Apesar da dificuldade de encontrarmos tempo para discutirmos projetos e artigos, agradeço pela oportunidade de ter convivido com você. Muitas coisas eu aprendi apenas te observando. Obrigada pela chance de seguir teus bem sucedidos passos e de ter entrado por novas portas abertas por você.

Agradeço também ao meu novo mentor Dr. Noah Craft pela chance de ter entrado no seu grupo e de poder aprender tanta coisa nova. Obrigada pelo apoio, compreensão e confiança na minha capacidade. Obrigada aos amigos do Craft's Lab, Kevin, Crisel, Jaime, Nathalie e Vera.

Minha ida para os Estados Unidos me rendeu outros queridos amigos. Rosaninha, obrigada pelas palavras de incentivo quanto tudo parecia naufragar! Sammy, minha vida nos EUA teria sido muito mais complicada sem ter você pra cuidar de mim. Obrigada pelas horas de carinho, de conversas, de lágrimas secadas e por fazer minha vida mais feliz.

Finalmente, agradeço à Fiocruz e LABioMed/UCLA pelo apoio financeiro à minha pesquisa e oportunidade de desenvolver minha carreira científica em institutos de tanto prestígio.

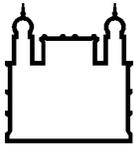
Enfim, obrigada, obrigada e obrigada. Agora, rumo ao pós-doc!!!

“No meio da dificuldade, encontra-se a oportunidade.”

(Albert Einstein)

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. APRESENTAÇÕES CLÍNICAS DE LTA.....	1
1.2. TRATAMENTO, CURA E CRONICIDADE DA LTA .....	2
1.3. PERSISTÊNCIA PARASITÁRIA E DISSEMINAÇÃO DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> .....	9
1.4. RESISTÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA À LEISHMANIOSE.....	10
1.5. JUSTIFICATIVA .....	11
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>15</b>
3.1. SELEÇÃO DOS PACIENTES .....	15
3.2. IMUNOHISTOQUÍMICA .....	17
3.3. ZIMOGRÁFIA <i>IN SITU</i> .....	18
3.4. CULTURA DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> E PURIFICAÇÃO DAS FORMAS METACÍCLICAS .....	18
3.5. CULTURA E INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS.....	19
3.6. ZIMOGRÁFIA CONVENCIONAL.....	20
3.7. WESTERN BLOT .....	20
3.8. IMUNOPRECIPITAÇÃO .....	21
3.9. PCR EM TEMPO REAL .....	21
3.10. <i>MRNA-SEQUENCING</i> (RNA-SEQ).....	23
3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
3.12. ORGANIZAÇÃO DOS GENES EM GRUPOS FUNCIONAIS E EM VIAS METABÓLICAS .....	25
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
4.1. ETAPA 1: AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DAS GELATINASES NA FALHA À RESPOSTA AO TRATAMENTO. 27	
4.2. ETAPA 2: AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE MMP-9 NO DESENVOLVIMENTO DA FORMA MUCOSA DE LTA. 37	
4.3. ETAPA 3: ESTUDOS DO TRANSCRIPTOMA DAS LESÕES CUTÂNEAS PRIMÁRIAS DE LTA. ....	43
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>74</b>
6.1. ETAPA 1: AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DAS GELATINASES NA FALHA À RESPOSTA AO TRATAMENTO. 74	
6.2. ETAPA 2: AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE MMP-9 NO DESENVOLVIMENTO DA FORMA MUCOSA DE LTA. 75	
6.3. ETAPA 3: DETERMINAÇÃO DOS COMPLEXOS GÊNICOS ENVOLVIDOS NA SUSCEPTIBILIDADE À LM. ....	76
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>77</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>105</b>



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

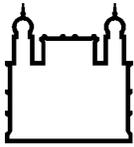
### **FATORES ENVOLVIDOS NA CRONICIDADE DAS LESÕES CUTÂNEAS E NA PROGRESSÃO DA FORMA CUTÂNEA PARA A FORMA MUCOSA TARDIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.**

#### **RESUMO**

#### **TESE DE DOUTORADO**

**Ana Cláudia Maretti Mira**

A forma de apresentação mais comum da leishmaniose tegumentar americana (LTA) é o aparecimento de uma úlcera auto-limitada no local da picada do inseto vetor. Embora estas lesões requeiram até 6 meses para atingirem a cura completa, o tratamento com antimonials pentavalentes pode reduzir significativamente este tempo de cicatrização. Entretanto, a quimioterapia nem sempre apresenta resultados satisfatórios, seja por não resolver a injúria tecidual, seja por permitir a persistência parasitária e desenvolvimento de lesões na mucosa oro-nasal. Desta forma, o presente estudo teve como objetivos principais avaliar fatores envolvidos na cronicidade das lesões cutâneas e na progressão da forma cutânea da leishmaniose para a forma mucosa tardia. A cronicidade de lesões cutâneas de diversas etiologias tem sido relacionada ao desequilíbrio da atividade de algumas metaloproteínases de matriz (MMPs), em especial, das gelatinases MMP-2 e MMP-9. Portanto, decidimos avaliar a participação destas enzimas e de seus moduladores nos danos teciduais causados por LTA. Verificamos que a atividade destas gelatinases atinge extensas áreas das lesões de má resposta, a qual estava associada a um elevado número de células produzindo IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e IL-10, com preponderância da citocina pró-protéolítica IFN- $\gamma$ . O oposto foi observado nas lesões de boa resposta, onde, paralelamente aos baixos níveis de atividade gelatinolítica e prevalência da citocina anti-inflamatória IL-10, pôde-se observar altos níveis de mRNA para MMP-2 e elevados valores da razão MMP-2:TIMP-2. Sugere-se então que o perfil imunológico *in situ* controla o balanço entre MMPs e inibidores, determinando assim, o sucesso ou fracasso da cicatrização. Entretanto, mesmo após a cura clínica, alguns indivíduos progridem para a forma mucosa, fato associado com a disseminação parasitária via células fagocíticas. Considerando a importância de MMP-9 na migração de células imunológicas, decidimos estudar a atividade desta gelatinase em cultura de macrófagos humanos infectados por *Leishmania braziliensis*. Observamos que a infecção por *L. braziliensis* induziu ao aumento de atividade de MMP-9 no sobrenadante das culturas e que os níveis de atividade de MMP-9 são maiores nas culturas de macrófagos de indivíduos que, no passado, desenvolveram a forma mucosa. Estes dados sugerem uma diferença fundamental na imunidade inata do hospedeiro, onde o padrão de ativação de MMP-9 pode ser um indicador de predisposição para o desenvolvimento de leishmaniose mucosa. Além da disseminação parasitária, o sistema imunológico também exerce controle sobre a evolução da forma cutânea para a forma mucosa de LTA. Por isso, a análise do transcriptoma do microambiente da lesão cutânea primária de indivíduos com a forma cutânea localizada e daqueles que desenvolveram a forma mucosa tardia pode auxiliar na compreensão deste quadro. Nossos resultados indicaram uma importante diferença da capacidade de resposta imunológica de ambos grupos, onde o grupo cutâneo mostrou maior eficácia no estabelecimento da resposta imune do tipo T helper 1 (Th1), com participação de células Th2 e forte controle imunotolerigênico.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### FACTORS INVOLVED IN THE CHRONICITY OF CUTANEOUS LESIONS AND IN THE PROGRESSION OF CUTANEOUS FORM TO LATE MUCOSAL FORM OF AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS.

#### ABSTRACT

#### PhD THESIS

**Ana Cláudia Maretti Mira**

The most common clinical presentation of American tegumentary leishmaniasis (ATL) is the development of a self-limited ulcer at the site of the insect vector's bite. Although these lesions require up to 6 months to completely cure, the treatment with pentavalent antimonials can significantly reduce the healing time. Thus, the present study aimed to evaluate the factors involved in the chronicity of cutaneous lesions and in the progression of cutaneous leishmaniasis to late mucosal form. The chronicity of cutaneous lesions from different etiologies has long been associated to an imbalanced activity of matrix metalloproteinases, especially gelatinases MMP-2 and MMP-9. Therefore, we decided to evaluate the participation of these enzymes and their modulators in the tissue damage caused by ATL. We verified that the gelatinase activity was widespread in the lesions from poor responders, and associated to high rates of cells producing IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  and IL-10, with preponderance of the pro-proteolytic cytokine IFN- $\gamma$ . The opposite was observed in lesions from good responders, where, in parallel to the low levels of gelatinase activity and the prevalence of the anti-inflammatory cytokine IL-10, we observed high levels of MMP-2 mRNA and high MMP-2:TIMP-2 ratios. This suggests that the *in situ* immunological profile controls the balance between MMPs and inhibitors, thus determining the healing success or failure. Nevertheless, even after clinical cure, some individuals progress to mucosal forms, a fact associated to parasite dissemination via phagocytic cells. Considering the importance of MMP-9 in the migration of immunological cells, we decided to study this gelatinase activity in human macrophage cultures infected with *Leishmania braziliensis*. We observed that *L. braziliensis* infection induced the increase of MMP-9 activity in culture supernatants and that the level of MMP-9 activity was higher in cultures from individuals that, in the past, had developed the mucosal form. These data suggest a fundamental difference in the innate immunity of the host, where the MMP-9 activation pattern may be an indicator for the predisposition of mucosal leishmaniasis development. Besides parasite dissemination, the immunological system also controls the evolution from cutaneous to mucosal form in ATL. Therefore, the transcriptome analysis of the primary cutaneous lesion microenvironment from individuals that had localized cutaneous leishmaniasis and from those who developed the late mucosal form can help to understand this state. Our results indicated an important difference in the immune capacity from both groups, where the cutaneous group showed better efficacy in establishing a type 1 (Th1) immune response, with participation of Th2 cells and a strong immune-tolerigenic control.

# 1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose representa um conjunto de doenças antropozoonóticas causadas por diversas espécies de tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*. As formas clínicas resultantes da infecção dependem de variáveis como a espécie do parasita, os hábitos do vetor e a resposta imune do hospedeiro (Da-Cruz e Pirmez, 2005). Além disso, o meio ambiente em que os indivíduos acometidos vivem e seu estado nutricional também são fatores de destaque no desenvolvimento da doença (Chandra, 1997; Machado-Coelho *et al.*, 2005).

A infecção está presente em 88 países tropicais e subtropicais. No Brasil, a leishmaniose pode ser classificada em duas categorias principais: leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA). A primeira é causada por qualquer uma das espécies de *Leishmania* dermatotrópicas, produzindo lesões cutâneas no local da picada do inseto, em geral ulcerosas (Convit *et al.*, 1993). Tais lesões podem curar-se espontaneamente, deixando em seu lugar uma cicatriz, ou originar lesões secundárias na mucosa oro-nasal. Já as espécies causadoras da LVA têm acentuado tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM) do baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides, gerando uma síndrome febril com caquexia, dores abdominais, hepatoesplenomegalia e anemia, tornando-se fatal caso não haja tratamento ou caso este não seja adequado (Chagas, 1936).

## 1.1. Apresentações Clínicas de LTA

No local a picada do inseto vetor, após um período que varia de 18 dias a 4 meses, pode haver o aparecimento de uma pequena lesão na pele, o que caracteriza a **leishmaniose cutânea localizada** (LCL) (Marzochi, 1992). Esta é a forma mais comum e menos grave da doença e pode ocorrer como lesão única ou múltipla, na mesma região da picada do vetor. Estas úlceras, em geral, são bem características, apresentando bordas elevadas e regulares de fundo granulomatoso, sendo também indolores e tendendo à cura de forma espontânea ou após tratamento adequado (Ministério da Saúde, 2006). Já a **leishmaniose cutânea disseminada** (LDiss) é uma forma mais rara observada em até 2% das infecções e se caracteriza por apresentar lesões cutâneas secundárias e distantes do local das picadas (Ministério da Saúde, 2007). A disseminação ocorre pela migração de células infectadas com *Leishmania* para outras regiões por via linfática ou hematogênica (Almeida *et al.*, 1996). As lesões resultantes geralmente são pequenas e ulceradas e costumam responder bem ao tratamento (Ministério da Saúde, 2006). No

Brasil, ambas as formas citadas são causadas principalmente por infecções com *Leishmania braziliensis* (Costa *et al.*, 1986; Oliveira-Neto *et al.*, 2000; Turetz *et al.*, 2002; Vieira-Goncalves *et al.*, 2008).

Outra manifestação cutânea da doença ocorre através da aparição de múltiplas lesões nodulares, caracterizando a **leishmaniose cutânea difusa** (LCD). Esta é uma forma mais rara, que se apresenta com múltiplos nódulos ou placas cutâneas, não-ulceradas, que se assemelha às lesões causadas na hanseníase lepromatosa, sendo ricas em parasitas e muito difíceis de curar. Esta forma clínica é associada à anergia específica aos antígenos de *Leishmania* e, no Brasil, é causada por infecções com *Leishmania amazonensis* (Convit *et al.*, 1972; Shaw e Lainson, 1975).

A **leishmaniose mucosa** (LM), por sua vez, é também considerada como uma consequência pouco freqüente da leishmaniose cutânea, uma vez que ocorre em 3% a 5% dos indivíduos infectados (Marsden, 1986). Geralmente ocorre meses ou anos depois da cicatrização da lesão cutânea primária (Walton *et al.*, 1973). A LM é produzida pela disseminação hematogênica de células infectadas com *L. braziliensis*, gerando ulcerações progressivas e desfigurantes na mucosa nasal e orofaríngea, palato, lábios, língua, laringe e, mais raramente, traquéia e árvore respiratória superior (Oliveira-Neto *et al.*, 2000; Ministério da Saúde, 2006). Entretanto, outras espécies de *Leishmania* como *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. peruviana* também podem causar infecção das mucosas por contiguidade (Marzochi *et al.*, 1999). O aparecimento de lesões na região mucosa concomitantes ao aparecimento das lesões cutâneas primárias caracteriza a **leishmaniose muco-cutânea** (LMC).

## 1.2. Tratamento, cura e cronicidade da LTA

Embora os casos cutâneos de LTA tendam à cura espontânea, mesmo que lentamente, a quimioterapia é a principal estratégia para o controle da doença (Costa *et al.*, 1987). Os antimoniais pentavalentes (Sb<sup>V</sup>) são as drogas de primeira escolha no tratamento da LTA desde a década de 40 e podem ser encontradas em duas formulações: antimoniato N-metil-glucamina (antimoniato de meglumina) e estibogluconato de sódio. O Ministério da Saúde distribui gratuitamente o antimoniato N-metil-glucamina (Glucantime<sup>®</sup>) na rede pública de saúde. Devido ao potencial de toxicidade cardíaca, hepática, pancreática e renal, este medicamento deve ser ministrado com cautela e sob monitorização clínica e laboratorial. O tratamento dura em média

20-30 dias. Em pacientes com nefropatias ou em gestantes, a droga de primeira escolha é a anfotericina B (Ministério da Saúde, 2006).

A quimioterapia nem sempre apresenta resultados satisfatórios. No Brasil, de 16% a 50% dos pacientes com a forma cutânea de LTA tratados com Sb<sup>V</sup> não atingem a cura clínica (Oliveira-Neto *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 2001). Muitos dos pacientes com lesão mucosa são refratários ao tratamento com Sb<sup>V</sup>, exigindo diversas séries de tratamento e, além disso, entre 22% e 50% dos pacientes reativam as lesões depois de terminado o tratamento (Zajtchuk *et al.*, 1989; Romero *et al.*, 1998; Amato *et al.*, 2009). Nos casos de falha terapêutica, o mais indicado é estender o tratamento por até 30 dias e caso a cura clínica não seja obtida, a anfotericina B passa a ser a droga de escolha (Rocha *et al.*, 1980; Marsden *et al.*, 1998).

Embora o mecanismo de atuação do Sb<sup>V</sup> não seja totalmente conhecido, sabe-se que esta droga inibe as vias glicolíticas e de oxidação dos ácidos graxos da forma amastigota da *Leishmania* (Croft *et al.*, 2006). Alguns autores propõem que a sensibilidade do parasita à Sb<sup>V</sup> varia de acordo com o programa de tratamento aplicado. Por um lado, sabe-se que o tratamento irregular ou parcial aumenta o risco de desenvolvimento da forma mucosa (Marsden *et al.*, 1998). Por outro, há indicações de que a interrupção prematura do tratamento ou protocolo utilizando baixas doses da droga poderia resultar na seleção dos parasitas mais resistentes e, conseqüentemente, na falha terapêutica (Grogl *et al.*, 1992). Além disso, alguns autores defendem que a falha do tratamento decorre da infecção por cepas mais refratárias à atividade de Sb<sup>V</sup> (da Luz *et al.*, 2009).

Além de fatores ligados ao parasita propriamente, relatos indicam diversas comorbidades como fatores coadjuvantes na má resposta às leishmanioses, uma vez que a integridade do estado imunológico do hospedeiro tem grande importância para a eficácia da atividade de Sb<sup>V</sup>. Em leishmaniose tegumentar, dados clínicos indicam que a desnutrição aumenta as chances de desenvolvimento de leishmaniose mucosa em até quatro vezes, embora pareça não influenciar a susceptibilidade à forma cutânea da doença (Weigel *et al.*, 1995; Machado-Coelho *et al.*, 2005). Em leishmaniose visceral, a desnutrição e o etilismos estão frequentemente correlacionadas à mortalidade. Diabetes, hipertensão arterial e insuficiência renal crônica também podem contribuir para o resultado obtido com o tratamento usando antimoniais (Oliveira *et al.*, 2010). Alguns autores demonstraram que a atividade de Sb<sup>V</sup> é dependente da resposta mediada por células T no hospedeiro (Murray *et al.*, 1993). Em modelo murino de leishmaniose visceral, foi observado que a deficiência das respostas mediadas tanto por células T *helper* 1 (Th1) quanto por macrófagos estão correlacionadas à falha do tratamento

com Sb<sup>v</sup> (Murray *et al.*, 1989). Dessa forma, a indução de uma resposta imunológica adequada levaria à cura da leishmaniose, tendo a imunidade celular papel crítico no controle da infecção por *Leishmania* (Carvalho *et al.*, 1985; Mendonca *et al.*, 1986).

Em modelos murinos de leishmaniose causada por *L. major*, a cura e a cronicidade da infecção são determinadas pela funcionalidade de diferentes sub-populações de linfócitos T (Reiner e Locksley, 1995; Gummy *et al.*, 2004). Postula-se que a predominância da resposta Th1 com produção de interleucina-12 (IL-12), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) resultam no controle da infecção em camundongos C57BL/6. Já a predominância da resposta Th2 permite a progressão da doença, como observado em camundongos BALB/c (Alexander e Bryson, 2005).

Todavia, esta dicotomia da resposta imunológica não se correlaciona com a cura ou a cronicidade das leishmanioses causadas por espécies do Novo Mundo. Alguns autores mostraram que macrófagos de camundongos C57BL/6 estimulados com IFN- $\gamma$  e infectados por amastigotas de *L. amazonensis* mostram exarcebação da infecção (Qi *et al.*, 2004). Por outro lado, a infecção de *L. braziliensis* em camundongos só é bem sucedida em animais IL-12<sup>-/-</sup> ou STATA4<sup>-/-</sup> (sinal transdutor e ativador de sinal 4) (Rocha *et al.*, 2007).

Os efeitos da polarização da resposta imunológica em leishmaniose humana ainda são pouco conhecidos. Alguns autores propõem que a cura clínica da LTA estaria associada mais à uma diminuição da resposta Th2 do que a um aumento da resposta Th1 (Badaro *et al.*, 2006). Uma das mais importantes funções efetoras da resposta mediada por linfócitos T é a ativação de macrófagos (Bertho *et al.*, 2000). Assim, os linfócitos Th1 que são atraídos ao sítio de infecção seriam as fontes secundárias de IFN- $\gamma$  nas lesões, o que estimularia os macrófagos infectados a produzirem óxido nítrico (NO) e controlarem a infecção (Brandonisio *et al.*, 2001; Da Cruz *et al.*, 2010). Além dos macrófagos, a atividade citotóxica *in situ* de células T CD8<sup>+</sup> também tem sido relatada como importante para o controle parasitário (Muller *et al.*, 1994; Maasho *et al.*, 1998).

A combinação de citocinas produzidas no microambiente da lesão também influencia o curso da infecção. Lesões cutâneas de cura espontânea ou auto-limitadas apresentam resposta imunológica Th1 característica, com produção de citocinas deste perfil, como IL-12 e IFN- $\gamma$  (Pirmez, 1992). IL-12 é produzido por macrófagos logo no início da infecção e induz linfócitos Th1 e células *natural killers* (NK) a produzirem IFN- $\gamma$ . Atuando sinergicamente com TNF- $\alpha$ , esta citocina estimula os macrófagos infectados a expressarem iNOS e, conseqüentemente, a

produzir NO (Liew *et al.*, 1990; Trinchieri e Gerosa, 1996; Liew *et al.*, 1997; Bogdan *et al.*, 2000). Entretanto, alguns autores demonstraram, recentemente, que lesões que não respondem ao tratamento com Sb<sup>v</sup> são resultantes da infecção por cepas de *L. braziliensis* resistentes à ação de NO (Souza *et al.*, 2010). Todavia, a persistência da infecção também pode ser favorecida pela atuação de algumas citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 e TGF- $\beta$ , o que resultaria na não resolução das lesões cutâneas (Barral-Netto *et al.*, 1992; Kane e Mosser, 2001). Estes achados mostram que, para a obtenção da cura, é necessário considerar tanto a susceptibilidade do parasita quanto uma resposta imunológica eficiente do hospedeiro.

A cronicidade das lesões de LTA também tem sido correlacionada com vários outros fatores imunológicos. Alguns autores já mostraram que não são apenas os linfócitos T específicos aos antígenos de *L. braziliensis* que participam da resposta inflamatória/imunológica de LTA. As lesões cutâneas crônicas apresentam maior número de células de memória específicas a outros antígenos como importantes componentes do infiltrado inflamatório (Diaz *et al.*, 2002; Da Cruz *et al.*, 2010). Este fato fortemente sugere que, uma vez estabelecida a injúria pela presença inicial da *L. braziliensis*, a manutenção do processo inflamatório não é somente uma consequência da resposta imune específica contra *Leishmania*. Além disso, a proporção de células imune não-específicas contra antígenos de *Leishmania* podem explicar a resposta imunológica aberrante, com produção de diversos tipos de citocinas nestas lesões. A desregulação da apoptose de células T também têm sido relacionada com a falha na resolução das lesões cutâneas, uma vez que permite a manutenção do já aumentado número destas células no infiltrado inflamatório (Orteu *et al.*, 1998).

A cronicidade das lesões cutâneas de LTA igualmente resultaria da deficiência da participação da epiderme na resposta imunológica. As células de Langerhans e queratinócitos são importantes por proverem sinais acessórios para o direcionamento migratório apropriado de células ativadas pelo antígeno de *Leishmania*, e é possível observar nos infiltrados destas lesões um maior número de células T ativadas (CD69<sup>+</sup>) comparado com o número de células de Langerhans (CD83<sup>+</sup>) (Diaz *et al.*, 2002).

### **1.2.1. Regeneração tecidual e Metaloproteinases de Matriz**

A resolução de úlceras é um processo que depende de uma seqüência de eventos. Dentre eles, os mais importantes são: finalização da coagulação e da inflamação, remoção dos componentes do agente lesivo e da matriz danificada, proliferação e migração celular,

angiogênese, síntese e deposição de matriz, epitelização, contração da ferida, regeneração e reparo tecidual (Martin, 1997). Para que haja a recuperação do tecido lesado com as mesmas células parenquimais e com os elementos da matriz original, é necessário um intenso processo de degradação e re-síntese da MEC, eventos estes facilitados pela participação de um grupo de enzimas proteolíticas conhecidas como metaloproteinases de matriz (Stadelmann *et al.*, 1998).

As metaloproteinases de matriz (MMP) são representadas por uma família de mais de 20 endopeptidases ativas em pH neutro e dependentes de  $Zn^{+2}$  e  $Ca^{+2}$ , que constituem a maior classe de enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular (MEC) em processos fisiológicos normais e patológicos (Woessner, Jr., 1994; Nagase e Woessner, Jr., 1999; Illman *et al.*, 2008). Todos os membros da família são secretados como zimógenos (pró-MMPs) sendo ativados por clivagem proteolítica (Murphy *et al.*, 1994). Estas proteases são produzidas em resposta a estímulos específicos por células residentes do tecido conjuntivo, bem como pela maioria dos tipos de células inflamatórias que invadem o tecido durante o remodelamento tecidual, incluindo linfócitos e granulócitos, mas em particular por macrófagos ativados (Birkedal-Hansen, 1993; Goetzl *et al.*, 1996).

Este grupo de enzimas pode degradar praticamente todos os componentes da MEC. Por isso, seus membros podem ser classificados de acordo com os substratos pelos quais têm preferência e por suas similaridades estruturais em diversas subfamílias, como colagenases, gelatinases, matrilisinas e estromelisinases. Além dos componentes de MEC, os substratos incluem outras proteases, fatores de crescimento e citocinas, para as quais as MMPs funcionam como ativadores (Sternlicht e Werb, 2001).

As MMPs não estão apenas envolvidas com o remodelamento gerado pela degradação dos componentes da MEC. Elas também participam da progressão de processos inflamatórios (Ito *et al.*, 1996; Korpos *et al.*, 2009) e proliferação celular (Whitelock *et al.*, 1996; Imai *et al.*, 1997). Além disso, essa família de enzimas é importante para a homeostase tecidual, uma vez que atua no equilíbrio entre crescimento celular e apoptose (Kayagaki *et al.*, 1995; Alexander *et al.*, 1996).

A atividade das MMPs pode ser regulada em diferentes níveis, que vão desde o controle transcricional dos genes das MMPs até a interação física destas enzimas com inibidores específicos (Toriseva e Kahari, 2009). A transcrição dos genes de MMP pode sofrer controle através de sinais extracelulares que são gerados via receptores celulares para fatores de crescimento ou citocinas, via integrinas, ou ainda, por alterações nas junções celulares mediadas por caderinas (Yan e Boyd, 2007). A ativação destas enzimas ocorre primariamente na

superfície celular ou no espaço extracelular e é controlada por um balanço entre ativação e inibição dos zimógenos. Estes inibidores podem ser endógenos, como a  $\alpha_2$ -macroglobulina, ou podem ser inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz (TIMPs) (Nagase *et al.*, 1991; Grinnell *et al.*, 1998).

TIMPs são considerados os controladores principais da ativação e atividade de MMPs. Atualmente, apenas 4 membros são conhecidos em vertebrados, sendo produzidos por uma variedade de tipos celulares (Brew e Nagase, 2010). Estes inibidores participam de vários eventos biológicos incluindo a modulação da proliferação celular, invasão e migração celular, anti-angiogênese, anti- e pró-apoptose e plasticidade sináptica. Entretanto, sua atividade não surge exatamente pela inibição que estas proteínas exercem sobre a atuação das MMPs. Estes inibidores podem interagir diretamente com receptores celulares, resultando em eventos que não podem ser reproduzidos através da utilização de inibidores sintéticos das MMPs (Stetler-Stevenson, 2008).

Além dos TIMPs, sabe-se que algumas citocinas presentes no local também podem atuar no controle da produção e ativação das MMPs, de forma direta ou indireta, porém, importante (Han *et al.*, 2001; Galboiz *et al.*, 2002; Abraham *et al.*, 2005).

Portanto, a atividade normal das MMPs é dependente do equilíbrio entre a produção e a ativação das MMPs, produção de TIMPs e interação com outros fatores existentes no meio extracelular. O desequilíbrio com um peso maior nas MMPs pode levar a uma intensa destruição tecidual (úlceras crônicas e artrite reumatóide, por exemplo), bem como à invasão de células tumorais e metástase (Kahari e Saarialho-Kere, 1997). Entretanto, quando a expressão do inibidor excede a da enzima, a síntese da matriz é favorecida, o que pode resultar em processo fibrótico (Baker e Leaper, 2000).

Desde os anos 1990, vários estudos demonstraram a importância da participação das MMPs na resolução de úlceras, em especial a subfamília das gelatinases, uma vez que estas podem ser detectadas tanto no fluido de úlceras recentes como de úlceras crônicas. Entretanto, os níveis protéicos e de atividade das gelatinases são maiores nas lesões com problemas de resolução (Wysocki *et al.*, 1993).

#### **1.2.1.1. Gelatinases**

A subfamília das gelatinases é constituída por apenas dois membros: MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (gelatinase B). A MMP-2 é uma enzima de 72-kDa, sintetizada por vários tipos

celulares, como fibroblastos da derme, células endoteliais e osteoblastos (Kalebic *et al.*, 1983; Rifas *et al.*, 1989; Beranger *et al.*, 1994). Por sua vez, a MMP-9 (92-kDa) é principalmente secretada por leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e mastócitos (Mainardi *et al.*, 1984; Hibbs *et al.*, 1985; Kanbe *et al.*, 1999).

O processo de ativação da pró-MMP-2 ocorre via um mecanismo de duas etapas associado à membrana e envolve a participação de TIMP-2 e MT1-MMP (Will *et al.*, 1996; Okada *et al.*, 1997; Nagase, 1998; Hernandez-Barrantes *et al.*, 2000). Serino-proteases presentes no sítio inflamatório, tais como o sistema PA/plasmina e proteases tipo tripsina podem participar da ativação de MMP-2 em vias alternativas (Baramova *et al.*, 1997; Sorsa *et al.*, 1997). Uma vez ativada, MMP-2 é capaz de clivar seus substratos localizados na MEC, além de ativar outras MMPs.

A ativação da pró-MMP-9 ocorre no meio extracelular e depende da atividade de outras proteases, incluindo MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-13 e MMP-26 (Fridman *et al.*, 1995; Knauper *et al.*, 1997; von Bredow *et al.*, 1998; Ramos-DeSimone *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2003).

As gelatinases são descritas como importantes no processo de regeneração tecidual. O fracasso da resolução e conseqüente cronificação de úlceras cutâneas vêm sendo correlacionados com altos níveis de atividade destas duas gelatinases (Wysocki *et al.*, 1993; Weckroth *et al.*, 1996). MMP-2 seria a mais importante durante um processo mais prolongado de reparo tecidual, enquanto MMP-9 atuaria na fase inicial deste processo, sendo ambas, porém, necessárias para o sucesso da reepitelização (Agren, 1994; Agren, 1999).

De acordo com vários autores, a atividade das gelatinases durante a regeneração tecidual seria mais evidente na migração celular, uma vez que estas enzimas degradam substratos do estroma e da membrana basal (Nagase *et al.*, 1991; Aimes e Quigley, 1995; Giannelli *et al.*, 1997; Karelina *et al.*, 2000). Estudos *in vitro* mostram a presença pontual de MMP-2 em estruturas de contato entre a membrana celular de queratinócitos humanos em migração e a matriz extracelular da derme que está sendo invadida. Por outro lado, MMP-9 foi localizada difusamente ao longo das membranas celulares destes queratinócitos, estando eles em processo migratório ou não (Makela *et al.*, 1999). Desta forma, a atividade das gelatinases ligadas às superfícies celulares promoveria o desligamento dos queratinócitos da membrana basal e a locomoção celular pela matriz da região lesionada promovendo a reepitelização e cicatrização (Salo *et al.*, 1994). Adicionalmente, as gelatinases têm se destacado nos eventos migratórios e transmigratórios de leucócitos durante a resposta inflamatória (Reichel *et al.*, 2008).

### 1.3. Persistência parasitária e disseminação de *L. braziliensis*

Após a recuperação natural ou deliberada da infecção causada por *Leishmania*, um pequeno número de parasitas viáveis pode persistir nos sítios de infecção primária ou linfonodos drenantes para que haja a persistência da resposta imunológica do hospedeiro (Schubach *et al.*, 1998; Okwor e Uzonna, 2008).

A persistência da infecção por *L. braziliensis* após a cura clínica das lesões tem sido explorada por alguns autores (de Rossell *et al.*, 1992; Aebischer, 1994). Essa persistência pode ser demonstrada através da reativação espontânea de lesões cutâneas (Weigle *et al.*, 1985), do desenvolvimento de lesões em pacientes imunocomprometidos (Coura *et al.*, 1987), pela transmissão da doença através de órgãos transplantados (Golino *et al.*, 1992), ou ainda pela presença de kDNA de *Leishmania* no sangue de indivíduos curados (de Oliveira *et al.*, 2006).

A cariotipagem e análises do zimodema podem ser usadas para que seja determinada a cepa responsável pela primeira infecção. Assim, seria possível fazer a distinção entre lesões resultantes de re-infecção das causadas pela persistência do parasita. Foi demonstrado que cerca de 50% dos indivíduos infectados por *L. braziliensis* teriam algum tipo de recidivação depois da cura clínica atingida (Saravia *et al.*, 1990). Outros autores contestam esses números, argumentando que as re-infecções poderiam ocorrer com a mesma cepa do parasita (Okwor e Uzonna, 2008).

A consequência mais importante da persistência pela infecção por *L. braziliensis* é o aparecimento de lesões na região oro-nasal de indivíduos com história prévia de LCL. Alguns autores acreditam que a disseminação de células parasitadas do sítio primário de infecção ocorreria tanto por via linfática como hematogênica e seria um evento relativamente comum em infecções causadas por *L. braziliensis* (Martinez *et al.*, 1992; Bertho *et al.*, 1994). Dessa forma, o desenvolvimento da LDiss e da LM seriam a consequência desse processo.

Estudos realizados em hamsters mostram a fase inicial da metástase de células infectadas a partir de capilares profundos da pele, em regiões de tecido hiperplásico apresentando reação inflamatória intensa e com numerosas células infectadas por *L. braziliensis* (Almeida *et al.*, 1996). Outro indício de metastatização de *L. braziliensis* é a detecção do kDNA do parasita por reação de polimerase em cadeia (PCR) no sangue de pacientes na fase ativa da doença, seja nas fomas cutânea ou mucosa de LTA, assim como em indivíduos curados. Esta detecção também é possível em indivíduos moradores de áreas endêmicas que não apresentam história prévia de LTA (de Oliveira *et al.*, 2006). Além disso, alguns autores já demonstraram a presença de

kDNA de *Leishmania* na mucosa oro-nasal de indivíduos apresentando lesões cutâneas ativas, porém sem nenhum tipo de manifestação da doença no tecido mucoso (Figueroa *et al.*, 2009).

#### **1.4. Resistência e susceptibilidade genética à Leishmaniose**

Fatores genéticos do hospedeiro ligados à resistência ou susceptibilidade à infecção por *Leishmania* têm sido explorados por quase 50 anos (Bradley, 1974). Vários genes e complexos gênicos que influenciam o fenótipo da doença têm sido descritos. Porém, os fatores determinantes da cura ou cronicidade das lesões cutâneas e do desenvolvimento da forma mucosa da LTA, ainda são pouco conhecidos.

Na leishmaniose cutânea causada por *L. major*, alguns autores mostraram que camundongos geneticamente resistentes (C57BL/6) mas deficientes para a proteína adaptadora MyD88 (comum para sinalização de Toll like receptor (TLR) e IL-1R), tornam-se susceptíveis à infecção por *L. major*, pois desenvolvem resposta imune polarizada do tipo Th2 (Muraille *et al.*, 2003). Outros estudos em modelo murino mostram que a resistência à infecção por *L. major* está diretamente ligada à capacidade de cicatrização de lesões não-infecciosas (Sakthianandeswaren *et al.*, 2005). Recentemente, este mesmo grupo correlacionou a expressão do gene *Fli1* com a resistência e a susceptibilidade de camundongos à infecção por *L. major*. Estes autores demonstraram que camundongos C57BL/6, comparados aos BALB/c, apresentam expressão significativamente aumentada deste gene mesmo antes de serem expostos à *L. major* (Sakthianandeswaren *et al.*, 2010).

Estudos sobre LTA desenvolvidos em humanos correlacionam o polimorfismo dos genes CXCR1 (IL-8RA) e SLC11A1 (proteína associada à resistência natural de macrófagos-1) com a susceptibilidade à infecção por *L. braziliensis* (Castellucci *et al.*, 2010). Outros autores correlacionam a susceptibilidade ao desenvolvimento de LM às diferenças individuais na expressão de HLA classe II (Petzl-Erler *et al.*, 1991).

##### **1.4.1. Estudo do transcriptoma na compreensão de doenças**

O transcriptoma é o conjunto completo (tipo e quantidade) dos transcritos produzidos por uma célula, tecido ou organismo. O uso dessa abordagem é importante para interpretar os elementos funcionais do genoma, para revelar os constituintes moleculares das células e dos

tecidos e também para entender o desenvolvimento dos organismos sob condições normais ou patológicas.

Até recentemente, poucas técnicas para o estudo do transcriptoma estavam disponíveis. As metodologias mais aplicadas eram os ensaios de microarranjos baseados na hibridização e o sequenciamento tipo Sanger. Entretanto, ambas as técnicas oferecem desvantagens. Os ensaios de microarranjo analisam a abundância de transcritos de forma indireta, uma vez que baseia os resultados na intensidade de hibridização e não na medição do número de transcritos. Desta forma, torna-se necessário a utilização de outras técnicas para a validação e quantificação destes transcritos para uma avaliação acurada da expressão gênica. Por outro lado, o sequenciamento tipo Sanger apresenta altos custos e, por isso, pouca cobertura do genoma, o que torna o método ineficiente para explorar o transcriptoma de organismos multicelulares (Morozova *et al.*, 2009).

Com a finalização dos projetos “Genoma” tanto do ser humano quanto de outros organismos de grande relevância biomédica, foi possível o desenvolvimento de um conjunto de técnicas de sequenciamento *high-throughput* classificadas como *Sequenciamento da Próxima Geração (Next Generation Sequencing – NGS)*, as quais apresentam uma relação custo-benefício melhor do que o sequenciamento de Sanger. Dentre as metodologias de NGS, encontra-se a técnica de *RNA-sequencing (RNA-seq)*, a qual tem possibilitado estudos mais profundos e completos do transcriptoma de diversos organismos. Esta técnica, possibilita a qualificação e quantificação da expressão gênica na mesma amostra, e a identificação de diferentes isoformas de um gene (Mortazavi *et al.*, 2008; Levin *et al.*, 2009).

A técnica de RNA-seq tem possibilitado a melhor compreensão de diferentes e complexos quadros patológicos, como câncer e doenças neurodegenerativas, uma vez que desvenda a assinatura padrão da expressão gênica destes mecanismos degenerativos e assim, indica novas direções para intervenções terapêuticas (Ding *et al.*, 2010; Courtney *et al.*, 2010).

## **1.5. Justificativa**

As lesões cutâneas de LTA têm como característica comum sua tendência à cronicidade. Quando submetidas a tratamento adequado, essas lesões podem evoluir rapidamente para a cura, mas nem todos os indivíduos reagem da mesma forma quanto à terapia, o que resulta na falha do processo de cicatrização e reativação das lesões em alguns casos. Os mecanismos patológicos que levam estas úlceras cutâneas à recidivação, mesmo depois de concluído o tratamento, são pouco detalhados na literatura e, em geral, estão envolvidos com a persistência parasitária que

leva à exarcebação da resposta imunológica. As falhas no processo de cicatrização de outros tipos de úlceras cutâneas de origem infecciosa ou não, têm sido correlacionadas à intensa atividade de MMPs, em especial, das gelatinases. Também pode ser observado na literatura, que citocinas podem influenciar a expressão e ativação das gelatinases e que estas enzimas podem ser produzidas por células da resposta imune. Reconhecendo a capacidade destrutiva da atividade das gelatinases, torna-se importante estudar como estas enzimas interferem no processo de cicatrização das lesões de LTA e se, por sua vez, a atividade observada segue um padrão correlacionado a resposta ao tratamento que o paciente apresentará. Além disso, considerando-se que a resposta à terapia depende do perfil imunológico apresentado pelo indivíduo, a importância deste estudo se estende à determinação de quais fatores ligados à resposta imunológica influenciariam a atividade das gelatinases e resultariam na falha da cicatrização das lesões cutâneas.

Mesmo após serem submetidos à terapia e terem alcançado a cura clínica, alguns indivíduos desenvolvem a forma mucosa da LTA. Sabe-se que a persistência parasitária e a disseminação do parasita pode ser um processo comum nas infecções causadas pela *L. braziliensis*. Alguns autores já mostraram que os macrófagos podem ser o veículo celular de transporte de *Leishmania* para diferentes pontos anatômicos. Enquanto os mecanismos de escape do sítio primário de infecção são pouco explorados, os estudos das alterações que a infecção causa aos macrófagos encontram-se em franca expansão. Além das quimiocinas e integrinas, as gelatinases, em especial MMP-9, têm sido envolvidas no processo migratório de vários tipos celulares e são tidas como importantes no processo de transmigração de leucócitos para os sítios de infecção e para o efluxo destas células a partir destes locais. Portanto, conhecer quais as alterações na expressão e atividade da MMP-9 em macrófagos humanos infectados por *L. braziliensis* pode auxiliar na compreensão das modificações do comportamento migratório destas células quando infectadas e no entendimento da participação da MMP-9 na patogênese da leishmaniose muco-cutânea.

Contudo, o conhecimento dos fatores inerentes ao hospedeiro que podem contribuir para a resistência ou susceptibilidade à infecção por *L. braziliensis*, cura ou cronicidade das lesões, bem como para o desenvolvimento da forma mucosa da LTA, ainda é muito limitado. Recentemente, a técnica *ultra high-throughput* para sequenciamento conhecida como *RNA-seq* tem oferecido mais atrativos do que a técnica de microarranjo para investigação em larga escala da expressão gênica. A habilidade desse ensaio de analisar simultaneamente milhares de transcritos qualitativa e quantitativamente, tem possibilitado importante progresso no estudo de

diversas doenças. A aplicação dessa técnica no estudo da LTA pode ser de extrema importância para o melhor entendimento dos fatores genéticos do hospedeiro que determinam a resolução da doença e a persistência parasitária com o agravamento da leishmaniose. Através do uso das lesões cutâneas primárias de pacientes LCL e de pacientes que evoluíram para LM, o microambiente destas lesões poderá ser profundamente detalhado e, desta forma, será possível determinar quais vias metabólicas estão envolvidas na susceptibilidade à LM.

## 2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos principais avaliar fatores envolvidos na cronicidade das lesões cutâneas e na progressão da forma cutânea da leishmaniose para a forma mucosa tardia.

Mais especificamente, propomos:

1. Correlacionar a falha terapêutica das lesões cutâneas com a atividade de gelatinases através da análise *in situ* da expressão, produção e atividade das gelatinases MMP-2 e MMP-9.
2. Avaliar a presença dos inibidores naturais de MMPs TIMP-1 e TIMP-2 e de algumas citocinas importantes tanto para o controle da expressão e ativação das MMPs quanto para o combate à infecção causada pela *Leishmania*.
3. Correlacionar a atividade de MMP-9 com a progressão para a leishmaniose mucosa através da avaliação da expressão, síntese e ativação de MMP-9 nas culturas de macrófagos humanos infectados por *L. braziliensis*.
4. Estudar o transcriptoma completo das lesões cutâneas primárias obtidas de indivíduos que desenvolveram apenas LCL e de indivíduos que após a cura desta lesão evoluíram para LM e assim definir quais grupos gênicos estão envolvidas na susceptibilidade à leishmaniose mucosa.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Seleção dos pacientes**

Um total de 71 amostras foram incluídas neste estudo. Todos os pacientes selecionados tinham diagnóstico positivo para LTA comprovado por pelo menos um de quatro métodos diagnósticos utilizados de rotina: impressão em lâmina, histopatologia, cultura em meio NNN ou PCR.

Quarenta e nove fragmentos de lesões cutâneas ativas foram selecionados a partir do arquivo de tecidos do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas/IOC. Todos os fragmentos de tecido obtidos por biópsia da borda da úlcera, sob condições de esterilidade e anestesia local e foram realizadas pelo Dr. Manoel Paes Oliveira Neto e pela Dra. Marise Mattos do ambulatório de Leishmaniose do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) – FIOCRUZ (RJ). As amostras obtidas foram incluídas em resina OCT (Tissue-Tek, Sakura Finetek, USA) e estocadas em nitrogênio líquido.

Macrófagos derivados de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isolados a partir de 30 mL de sangue obtidos de 21 indivíduos saudáveis com história prévia de LTA. A coleta do sangue foi realizada parte no hospital do IPEC, sob supervisão do Dr. Manoel Paes Oliveira Neto e parte na residência dos voluntários pela Dra. Káris Maria de Pinho Rodrigues. As amostras de sangue foram colhidas em tubos de heparina (Becton Dickinson Company, Flanklin Lakes, NJ, EUA)

O presente estudo foi realizado sob protocolos aprovados tanto pelo Comitê de Ética da Fiocruz, Comitê de Ética do IPEC (P#133/01, P#013/08 e P#695/10) e Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (Protocolo nº 15.777)

##### **3.1.1. Critério de inclusão e detalhes sobre amostragem**

Os critérios de seleção usados variaram de acordo com o objetivo da etapa do estudo.

#### **ETAPA 1: Avaliação da participação das gelatinases na falha à resposta ao tratamento.**

Trinta e nove fragmentos de lesão cutânea foram selecionados de acordo com a resposta que os pacientes apresentaram à terapia com Glucantime® (Rhodia Laboratories, Antony,

França) e distribuídos em grupos de boa ou má resposta ao tratamento. Vinte e quatro indivíduos foram enquadrados no grupo de boa resposta, enquanto 15 constituíram o grupo de má resposta. A resposta ao tratamento foi considerada boa quando as lesões tratadas mostraram completa reepitelização e ausência de eritema, endurecimento ou pápulas até 3 meses depois de finalizado o tratamento. O grupo de má resposta foi definido como lesões que, 3 meses após a conclusão da terapia, não apresentaram completa cicatrização ou cujas cicatrizes ainda se apresentavam eritematosas. Além disso, nesse grupo também foram incluídas lesões de indivíduos que apresentaram recidivação ou lesões metastáticas secundárias. De modo geral, ambos os grupos apresentavam médias similares de idade (média  $\pm$  desvio padrão;  $37 \pm 18$  anos), número de lesões ( $1 \pm 1,4$ ), área de lesão (boa resposta:  $7,8 \pm 10,6$  cm<sup>2</sup>; má resposta:  $8,2 \pm 10,5$  cm<sup>2</sup>) e tempo de evolução da lesão ( $3,0 \pm 1,5$  meses).

Para esta etapa do estudo, ainda foram incluídos 5 amostras de pele normal que foram usadas como controles para os testes realizados. Estas amostras foram obtidas de indivíduos saudáveis submetidos à cirurgia plástica.

## **ETAPA 2: Avaliação do envolvimento de MMP-9 no desenvolvimento da forma mucosa de LTA.**

Vinte e um indivíduos com história prévia de leishmaniose tegumentar americana tratados com Glucantime® e seguidos até a cura completa no ambulatório de leishmanioses do IPEC foram selecionados. Destes indivíduos, coletou-se sangue, do qual foram isolados macrófagos. No momento da coleta, todos os voluntários apresentavam pelo menos 3 anos de cura completa de leishmaniose cutânea localizada (LCL) ou de leishmaniose mucosa (LM), sem indícios de recidivação. O tempo médio decorrido após a cura clínica era similar entre os grupos (LCL:  $6 \pm 1,5$  anos; LM:  $7 \pm 1,7$  anos). Doze indivíduos foram incluídos no grupo LCL e nove indivíduos foram incluídos no grupo LM. As médias de idade apresentadas divergiram um pouco, uma vez que os indivíduos do grupo LCL eram mais jovens (LCL:  $41 \pm 15$  anos; LM:  $65 \pm 21$  anos).

## **ETAPA 3: Determinação dos complexos gênicos envolvidos na susceptibilidade à LM.**

Nesta etapa, foram incluídos 10 fragmentos de lesão cutânea de leishmaniose. Os critérios de seleção incluíram lesões (i) cutâneas primárias, (ii) recentes, com no máximo 4 meses de evolução e que (iii) tivessem atingido a cura clínica completa após tratamento com Glucantime® ou que (iv) tivessem evoluído para a forma mucosa após a cicatrização da lesão. A

partir da seleção, as amostras foram divididas de acordo com o desfecho da LTA em LCL e em LM. Cinco amostras compuseram o primeiro grupo e cinco amostras integraram o segundo. As médias de idade variaram um pouco entre os grupos (LCL  $25 \pm 21$  anos; LM  $42 \pm 15$  anos) assim como o número de lesões apresentadas pelos indivíduos, onde LCL apresentaram somente 1 lesão e LM apresentaram 1 (3 casos), 6 (1 caso) e 19 (1 caso) lesões. As médias de tempo de evolução da lesão foram semelhantes (LCL:  $1,0 \pm 0,5$  meses; LM:  $2,0 \pm 1,3$  meses). Uma amostra de pele normal foi usada como controle para os testes realizados.

### 3.2. Imunohistoquímica

Esta técnica, previamente estabelecida por Pirmez e colaboradores (1990), foi utilizada para detecção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-10, TGF- $\beta$ , MMP-2 e MMP-9. O procedimento se iniciou pela fixação de cortes congelados com  $3\mu\text{m}$  de espessura em acetona:metanol:formol tamponado (19:19:2) durante 2 min, com posterior hidratação do tecido com tampão Tris salina 1X (TBS: Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, pH 7,5) por 10 min. Seguiram-se os bloqueios da peroxidase endógena com  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% em Tris-HCl por 10 min, e de possíveis ligações inespecíficas com BSA 2% em Tris-HCl por 20 min. As incubações com os anticorpos primários anti-humano, nas concentrações especificadas na tabela abaixo (Tab.3.1) foram realizadas por 12 horas a  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente, os cortes foram incubados por 30 min em Envision anti-mouse kit (Dako, Glostrup, Denmark), seguida por contracoloração com hematoxilina de Mayer (Merck, Whitehouse Station, USA) por 30 seg e a montagem efetuada com lamínula em meio aquoso gelatina-glicerina. Entre as incubações citadas, realizaram-se duas lavagens de 5 min com TBS. Todo procedimento foi efetuado em câmara úmida.

*Tabela 3.1: Concentração dos anticorpos utilizados nos ensaios de imunohistoquímica (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA)*

Anticorpo Anti-	Concentração	Purificado de
IFN- $\gamma$	17 $\mu\text{g}/\text{mL}$	camundongo
IL-10	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	camundongo
TGF- $\beta$	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	camundongo
MMP-2	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	camundongo
MMP-9	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	camundongo

### **3.3. Zimografia *in situ***

Esta técnica foi utilizada para localizar no tecido a atividade enzimática das gelatinases em questão (Kurschat *et al.*, 2002). Inicialmente, montou-se um gel de poliacrilamida com gelatina na concentração final de 15 mg/mL, e de espessura igual a 50 µm em uma lâmina comum. Sobre este gel, colocou-se uma secção com 8 µm de espessura dos tecidos estudados criopreservados em O.C.T. Estas lâminas foram incubadas por 24h em câmara úmida a 37°C. Seguido este período de incubação, os cortes foram corados com Azul de Metileno (0,5% em PBS pH 7,4) e fotografados para posterior análise. As lâminas foram então incubadas em solução SDS 5% em PBS pH 7,4 por 30 min a 37°C e o tecido removido cuidadosamente. O gel remanescente foi corado com solução Coomassie blue (0,1% Coomassie Brilliant Blue – Merck, em 50% de metanol e 10% de ácido acético) e fotografado na mesma posição e aumento no qual o tecido foi fotografado anteriormente para interposição e comparação das imagens. As áreas mais claras no gel correspondem aos locais de atividade das gelatinases e foram analisadas pelo programa Image Pro-Plus versão 4.5.1.29 (Media Cybernetics, Maryland, USA). Os resultados foram expressos como percentagem da área positiva para atividade das gelatinases em comparação à área total da secção de tecido analisada. Além disso, cortes sequenciais àqueles obtidos para a técnica de zimografia *in situ* foram corados pela hematoxilina e eosina. Cortes de 6 µm obtidos de fragmentos congelados de pele normal e de lesão foram fixados por 10 min com acetona (Merck), corados com hematoxilina de Mayer (Merck) por 30 segundos, lavados em água corrente por 5 minutos e contracorados em eosina aquosa por 2 minutos. Estas secções foram novamente lavadas em água corrente e posteriormente montados em meio aquoso gelatina-glicerina com lamínula. Essas imagens foram utilizadas como auxílio à localização da atividade das gelatinases.

### **3.4. Cultura de *L. braziliensis* e purificação das formas metacíclicas**

Para evitar a perda da infectividade, a *L. braziliensis* usada neste estudo foi passada sucessivas vezes em *golden* hamsters. As formas promastigotas recentemente isoladas de hamsters foram cultivadas em meio Schneider (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA) completo com 20% de soro fetal bovino (Gibco), 2% de urina humana e 0,1% de Penicilina/Estreptomicina (Sigma, St. Louis, USA) a 27°C por 5 dias para que atingissem sua fase estacionária de crescimento.

A purificação das formas promastigotas metacíclicas foi realizada de acordo com protocolo estabelecido previamente (Spath e Beverley, 2001) com algumas modificações. Solução de 20% de Ficoll tipo 400 (Sigma) foi diluída para a concentração de 10% em meio M199 (Sigma) sem soro e pH 7,3 e água estéril. A solução foi filtrada em filtro de acetato de celulose de poros 0,22 µm. As culturas de *L. braziliensis* na fase estacionária foram centrifugadas a 3200 g por 10 min. O sedimento foi ressuspendido em 10 mL de meio DMEM sem soro. Em um tubo cônico de 50 mL foram colocados 10 mL de Ficoll 10% e depois os 10 mL de meio DMEM contendo *Leishmania*. A suspensão foi centrifugada por 15 min a 1400 g em temperatura ambiente. Os parasitas foram recuperados coletando 10 mL da interface superior com pipeta estéril. Os parasitas foram lavados duas vezes com PBS gelado, centrifugados a 3200 g por 10min ressuspensos em meio DMEM sem soro, contados e utilizados para infecção.

### **3.5. Cultura e infecção de macrófagos humanos**

A partir dos 30 mL de sangue periférico dos pacientes da etapa 2 (LCL:  $n = 12$ , LM:  $n = 9$ ), macrófagos derivados de monócitos foram obtidos de células mononucleares (PBMC) isoladas por gradiente de Ficoll, como descrito anteriormente (Barreto-de-Souza *et al.*, 2006). Resumidamente, PBMCs foram separados por gradiente de densidade usando Hystopaque (Sigma) em centrifugação por 20 min, 1200 g e temperatura ambiente. O anel de PBMCs foi coletado e lavado em meio RPMI 1640 (Sigma) sem soro e as células centrifugadas a 1340 g por 10 min. O sedimento foi ressuspendido em meio DMEM (Sigma) e as células contadas e ajustadas para a concentração desejada. Em placas de 6 poços,  $1 \times 10^7$  PBMCs foram plaqueados por poço e mantidos em meio DMEM completo (10% de soro humano AB Sigma e 0,1% de Penicilina/Estreptomicina, Sigma) por 7 dias a 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células não aderentes foram removidas e novo meio adicionado. Estas células foram mantidas por mais 2-3 dias nas condições anteriores.

Macrófagos aderentes foram lavados com meio DMEM sem soro antes de serem expostos aos parasitas. Promastigotas metacíclicas foram utilizados na proporção de 3 a 5 parasitas por macrófagos. As culturas foram incubadas por 3h a 37°C/5% CO<sub>2</sub> em meio DMEM sem soro. Os parasitas livres no meio foram removidos em 3 lavagens com PBS em temperatura ambiente. As culturas de macrófagos foram então incubadas em meio DMEM completo por 48h a 37°C/5% CO<sub>2</sub>. No final do ensaio, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados a 3200 g para que os possíveis parasitas ou células fossem removidos, transferidos para novo tubo e

estocados a -20°C. As células foram coletadas em 1 mL de Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen) e mantidas a -70°C até seu uso. As infecções foram realizadas em triplicatas. Culturas de macrófagos não infectados foram utilizadas como controle e submetidas às mesmas condições de cultura das culturas infectadas.

### **3.6. Zimografia convencional**

Para determinar a atividade gelatinolítica de pro-MMP-9 e MMP-9, o sobrenadante das culturas ou de lisado das formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* foram analisadas com Novex<sup>®</sup> 10% Zymogram/Gelatin (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. As concentrações de proteína total das amostras foram determinadas usando o kit D<sub>C</sub> Protein Assay (Biorad, Hercules, USA). Para cada ensaio de zimografia foram utilizados 30 µg de proteína de cada amostra, as quais foram analisadas duas vezes em géis diferentes. Resumidamente, depois da eletroforese (110volts por 2 h), os géis foram incubados por 1h em tampão renaturante (1x Zymogram Renaturation Buffer - Biorad) em temperatura ambiente, por 16h em tampão de desenvolvimento (1x Zymogram Development Buffer - Biorad) a 37°C e corados em Coomassie Blue 0.5% por 30 min. O excesso de corante foi retirado em banhos de 5 a 10 min com solução descorante (ácido acético 2% em água). A imagem do gel foi digitalizada no transiluminador Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Biorad). A densidade óptica das bandas indicando a atividade de MMP-9 foi medida usando-se o software Image J 1.41 software (NIH, USA).

### **3.7. Western Blot**

Esta técnica foi usada para a quantificação da proteína MMP-9 em suas formas inativa e ativa e de seu inibidor TIMP-1. Neste ensaio foram usados o anticorpo anti- MMP-9 humana recombinante (R&D Systems, Minneapolis,USA) que reconhece ambas as formas de MMP-9, e anticorpo anti-TIMP-1 humana (R&D Systems). Para a eletroforese, foi utilizado o Ready Gel<sup>®</sup> precast polyacrylamide gel (Biorad) e as instruções do fabricante foram seguidas. As concentrações de proteína total das amostras foram determinadas usando o kit D<sub>C</sub> Protein Assay (Biorad). Para cada ensaio de zimografia foram utilizados 15 µg de proteína de cada amostra, as quais foram analisadas duas vezes em géis diferentes. Depois da eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Biorad). A etapa de bloqueio contra ligações inespecíficas foi realizada usando solução contendo 5% de leite em pó desnatado diluído em

TBS-T (Tris-HCL 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%) durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 12h a 4°C com o anticorpo primário anti-MMP-9 ou anti-TIMP-1 na concentração de 0,75µg/mL. Depois de lavadas por 30 min com TBS-T, as membranas foram incubadas durante 1h em temperatura ambiente com o anticorpo secundário policlonal anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (ABCam, Cambridge, USA), na concentração de 0,8 µg/mL. A revelação da reação foi feita usando-se o kit *SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific, Suwanee, USA) e as membranas exposta ao filme de autoradiografia HyBlot CL™ (Denville Scientific, Inc; Metuchen, USA). Depois de revelado, a imagem do filme foi digitalizada e as bandas analisadas usando-se o software Image J 1.41 software.

### **3.8. Imunoprecipitação**

Esta técnica foi utilizada para confirmar se a atividade observada no gel de zimografia era realmente devido a atividade de MMP-9. Seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante, *Magnetic Dynabeads<sup>®</sup> protein G* (Invitrogen) foram incubadas com 10 µg de anticorpo anti-MMP-9 humana (R&D Systems, MAB936) e usadas para imunoprecipitar a MMP-9 contida em 10 µg de proteína total do sobrenadante das culturas de macrófagos. Um anticorpo de isótopo relevante foi usado como controle negativo da reação. A incubação foi realizada por 12h a 4°C. A técnica de eluição escolhida foi a não-desnaturante.

### **3.9. PCR em tempo real**

#### **3.9.1. Isolamento de RNA total e síntese de cDNA**

As amostras que foram submetidas ao PCR em tempo real tiveram seu RNA total extraído pelo método do Trizol (Gibco). Brevemente, após incluídas no Trizol, as amostras foram homogeneizadas em vortex por alguns segundos, e acrescentou-se 200 µl de clorofórmio (Merck). A mistura foi centrifugada por 15 min a 15.000 g e a fase aquosa transferida para um novo tubo onde foram adicionados 500µl de isopropanol (Merck). Após homogeneização, as amostras foram, centrifugadas por 10 min a 13.000 rpm, para precipitação do RNA. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado cuidadosamente com etanol 70%. O

sedimento final foi ressuspensão em 8 µL de água livre de RNase (USB, Ohio, EUA), 1 µL de tampão para reação de DNase 10X e 1 µL de DNase I (1 U/µL) (Boehringer, Mannheim, Alemanha) e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente.

Para a síntese do cDNA, o kit Superscript II RT (Invitrogen) foi usado com 1 µg de RNA total, e o protocolo fornecido pelo fabricante foi seguido.

### 3.9.2. Reação de PCR

Cada reação foi realizada em duplicata. As sequências nucleotídicas dos pares de primers específicos para os alvos selecionados neste estudo estão detalhadas na tabela 3.2 (5'-3'). A reação de PCR foi realizada num volume final de 25 µl contendo SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA), 10 pmoles do par de primers (Tab.3.2) e água livre de nucleases. As amplificações foram realizadas no termociclador ABI Prism 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems), em 40 ciclos que consistiam em: desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 59°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. A curva de dissociação (95°C/ 15seg, 60°C/ 20seg, 95°C/ 15seg) para averiguação da especificidade dos produtos amplificados foi realizada ao fim dos 40 ciclos. Uma curva padrão produto-específica foi feita para cada primer utilizado. Os valores obtidos para amplificação dos alvos foram normalizados em relação aos valores obtidos para o gene constitutivo escolhido ( $\beta$ -actina) e, desta forma, os resultados foram expressos em valores do coeficiente alvo/ $\beta$ -actina.

*Tabela 3.2: Sequência dos primers utilizados para as reações de PCR em tempo real.*

Alvos	Sequência senso	Sequência anti-senso
$\beta$ -actina	TAATGTCACGCACGATTTCCC	TCACCGAGCGCGGCT
MMP-2	TGCTGGAGACAAATTCTGGAGATA	ACTTCACGCTCTTCAGACTTTGG
MMP-9	ACGATGCCTGCAACGTGA	ATACAGCTGGTTCCCAATCTCC
TIMP-1	CCCAGAGAGACACCAGAGAAC	CACGAACTTGGCCCTGATGAC
TIMP-2	GCACATCACCTCTGTGACTT	AGCGCGTGATCTTGC ACT

Para a análise da expressão gênica de MMP-9 e HPRT1 (gene constitutivo) dos macrófagos cultivados utilizou-se *Taqman® gene expression assays* (Applied Biosystems), cujas identificações de primers e sondas no catálogo do fabricante são Hs00957562\_m1 (MMP-9) e HS99999909\_m1 (HPRT1). Os resultados foram expressos em valores de  $\Delta Ct$ .

### **3.10. mRNA-sequencing (RNA-seq)**

#### **3.10.1. Isolamento do RNA total**

A extração do RNA total para a técnica de RNA-seq foi realizada pelo método da guanidina-fenol-clorofórmio estabelecida anteriormente, porém com algumas modificações (Chomczynski e Sacchi, 1987). Nesta técnica, foram utilizados cerca de 35 cortes de 5  $\mu m$  de tecido congelado, os quais foram coletados em 500  $\mu L$  do Tampão desnaturante para isolamento de RNA (*Denaturation solution for the isolation of RNA* - Sigma) e homogenizados em vórtex. Em seguida, foram adicionados 50  $\mu L$  de acetato de sódio 2M, pH 4, 500  $\mu L$  de fenol saturado em água (Invitrogen) e 100  $\mu L$  de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) (Sigma). A mistura foi centrifugada por 15 min a 15.000 g. A fase aquosa foi transferida para novo tubo contendo 550  $\mu L$  de isopropanol (Sigma) e centrifugada a 15.000 g por 30 min. O sedimento foi lavado em etanol 70%, centrifugado por 5 min a 7.000 g, tratado com DNase (Qiagen, Valencia, USA) e purificado usando *Rneasy Micro-kit* (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. No final deste procedimento, as amostras foram avaliadas quanto a sua quantidade usando *Nano drop* (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) e quanto a sua qualidade por *Bioanalyzer* (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

#### **3.10.2. Preparação da biblioteca de cDNA para sequenciamento**

Para este procedimento, o kit *mRNA-Seq sample preparation kit* (Illumina, San Diego, USA) foi utilizado e o protocolo foi executado segundo as instruções do fabricante. A purificação do mRNA foi feita pelo uso de contas magnéticas revestidas de oligo-dT. Depois de isolado, o mRNA foi fragmentado por ação enzimática a 94°C e precipitado usando glicogênio. O sedimento resultante foi utilizado como molde para a síntese de cDNA de dupla-fita, usando o kit Superscript II (Invitrogen) e primers randômicos para a síntese da primeira fita, e enzima

DNA polimerase I e dNTP para a produção da segunda fita. O reparo das extremidades da dupla fita do cDNA utilizou T4 DNA polimerase e Klenow DNA polimerase. Depois de reparada, uma cauda poli-A foi adicionada na extremidade 3' do DNA polifosforilado e adaptadores foram ligados à ambas extremidades. Para a purificação dos fragmentos de cDNA, os fragmentos de 200 pb são selecionados através de separação por eletroforese em gel de agarose 2% e isolados usando o kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen). Por fim, estes fragmentos foram amplificados por PCR e avaliados por *Bioanalyzer* (Agilent).

Após realizadas todas as etapas, as amostras foram enviadas para o *Genome Center Nucleic Acid Core* na *University of California in Davis*, onde as amostras foram sequenciadas usando *Genome Analyzer II* (Illumina).

### 3.10.3. Análise dos fragmentos de leitura

Os fragmentos sequenciados foram alinhados com os genomas humano (*Homo sapiens* – hg18) e *Leishmania braziliensis* (LBRM\_V2\_OCTOBER) usando o programa Burrows-Wheeler Aligner (BWA) (Li e Durbin, 2009) e processados usando os programas SAMtools (Li *et al.*, 2009) e BEDtools (Quinlan e Hall, 2010). Com o programa DEGseq do pacote R DEGseq (Wang *et al.*, 2010), calculou-se o número de leituras por gene e normalizou-se os valores para RPKM (*Reads Per Kb per Million reads*), que considera a seguinte equação:

$$RPKM = (1e9 * C) / (N * L)$$

onde:

C = números de leituras mapeadas por gene

N = números total de leituras mapeadas no experimento

L = comprimento do exon em pares de bases para um dado gene

### 3.11. Análise Estatística

Para a maioria das análises realizadas neste estudo, o programa Prism 5.01 (GraphPad software Inc., La Jolla, USA) foi usado. O teste *t Mann Whitney* (não-paramétrico) foi usado para comparar dois grupos de amostras independentes. O teste *t Wilcoxon* (pareado e não-paramétrico) foi usado para analisar as amostras do mesmo indivíduo quando submetidas a

condições experimentais diferentes. A regressão linear e a correlação não-paramétrica de *Spearman* foram usadas para avaliar a relação entre dois grupos. As diferenças e comparações foram consideradas estatisticamente significantes quando  $P < 0,05$ . Todos os dados foram expressos graficamente usando-se as médias e o erro padrão da média (SEM).

Para a análise dos dados obtidos por RNA-seq, os dados foram pré-selecionados através do teste *t* simples entre dois grupos, onde apenas genes que apresentaram  $P < 0,05$  foram incluídos em uma lista para a análise estatística. O programa samWrapper do pacote R DEGseq (Wang *et al.*, 2010) foi usado para calcular a diferença na expressão gênica entre dois grupos, considerando os seguintes parâmetros: *fold change* mínimo = 2, valor máximo de  $q = 0,0001$ , número de permutações = 2000. Os genes considerados como diferentes quanto à expressão deveriam possuir  $q \leq 0,0001$  e *fold change*  $\geq 2$ .

### **3.12. Organização dos genes em grupos funcionais e em vias metabólicas**

Para esta finalidade, foi usada a base de dados bioinformáticos DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) versão 6.7 (NIAID-NIH). Este programa é utilizado para extrair o significado biológico de uma grande lista de genes de acordo com o organismo selecionado, agrupando-os pela semelhança funcional e atribuindo-lhes termos relacionados a processo biológico, função molecular e componente celular. Além disso, este programa, ao utilizar outras fontes que fornecem vias metabólicas, tem a capacidade de localizar nestas vias os componentes da lista de genes utilizadas para a análise. Desta forma, torna-se possível o conhecimento das vias metabólicas relevantes no modelo estudado. Esta base de dados está disponível on line e é atualizada semanalmente (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>). Além disso, DAVID aplica análises estatísticas para classificar a importância de cada grupo gênico ou de certa via metabólica pelo teste exato de Fisher modificado (*EASE score*). O resultado obtido indica se as chances da presença do termo ou grupo gênico é significativamente mais importante do que randômica no estudo realizado. Os valores considerados são menores que 0,05. Já o *enrichment score* fornece a importância geral (enriquecimento) de certos eventos. Para isso, ele utiliza o significado geométrico de todos os EASE scores para cada termo anotado associado com os genes componentes do grupo. Os resultados são dados em  $-\log$ , e dessa forma a significância é considerada a partir de 1,3 (o que corresponde a  $P \leq 0,05$ ). Os módulos analíticos de DAVID considerados para este estudo incluíram:

- A. Classificação funcional do gene:** relaciona os genes em grupos de acordo com suas funções e, por atribuir valores de importância funcional (*enrichment score*), organiza-os em categorias.
- B. Agrupamento por anotação funcional:** mede a relação entre os termos de anotação baseados no grau de sua co-associação com genes da lista usada em grupos relativamente heterogêneos, ainda que altamente similares quanto a a anotação funcional. Isto fornece uma visão clara das relações entre categorias de anotação e termos comparados. Esta análise também classifica os resultados baseados no *enrichment score*.
- C. Gráfico de anotação funcional:** identifica os termos mais relevantes associados à lista de gene usada. Neste estudo, consideramos os termos de processos biológicos e sua importância foi baseada no *P*-value e no percentual de genes da lista usada que integravam o termo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ETAPA 1: Avaliação da participação das gelatinases na falha à resposta ao tratamento.

Quando comparadas aos dados obtidos com pele saudável, todas as lesões cutâneas de LTA apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto à produção de citocinas, expressão de MMPs e TIMPs e atividade das gelatinases.

#### 4.1.1. Lesões de pacientes com má resposta ao tratamento mostraram proporções menores de MMP-2:TIMP-2 mRNA e maiores níveis de atividade gelatinolítica.

Para determinar se a atividade de gelatinases corresponde à resposta ao tratamento em LTA, a atividade das gelatinases e a expressão gênica de MMPs e TIMPs foram analisadas em 39 fragmentos de lesões cutâneas resultantes da infecção por *L. braziliensis*.

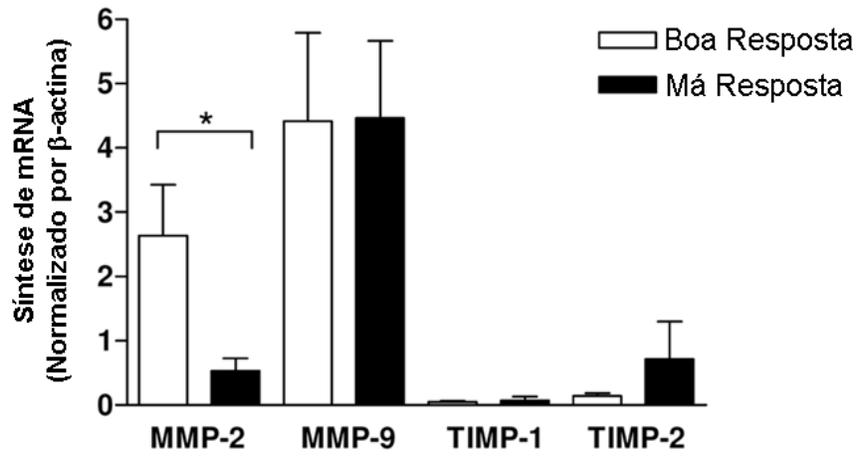
De acordo com os grupos de boa e má resposta, foi possível observar uma transcrição significativamente maior de mRNA para MMP-2 em lesões de pacientes que responderam bem ao tratamento ( $P = 0,04$ ; Fig.4.1A). Por outro lado, não foram observadas diferenças na expressão de mRNA para MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 em ambos grupos analisados (Fig.4.1A). A avaliação da quantidade relativa de mRNA para as gelatinases e seus respectivos inibidores mostrou que as proporções entre mRNA de MMP-2 e TIMP-2 se correlacionavam com a resposta ao tratamento (Fig.4.1B). Nas lesões do grupo de boa resposta, as razões MMP-2:TIMP-2 foram elevadas, com mediana igual a 9,7 enquanto o grupo de má resposta teve mediana igual a 0,6. Em contrapartida, as proporções obtidas entre os níveis de mRNA para MMP-9 e TIMP-1 foram similares em ambos os grupos, com razões maiores que 1,0 em todas as amostras (Fig.4.1B). Estes dados sugerem que o equilíbrio da produção de MMP-2 e TIMP-2 contribui para o sucesso da cicatrização das lesões cutâneas de LTA.

Células produzindo MMP-2 e MMP-9 foram localizadas *in situ* (Fig.4.1C). Observou-se no grupo de boa resposta ( $n = 10$ ) uma tendência à presença de um maior número de células produzindo MMP-2 do que MMP-9. Entretanto, com o pequeno número de amostras analisadas

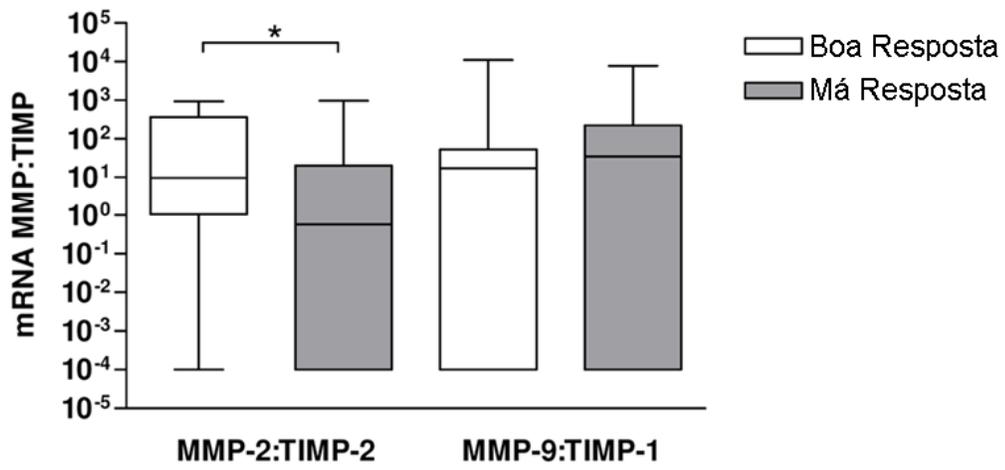
para o grupo de má resposta ( $n = 5$ ) não se pode observar o mesmo padrão. Porém, como as MMPs são liberadas na forma inativa (zimógenos) e precisam ser clivadas para ter atividade, a detecção da produção proteica não prediz, necessariamente, os níveis de ativação destas enzimas. Portanto, a detecção da atividade funcional destas MMPs e o mapeamento de sua presença nas lesões foram realizados através da medição da atividade gelatinolítica diretamente no tecido. A análise por zimografia *in situ* demonstrou níveis significativamente maiores de atividade das gelatinases nas lesões do grupo de má resposta ( $n = 15$ ) comparados ao grupo de boa resposta ( $n = 24$ ) ( $P = 0,04$ ; Fig.4.2A). Além disso, este mesmo grupo apresentou a atividade gelatinolítica mais intensa em lesões de má resposta com diferentes tempos de evolução (não mostrado), sugerindo que a idade da úlcera não influencia a magnitude da atividade proteolítica das MMPs neste estudo.

A localização da atividade das gelatinases nas lesões foi possível comparando os resultados obtidos pela zimografia *in situ* com os da técnica H&E usando cortes sequenciais dos fragmentos. A atividade gelatinolítica foi intensa na epiderme associada à úlcera (Fig.4.2B-D) e em áreas necrosadas da derme (Fig.4.2E-G). Em alguns casos, também foi possível perceber esta atividade no infiltrado inflamatório e em granulomas (Fig.4.2H-J).

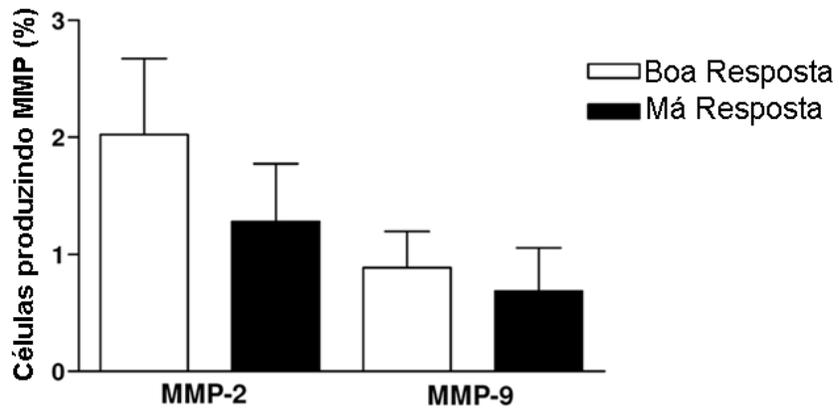
A



B

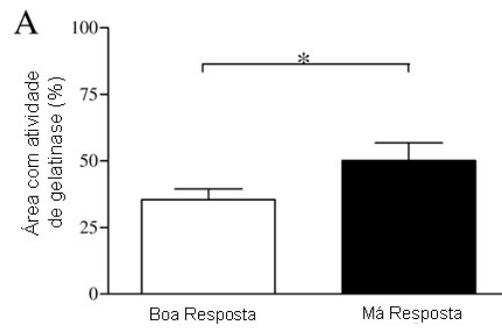


C



**Figura 4.1: Detecção da expressão das gelatinases e de TIMPs em lesões cutâneas de LTA.**

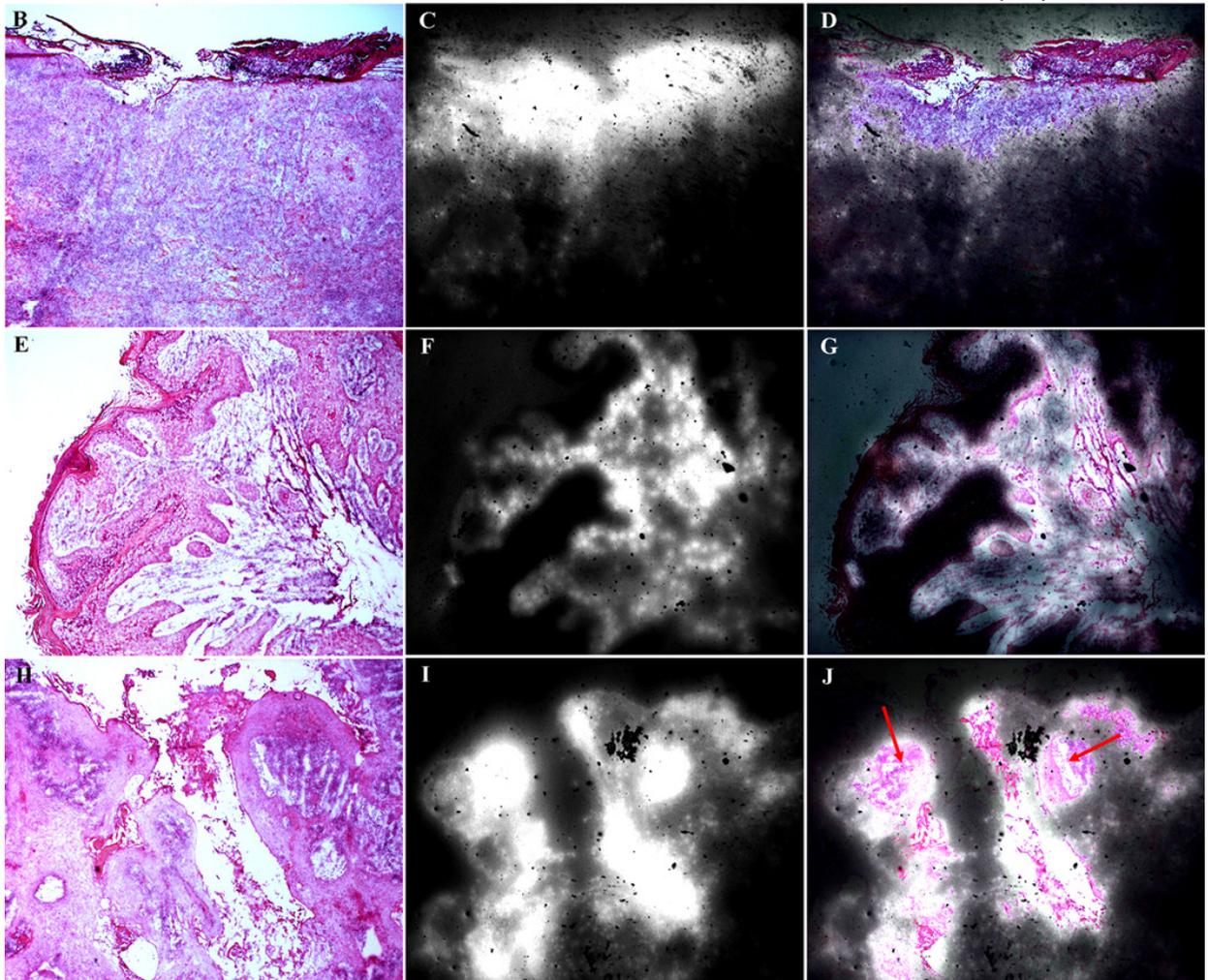
Os níveis de mRNA para MMPs e TIMPs foram avaliadas por PCR em tempo real em 39 fragmentos de lesões cutâneas. **(A)** Altos níveis de mRNA para MMP-2 foram detectados no grupo de boa resposta ( $n = 24$ ) comparados com o grupo de má resposta à terapia ( $n = 15$ ). Por outro lado, os níveis de mRNA para MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 foram similares em ambos os grupos. Os valores de mRNA para gelatinases e inibidores foram normalizados por  $\beta$ -actina. **(B)** As análise das proporções de MMP:TIMP mostram que altos valores da relação MMP-2:TIMP-2 foram correlacionados com boa resposta ao tratamento. Em contraste, as razões de MMP-9:TIMP-1 foram constantes em ambos os grupos, sugerindo que o balanço na expressão de MMP-2 e de seu inibidor participam da boa resolução das lesões cutâneas de LTA. **(C)** Células produzindo MMP-2 e MMP-9 foram detectadas *in situ* por imunohistoquímica. Nas lesões do grupo de boa resposta ( $n = 10$ ) pode-se observar uma tendência à presença de um maior número de células produzindo MMP-2 comparadas ao número de células produzindo MMP-9 ( $P = 0,06$ ). O grupo de má resposta não apresenta a mesma tendência ( $n = 5$ ;  $P = 0,2$ ). \* $P$ -value  $\leq 0,05$ . Barras representam o erro padrão (SEM).



Coloração de H&E

Zimografia *in situ*

Sobreposição



**Figura 4.2: Análise *in situ* da atividade das gelatinases em lesões cutâneas de LTA.** A atividade gelatinolítica das MMPs foi medida diretamente no tecido usando a técnica de zimografia *in situ*. **(A)** A medição demonstrou altos níveis de atividade de gelatinase nas lesões de indivíduos que responderam mal ao tratamento ( $n = 15$ ) comparadas ao grupo de boa resposta ( $n = 24$ ). Os dados apresentados nos gráficos representam a área tecidual com atividade das gelatinases na secção de tecido analisado (correspondendo às áreas claras do gel). Os valores foram obtidos por análise densitométrica do gel. **(B-D)** Áreas úlcera das secções demonstram intensa atividade de gelatinases. **(E-G)** Áreas com atividade gelatinolítica aumentada também podem ser observadas nas áreas de necrose da derme. **(H-J)** Os granulomas e infiltrados inflamatórios também apresentam atividade gelatinolítica (setas vermelhas). Painéis B, E, H: coloração por hematoxilina-eosina (H&E). Painéis C, F, I: reação de zimografia *in situ*. Painéis D, G, J: sobreposição das imagens obtidas por H&E e zimografia *in situ*. Aumentos originais: B-J: 40X. \* $P$ -value  $\leq 0,05$ . Barras representam o erro padrão (SEM).

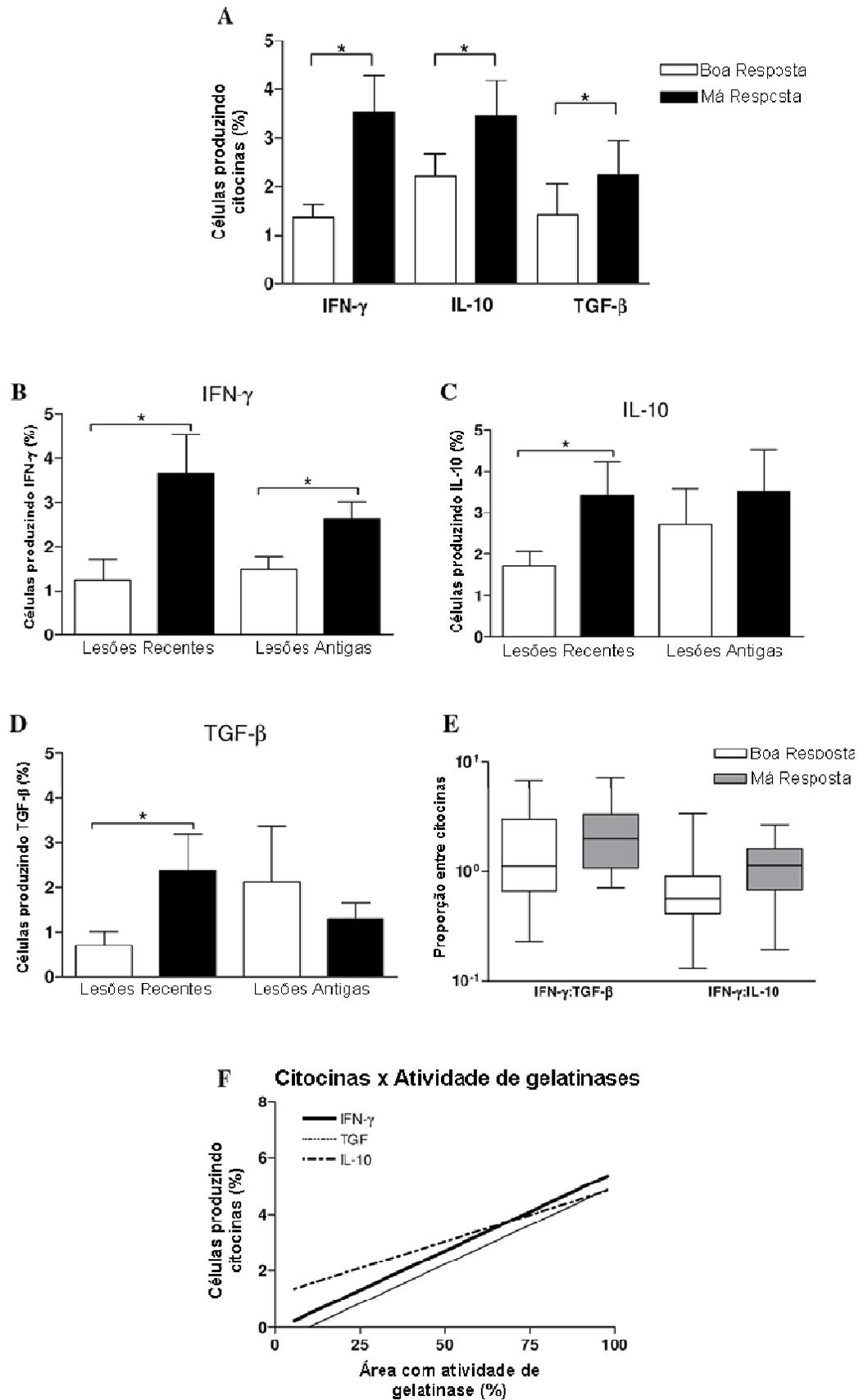
#### **4.1.2. Lesões do grupo de má resposta apresentam grande número de células produzindo IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ e IL-10.**

As citocinas presentes no sítio inflamatório podem direcionar a resposta ao tratamento e contribuir para a resolução das lesões de LTA. A análise *in situ* da presença de células produzindo citocinas importantes para a resposta imunológica contra a infecção por *L. braziliensis* evidenciou que lesões de pacientes que responderam mal à terapia ( $n = 15$ ) têm maior número de células produzindo IFN- $\gamma$  ( $P = 0,003$ ), IL-10 ( $P = 0,02$ ) e TGF- $\beta$  ( $P = 0,01$ ) (Fig.4.3A). Adicionalmente, pôde-se observar que, no grupo de má resposta, as áreas das lesões com células produzindo TGF- $\beta$  também apresentavam números elevados de células produzindo IL-10 ou IFN- $\gamma$ . Os percentuais de correlação foram de 71% para TGF- $\beta$  e IL-10, e 87% para TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  (Tab.4.1).

Além da resposta à terapia, o tempo de evolução das lesões também se correlacionou com a produção de citocinas. Lesões recentes ( $\leq 3$  meses) do grupo de má resposta tinham maior números de células produzindo as 3 citocinas quando comparadas às lesões recentes do outro grupo (IFN- $\gamma$ :  $P = 0,006$ ; IL-10:  $P = 0,03$ ; TGF- $\beta$ :  $P = 0,006$ ). Por outro lado, as lesões antigas ( $> 3$  meses) não apresentaram esta diferença (Fig.4.3B-D).

Finalmente, foi possível determinar que lesões do grupo de má resposta apresentaram elevadas proporções de células produzindo citocinas inflamatórias, com a razão IFN- $\gamma$ :TGF- $\beta$  igual a 2. Interessantemente, em lesões do grupo de boa resposta houve a preponderância de citocinas anti-inflamatórias, uma vez que a razão IFN- $\gamma$ :IL-10 foi 0,5 (Fig.4.3E).

A atividade das MMPs tem sido correlacionada com o fenótipo imunológico em outros modelos. Através da correlação dos resultados obtidos por zimografia *in situ* e imunohistoquímica para citocinas, pode-se notar uma forte e positiva relação entre a atividade gelatinolítica e a produção das 3 citocinas analisadas (IFN- $\gamma$ :  $P = 0,0002$ ; TGF- $\beta$ :  $P < 0,0001$ ; IL-10:  $P = 0,01$ ; Fig.4.3F).



**Figura 4.3: Análise *in situ* da produção de citocinas nas lesões cutâneas de LTA.** A presença de células produzindo IFN- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$  foi avaliada pela técnica de imunohistoquímica nos 39 fragmentos de lesões. **(A)** A análise *in situ* das três citocinas indica que todas foram encontradas em padrões semelhantes. O teste de Man-Whitney foi usado para comparar os grupos e mostrou que lesões de pacientes com má resposta ao tratamento ( $n = 15$ ) apresentavam maior percentual de células produzindo as citocinas estudadas em comparação ao grupo de boa resposta ( $n = 24$ ). **(B-D)** Usando a idade da úlcera como parâmetro adicional de análise, pode-se observar que as lesões recentes ( $\leq 3$  meses) mostraram as diferenças mais importantes no padrão de citocinas produzidas. Lesões do grupo de má resposta tiveram os maiores percentuais de células produzindo IFN- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$ . **(E)** Comparando as proporções de células produzindo as citocinas analisadas, houve uma predominância de células produzindo a citocina pró-inflamatória IFN- $\gamma$  nas lesões do grupo de má resposta, e prevalência de células produzindo a citocina anti-inflamatória IL-10 nas lesões do grupo de boa resposta.  $*P \leq 0,05$ . Barras representam o erro padrão (SEM). **(F)** A correlação não-paramétrica de Spearman mostrou uma forte e positiva associação entre a presença de atividade gelatinolítica e a produção das 3 citocinas estudadas (IFN- $\gamma$ :  $P = 0,0002$ ; IL-10:  $P = 0,01$ ; TGF- $\beta$ :  $P < 0,0001$ ).

*Tabela 4.1: Avaliação da presença de células produtoras das diferentes citocinas na mesma secção de tecido.*

Citocinas	Resposta ao tratamento ( $r^2$ )	
	Boa	Má
IFN- $\gamma$ x TGF- $\beta$	0,2053	<b>0,8774</b>
IFN- $\gamma$ x IL-10	0,2395	0,5591
IL-10 x TGF- $\beta$	0,5836	<b>0,7111</b>

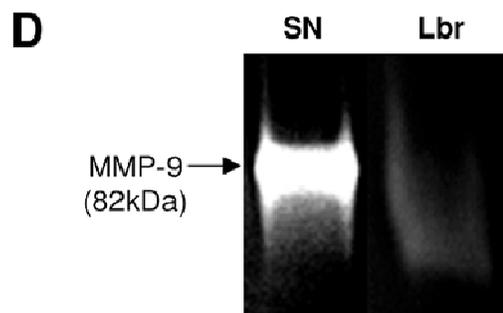
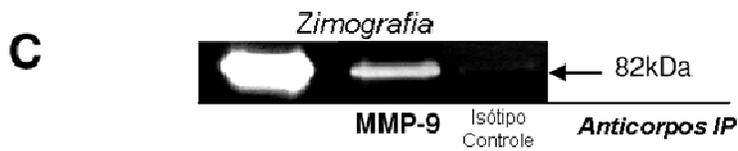
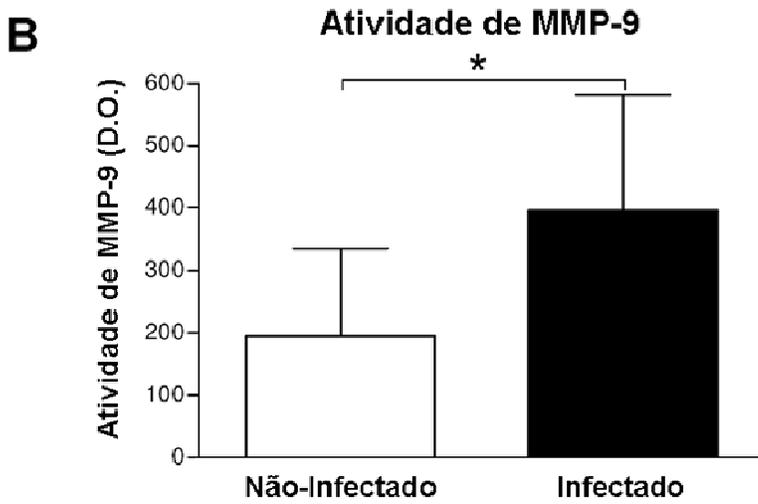
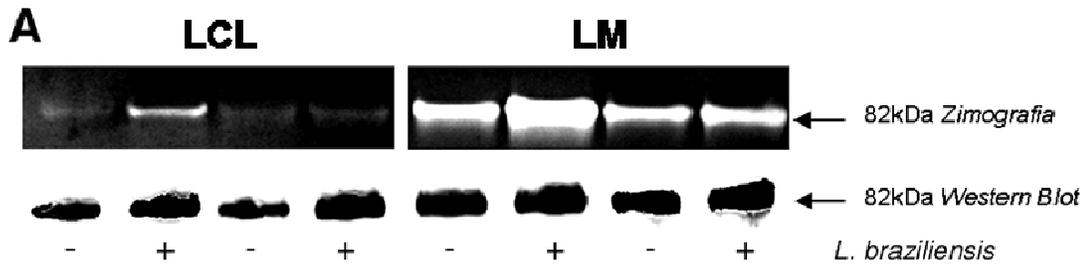
Usando a análise por Regressão Linear, encontrou-se uma relação linear entre os números de células produzindo dois tipos diferentes de citocinas no mesmo fragmento de tecido analisado. Considerando resposta à terapia, pode-se observar uma forte correlação (alto valor de  $r^2$ ) entre a presença de células produzindo TGF- $\beta$  and IL-10 ou IFN- $\gamma$  nas lesões do grupo de má resposta. Os valores estão expressos em  $r^2$ .

## **4.2. ETAPA 2: Avaliação do envolvimento de MMP-9 no desenvolvimento da forma mucosa de LTA.**

### **4.2.1. Infecção por *L. braziliensis* aumenta a ativação de MMP-9 na cultura de macrófagos humanos.**

A modulação pelo parasita da atividade de MMP no hospedeiro pode beneficiar a sobrevivência parasitária e facilitar sua disseminação para diferentes sítios do organismo. Para determinar os efeitos da infecção de *L. braziliensis* sobre a atividade da MMP-9 secretada, macrófagos humanos de indivíduos clinicamente curados ( $n = 21$ ) foram infectados com formas metacíclicas de *L. braziliensis* e avaliados quanto à produção de MMP-9 nos sobrenadantes após 48h da infecção (Fig.4.4A). Em geral, a infecção por *L. braziliensis* induziu um aumento significativo da atividade da MMP-9 secretada para o sobrenadante ( $P = 0,006$ , Fig.4.4B). Por imunoprecipitação, pode-se confirmar que a atividade detectada era realmente devido à presença de MMP-9 humana (Fig.4.4C), e por Western Blot, pode-se verificar que se tratava da forma ativa da proteína, de 82kDa (Fig.4.4A). A forma inativa de MMP-9 não foi detectada por Western Blot.

Para verificar se a presença de *L. braziliensis* no meio extracelular poderia influenciar os níveis detectados de MMP-9, tanto proteicos quanto de atividade, 30 $\mu$ g de proteína do lisado das formas promastigotas do parasita foram analisadas por zimografia. Esta análise revelou que os promastigotas de *L. braziliensis* apresentam pequena atividade gelatinolítica (Fig.4.4D), a qual, porém, não correspondeu ao tamanho da proteína MMP-9 (92kDa – 82kDa) ou MMP-2 (72kDa – 62kDa), além de nenhum vestígio da proteína MMP-9 poder ter sido detectado por western blot (não mostrado).



**Figura 4.4: Infecção por *Leishmania braziliensis* aumenta os níveis de atividade de MMP-9 nas culturas de macrófagos humanos.** (A) Macrófagos humanos de indivíduos clinicamente curados de LTA ( $n = 21$ ) foram infectados por *L. braziliensis*. Depois de 48 horas de exposição, os sobrenadantes das culturas de macrófagos foram coletadas e analisadas por western blot e zimografia. A atividade gelatinolítica observada corresponde à presença da forma ativa de MMP-9 (82kDa), como confirmado pela análise por western blot. As imagens dos géis de zimografia e western blot estão organizados de acordo com a forma clínica de LTA que o indivíduo desenvolveu no passado (B) Atividade de MMP-9 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos antes e depois da infecção. (C) O ensaio de imunoprecipitação (IP) confirmou a especificidade da atividade observada nos géis de zimografia como sendo devido à presença de MMP-9 humana (raia central). Um isótopo irrelevante foi usado como controle negativo (raia direita). A raia da esquerda mostra uma amostra sem ter sido submetida à IP. (D) Para determinar se a atividade de MMP-9 detectada no sobrenadante das culturas infectadas poderia ser alterada pela presença extracelular do parasita, o lisado de formas promastigotas de *L. braziliensis* foi analisado por zimografia. A primeira raia mostra o sobrenadante de uma cultura de macrófagos infectados por *L. braziliensis*, enquanto a segunda raia mostra o lisado de *L. braziliensis* aplicado diretamente no gel. O lisado de *L. braziliensis* apresenta pequena quantidade de atividade gelatinolítica. Entretanto, esta atividade não correspondeu ao peso molecular de MMP-9. LCL = Leishmaniose cutânea localizada. LM = Leishmaniose mucosa. SN: sobrenadante; *Lbr*: *L. braziliensis*. D.O.: densidade óptica. \* $P$ -value  $\leq 0.05$ . Barras representam o erro padrão (SEM).

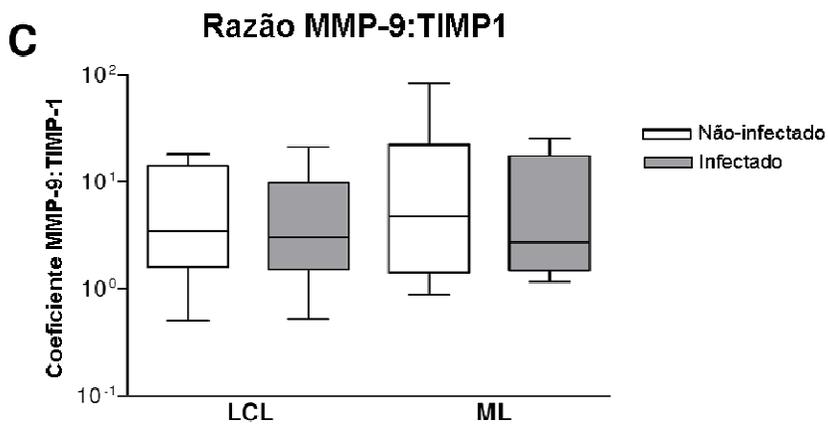
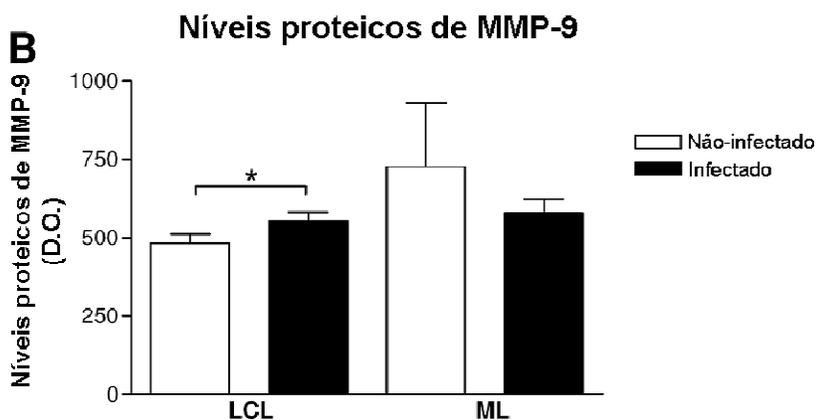
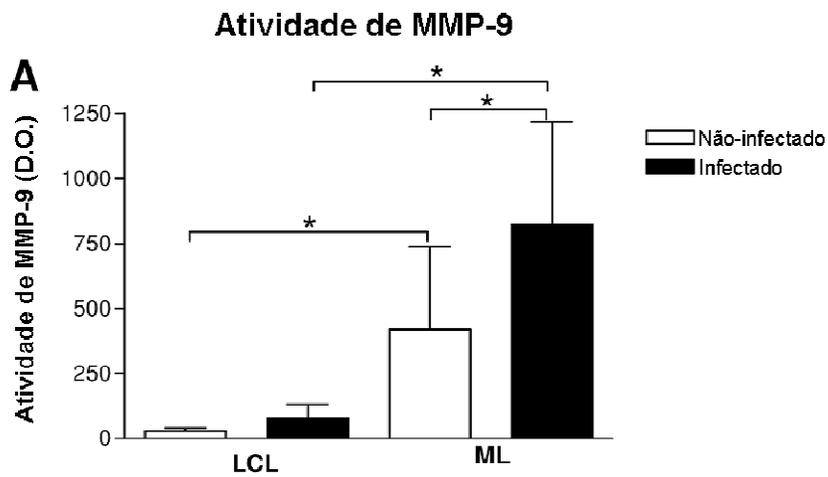
#### **4.2.2. Atividade de MMP-9 é maior nas culturas do grupo LM.**

Para determinar se a atividade basal de MMP-9 nas culturas de macrófagos humanos está associada a uma forma clínica específica de LTA, as amostras foram estratificadas em grupos de acordo com o tipo de leishmaniose previamente apresentada pelos indivíduos participantes do estudo. Os doadores foram classificados por grupo LCL ( $n = 12$ ) ou grupo LM ( $n = 9$ ), o que correspondeu aos históricos clínicos de leishmaniose cutânea localizada e leishmaniose mucosa, respectivamente. Os macrófagos do grupo LM mostraram altos níveis de atividade de MMP-9 comparado aos do grupo LCL, tanto antes ( $P = 0,049$ ) quanto depois da infecção por *L. braziliensis* ( $P = 0,021$ ; Fig.4.4A e 4.5A). Estes resultados sugerem que a ativação de MMP-9 por macrófagos *in vitro* pode ser correlacionada com a apresentação clínica da doença.

#### **4.2.3. A atividade diferencial de MMP-9 se deve à ativação extracelular de MMP-9.**

Para verificar em qual nível a atividade de MMP-9 estaria sendo modulada, procedeu-se à investigação dos níveis do transcrito e da proteína MMP-9 e dos níveis proteicos de seu inibidor natural, TIMP-1. Através da técnica de PCR em tempo real, observou-se que as diferenças nos níveis de mRNA para MMP-9 entre os grupos não era significativa (não mostrado). Por outro lado, os resultados de Western Blot indicaram que os macrófagos do grupo LCL, depois da infecção por *L. braziliensis*, secretaram níveis significativamente maiores de MMP-9 ( $P = 0,039$ , Fig.4.4B). Entretanto, esta diferença não se correlaciona com a variação dos níveis de atividade de MMP-9 observada neste grupo.

Os níveis proteicos de TIMP-1 foram medidos nos sobrenadantes das culturas de macrófagos e correlacionados com os níveis proteicos de MMP-9. Nenhuma diferença estatística foi observada nos níveis de TIMP-1 secretado por macrófagos em cultura, antes ou depois da infecção por *L. braziliensis*. Da mesma forma, nenhuma diferença nos valores da razão MMP-9 : TIMP-1 puderam ser observados em ambos os grupos (Fig.4.5C).



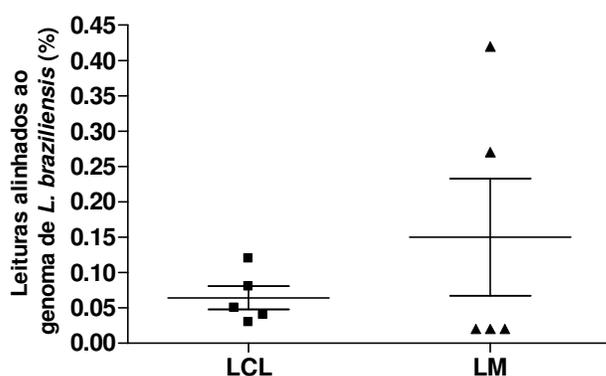
**Figura 4.5: Os níveis de atividade e de proteína de MMP-9 se correlacionam com a apresentação clínica de LTA.** Os gráficos representam os valores da análise quantitativa, por densitometria óptica (D.O.) do western blot. **(A)** A análise por zimografia de acordo com as formas clínicas de leishmaniose indicou que os sobrenadantes obtidos do grupo LM ( $n = 9$ ) demonstraram altos níveis de atividade de MMP-9 após a infecção por *L. braziliensis* e quando comparados com o grupo LCL ( $n = 12$ ) tanto antes como depois da infecção. **(B)** Por western blot, pode-se observar no grupo LCL que a infecção por *L. braziliensis* aumenta a secreção da proteína MMP-9. Nenhuma diferença estatística quanto aos níveis proteicos de MMP-9 foi detectado entre os grupos LCL e LM. **(C)** As análises das razões entre os níveis proteicos de MMP-9: TIMP-1 também não revelaram diferenças entre os grupos. LCL = Leishmaniose cutânea localizada. LM = Leishmaniose mucosa. \* $P$ -value  $\leq 0.05$ . Barras representam o erro padrão (SEM).

### 4.3. ETAPA 3: Estudos do transcriptoma das lesões cutâneas primárias de LTA.

#### 4.3.1. A técnica de RNA-seq permite avaliar a presença de transcritos pertencentes a diferentes organismos em uma mesma amostra.

Após o sequenciamento, as leituras obtidas das amostras incluídas no estudo foram alinhadas com o genoma completo do *Homo sapiens* (hg18) e com o genoma da *L. (Viannia) braziliensis* (LBRM\_V2\_OCTOBER). Os resultados obtidos indicaram que, nas amostras de lesões cutâneas de LTA, pôde-se identificar transcritos de ambos os genomas. O número de genes possivelmente detectáveis no genoma humano foi de 22.145, enquanto os genes codificantes de proteínas atualmente anotados para *L. braziliensis* compreendeu a 8.315 genes.

O percentual de transcritos de *L. braziliensis* identificados em cada amostra se encontra na tabela 4.2. Em geral, os valores médios do nível de transcritos de *L. braziliensis* foram de 0,06% nas amostras do grupo LCL ( $n = 5$ ) e de 0,15% nas amostras do grupo LM ( $n = 5$ ). Entretanto, esta diferença não é estatisticamente significativa ( $P = 0,34$ , Fig.4.6).



**Figura 4.6: Níveis de transcritos de *Leishmania braziliensis* nas lesões de LTA estudadas.** É possível observar uma diferença na quantidade de leituras que foram alinhadas com o genoma da *L. braziliensis*. Porém esta diferença não é estatisticamente significativa. LCL = Leishmaniose cutânea localizada. LM = Leishmaniose mucosa.

Tabela 4.2: Percentual de leituras alinhadas ou não com o genoma da *L. braziliensis* em cada uma das amostras estudadas.

Amostras	leituras alinhadas (%)	leituras não alinhadas (%)
LCL-01	0.05	99.93
LCL-02	0.04	99.76
LCL-03	0.08	99.82
LCL-04	0.03	99.94
LCL-05	0.12	99.85
Média	0.06	99,86
Mediana	0.05	99,85
LM-01	0.27	99.24
LM-02	0.42	99.12
LM-03	0.02	99.95
LM-04	0.02	99.95
LM-05	0.02	99.92
Média	0.15	99,64
Mediana	0.02	99,92

LCL = Leishmaniose cutânea localizada. LM = Leishmaniose mucosa.

#### 4.3.2. Genes de *L. braziliensis* com expressão diferencial nas lesões LTA estavam envolvidos em tradução gênica.

O pequeno número de transcritos de *L. braziliensis* detectados nos fragmento de lesão indica que provavelmente existem poucas amastigotas *in situ*. Este fato comprometeu a cobertura da análise da expressão gênica deste parasita neste estudo. A análise usando teste *t* revelou 16 genes com expressão diferencial, com  $P < 0,05$ . Todos os genes foram encontrados em maiores níveis nas amostras do grupo LCL. Dentre eles, 11 genes foram funcionalmente classificados como codificantes para proteínas participantes do processo de tradução gênica (em sua maioria, proteínas ribossomais), 3 codificam para proteínas hipotéticas, um para uma proteína de resposta a choque térmico e um para uma proteína GP63.

### **4.3.3. Diversos genes envolvidos com a resposta de defesa do organismo são ativados pela infecção com *L. braziliensis*.**

O programa samWrapper do pacote R DEGseq foi utilizado para analisar estatisticamente as diferenças entre o transcriptoma do microambiente de lesões cutâneas primárias de LTA ( $n = 10$ ) e o de pele saudável ( $n = 1$ ), a qual forneceu um limiar de expressão normal para os genes avaliados. De modo geral, pôde-se observar uma mudança nos principais grupos gênicos expressos, embora a pele normal tenha apresentado a grande maioria de genes com altos níveis de transcritos (8585 genes). As amostras do grupo LCL ( $n = 5$ ) apresentaram aumento na concentração de transcritos de 1169 genes enquanto o grupo LM ( $n = 5$ ) apresentou aumento da presença de 568 genes.

As listas de genes formadas a partir das análises estatísticas realizadas foram organizadas em grupos gênicos de acordo com sua anotação funcional utilizando a base de dados bioinformáticos DAVID vs 6,7. DAVID fornece diferentes tipos de análises baseadas na ontologia gênica (Gene Ontology, GO). Em nosso estudo, priorizamos a análise por processos biológicos, uma vez que para avaliar as vias metabólicas, seria necessário considerar a dinâmica e as dependências das interações entre as redes gênicas dos processos biológicos, moleculares e celulares. DAVID classifica os processos biológicos de acordo com sua probabilidade de acontecimento real. Por exemplo, o genoma humano apresenta cerca de 30.000 genes, 40 dos quais fazem parte da via de sinalização da proteína p53. Em uma dada lista composta por 300 genes, verifica-se que 3 genes pertencem à via de sinalização de p53. Utilizando o teste exato de Fisher, DAVID considera a chance de 3/300 acontecer randomicamente quando comparado a 40/30.000. O valor real é  $P = 0,008$ . Quando os valores de  $P$  são menores que 0,01, a lista de genes fornecida pelo usuário é associada ao processo biológico questionado, ao invés de ser considerada uma possibilidade randômica, o que ocorre quando  $P > 0,01$ . Entretanto, quando trabalhamos com listas contendo poucos genes, é importante considerar processos biológicos com valores de  $P$  variando entre 0,01 e 0,05. Por isso, em algumas tabelas apresentadas neste estudo, incluímos processos biológicos com estes valores de  $P$ . Assim, destacamos neste estudo apenas os primeiros processos biológicos organizados de acordo com o valor de  $P$  atribuído por DAVID. Outro termo encontrado nas tabelas é o percentual de genes da lista fornecida que fazem parte do processo biológico abordado.

Os processos biológicos de principal destaque nas lesões de LTA estão na tabela 4.3 e exibidas de acordo com os grupos LCL e LM. Ambos os grupos apresentam processos comuns,

como resposta imunológica, inflamatória e ativação de leucócitos, indicando que os processos desencadeados pela infecção por *L. braziliensis* é similar em ambos os grupos. Interessantemente, a pele em estado fisiológico normal apresentou, como processos biológicos mais importantes, eventos ligados à biosíntese de lipídeos e à morfogênese celular, principalmente à neuronal.

A partir da lista de genes obtidas das lesões em comparação à pele normal, avaliamos quais processos biológicos eram específicos para determinada forma clínica de LTA. Assim, comparou-se a lista de genes mais expressos no grupo LCL (1169 genes) com os genes mais expressos no grupo LM (568 genes). Os resultados indicaram que 457 genes são expressos comumente por ambas as formas clínicas, enquanto 712 genes foram estimulados unicamente no grupo LCL e 111 genes no grupo LM. Quando analisados quanto à funcionalidade, algumas peculiaridades foram observadas, embora ambos os grupos apresentassem eventos relacionados à resposta imunológica. Os transcritos aumentados unicamente no grupo LCL mostram evidente envolvimento com processamento e apresentação de antígenos e regulação da resposta imune adaptativa (Tabela 4.4). Os mesmos processos biológicos não foram encontrados no grupo LM. Os diversos eventos de quimiotaxia celular encontrados neste grupo também estão presentes na lista de processos biológicos do grupo LCL, porém não se encaixaram dentre os primeiros 15 (Tabela 4.4).

*Tabela 4.3: Processos biológicos em destaque nos grupos LCL e LM comparados à pele em estado fisiológico normal..*

<b>Grupo LCL (1169 genes)</b>	<b>%</b>	<b>P</b>
GO:0006955~Resposta imunológica	15,5	5,00E-067
GO:0006952~Resposta de defesa	10,2	1,31E-029
GO:0002684~Regulação positiva do sistema imunológico	5,6	1,84E-024
GO:0051249~Regulação da ativação de linfócitos	4,3	5,84E-024
GO:0050865~Regulação da ativação celular	4,5	4,70E-022
GO:0002694~Regulação da ativação de leucócitos	4,3	1,67E-021
GO:0050863~Regulação da ativação de células T	3,4	1,53E-018
GO:0046649~Ativação de linfócitos	4,3	3,83E-017
GO:0042110~Ativação de células T	3,3	1,78E-016
GO:0019882~Processamento e apresentação de antígenos	2,7	2,24E-016
<b>Grupo LM (568 genes)</b>		
GO:0006955~Resposta Imunológica	19,2	1,10E-048
GO:0051249~Regulação da ativação de linfócitos	6,1	2,23E-020
GO:0002694~ Regulação da ativação de leucócitos	6,1	9,43E-019
GO:0050865~ Regulação da ativação celular	6,1	5,08E-018
GO:0050863~ Regulação da ativação de células T	5,0	2,70E-017
GO:0002684~Regulação positiva do sistema imune	6,8	3,62E-017
GO:0046649~Ativação de linfócitos	6,1	2,77E-016
GO:0045321~Ativação de leucócitos	6,6	5,23E-016
GO:0006952~Resposta de defesa	1,6	1,22E-015
GO:0001775~Ativação celular	7,0	3,66E-015
<b>Pele normal (8585 genes)</b>		
GO:0008610~Processo biosintético de lipídeos	3,7	3,11E-16
GO:0048858~Morfogênese de prolongamento celular	2,9	6,85E-14
GO:0030030~Organização de prolongamento celular	3,9	2,00E-13
GO:0032990~Morfogênese de partes celulares	2,9	9,50E-13
GO:0006631~Processo metabólico de ácidos graxos	2,4	1,18E-11
GO:0000902~Morfogênese celular	3,6	3,13E-11
GO:0048812~Morfogênese de prolongamento de neurônios	2,5	4,90E-11
GO:0032989~Morfogênese de componentes celulares	3,8	7,55E-11
GO:0048667~ Morfogênese celular envolvida em diferenciação de neurônios	2,4	4,63E-10
GO:0000904~ Morfogênese celular envolvida em diferenciação	2,6	6,54E-10

Esta tabela mostra os 10 processos biológicos mais importantes nas lesões de LTA e na pele saudável. De acordo o número de genes fornecidos pela lista de cada grupo, podemos observar o percentual (%) de genes participantes de cada processo biológico. Estes processos estão organizados de acordo com o valor de **P** fornecido pelo teste exato de Fisher usado pelo programa DAVID. GO = ontologia gênica

Tabela 4.4: Eventos biológicos estimulados unicamente no grupo LCL e no grupo LM.

<b>Grupo LCL (712 genes)</b>	<b>%</b>	<b>P</b>
GO:0006955~Resposta imunológica	11,7	1,61E-021
GO:0006952~Resposta de defesa	9,4	5,63E-015
GO:0019882~ <b>Processamento e apresentação de antígenos</b>	2,7	7,87E-010
GO:0002684~Regulação positiva do sistema imune	4,1	4,45E-008
GO:0006954~Resposta inflamatória	4,8	1,02E-007
<b>GO:0002504~ Processamento e apresentação de antígenos via MHC de classe II</b>	<b>1,6</b>	<b>1,64E-007</b>
GO:0009611~Resposta a ferimento	6,4	2,83E-007
<b>GO:0048002~ Processamento e apresentação de antígenos</b>	<b>1,4</b>	<b>3,92E-007</b>
<b>GO:0002822~Regulação da resposta imune adaptativa baseada na recombinação somática dos receptores imunológicos construídos a partir dos domínios da superfamília das imunoglobulinas</b>	<b>1,7</b>	<b>3,77E-006</b>
GO:0002819~Regulação da resposta imune adaptativa	1,7	4,54E-006
<b>GO:0019884~Processamento e apresentação de antígenos exógenos</b>	<b>1,0</b>	<b>5,32E-006</b>
GO:0050778~Regulação positiva da resposta imune	2,7	5,43E-006
GO:0048584~Regulação positiva da resposta à estímulos	3,6	5,61E-006
GO:0050865~Regulação da ativação celular	3,0	5,95E-006
GO:0051249~Regulação da ativação de linfócitos	2,7	7,26E-006
<b>Grupo LM (111 genes)</b>		
GO:0006955~Resposta imunológica	10,9	9,87E-004
GO:0006954~Resposta inflamatória	7,3	0,00167439
GO:0045321~Ativação de leucócitos	6,4	0,00179669
GO:0030098~Diferenciação de linfócitos	4,5	0,00219285
GO:0007610~Resposta comportamental à estímulos	8,2	0,00336584
GO:0046649~Ativação de linfócitos	5,4	0,00412918
GO:0001775~Ativação celular	6,4	0,00418769
GO:0006952~Resposta de defesa	9,1	0,00516057
GO:0002521~Diferenciação de leucócitos	4,5	0,0051988
GO:0042330~Taxia	4,5	0,01040075
GO:0006935~Quimiotaxia	4,5	0,01040075
GO:0034728~Organização de nucleossomo	3,6	0,01332836
GO:0030595~Quimiotaxia de leucócitos	2,7	0,01649824
GO:0060326~Quimiotaxia celular	2,7	0,01823143
GO:0046651~Proliferação de linfócitos	2,7	0,02096857

Esta tabela mostra os 15 processos biológicos mais importantes nos grupos LCL e LM baseados na lista de genes unicamente estimulados nestes grupos. De acordo o número de genes fornecidos pela lista de cada grupo, podemos observar o percentual (%) de genes participantes de cada processo biológico. Estes processos estão organizados de acordo com o valor de **P** fornecido pelo teste exato de Fisher usado pelo programa DAVID. Embora a maioria dos processos reflitam eventos da resposta imune, alguns processos não puderam ser encontrados no grupo LM. Estes processos estão destacados na lista LCL em negrito. GO = ontologia gênica

#### **4.3.4. O grupo LCL expressou mais genes envolvidos com a resposta imunológica.**

A comparação direta entre os genes expressos nos grupos LCL ( $n = 5$ ) e LM ( $n = 5$ ), sem considerar a expressão gênica da pele saudável, revelou que existem 1183 genes diferencialmente expressos e todos estão aumentados no grupo LCL. Os principais processos biológicos onde estes genes estão envolvidos encontram-se listados na tabela 4.5.

O primeiro processo biológico de importância é a resposta imunológica, com 74 genes (6,3% de 1183 genes) classificados em diferentes categorias (Tabela 4.6). Neste grupo, pôde-se encontrar transcritos de genes codificadores de citocinas, quimiocinas e respectivos inibidores. Além disso, também foram encontrados genes codificantes do complexo principal de histocompatibilidade e seus ligantes (receptores LIR), antígenos de superfície marcadores de monócitos/macrófagos, de ativação de linfócitos T e de células NK, além de grupos de genes envolvidos com transdução intracelular de sinais e ativadores de transcrição (Fig.4.7).

*Tabela 4.5: Processos biológicos cujos genes apresentam expressão diferencial na comparação LCL x LM. Todos os genes são mais expressos em LCL.*

<b>Grupo LCL (1183 genes)</b>	<b>%</b>	<b>P</b>
GO:0006955~Resposta imunológica	6,3	1,40E-006
GO:0050865~Regulação da ativação celular	2,2	4,70E-005
GO:0002694~Regulação da ativação de leucócitos	2,1	5,45E-005
GO:0051249~ Regulação da ativação de linfócitos	1,8	2,04E-004
GO:0002684~Regulação positiva do sistema imune	2,5	2,23E-004
GO:0045321~Ativação de leucócitos	2,5	2,96E-004
GO:0030036~Organização da actina no citoesqueleto	2,4	4,96E-004
GO:0002696~Regulação positiva da ativação de leucócitos	1,4	5,67E-004
GO:0051251~Regulação positiva da ativação de linfócitos	1,3	6,44E-004
GO:0007155~Adesão celular	5,4	7,89E-004
GO:0022610~Adesão biológica	5,4	8,34E-004
GO:0046649~Ativação de linfócitos	2,1	8,72E-004
GO:0008283~Proliferação celular	3,7	9,30E-004
GO:0050867~Regulação positiva da ativação celular	1,4	9,48E-004
GO:0048002~Processamento e apresentação de antígenos	0,6	0,0010729

Esta tabela mostra os 15 processos biológicos mais importantes nas lesões do grupo LCL cujos genes estão inibidos ou com expressão diminuída no grupo LM, sem considerar o limiar oferecido pela pele saudável. De acordo o número de genes fornecidos pela lista de cada grupo, podemos observar o percentual (%) de genes participantes de cada processo biológico. Estes processos estão organizados de acordo com o valor de **P** fornecido pelo teste exato de Fisher usado pelo programa DAVID. GO = ontologia gênica.

Tabela 4.6: *Categorias funcionais de genes envolvidos na resposta imunológica expressos diferencialmente entre os grupos LCL e LM.*

<b>Gene</b>	<b>Produto</b>
<b><i>Citocinas e receptores</i></b>	
IL17B	Interleucina-17, beta
IL27	Interleucina-27
IL2RA	Receptor de Interleucina-2, alfa
TGFB1	Fator transformador de crescimento beta 1
<b><i>Quimiocinas e receptores</i></b>	
CCL17	Quimiocina CC, ligante 17
CCL18	Quimiocina CC, ligante 18
CCR7	Quimiocina CC, receptor 7
CXCL16	Quimiocina CXC, ligante 16
<b><i>MHC</i></b>	
CD74	Complexo principal de histocompatibilidade, classe II, cadeia invariante (DR-gama)
CIITA	Complexo principal de histocompatibilidade, classe II, transativador tipo III
HLA-A	Complexo principal de histocompatibilidade, classe I, A
HLA-C	Complexo principal de histocompatibilidade, classe I, C
HLA-DQA1	Complexo principal de histocompatibilidade, classe II, DQ alfa 1
HLA-DQB1	Complexo principal de histocompatibilidade, classe II, DQ beta 1
HLA-DRB1	Complexo principal de histocompatibilidade, classe II, DR beta 1
HLA-G	Complexo principal de histocompatibilidade, classe I, G
HLA-H	Complexo principal de histocompatibilidade, classe I, H
<b><i>Superfamília de receptores TNF</i></b>	
CD27	Receptores da superfamília de fator de necrose tumoral, membro 7
TNFRSF1B	Receptores da superfamília de fator de necrose tumoral, membro 1B
TNFRSF4	Receptores da superfamília de fator de necrose tumoral, membro 4
<b><i>Antígenos de superfície e ligantes</i></b>	
CD14	Antígeno de diferenciação de monócitos, CD14
CD28	Antígeno de superfície de células T, glicoproteína CD28
CD4	Antígeno de superfície de células T, glicoproteína CD4
CD40LG	Ligante do antígeno CD40
SPN	Sialoglicoproteína de superfície
<b><i>Inibidores de peptidases</i></b>	
CST7	Leucocistatina
SERPING1	Inibidor de serina/cisteína proteinase
<b><i>Proteínas transmembrana</i></b>	
CD97	Receptor sete hélices transmembrana
IFITM2	Proteína transmembrana induzida por interferon 2
IFITM3	Proteína transmembrana induzida por interferon 3
TMEM173	Proteína transmembrana 173

### ***Fatores (co-)ativadores de transcrição***

BCL3	Co-ativador transcricional célula B CLL/linfoma 3
FOXJ1	Fator transcricional forkhead HFH-4
RELB	Fator transcricional RelB
TFE3	Fator transcricional E3

### ***Componentes do sistema complemento***

C1RL	Componente do complemento 1, subcomponente-like
C2	Componente do complemento 2

### ***Família das Imunoglobulinas (ou Ig-like)***

CD300LB	Receptor Ig de ativação não-clássico de células mielóides
CD96	Antígeno de ativação de célula T, aumento tardio de expressão
FCGRT	Fragmento Fc da IgG
KIR2DL1	Receptor Ig-like de células NK, 2 domínios, cauda citoplasmática longa, 1
KIR2DS2	Receptor Ig-like de células NK, 2 domínios, cauda citoplasmática longa, 2
LAIR1	Receptor 1 Ig-like associado à leucócitos
LILRA6	Receptor 6 imunoglobulina-like de leucócitos, subfamília A
LILRB1	Receptor 1 imunoglobulina-like de leucócitos, subfamília B
LILRB2	Receptor 2 imunoglobulina-like de leucócitos, subfamília B
LILRB3	Receptor 3 imunoglobulina-like de leucócitos, subfamília B
LILRB4	Receptor 4 imunoglobulina-like de leucócitos, subfamília B
LILRB5	Receptor 5 imunoglobulina-like de leucócitos, subfamília B
SEMA4D	Domínio transmembrana da imunoglobulina

### ***Transdução de sinais***

GPSM3	Modulador de sinalização 3 da proteína G
INPPL1	Inositol fosfato fosfatase-like 1
LAT	Proteína adaptadora fosfo-tirosina de 36kDa
TICAM1	Molécula adaptadora 1 do receptor Toll-like
WAS	Trombocitopenia 1

### ***Receptores (diversos)***

HRH2	Receptor de histamine H2
S1PR4	Receptor 4 esfingosina-1-fosfato

### ***Integrinas***

ITGAL	Integrina alfa L
-------	------------------

### ***Apoptose***

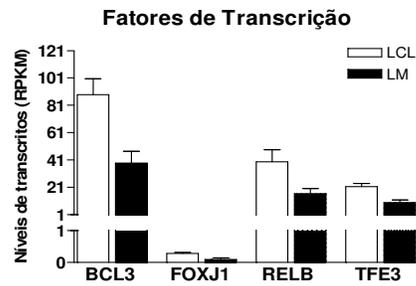
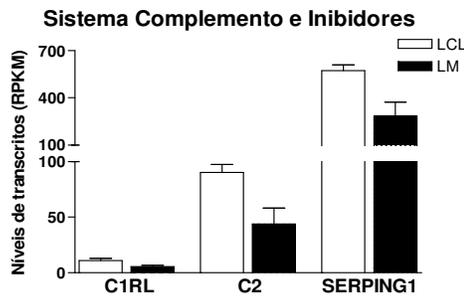
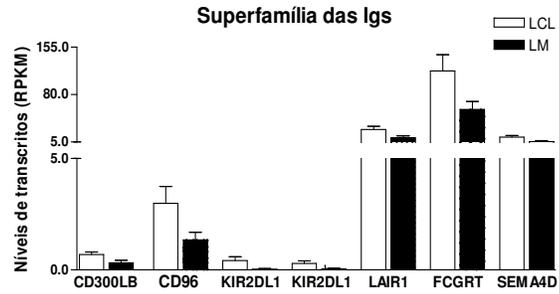
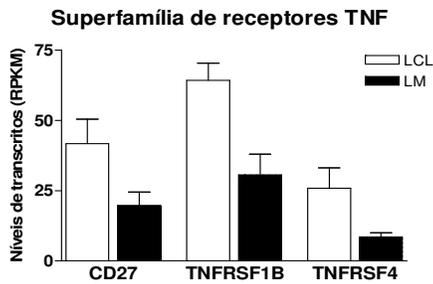
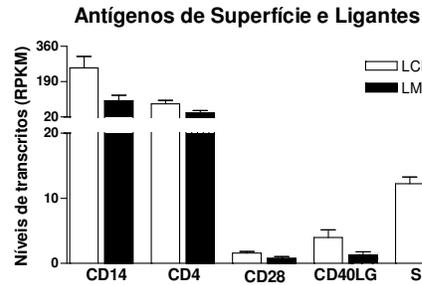
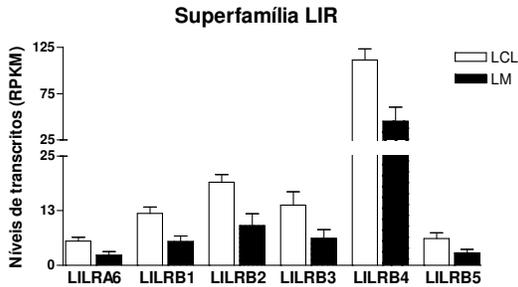
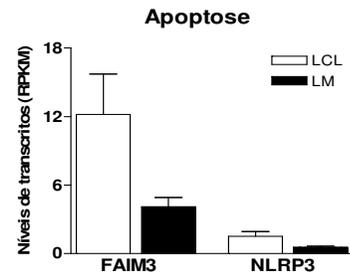
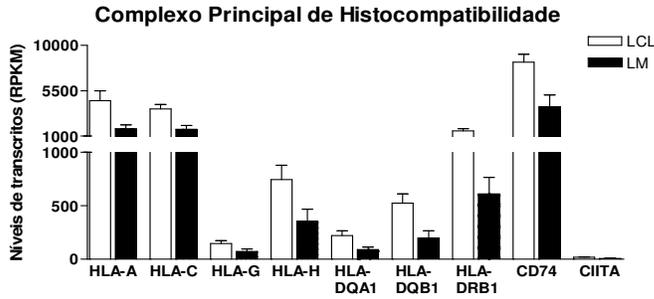
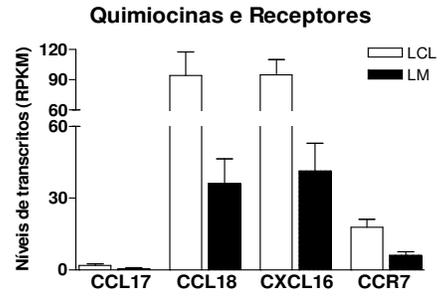
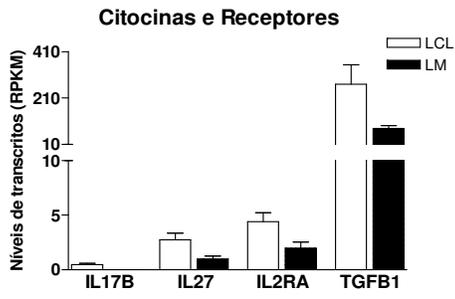
FAIM3	Molécula inibidora de apoptose Fas 3
NLRP3	Família NLR, com 3 domínios pirina

### ***Proteínas ligantes***

STXBP2	Proteína ligante de syntaxina 2
TAPBP	Tapasina - Proteína ligante de transportador associado com processamento de antígeno
TBKBP1	Proteína ligante TBK1

## ***Outros***

ERAP1	Aminopectidase do retículo endoplasmático 1
HAMP	Peptídeo antimicrobial hepcidina
ORAI1	Canal de cálcio 1 ativado pela liberação de cálcio
PRELID1	Proteína 1 contendo domínio PRELI, mitocôndria
PRG4	Fator estimulador de megacariócitos, proteoglicano 4
PTMS	Paratimosina
SBNO2	Homologo 2 de NOTCH <i>strawberry</i>
SECTM1	Proteína secretada e transmembrana 1
THBS1	Trombospodina-1
UNC13D	Homólogo D da proteína unc-13



**Figura 4.7: Grupos gênicos participantes do processo biológico GO:0006955~Resposta imunológica.** Os gráficos apresentados ilustram algumas das famílias e grupos de genes cujos transcritos foram encontrados em maiores níveis nas lesões cutâneas do grupo LCL ( $n = 5$ ) quando comparados ao grupo LM ( $n = 5$ ). Estes genes estão agrupados funcionalmente como parte da resposta imunológica de acordo com as análises realizadas pela base de dados bioinformáticos DAVID. É possível observar membros das famílias de citocinas, quimiocinas, sistema complemento, complexo principal de histocompatibilidade e ligantes. Além disso, pode-se observar a presença de imunoglobulinas (ou Ig-like), receptores TNF e LIR, diversos antígenos de superfície, fatores de transcrição, moléculas envolvidas na apoptose, entre outros genes que eram os únicos representantes de um grupo funcional (não incluídos nos gráficos acima). LCL = Leishmaniose cutânea localizada. LM = Leishmaniose mucosa.

#### **4.3.5. O grupo LM mostra deficiência em importantes atividades metabólicas.**

A análise dos genes inibidos ou silenciados no grupo LM, tanto em relação ao grupo LCL quanto à pele saudável, revelou uma lista de 346 genes.

A análise de funcionalidade indicou que estes genes são importantes para os eventos de fosforilação, regulação negativa de processos biossintéticos, angiogênese e transcrição gênica (Tabela 4.7).

De acordo com a ordem de importância fornecida pela análise através da base de dados DAVID, o evento de fosforilação é o primeiro da lista. Dos 346 genes inibidos no grupo LM, 27 (7,9%) participam do processo de fosforilação. Estes genes foram classificados quanto à sua funcionalidade como membros das famílias das cinases, fatores de transcrição e componentes da fosforilação oxidativa (Tabela 4.8, Fig.4.8).

Pode-se observar que, embora alguns genes também se encontrem com expressão diminuída no grupo LCL em comparação à pele saudável (Fig.4.8), muitos genes apresentam expressão similar em ambos os grupos (LCL e pele saudável). Este fato sugere que o grupo LM apresenta deficiência na expressão destes genes e, conseqüentemente, comprometimento de importantes vias de sinalização celular.

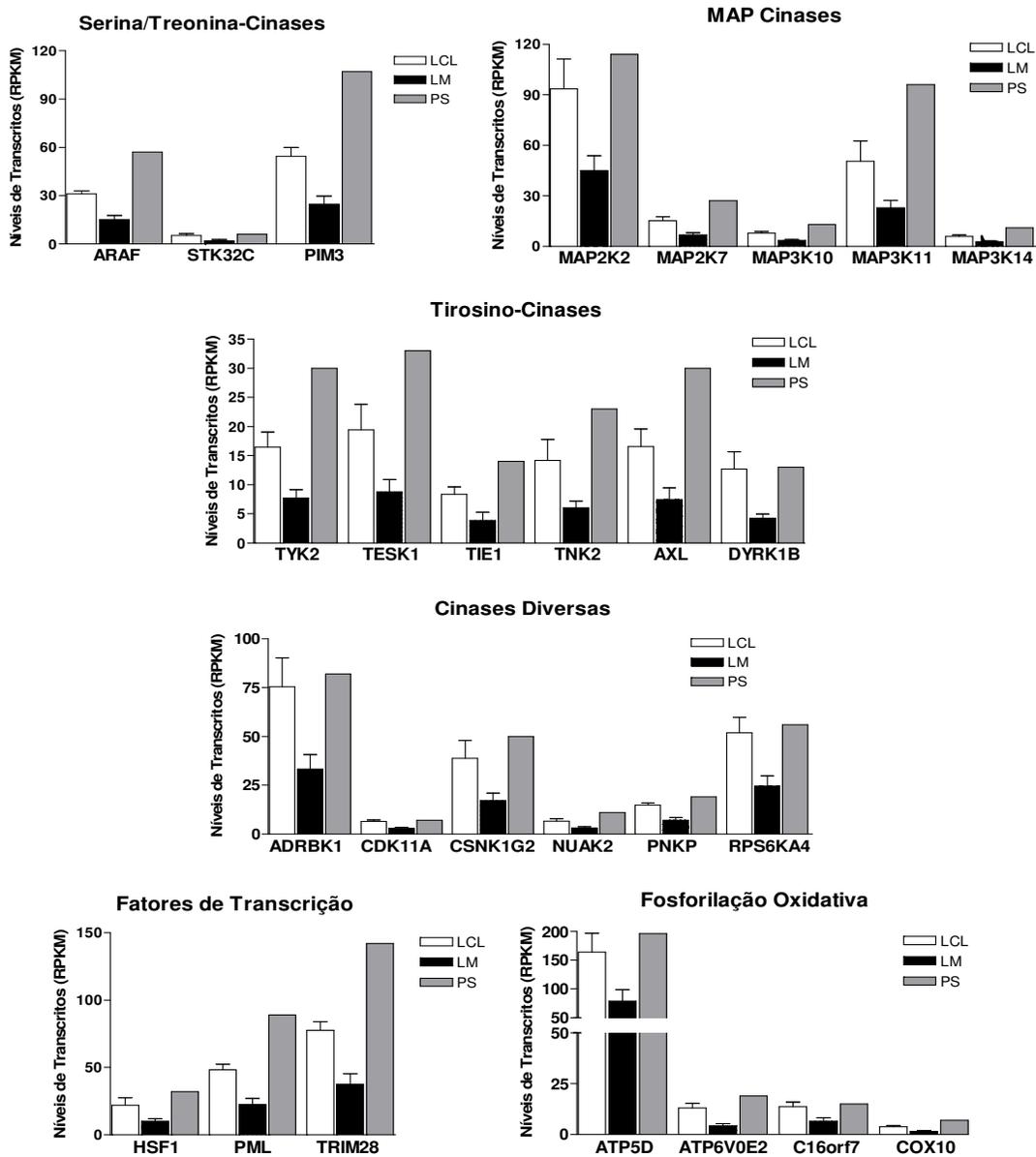
4.7: Processos biológicos inibidos no grupo LM em comparação ao grupo LCL e à pele saudável.

<b>Grupo LM (346 genes)</b>	<b>%</b>	<b>P</b>
GO:0016310~Fosforilação	7,9	0,00127992
GO:0006793~Processo metabólico do fósforo	8,8	0,00250024
GO:0006796~ Processo metabólico do fosfato	8,8	0,00250024
GO:0006468~Fosforilação dos aminoácidos de proteínas	6,4	0,00531007
GO:0031327~Regulação celular negativa de processos biosintéticos	5,2	0,01649641
GO:0009890~ Regulação negativa de processos biosintéticos	5,3	0,01998261
GO:0010558~ Regulação negativa de processos biosintéticos macromoleculares	5,0	0,02639123
GO:0016481~Regulação negativa da transcrição	4,4	0,02697725
GO:0045934~Regulação negativa do processo metabólico de nucleobases, nucleosídeos e ácidos nucleicos	4,7	0,03076641
GO:0007178~Via de sinalização pelo receptor de membrana serina/treonina	1,8	0,03211314
GO:0051172~Regulação negativa do processo metabólico de componentes de nitrogênio	4,7	0,03402725
GO:0045449~Regulação da transcrição	16,7	0,03623088
GO:0002275~Ativação de células mielóides durante a resposta imune	0,9	0,03740829
GO:0001525~Angiogênese	2,1	0,04221989
GO:0006350~Transcrição	13,8	0,04495271

Esta tabela mostra os 15 processos biológicos mais importantes que estão inibidos nas lesões do grupo LM tanto em relação ao grupo LCL quanto à pele saudável. De acordo o número de genes fornecidos pela lista de cada grupo, podemos observar o percentual (%) de genes participantes de cada processo biológico. Estes processos estão organizados de acordo com o valor de *P* fornecido pelo teste exato de Fisher usado pelo programa DAVID. GO = ontologia gênica.

Tabela 4.8: Categorias funcionais de genes envolvidos com fosforilação e inibidos no grupo LM.

<b>Genes</b>	<b>Produtos</b>
<b>Cinases</b>	
ADRBK1	Receptor beta-adrenérgico cinase-1
ARAF	Proteína serina/treonina-cinase A-Raf
AXL	Receptor tirosino-cinase AXL
CDK11A	Cinase dependente de ciclina 11A
CSNK1G2	Caseína-cinase 1, gama 2
DYRK1B	Cinase regulada por fosforilação de tirosina, duplo específica 1B
MAP2K2	Proteína cinase cinase ativada por mitógeno 2
MAP2K7	Proteína cinase cinase ativada por mitógeno 7
MAP3K10	Proteína cinase cinase cinase ativada por mitógeno 10
MAP3K11	Proteína cinase cinase cinase ativada por mitógeno 11
MAP3K14	Proteína cinase cinase cinase ativada por mitógeno 14
NUAK2	Família NUAK, cinase 2 SNF1-like
PIM3	Proteína serina/treonina-cinase pim-3
PNKP	Cinase polinucleotídica 3'-fosfatase
STK32C	Proteína serina/treonina-cinase 32C
TESK1	Cinase testículos-específico
TIE1	Tirosino-cinase com domínios Ig-like e EGF-like 1
TNK2	Tirosino-cinase, não-receptora, 2
TYK2	Tirosino-cinase 2
RPS6KA4	Proteína ribossomal cinase S6
<b>Transcrição</b>	
HSF1	Fator de transcrição <i>heat shock</i> 1
PML	Fator de transcrição PML
TRIM28	Fator intermediário de transcrição 1, beta
<b>Fosforilação Oxidativa</b>	
ATP5D	ATP sintase transportador de H <sup>+</sup> , complexo mitocondrial F1, subunidade delta
ATP6V0E2	ATPase, transportadora de H <sup>+</sup> V0 subunidade e2
C16orf7	ATP sintase, subunidade b-like
COX10	Homólogo COX10, proteína de montagem citocromo c oxidase, heme A: farnesiltransferase



**Figura 4.8: Grupos gênicos participantes do processo biológico GO:00016310~Fosforilação.** Os gráficos apresentados ilustram a expressão de alguns genes inibidos no grupo LM ( $n = 5$ ) em comparação ao grupo LCL ( $n = 5$ ) e pele fisiologicamente normal ( $n = 1$ ). O primeiro evento biológico mais importante de acordo com a lista de genes submetida à base de dados DAVID foi o processo de fosforilação. Acima, encontram-se as famílias de genes contidas neste processo biológico. Podemos encontrar diversas cinases, fatores de transcrição e diferentes componentes da fosforilação oxidativa. LCL = Leishmaniose cutânea localizada. LM = Leishmaniose mucosa. PS = Pele saudável.

## 5. DISCUSSÃO

Embora as lesões cutâneas de leishmaniose tegumentar americana (LTA) requeiram até 6 meses para atingirem a cura completa, o tratamento com antimoniais pentavalentes pode reduzir significativamente este tempo de cicatrização. Os critérios adotados para considerar as lesões cutâneas como clinicamente curadas envolvem tanto a reepitelização completa da úlcera como a regressão total da infiltração e do eritema em até 3 meses após a conclusão do esquema terapêutico (Oliveira-Neto *et al.*, 2000). O sucesso da cicatrização é, atualmente, relacionado à características imunológicas do hospedeiro, as quais devem garantir o controle da infecção por *L. braziliensis*. Entretanto, o controle da resolução da injúria tecidual é pouco compreendido. Muitos autores sugerem que tanto a atividade citotóxica exercida por células NK e CD8<sup>+</sup> quanto a sensibilidade de linfócitos a antígenos de *L. braziliensis* podem contribuir para a necrose tecidual (Titus *et al.*, 1984; Conceicao-Silva *et al.*, 1990; Machado *et al.*, 2002; Da Cruz *et al.*, 2005; Da Cruz *et al.*, 2010). O processo de necrose é um fenômeno comum às lesões de LTA e pode ser representado por múltiplos focos ou ser extenso, atingindo grandes áreas, o que resulta na formação de uma úlcera rasa ou profunda de bordas salientes e firmes e que não ultrapassa a derme (Grevelink e Lerner, 1996). Um dos objetivos de nosso trabalho foi avaliar a participação da atividade das gelatinases, conhecidamente importantes para a degradação de componentes de matrix extracelular (MEC), na extensão dos danos teciduais observados nas lesões cutâneas de leishmaniose e correlacionar este fato ao sucesso ou fracasso da cicatrização destas lesões.

Através da técnica de zimografia *in situ*, foi possível observar uma intensa atividade gelatinolítica nas áreas necróticas, na base da úlcera e, em alguns casos, no infiltrado inflamatório e granuloma em formação. Por sua atuação em processos de degradação da MEC, a exarcebação da atividade de gelatinases tem sido fortemente correlacionada com a falha na cicatrização e cronificação de úlceras de pele (Wysocki *et al.*, 1993; Weckroth *et al.*, 1996). No presente estudo, pôde-se observar que as lesões de indivíduos que responderam mal ao tratamento apresentaram intensa atividade de gelatinases, porém, baixos níveis do transcrito para MMP-2. Além disso, observou-se que lesões de pacientes que responderam bem à terapia exibiam altos valores da razão MMP-2:TIMP-2, enquanto as proporções entre MMP-9 e TIMP-1 foram similares em ambos os grupo. Isso indica que o aumento da atividade de MMP-2 pode ser benéfico para a resolução das lesões. Estes dados corroboram os achados de outros autores, os quais demonstraram que, não obstante o excesso de atividade gelatinolítica em lesões ser

prejudicial à cicatrização, a presença de níveis aumentados de atividade de MMP-2 e níveis latentes de MMP-9 favorecem o sucesso da reepitelização (Agren *et al.*, 2001).

O controle da atividade destas enzimas depende da atuação tanto dos seus inibidores naturais (TIMPs) quanto de outras proteínas, entre elas, as citocinas (Beranger *et al.*, 1994; Goetzl *et al.*, 1996). A influência das citocinas sobre a atividade das gelatinases tem sido relatada em outros processos infecciosos, como hanseníase. Nesta patologia, as lesões tuberculóides são associadas a altos níveis de mRNA para TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MMP-2 e MMP-9 e a uma intensa atividade gelatinolítica, fato não observado nas lesões lepromatosas, resultantes do pólo imunológico oposto (Teles *et al.*, 2010).

Nossos resultados mostram que na leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*, as citocinas encontradas nas lesões também apresentam correlação com os níveis de atividade gelatinolítica e com o êxito da cicatrização. Sabe-se que *in situ*, a presença deste parasita induz uma resposta inflamatória mediada por citocinas de perfil Th1 para o controle da infecção (Pirmez *et al.*, 1993). Os linfócitos com este perfil atraídos para o sítio de infecção passam a ser, juntamente com as células NK presentes, fonte de IFN- $\gamma$ , citocina considerada crucial para a resolução de úlceras cutâneas leishmanióticas (Harms *et al.*, 1989; Heinzl *et al.*, 1991; Da Cruz *et al.*, 2010). Porém, IFN- $\gamma$  também apresenta atividade “pro-teolítica” de grande impacto (Galboiz *et al.*, 2002), o que corrobora nossos achados, uma vez que lesões do grupo de má resposta exibiram tanto um elevado número de células produzindo IFN- $\gamma$  como altos níveis teciduais de atividade das gelatinases. Em adição, estas mesmas lesões apresentavam altos percentuais de células produzindo tanto TGF- $\beta$  quanto IL-10, citocinas correlacionadas com a persistência parasitária e cronicidade de lesões (Barral *et al.*, 1995; Belkaid *et al.*, 2001). Igualmente, outros autores observaram um grande número de células produzindo IL-10 e IFN- $\gamma$  em lesões mucosas recorrentes de LTA, o que sugere que a presença destas citocinas contribui para a falha terapêutica em lesões de LTA (Tuon *et al.*, 2008). A comparação das proporções de células produzindo as diferentes citocinas estudadas revelou a prevalência da citocina inflamatória IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ : TGF- $\beta$  = 2,0) nas lesões de má resposta, o que, novamente reforça a idéia de que o excesso de IFN- $\gamma$  pode ter um efeito oposto e prejudicar a cicatrização destas lesões (Ishida *et al.*, 2004). Em contraste, a preponderância de citocinas anti-inflamatórias nas lesões de boa resposta (IFN- $\gamma$ : IL-10 = 0,5) pode ser responsável pelos baixos níveis de atividade gelatinolítica observados nestas lesões. IL-10 parece ser a única dentre as linfocinas com

habilidade de suprimir a produção e ativação das MMPs, assim desempenhando importante papel de proteção à matriz durante a inflamação (Lacraz *et al.*, 1995; Stearns *et al.*, 2003).

Além da participação de linfócitos e seus produtos para a resolução da infecção, os macrófagos desempenham papel importante conjugando resposta imune inata e adaptativa. Os macrófagos são essenciais não só para o controle efetivo de diversas infecções como também para o reparo tecidual durante o processo de cicatrização (Green, 1968; Leibovich e Ross, 1975). Uma vez que representam as células hospedeiras preferenciais para a replicação de *Leishmania spp.* (Phillips *et al.*, 2010), os macrófagos podem contribuir de modo determinante para a disseminação do parasita para diferentes locais do corpo do hospedeiro vertebrado. Em casos resultantes da infecção por *L. braziliensis*, a pior consequência da emigração de macrófagos do sítio de infecção é o estabelecimento da infecção por *L. braziliensis* na mucosa oro-nasal, resultando na leishmaniose mucosa (LM).

Os mecanismos de disseminação de *L. braziliensis* são pouco estudados. Alguns autores já mostraram que fagócitos mononucleares infectados por diferentes espécies de *Leishmania* perdem sua capacidade adesiva à matriz do tecido inflamado logo após a infecção (2h-4h) por aumentarem a expressão dos receptores de quimiocinas CCR4 e CCR5 no início da infecção (Carvalho *et al.*, 2004; Pinheiro, Jr. *et al.*, 2006). CCR5 participa do estímulo à produção de MMP-9. Juntamente com CCR5 e CCL5, MMP-9 mostra-se aumentada em células com aumentada atividade migratória, servindo como marcador para células cancerígenas metastáticas (Chuang *et al.*, 2009). Os macrófagos, por sua vez, também dependem de MMP-9 para migrarem durante diferentes eventos imunológicos, além de serem capazes de emigrar a partir dos sítios inflamatórios via canais linfáticos ou vasos sanguíneos (Gerrity, 1981; Bellingan *et al.*, 1996; Tomlinson *et al.*, 2008; Gong *et al.*, 2008). Portanto, o presente trabalho procurou determinar o efeito da infecção por *L. braziliensis* sobre a produção de MMP-9 em macrófagos humanos.

Para explorar os fatores intrínsecos do hospedeiro que influenciariam a disseminação de macrófagos infectados por *L. braziliensis* e resultassem no desenvolvimento das diferentes formas clínicas de LTA, selecionamos doadores com histórico clínico prévio de LCL ou LM. Todos, porém, deveriam estar curados há pelo menos 3 anos (média = 6 anos) e sem relatos de recidivação. O uso de células provenientes de indivíduos com a doença na fase ativa foi desconsiderada a fim de evitar a influência que isso poderia causar na atividade e estado dos macrófagos *in vitro* e, conseqüentemente, na produção de MMP-9.

Nossos resultados demonstraram que a infecção por *L. braziliensis* aumenta os níveis de atividade de MMP-9 no sobrenadante das monoculturas de macrófagos humanos, sugerindo novamente que após a infecção por *Leishmania*, estas células recebem estímulo para migrar. Macrófagos infectados ou estimulados por diversos agentes patogênicos também produzem MMP-9, o que auxiliaria o funcionamento eficaz do sistema imunológico (Goetzl *et al.*, 1996; Rivera-Marrero *et al.*, 2000; Quiding-Jarbrink *et al.*, 2001; Rivera-Marrero *et al.*, 2002).

Por outro lado, isso inclui os macrófagos como importante fonte de gelatinases no sítio de infecção. E como exposto anteriormente, a presença da atividade destas enzimas contribui para a típica injúria tecidual observada nas lesões cutâneas de LTA (Maretti-Mira *et al.*, 2011). Em modelo murino de leishmaniose visceral, já foi observado que os macrófagos também representam fonte de MMP-9 quando infectados por *L. chagasi*. Desta forma, estas células participariam dos danos causados aos hepatócitos durante a evolução da doença (Costa *et al.*, 2008)

A migração de células infectadas por *L. braziliensis* é relatada como um evento comum a todos os indivíduos infectados. É possível encontrar kDNA de *Leishmania (Viannia) spp.* tanto na mucosa de indivíduos com lesões cutâneas ativas, porém sem sintomas de lesões mucosas, quanto no sangue de indivíduos na fase ativa da doença ou já curados (de Oliveira *et al.*, 2006; Figueroa *et al.*, 2009). Entretanto, nossos achados claramente indicam que macrófagos de indivíduos que desenvolveram diferentes formas clínicas de LTA apresentam diferentes padrões na produção e ativação de MMP-9 *in vitro*. Amostras do grupo LM apresentaram níveis aumentados de atividade de MMP-9 no sobrenadante das culturas antes e depois da infecção por *L. braziliensis* quando comparadas às amostras do grupo LCL, indicando que indivíduos do grupo LM apresentam, naturalmente, um limiar mais elevado para atividade de MMP-9. Além disso, a ativação de MMP-9 por macrófagos deste grupo parece sofrer maior influência da infecção por *L. braziliensis*, pois LM é o único grupo que apresenta evidente aumento da atividade de MMP-9 depois de submetido à infecção. Embora não testados diretamente, estes resultados fortemente sugerem que os macrófagos de indivíduos propensos a desenvolver LM têm acentuada capacidade migratória. Por outro lado, estes resultados também indicam que macrófagos de indivíduos que desenvolvem apenas a forma cutânea de LTA, devido aos baixos níveis de atividade de MMP-9, limitam a presença de *L. braziliensis* ao sítio inicial de entrada, controlando e efetivamente resolvendo a infecção.

Embora os ensaios *in vitro* possam trazer certos esclarecimentos sobre a relação parasita-hospedeiro, as análises *in vivo* permitem a consideração da complexidade biológica desta

interação. Na leishmaniose, a lesão cutânea primária é o local onde se estabelece o primeiro contato entre parasita e hospedeiro. Muitos autores concordam com o fato de que no sítio primário da infecção são encontrados os fatores que direcionam a evolução da doença, seja para a cura espontânea, para uma boa ou má resposta à terapia, seja para formação das lesões mucosas (Locksley *et al.*, 1987; Pirmez, 1992; Pirmez *et al.*, 1993; Antonelli *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2009). O estudo do microambiente da lesão cutânea primária pode, desta forma, indicar quais interações e produtos celulares estão envolvidos na persistência parasitária e na disseminação de células infectadas com amastigotas ainda viáveis para fora do sítio inicial de infecção.

Diversas ferramentas podem ser usadas para este tipo de análise. Estudos genéticos vêm sendo aplicados com cada vez mais frequência em diversas doenças para que sejam determinados polimorfismos de genes importantes na resposta imunológica, ou ainda, qual a modulação que a expressão gênica sofre perante a infecção com diferentes agentes patológicos que resultem na recuperação completa ou na cronificação da doença.

O estudo da expressão gênica em larga escala representa uma importante ferramenta para a determinação de vias metabólicas relevantes para determinados processos biológicos. Nos últimos anos, a técnica de *RNA-sequencing* (*RNA-seq*) tem possibilitado o estudo do transcriptoma de diferentes organismos (Mortazavi *et al.*, 2008). Esta técnica apresenta algumas modificações em sua execução de acordo com a plataforma de escolha, as quais podem ser: 454 (Roche), Solexa (Illumina) e SoliD (Applied Biosystems) (Margulies *et al.*, 2005; Bennett *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2008).

A plataforma utilizada para o presente trabalho é a da Illumina, a qual utiliza um sequenciamento paralelo e massivo do tipo Sanger para sequenciar simultaneamente milhões de pequenos fragmentos de DNA. Em cada ciclo, oito bibliotecas de cDNA podem ser sequenciadas independentemente em diferentes raias da mesma célula de fluxo, gerando muitos milhões de *short reads*, de 40 pares de base. Do sequenciamento realizado, são coletadas imagens que posteriormente são digitalizadas e transformadas em dados numéricos que indicam o número de leituras realizado em cada fragmento do genoma. Estas leituras são então alinhadas com o genoma-alvo e podem ser classificadas em genes utilizando-se diferentes tipos de softwares (Marioni *et al.*, 2008; Nagalakshmi *et al.*, 2010). Desta forma, além de ser possível obter a quantificação dos transcritos dos genes anotados, também se pode identificar novos transcritos, sendo este um instrumento de grande valia para o conhecimento do transcriptoma completo de dado organismo e para a detecção de mutações ou fusões gênicas derivadas de diferentes patologias (Levin *et al.*, 2009).

A técnica de RNA-seq foi aplicada às lesões cutâneas primárias de indivíduos que curaram completamente (LCL) e de indivíduos que, meses ou anos após a cura clínica desta lesão cutânea, desenvolveram lesões na região da mucosa oro-nasal (LM). Os resultados obtidos pelo sequenciamento englobaram a análise de 22.145 genes humanos e 8.315 genes de *L. braziliensis*.

Utilizando esta técnica, pôde-se distinguir os transcritos produzidos pelo hospedeiro e pelo parasita. Infelizmente, as amastigotas de *L. braziliensis* foram encontradas em pouco número nas lesões, o que prejudicou a análise do transcriptoma deste parasita quando em contato com o hospedeiro. A grande maioria dos genes de *L. braziliensis* que apresentaram diferença quanto à expressão gênica, comparando os grupos LCL e LM, estão correlacionados com o processo de tradução de proteínas, possivelmente indicando que o parasita está em plena atividade metabólica. Considerando que estes transcritos foram detectados em maiores níveis no grupo LCL, pode-se supor que os parasitas das lesões do grupo LM estão em estado latente, o que auxiliaria a persistência parasitária nestas lesões.

Para as análises dos níveis de transcritos detectados no microambiente das lesões, usamos um limiar de expressão gênica normal estabelecido pelo uso de dados obtidos com pele saudável. Os dados revelaram que a infecção por *L. braziliensis* é capaz de estimular a resposta imunológica do organismo hospedeiro. Entretanto, diferenças puderam ser observadas quanto à forma clínica de LTA. Indivíduos que curaram as lesões cutâneas e não reativaram a doença apresentam aparentemente uma resposta imunológica mais eficiente do que os indivíduos que desenvolveram LM depois da cura da lesão cutânea primária. Este fato foi evidenciado pelos processos biológicos nos quais os genes com maiores níveis de transcritos faziam parte. O grupo LCL apresentou genes envolvidos com o processamento e a apresentação de antígenos, genes estes que se encontram inibidos ou são pouco expressos no grupo LM, assim como genes responsáveis pela modulação da resposta imunológica adaptativa.

Uma observação já feita por alguns autores é a presença de células de diferentes perfis imunológicos nas lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* (Pirmez *et al.*, 1993; Salhi *et al.*, 2008). O mesmo foi observado em nossas amostras, inclusive nas amostras do grupo LCL, o qual apresentou completa resolução da úlcera e, possivelmente, da infecção. Diferentes fatores imunológicos cujos transcritos foram encontrados em maiores níveis no microambiente das lesões do grupo LCL indicam que este grupo desenvolve, predominantemente, resposta imune do tipo Th1. O maior indicador é a presença de IL-27. Esta citocina tem funções ambíguas, pois, ao mesmo tempo em que é crucial para o direcionamento de células T CD4<sup>+</sup> *naïve* para o perfil

Th1, estimula células T CD4<sup>+</sup> a produzir IL-10. Além disso, IL-27 inibe c-Fos e reduz a expressão de NF-Atc1, fator de transcrição de diversas citocinas pro-inflamatórias (Yoshida *et al.*, 2009). Assim, IL-27 atua como iniciador e atenuador da resposta imune, o que garante uma resposta eficaz porém, sem danos excessivos. Alguns autores sugerem que IL-27 seja importante para desencadear a resposta Th1 em pacientes infectados com *L. braziliensis* e que desenvolveram a doença (Novoa *et al.*, 2011). Nossos resultados mostram que, além de serem importantes para o direcionamento da resposta imune para o perfil Th1, baixos níveis desta citocina contribuem para o desenvolvimento da forma mucosa de LTA. Além de IL-27, CXCL16 também participa da resposta Th1, uma vez que, quando solúvel no meio, atua na quimioatração de linfócitos Th1, células T citotóxicas 1, células *natural killer* (NK), macrófagos e neutrófilos para o sítio de inflamação (Kim *et al.*, 2001; Motsinger *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2009; Woehrl *et al.*, 2010). A participação de CD40L também auxilia no estabelecimento de resposta imune Th1. A interação CD40/CD40L é importante na diferenciação de células T, uma vez que aumenta a expressão de IL-12 em células apresentadoras de antígenos (APCs), direcionando a resposta imune para o perfil Th1, o que auxilia na eliminação intracelular de *Leishmania* (Foy *et al.*, 1996).

Embora seja possível detectar IL-17B nas lesões LCL, não acreditamos que haja o desenvolvimento da resposta imune Th17, uma vez que a simples presença de IL-27 é capaz de suprimir a diferenciação deste tipo celular (Yoshida *et al.*, 2009). Certamente, a presença de IL-17B está correlacionada com os altos níveis de TGF- $\beta$  encontradas no mesmo grupo, uma vez que este fator de crescimento induz a expressão desta citocina (Moseley *et al.*, 2003). Alguns autores defendem a participação negativa da família IL-17 na patologia da leishmaniose, seja por induzir camundongos resistentes à susceptibilidade na infecção por *L. major*, ou por ser detectada em altos níveis em lesões mucosas de LTA (Bacellar *et al.*, 2009; Lopez *et al.*, 2009). Entretanto, outros autores sugerem a participação benéfica desta citocina, pois lesões de cura espontânea causadas por *L. braziliensis* em camundongos foram correlacionadas à expansão do número de células TCD4<sup>+</sup> produzindo IFN- $\gamma$  e IL-17 (Vargas-Inc *et al.*, 2008). Em nosso estudo, como não foi possível detectar IL-17B nas lesões do grupo LM, sugerimos que esta citocina contribua de forma favorável para a resolução da infecção por *L. braziliensis*, atuando no estímulo à produção de outras citocinas pro-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e promovendo a migração de neutrófilos (Pappu *et al.*, 2010).

Os indícios da regulação da resposta imunológica em lesões LCL são evidenciados pelo elevado número de transcritos para CD4, CD25 (IL-2RA) e TGF- $\beta$ 1, o que poderia indicar a presença de células T regulatórias (Treg) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nestas lesões. A interação IL-2/IL-2R é fundamental para o desenvolvimento, homeostase e função de células Treg Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Wang *et al.*, 2009). IL-2RA é uma das subunidades do receptor IL-2R e não pode ser detectado na maioria das células linfóides. A expressão de IL-2RA é alta tanto em células T *naïve* durante sua ativação quanto em células Treg Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturais (Malek, 2008). A presença de IL-2 ou de TGF- $\beta$ 1 é requerida para induzir a expressão de IL-2RA em células Treg (Kim *et al.*, 2005). A atuação das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no desenvolvimento de lesões leishmanióticas é controversa, pois se por um lado a presença de tais tipos celulares levaria à persistência parasitária por serem imunossupressoras, por outro lado beneficiaria o hospedeiro por evitar a exarcebação da resposta imune (Belkaid, 2003). Recentemente foi mostrado que a presença de células Treg em lesões causadas por *L. braziliensis* aumenta concomitantemente com a resolução da úlcera (de Campos *et al.*, 2010). No presente estudo, a presença destas células seria associada com a cura satisfatória de lesões, enquanto a ausência deste tipo celular estaria relacionada com a evolução para LM. Além disso, a presença de CCL18 promoveria condições tolerigênicas, limitando assim a geração de uma resposta inflamatória descontrolada e atraindo para o local da inflamação células T CD4<sup>+</sup> *naïve* e células dendríticas (DCs) imaturas (Vulcano *et al.*, 2003). Porém, CCL18 não atua em células não-linfóides, como monócitos e granulócitos (van Lieshout *et al.*, 2006).

A participação de linfócitos Th2 é indicada pela presença de CCL17, TNFRSF4 e ITGAL. CCL-17 é importante para a atração de linfócitos Th2, Treg e de DCs (Sallusto *et al.*, 1998; Imai *et al.*, 1999; Cavassani *et al.*, 2006). Já foi observado em *hamsters* que esta quimiocina é modulada pela infecção por *L. panamensis*, uma vez que maiores níveis de mRNA para CCL17 foram detectados tanto na pele infectada quanto nos linfonodos drenantes dos animais infectados quando comparados ao grupo controle (Espitia *et al.*, 2010). A integrina ITGAL (CD11a) é essencial no direcionamento de células Th2 produtoras de IL-4 para os sítios de inflamação (Lee *et al.*, 2008). A expressão desta integrina foi detectada em células T CD4<sup>+</sup> com perfil Th2 localizadas no sangue periférico de pacientes no estágio inicial de leishmaniose, indicando o direcionamento destas células dos linfonodos locais para o sítio de infecção (Costa *et al.*, 2003). Além de moléculas ligadas à migração, também é possível detectar altos níveis do receptor de TNF TNFRSF4 (OX40), o qual é correlacionado com o desenvolvimento da resposta

imune Th2. Estudos em camundongos BALB/c infectados com *L. major* mostram que, ao ser inibido o ligante de OX40, há recuperação parcial das lesões, a qual não é completa por existir persistência de parasitas. Porém, a inibição deste receptor não resulta no desenvolvimento da resposta Th1 (Akiba *et al.*, 2000).

Outros fatores imunológicos também são importantes para a iniciação e estabelecimento da resposta imune adaptativa. CCR7 é altamente expresso por DCs maduras bem como por células T *naïve*, de memória e regulatórias, servindo para orientar e posicionar estas células nos órgãos linfóides secundários (Sallusto *et al.*, 1999; Menning *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2007; Hopken *et al.*, 2010). CCR7, bem como a quimiocina CCL17, participam da migração de DCs para órgãos linfóides secundários, tanto em condições inflamatórias quanto em condições normais (Xin *et al.*, 2009; Stutte *et al.*, 2010). Alguns autores já demonstraram que DCs infectadas *in vitro* por *L. major* exibiram aumento da expressão de CCR7 e aumento da atividade migratória em resposta à CCL21, quimiocina ligante de CCR7, o que indica que estas células são recrutadas para os órgãos linfóides secundários (Steigerwald e Moll, 2005). Por outro lado, DCs isoladas de baço de camundongos cronicamente infectados com *L. donovani* diminuem a densidade de CCR7 e sua atividade migratória, o que contribui para o desenvolvimento da leishmaniose visceral (Ato *et al.*, 2002). A recirculação de linfócitos e extravasamento de leucócitos de sítios inflamatórios depende tanto de CCR7 quanto de ITGAL. Além disso, ITGAL participa da ativação de linfócitos T e da sinapse imunológica (Dustin e Springer, 1989; Van Seventer *et al.*, 1990; Grakoui *et al.*, 1999).

Os receptores de TNF encontrados nas amostras no grupo LCL também participam do estabelecimento da resposta imune. CD27 (TNFRSF7) é muito importante para geração de resposta imune baseada em células T e para a formação de memória imunológica (Hendriks *et al.*, 2000; Nolte *et al.*, 2009). A baixa expressão deste receptor é associada à persistência da infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, vírus da hepatite C e *Trypanosoma cruzi* (Jiang *et al.*, 2010; Mizuochi *et al.*, 2010; Albareda *et al.*, 2010). O receptor do tipo II de TNF (TNFRSF1B) também participa do estabelecimento de uma resposta imune eficaz e é apenas expresso em certas subpopulações de células imunológicas e em outros poucos tipos celulares. TNFRII atua, principalmente, na proliferação e sobrevivência de células T por promover a entrada de NF- $\kappa$ B no núcleo e expressar genes pró-sobrevivência celular (Faustman e Davis, 2010). Entretanto, alguns trabalhos indicam que este receptor não é necessário para a resolução da infecção por *L. major* (Derouich-Guergour *et al.*, 2001).

A apresentação de antígenos parece ser um processo biológico de grande importância nas lesões LCL, uma vez que este grupo apresenta alta expressão de diversos membros do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) tanto de classe I (MHC-I) quanto de classe II (MHC-II). MHC-I apresenta antígenos externos para células T citotóxicas enquanto MHC-II apresenta antígenos externos para células T *helper* (Kaslow e Shaw, 1981). Portanto, a presença de elevados níveis de transcritos para CD4 conjugada com a grande quantidade de MHC-II indica uma resposta imunológica direcionada pela interação entre células T *helper* e células apresentadoras de antígenos (APC) no grupo LCL. Sabe-se que uma das estratégias que a *Leishmania spp.* usa para escapar do sistema imune é a inibição da expressão de MHC-II nos macrófagos que este parasita coloniza (Ho *et al.*, 1994; Lang *et al.*, 2000). Esta inibição resulta em uma resposta imune deficiente, onde a atividade anti-inflamatória é reduzida, não há ativação de células T e, conseqüentemente, não há produção de IFN- $\gamma$ . Desta forma, a participação do MHC fica evidente na patologia da LTA.

Embora ambas as classes de MHC sejam encontradas nas amostras, aparentemente, somente MHC-II desempenha papel importante no combate à infecção por *Leishmania spp.* Em modelo murino, já foi visto que camundongos deficientes para  $\beta$ 2-microglobulina, os quais não expressam MHC-I ou células TCD8<sup>+</sup>, conseguem controlar perfeitamente a infecção, tal qual os camundongos normais. Entretanto, camundongos deficientes para MHC-II desenvolvem uma infecção fatal (Locksley *et al.*, 1995). Da mesma forma, outros autores sugerem a participação de determinados alelos de HLA-DR (MHC-II) no desenvolvimento de resposta imune eficaz contra infecção por *L. panamensis* e na resistência ao desenvolvimento da forma mucosa da LTA (Petzl-Erler *et al.*, 1991; Delgado *et al.*, 2003). Ademais, durante o processo de cura de lesões leishmanióticas, o número de células positivas para HLA-DR aumenta expressivamente, tanto *in situ* quanto sistemicamente, indicando, mais uma vez a atuação positiva destes receptores na resolução de LTA (Haas *et al.*, 2002). Entretanto, CD74 (HLA-DG) não apresenta participação tão positiva na leishmaniose. Observou-se que a interação entre a proteína de *L. major* Lm1740MIF, ortóloga ao fator de inibição de migração (MIF), e macrófagos ativa CD74 (receptor de MIF), protegendo estes fagócitos da apoptose e auxiliando o parasita a evadir o sistema imune (Kamir *et al.*, 2008).

Entre os membros do complexo MHC-I encontrados no grupo LCL, apenas HLA-G já foi correlacionado diretamente com leishmaniose. HLA-G tem efeitos tolerogênicos e seu aumento

no plasma de indivíduos com leishmaniose visceral é relacionado com a resistência parasitária (Le Friec *et al.*, 2003; Donaghy *et al.*, 2007).

Além da expressão de MHC-II, foi possível detectar nas amostras transcritos de CIITA, o qual pertence a uma família de genes induzidos por IFN- $\gamma$  e regula a expressão constitutiva e induzível de MHC-II. Muitos estudos indicam que CIITA pode ser inibida ou estimulada durante a infecção com determinados agentes patogênicos (Accolla *et al.*, 2001). Nossos resultados sugerem que a expressão de MHC-II nas lesões de LTA correlaciona-se diretamente com a expressão de CIITA.

A presença de CD28 no grupo LCL auxilia o estabelecimento da resposta imune a partir da apresentação de antígenos. CD28 é uma molécula co-estimuladora localizada na superfície de células T e que interage com B7-1 e B7-2 na superfície de APCs. Sua atividade resulta na proliferação das células T, produção de IL-2, prevenção de anergia e produção do fator anti-apoptótico Bcl-x<sub>L</sub>, além de auxiliar no direcionamento da migração de células T para os sítios inflamatórios. Este antígeno também desempenha importante papel na diferenciação de células B e na produção de anticorpos (Bour-Jordan e Blueston, 2002). A interação CD28/B7 é importante para a resistência murina contra infecção por *L.major* (Corry *et al.*, 1994). O bloqueio desta interação em PBMCs de pacientes com leishmaniose cutânea é capaz de inibir a produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10, mostrando que esta interação é importante para a resposta imune contra *Leishmania* (Favali *et al.*, 2005).

A habilidade para reconhecer MHC não é apenas dos linfócitos T. As próprias APCs respondem às moléculas MHC-I clássicas e à não-clássica HLA-G utilizando membros da família de receptores de leucócitos Ig-like (LILR) (Shiroishi *et al.*, 2003). Estes receptores influenciam tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo e induzem à imunotolerância. LILRs são predominantemente expressos em células mielomonocíticas e em células B, mas, em geral, todas as células do sistema imune apresentam pelo menos um membro desta família (Brown *et al.*, 2004). Esta família pode ser dividida em duas subfamílias: LILRA, composta por membros com atividade estimulatória; e LILRB, composta por membros com atividade inibitória (Nakajima *et al.*, 1999). Embora os estudos das funções de LILRs estejam muito no início, é possível perceber sua importante participação no desenvolvimento de patologias que envolvam desde uma atividade excessiva da resposta imunológica até situações em que o sistema imune responda de modo ineficiente a diferentes tipos de infecções (Anderson e Allen, 2009).

Em nossos resultados, observamos que lesões de pacientes que curaram completamente apresentam transcritos para 5 membros da subfamília LILRB e apenas um membro da subfamília LILRA. LILRB tem efeito imunossupressor. Poucos membros desta subfamília já foram bem estudados. Quando LILRB1 é estimulado, há a inibição da proliferação antígeno-específica de células T, aumento da produção de IL-10 e TGF- $\beta$  e diminuição da produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  (Kuroki *et al.*, 2005). LILRB2 tem sido relacionado à disfunção de células dendríticas quando altos níveis de HLA-G solúveis estejam presentes (Huang *et al.*, 2010). ILIRB4, por sua vez, mostra-se importante na determinação de qual caminho a resposta imune terá: defesa ou tolerância. Este receptor atua na conversão de DCs e macrófagos de APCs para células tolerigênicas (Chang *et al.*, 2002). Desta forma, a presença de Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> não se torna necessária para a supressão das células dendríticas. Além disso, quando células T *helper* CD4<sup>+</sup> são estimulados por LILRB4 localizados na superfície de células dendríticas, estes linfócitos se diferenciam em Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Thomas *et al.*, 2010).

A presença de transcritos para outros tipos de receptores, no grupo LCL, indica que existe também controle sobre a atividade de células NK. Os receptores de NK Ig-like (KIR) controlam positiva (subfamília S) ou negativamente (subfamília L) a citotoxicidade das células NK ao interagirem com HLA-A, B ou C (Andersson *et al.*, 2010). Nossos resultados mostram que apenas um membro de cada subfamília foi detectado em elevados níveis no grupo LCL. KIR2DL1 tem alta afinidade por HLA-C2, inibindo a atividade citotóxica de NK contra células expressando este MHC-I. Já KIR2DS2 reconhece HLA-C1, ativando a citotoxicidade de NK contra células expressando este receptor (Purdy e Campbell, 2009). Além da família KIR, o receptor CD96 (TACTILE) também modula a atividade de células NK. Este receptor, que faz parte da superfamília das imunoglobulinas, é um co-estimulante expresso na superfície de linfócitos citotóxicos, promovendo a adesão com a célula-alvo (expressando CD155) e aumentando a capacidade citolítica das células NK e citotóxicas (Stanietsky e Mandelboim, 2010). A participação destes moduladores (LILR, KIR e CD96) ainda não foi descrita na leishmaniose, mas reforça a idéia de desenvolvimento de resposta imune eficaz, porém, moderada.

Nas lesões do grupo LCL, o elevado número de transcritos para CD14 indica grande número de monócitos no sítio inflamatório, os quais poderão se diferenciar em macrófagos ou células dendríticas (Seta e Kuwana, 2010). A presença de SPN (CD43), por sua vez, é detectada em monócitos maduros e é associada com a diferenciação de DCs (Corinti *et al.*, 1999;

Sunderkotter *et al.*, 2004). A presença de transcritos para ambos antígenos sugere a presença de DCs em maior número nas lesões de LCL em comparação com o grupo LM. Além disso, a presença de altos níveis de transcritos para RELB pode indicar amadurecimento de células dendríticas. Este processo é marcado pelo translocamento nuclear do fator de transcrição RelB, fato evidente em células dendríticas infectadas por *L. donovani* (Ghosh *et al.*, 2006). O aumento da expressão deste fator de transcrição nas amostras LCL pode ser mais um indicativo da diferenciação de monócitos em células dendríticas nestas lesões.

Desta forma, sugere-se que o grupo LCL apresenta resposta imune predominantemente Th1, porém com presença de células Th2 e regulação por diversos fatores, incluindo células Treg. O baixo número de transcritos para os genes envolvidos neste processo no grupo LM indica a importância destes genes para a resolução da infecção por *L. braziliensis* e para a manutenção da imunidade contra este parasita, não permitindo o aparecimento de lesões na mucosa oro-nasal.

É evidente a deficiência da expressão de vários grupos gênicos nas lesões cutâneas primárias de indivíduos que, após a cicatrização desta lesão, desenvolveram a forma mucosa de LTA. Quando comparados à pele normal, pôde-se observar que este grupo apresentou somente a expressão diferencial de 568 genes, enquanto o grupo LCL apresentou o dobro (1169 genes). Além disso, o grupo LM apresentou inibição da transcrição de genes importantes para o processo de sinalização intracelular, de transcrição gênica e de angiogênese. Sabe-se que a angiogênese é um dos processos cruciais para a regeneração tecidual, uma vez que o oxigênio é requerido para quase todas as etapas da cicatrização (Schreml *et al.*, 2010).

Alguns autores já mostraram que a infecção por *Leishmania* pode inibir as vias fosforilativas de sinalização JAK/STAT e MAPK de macrófagos hospedeiros, alterando assim a capacidade de apresentação de antígenos e de produção de citocinas (Gregory e Olivier, 2005; Olivier *et al.*, 2005). Entretanto, nenhuma das cinases inibidas no grupo LM tem sido associada à leishmaniose. Em geral, dentro do grupo das cinases cujos transcritos estavam em baixa quantidade, temos algumas que já foram descritas como envolvidas no processo de migração (ADRBK1, AXL e DYRK1B), de adesão celular (NUAK2), e de fagocitose (ARAF, AXL e MAP2K2) (Downey *et al.*, 1998; Graham e Clark-Curtiss, 1999; Korshunov *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2006; Seitz *et al.*, 2007; Penela *et al.*, 2008; Zagorska *et al.*, 2010). Também temos cinases descritas como envolvidas no processo desencadeador da reação inflamatória (MAP2K7 e PIM3) e anti-inflamatória (TNK2, TYK2 e RPS6KA4) (Petit-Bertron *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2003; Papa *et al.*, 2004; Ananieva *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010). Além disso, a baixa expressão

de algumas MAP cinases (MAP3Ks, MAP2K7) necessárias para que a célula responda a determinadas citocinas, ao estresse celular e a fatores de crescimento também pode contribuir para a deficiência que o grupo LM apresenta nos eventos participantes da resposta imune contra a infecção por *L. braziliensis* (Rincon *et al.*, 2000).

## 6. CONCLUSÕES

### 6.1. ETAPA 1: Avaliação da participação das gelatinases na falha à resposta ao tratamento.

1. A participação da atividade das gelatinases em danos da pele nas lesões de LTA foi sugerida pela detecção de atividade gelatinolítica em áreas necróticas, na base da úlcera e no infiltrado inflamatório.
2. A contribuição das gelatinases na falha da terapia nas lesões cutâneas de LTA foi indicada (i) pela extensa presença de atividade gelatinolítica associada a um elevado número de células produzindo IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e IL-10 nas lesões de má resposta; (ii) pelo aumento do nível de mRNA para MMP-2 e elevados valores da razão MMP-2:TIMP-2 observados nas lesões de boa resposta; (iii) pela preponderância da citocina pró-teolítica IFN- $\gamma$  nas lesões de má resposta; e (iv) pela prevalência da citocina anti-inflamatória IL-10 associada aos baixos níveis de atividade gelatinolítica observada nas lesões de boa resposta.
3. Conclusão: O perfil imunológico em resposta à LTA é estabelecido logo no início da infecção e pode influenciar diretamente os padrões de atividade das gelatinases nas lesões cutâneas de LTA. O balanço entre MMPs e TIMPs resultante do repertório de citocinas apresentados no sítio inflamatório pode, por fim, determinar o sucesso ou o fracasso do processo de cicatrização durante a terapia com antimoniais para a leishmaniose.

## **6.2. ETAPA 2: Avaliação do envolvimento de MMP-9 no desenvolvimento da forma mucosa de LTA.**

1. A infecção por *L. braziliensis* induz o aumento de atividade de MMP-9 nos sobrenadantes de culturas de macrófagos humanos, indicando que este tipo celular é uma das principais fontes de MMP-9 que contribue para os danos teciduais observados nas lesões cutâneas de LTA.
2. A alta capacidade gelatinolítica observada nas amostras do grupo LM, especialmente após a infecção, sugere que os macrófagos destes indivíduos teriam maior predisposição para emigrar do sítio inicial de infecção.
3. Conclusão: Existe uma diferença fundamental na imunidade inata do hospedeiro, onde MMP-9 pode desempenhar um fator direcionador do comportamento migratório de macrófagos humanos durante um processo infeccioso. A capacidade intrínseca de cada indivíduo para ativação de MMP-9 pode influenciar a intensidade de efluxo de macrófagos e disseminação da infecção por *L. braziliensis* para diferentes sítios anatômicos. Embora outros fatores moduladores da resposta imune certamente controlem a progressão para LM, MMP-9 pode representar um biomarcador para prognosticar o risco aumentado de disseminação do parasita e desenvolvimento da leishmaniose mucosa.

### **6.3. ETAPA 3: Determinação dos complexos gênicos envolvidos na susceptibilidade à LM.**

1. Com a técnica de *RNA-seq* foi possível detectar a presença de *L. braziliensis* em lesões cutâneas primárias de LTA. Os genes deste parasita com expressão diferencial foram detectados em maiores níveis no grupo LCL e encontram-se, basicamente, relacionados ao processo de tradução, o que indicaria maior atividade celular parasitária.
2. A comparação dos transcriptomas obtidos do microambiente da pele em estado fisiológico normal e de lesões de LTA indicou que a infecção por *L. braziliensis* estimula a expressão de genes relacionados à resposta de defesa do hospedeiro. O grupo LCL apresenta mais genes envolvidos neste processo do que o grupo LM.
3. Os indivíduos do grupo LCL apresentam genes envolvidos na resposta imunológica que indicam a participação de células Th1, Th2 e Tregs. Além disso, foi possível detectar diversos fatores indicando o processamento e apresentação de antígenos e estabelecimento da resposta imune adaptativa. Estes processos biológicos estão inibidos no grupo LM.
4. Os indivíduos do grupo LM apresentam expressão abaixo do normal de genes envolvidos com a fosforilação que podem influenciar o estabelecimento de uma resposta imune eficiente.
5. Conclusão: Utilizando a técnica de RNA-seq, os fatores inerentes ao hospedeiro tiveram mais peso na determinação da forma clínica de LTA do que os fatores do parasita. Entretanto, sugere-se que os parasitas encontrados nas lesões do grupo LM, por apresentarem menor atividade celular, estejam silenciados, o que pode contribuir para a persistência parasitária. Sugerimos que uma atividade imune satisfatória contra *L. braziliensis* deva ter características imunotolerigênicas e envolver a participação de células Th1 e Th2. Também sugerimos que o grupo LM apresenta baixa atividade imunológica e que a deficiência de fatores relacionados aos sistemas imune inato e adaptativo, detectada neste estudo, pode servir como indicador de futura evolução para a forma mucosa de LTA.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham M, Shapiro S, Karni A, Weiner HL, Miller A. Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are preferentially expressed by Th1 vs. Th2 cells. *J Neuroimmunol* 2005; 163(1-2):157-164.

Accolla RS, De Lerma BA, Mazza S, Casoli C, De Maria A, Tosi G. The MHC class II transactivator: prey and hunter in infectious diseases. *Trends Immunol* 2001; 22(10):560-563.

Aebischer T. Recurrent cutaneous leishmaniasis: a role for persistent parasites? *Parasitol Today* 1994; 10(1):25-28.

Agren MS. Gelatinase activity during wound healing. *Br J Dermatol* 1994; 131(5):634-640.

Agren MS. Matrix metalloproteinases (MMPs) are required for re-epithelialization of cutaneous wounds. *Arch Dermatol Res* 1999; 291(11):583-590.

Agren MS, Mirastschijski U, Karlsmark T, Saarialho-Kere UK. Topical synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases delays epidermal regeneration of human wounds. *Exp Dermatol* 2001; 10(5):337-348.

Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem* 1995; 270(11):5872-5876.

Akiba H, Miyahira Y, Atsuta M, Takeda K, Nohara C, Futagawa T et al. Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis. *J Exp Med* 2000; 191(2):375-380.

Albareda MC, Olivera GC, De Rissio AM, Postan M. Assessment of CD8(+) T cell differentiation in *Trypanosoma cruzi*-infected children. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82(5):861-864.

- Alexander CM, Howard EW, Bissell MJ, Werb Z. Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and entactin degradation by a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 transgene. *J Cell Biol* 1996; 135(6 Pt 1):1669-1677.
- Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett* 2005; 99(1):17-23.
- Almeida MC, Cuba-Cuba CA, Moraes MA, Miles MA. Dissemination of Leishmania (Viannia) braziliensis. *J Comp Pathol* 1996; 115(3):311-316.
- Amato VS, Tuon FF, Imamura R, Abegao dC, Duarte MI, Neto VA. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23(9):1026-1034.
- Ananieva O, Darragh J, Johansen C, Carr JM, McIlrath J, Park JM et al. The kinases MSK1 and MSK2 act as negative regulators of Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* 2008; 9(9):1028-1036.
- Anderson CF, Stumhofer JS, Hunter CA, Sacks D. IL-27 regulates IL-10 and IL-17 from CD4+ cells in nonhealing Leishmania major infection. *J Immunol* 2009; 183(7):4619-4627.
- Anderson KJ, Allen RL. Regulation of T-cell immunity by leucocyte immunoglobulin-like receptors: innate immune receptors for self on antigen-presenting cells. *Immunology* 2009; 127(1):8-17.
- Andersson S, Malmberg JA, Malmberg KJ. Tolerant and diverse natural killer cell repertoires in the absence of selection. *Exp Cell Res* 2010; 316(8):1309-1315.
- Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett* 2005; 101(2):226-230.
- Ato M, Stager S, Engwerda CR, Kaye PM. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol* 2002; 3(12):1185-1191.

Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO et al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 2009; 200(1):75-78.

Badaro R, Lobo I, Munos A, Netto EM, Modabber F, Campos-Neto A et al. Immunotherapy for drug-refractory mucosal leishmaniasis. *J Infect Dis* 2006; 194(8):1151-1159.

Baker EA, Leaper DJ. Proteinases, their inhibitors, and cytokine profiles in acute wound fluid. *Wound Repair Regen* 2000; 8(5):392-398.

Baramova EN, Bajou K, Remacle A, L'Hoir C, Krell HW, Weidle UH et al. Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS Lett* 1997; 405(2):157-162.

Barral A, Teixeira M, Reis P, Vinhas V, Costa J, Lessa H et al. Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol* 1995; 147(4):947-954.

Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR et al. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* 1992; 257(5069):545-548.

Barreto-de-Souza V, Pacheco GJ, Silva AR, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Saraiva EM et al. Increased *Leishmania* replication in HIV-1-infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis. *J Infect Dis* 2006; 194(6):846-854.

Belkaid Y. The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3(6):875-885.

Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med* 2001; 194(10):1497-1506.

Bellingan GJ, Caldwell H, Howie SE, Dransfield I, Haslett C. In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes. *J Immunol* 1996; 157(6):2577-2585.

Bennett ST, Barnes C, Cox A, Davies L, Brown C. Toward the 1,000 dollars human genome. *Pharmacogenomics* 2005; 6(4):373-382.

Beranger JY, Godeau G, Frances C, Robert L, Hornebeck W. Presence of gelatinase A and metalloelastase type protease at the plasma membrane of human skin fibroblasts. Influence of cytokines and growth factors on cell-associated metalloendopeptidase levels. *Cell Biol Int* 1994; 18(7):715-722.

Bertho AL, Santiago MA, Coutinho SG. An experimental model of the production of metastases in murine cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol* 1994; 80(1):93-99.

Bertho AL, Santiago MA, Da Cruz AM, Coutinho SG. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33(3):317-325.

Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993; 64(5 Suppl):474-484.

Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 2000; 173:17-26.

Bour-Jordan H, Blueston JA. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *J Clin Immunol* 2002; 22(1):1-7.

Bradley DJ. Letter: Genetic control of natural resistance to *Leishmania donovani*. *Nature* 1974; 250(464):353-354.

Brandonisio O, Panaro MA, Sisto M, Acquafredda A, Fumarola L, Leogrande D et al. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by cytokines and prostaglandins. *Parassitologia* 2001; 43 Suppl 1:1-6.

Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803(1):55-71.

Brown D, Trowsdale J, Allen R. The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue Antigens* 2004; 64(3):215-225.

Carvalho DG, Barbosa A, Jr., D'El-Rei HM, Clarencio J, Pinheiro NF, Jr., Veras PS et al. The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion in vitro: application to disclose a specific inhibitory effect of Leishmania infection. *Exp Parasitol* 2004; 107(3-4):189-199.

Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JL, Reed S et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol* 1985; 135(6):4144-4148.

Castellucci L, Jamieson SE, Miller EN, Menezes E, Oliveira J, Magalhaes A et al. CXCR1 and SLC11A1 polymorphisms affect susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil: a case-control and family-based study. *BMC Med Genet* 2010; 11:10.

Cavassani KA, Campanelli AP, Moreira AP, Vancim JO, Vitali LH, Mamede RC et al. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. *J Immunol* 2006; 177(9):5811-5818.

Chagas E. Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Science* 1936; 84(2183):397-398.

Chandra RK. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr* 1997; 66(2):460S-463S.

Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F et al. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 2002; 3(3):237-243.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1):156-159.

Chuang JY, Yang WH, Chen HT, Huang CY, Tan TW, Lin YT et al. CCL5/CCR5 axis promotes the motility of human oral cancer cells. *J Cell Physiol* 2009; 220(2):418-426.

Collins CS, Hong J, Sapinoso L, Zhou Y, Liu Z, Micklash K et al. A small interfering RNA screen for modulators of tumor cell motility identifies MAP4K4 as a promigratory kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(10):3775-3780.

Conceicao-Silva F, Dorea RC, Pirmez C, Schubach A, Coutinho SG. Quantitative study of *Leishmania braziliensis braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American mucocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 1990; 79(2):221-226.

Convit J, Pinardi ME, Rondon AJ. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1972; 66(4):603-610.

Convit J, Ulrich M, Fernandez CT, Tapia FJ, Caceres-Dittmar G, Castes M et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87(4):444-448.

Corinti S, Fanales-Belasio E, Albanesi C, Cavani A, Angelisova P, Girolomoni G. Cross-linking of membrane CD43 mediates dendritic cell maturation. *J Immunol* 1999; 162(11):6331-6336.

Corry DB, Reiner SL, Linsley PS, Locksley RM. Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 1994; 153(9):4142-4148.

Costa JD, Nogueira de Melo AC, Vermelho AB, Meirelles MN, Porrozzi R. In vitro evidence for metalloproteinase participation in hepatocyte damage induced by *Leishmania chagasi*-infected macrophages. *Acta Trop* 2008; 106(3):175-183.

Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg* 1986; 89(6):319-323.

Costa JM, Netto EM, Vale KC, Osaki NK, Tada MS, Marsden PD. Spontaneous healing of cutaneous *Leishmania braziliensis braziliensis* ulcers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81(4):606.

Costa RP, Gollob KJ, Machado PR, Bacellar OA, Almeida RP, Barral A et al. Adhesion molecule expression patterns indicate activation and recruitment of CD4+ T cells from the lymph node to the peripheral blood of early cutaneous leishmaniasis patients. *Immunol Lett* 2003; 90(2-3):155-159.

Coura JR, Galvao-Castro B, Grimaldi JG. Disseminated American cutaneous leishmaniasis in a patient with AIDS. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987; 82(4):581-582.

Courtney E, Kornfeld S, Janitz K, Janitz M. Transcriptome profiling in neurodegenerative disease. *J Neurosci Methods* 2010; 193(2):189-202.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(1):111-126.

Da Cruz AM, Bertho AL, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Br J Dermatol* 2005; 153(3):537-543.

Da Cruz AM, Oliveira-Neto MP, Bertho AL, Mendes-Aguiar CO, Coutinho SG. T cells specific to leishmania and other nonrelated microbial antigens can migrate to human leishmaniasis skin lesions. *J Invest Dermatol* 2010; 130(5):1329-1336.

da Luz RI, Vermeersch M, Dujardin JC, Cos P, Maes L. In vitro sensitivity testing of *Leishmania* clinical field isolates: preconditioning of promastigotes enhances infectivity for macrophage host cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(12):5197-5203.

Da-Cruz AM, Pirmez C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Coura JJ, editor. *Dinâmica das doenças infecciosas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

de Campos SN, Souza-Lemos C, Teva A, Porrozi R, Grimaldi G, Jr. Systemic and compartmentalised immune responses in a *Leishmania braziliensis*-macaque model of self-healing cutaneous leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2010; 137(1-2):149-154.

de Oliveira CP, Junger J, do Espirito Santo Silva Pires, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Fernandes O et al. Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100(12):1112-1117.

de Rossell RA, de Duran RJ, Rossell O, Rodriguez AM. Is leishmaniasis ever cured? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86(3):251-253.

Delgado G, Parra-Lopez CA, Vargas LE, Hoya R, Estupinan M, Guzman F et al. Characterizing cellular immune response to kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) during *Leishmania (Viannia) panamensis* infection using dendritic cells (DCs) as antigen presenting cells (APCs). *Parasite Immunol* 2003; 25(4):199-209.

Derouich-Guergour D, Brenier-Pinchart MP, Ambroise-Thomas P, Pelloux H. Tumour necrosis factor alpha receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections. *Int J Parasitol* 2001; 31(8):763-769.

Diaz NL, Zerpa O, Ponce LV, Convit J, Rondon AJ, Tapia FJ. Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterisation of the lesion. *Exp Dermatol* 2002; 11(1):34-41.

Ding L, Wendl MC, Koboldt DC, Mardis ER. Analysis of next-generation genomic data in cancer: accomplishments and challenges. *Hum Mol Genet* 2010; 19(R2):R188-R196.

Donaghy L, Gros F, Amiot L, Mary C, Maillard A, Guiguen C et al. Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leucocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 2007; 147(2):236-240.

Downey GP, Butler JR, Tapper H, Fialkow L, Saltiel AR, Rubin BB et al. Importance of MEK in neutrophil microbicidal responsiveness. *J Immunol* 1998; 160(1):434-443.

Dustin ML, Springer TA. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 1989; 341(6243):619-624.

Espitia CM, Zhao W, Saldarriaga O, Osorio Y, Harrison LM, Cappello M et al. Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. *BMC Immunol* 2010; 11:31.

Faustman D, Davis M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9(6):482-493.

Favali C, Costa D, Afonso L, Conceicao V, Rosato A, Oliveira F et al. Role of costimulatory molecules in immune response of patients with cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect* 2005; 7(1):86-92.

Figueroa RA, Lozano LE, Romero IC, Cardona MT, Prager M, Pacheco R et al. Detection of *Leishmania* in unaffected mucosal tissues of patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) species. *J Infect Dis* 2009; 200(4):638-646.

Foy TM, Aruffo A, Bajorath J, Buhlmann JE, Noelle RJ. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:591-617.

Fridman R, Toth M, Pena D, Mobashery S. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res* 1995; 55(12):2548-2555.

Galboiz Y, Shapiro S, Lahat N, Miller A. Modulation of monocytes matrix metalloproteinase-2, MT1-MMP and TIMP-2 by interferon-gamma and -beta: implications to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2002; 131(1-2):191-200.

Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1981; 103(2):191-200.

Ghosh M, Mandal L, Maitra S, Rakshit S, Paul K, Bagchi J et al. *Leishmania donovani* infection of human myeloid dendritic cells leads to a Th1 response in CD4+ T cells from healthy donors and patients with kala-azar. *J Infect Dis* 2006; 194(3):294-301.

Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* 1997; 277(5323):225-228.

Goetzl EJ, Banda MJ, Leppert D. Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol* 1996; 156(1):1-4.

Golino A, Duncan JM, Zeluff B, DePriest J, McAllister HA, Radovancevic B et al. Leishmaniasis in a heart transplant patient. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11(4 Pt 1):820-823.

Gong Y, Hart E, Shchurin A, Hoover-Plow J. Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 activation by plasminogen in mice. *J Clin Invest* 2008; 118(9):3012-3024.

Graham JE, Clark-Curtiss JE. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(20):11554-11559.

Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999; 285(5425):221-227.

Green GM. Pulmonary clearance of infectious agents. *Annu Rev Med* 1968; 19:315-336.

Gregory DJ, Olivier M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology* 2005; 130 Suppl:S27-S35.

Grevelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34(2 Pt 1):257-272.

Grinnell F, Zhu M, Parks WC. Collagenase-1 complexes with alpha2-macroglobulin in the acute and chronic wound environments. *J Invest Dermatol* 1998; 110(5):771-776.

Grogl M, Thomason TN, Franke ED. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47(1):117-126.

Gumy A, Louis JA, Launois P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *Int J Parasitol* 2004; 34(4):433-444.

Haas N, Hauptmann S, Paralikoudi D, Mucbe M, Kolde G. Interferon-gamma treatment induces granulomatous tissue reaction in a case of localized cutaneous leishmaniasis. *Am J Dermatopathol* 2002; 24(4):319-323.

Han YP, Tuan TL, Hughes M, Wu H, Garner WL. Transforming growth factor-beta - and tumor necrosis factor-alpha -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J Biol Chem* 2001; 276(25):22341-22350.

Harms G, Zwingenberger K, Chehade AK, Talhari S, Racz P, Mouakeh A et al. Effects of intradermal gamma-interferon in cutaneous leishmaniasis. *Lancet* 1989; 1(8650):1287-1292.

Heinzel FP, Sadick MD, Mutha SS, Locksley RM. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(16):7011-7015.

Hendriks J, Gravestien LA, Tesselaar K, van Lier RA, Schumacher TN, Borst J. CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol* 2000; 1(5):433-440.

Hernandez-Barrantes S, Toth M, Bernardo MM, Yurkova M, Gervasi DC, Raz Y et al. Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem* 2000; 275(16):12080-12089.

Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM, Kang AH, Mainardi CL. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 1985; 260(4):2493-2500.

Ho JL, Badaro R, Hatzigeorgiou D, Reed SG, Johnson WD, Jr. Cytokines in the treatment of leishmaniasis: from studies of immunopathology to patient therapy. *Biotherapy* 1994; 7(3-4):223-235.

Hopken UE, Winter S, Achtman AH, Kruger K, Lipp M. CCR7 regulates lymphocyte egress and recirculation through body cavities. *J Leukoc Biol* 2010; 87(4):671-682.

Huang J, Burke P, Yang Y, Seiss K, Beamon J, Cung T et al. Soluble HLA-G inhibits myeloid dendritic cell function in HIV-1 infection by interacting with leukocyte immunoglobulin-like receptor B2. *J Virol* 2010; 84(20):10784-10791.

Hughes DP, Marron MB, Brindle NP. The antiinflammatory endothelial tyrosine kinase Tie2 interacts with a novel nuclear factor-kappaB inhibitor ABIN-2. *Circ Res* 2003; 92(6):630-636.

Illman SA, Lohi J, Keski-Oja J. Epilysin (MMP-28)--structure, expression and potential functions. *Exp Dermatol* 2008; 17(11):897-907.

Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD, Okada Y. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J* 1997; 322 ( Pt 3):809-814.

Imai T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M, Wang J et al. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol* 1999; 11(1):81-88.

Ishida Y, Kondo T, Takayasu T, Iwakura Y, Mukaida N. The essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TGF-beta in the skin wound-healing process. *J Immunol* 2004; 172(3):1848-1855.

Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ et al. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1996; 271(25):14657-14660.

- Jiang J, Wang X, Wang X, Cao Z, Liu Y, Dong M et al. Reduced CD27 expression on antigen-specific CD4+ T cells correlates with persistent active tuberculosis. *J Clin Immunol* 2010; 30(4):566-573.
- Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997; 6(5):199-213.
- Kalebic T, Garbisa S, Glaser B, Liotta LA. Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. *Science* 1983; 221(4607):281-283.
- Kamir D, Zierow S, Leng L, Cho Y, Diaz Y, Griffith J et al. A Leishmania ortholog of macrophage migration inhibitory factor modulates host macrophage responses. *J Immunol* 2008; 180(12):8250-8261.
- Kanbe N, Tanaka A, Kanbe M, Itakura A, Kurosawa M, Matsuda H. Human mast cells produce matrix metalloproteinase 9. *Eur J Immunol* 1999; 29(8):2645-2649.
- Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol* 2001; 166(2):1141-1147.
- Karelina TV, Bannikov GA, Eisen AZ. Basement membrane zone remodeling during appendageal development in human fetal skin. The absence of type VII collagen is associated with gelatinase-A (MMP2) activity. *J Invest Dermatol* 2000; 114(2):371-375.
- Kaslow RA, Shaw S. The role of histocompatibility antigens (HLA) in infection. *Epidemiol Rev* 1981; 3:90-114.
- Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S et al. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med* 1995; 182(6):1777-1783.
- Kim CH, Kunkel EJ, Boisvert J, Johnston B, Campbell JJ, Genovese MC et al. Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential. *J Clin Invest* 2001; 107(5):595-601.

Kim HP, Kim BG, Letterio J, Leonard WJ. Smad-dependent cooperative regulation of interleukin 2 receptor alpha chain gene expression by T cell receptor and transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 2005; 280(40):34042-34047.

Knauper V, Smith B, Lopez-Otin C, Murphy G. Activation of progelatinase B (proMMP-9) by active collagenase-3 (MMP-13). *Eur J Biochem* 1997; 248(2):369-373.

Korpos E, Wu C, Sorokin L. Multiple roles of the extracellular matrix in inflammation. *Curr Pharm Des* 2009; 15(12):1349-1357.

Korshunov VA, Mohan AM, Georger MA, Berk BC. Axl, a receptor tyrosine kinase, mediates flow-induced vascular remodeling. *Circ Res* 2006; 98(11):1446-1452.

Kuroki K, Tsuchiya N, Shiroishi M, Rasubala L, Yamashita Y, Matsuta K et al. Extensive polymorphisms of LILRB1 (ILT2, LIR1) and their association with HLA-DRB1 shared epitope negative rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet* 2005; 14(16):2469-2480.

Kurschat P, Wickenhauser C, Groth W, Krieg T, Mauch C. Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by in situ zymography. *J Pathol* 2002; 197(2):179-187.

Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1995; 96(5):2304-2310.

Lang T, Ave P, Huerre M, Milon G, Antoine JC. Macrophage subsets harbouring *Leishmania donovani* in spleens of infected BALB/c mice: localization and characterization. *Cell Microbiol* 2000; 2(5):415-430.

Le Fric G, Laupeze B, Fardel O, Sebti Y, Pangault C, Guilloux V et al. Soluble HLA-G inhibits human dendritic cell-triggered allogeneic T-cell proliferation without altering dendritic differentiation and maturation processes. *Hum Immunol* 2003; 64(8):752-761.

- Lee SH, Prince JE, Rais M, Kheradmand F, Ballantyne CM, Weitz-Schmidt G et al. Developmental control of integrin expression regulates Th2 effector homing. *J Immunol* 2008; 180(7):4656-4667.
- Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 1975; 78(1):71-100.
- Levin JZ, Berger MF, Adiconis X, Rogov P, Melnikov A, Fennell T et al. Targeted next-generation sequencing of a cancer transcriptome enhances detection of sequence variants and novel fusion transcripts. *Genome Biol* 2009; 10(10):R115.
- Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009; 25(14):1754-1760.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009; 25(16):2078-2079.
- Liew FY, Li Y, Millott S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology* 1990; 71(4):556-559.
- Liew FY, Wei XQ, Proudfoot L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1997; 352(1359):1311-1315.
- Liu LM, Zhang JX, Wang XP, Guo HX, Deng H, Luo J. Pim-3 protects against hepatic failure in D-galactosamine (D-GalN)-sensitized rats. *Eur J Clin Invest* 2010; 40(2):127-138.
- Locksley RM, Heinzl FP, Sadick MD, Holaday BJ, Gardner KD, Jr. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann Inst Pasteur Immunol* 1987; 138(5):744-749.
- Locksley RM, Wakil AE, Corry DB, Pingel S, Bix M, Fowell DJ. The development of effector T cell subsets in murine *Leishmania major* infection. *Ciba Found Symp* 1995; 195:110-117.

Lopez KS, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol* 2009; 182(5):3039-3046.

Maasho K, Sanchez F, Schurr E, Hailu A, Akuffo H. Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. *Infect Immun* 1998; 66(6):2698-2704.

Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araujo C, Carvalho EM. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol* 2002; 12(5):449-451.

Machado-Coelho GL, Caiaffa WT, Genaro O, Magalhaes PA, Mayrink W. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 99(1):55-61.

Mainardi CL, Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM. Purification of a type V collagen degrading metalloproteinase from rabbit alveolar macrophages. *Coll Relat Res* 1984; 4(6):479-492.

Makela M, Larjava H, Pirila E, Maisi P, Salo T, Sorsa T et al. Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) is related to migration of keratinocytes. *Exp Cell Res* 1999; 251(1):67-78.

Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 2008; 26:453-479.

Maretti-Mira AC, Oliveira-Neto MP, Da Cruz AM, De Oliveira MP, Craft N, Pirmez C. Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. *Clin Exp Immunol* 2011; 163(2):207-214.

Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bembem LA et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005; 437(7057):376-380.

Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res* 2008; 18(9):1509-1517.

Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986; 80(6):859-876.

Marsden PD, Lessa HA, Oliveira MR, Romero GA, Marotti JG, Sampaio RN et al. Clinical observations of unresponsive mucosal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59(4):543-545.

Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997; 276(5309):75-81.

Martinez JE, Alba, Arias L, Escobar MA, Saravia NG. Haemoculture of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from two cases of mucosal leishmaniasis: re-examination of haematogenous dissemination. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86(4):392-394.

Marzochi MCA. Leishmaniose no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina* 1992; 63:82-104.

Marzochi MCA, Schubach A, Marzochi KBF. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. In: Cimerman B, Clements J, editors. São Paulo: Atheneu, 1999.

Mendonca SC, Coutinho SG, Amendoeira RR, Marzochi MC, Pirmez C. Human american cutaneous leishmaniasis (*Leishmania b. braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy. *Clin Exp Immunol* 1986; 64(2):269-276.

Menning A, Hopken UE, Siegmund K, Lipp M, Hamann A, Huehn J. Distinctive role of CCR7 in migration and functional activity of naive- and effector/memory-like Treg subsets. *Eur J Immunol* 2007; 37(6):1575-1583.

Meyer M, Briggs AW, Maricic T, Hober B, Hoffner B, Krause J et al. From micrograms to picograms: quantitative PCR reduces the material demands of high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(1):e5.

Ministério da Saúde. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana - Diagnóstico Diferencial. 1.ed ed. Brasília: Editora MS, 2006.

Ministério da Saúde. Manual da Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2.ed ed. Brasília: Editora MS, 2007.

Mizuochi T, Ito M, Saito K, Kasai M, Kunimura T, Morohoshi T et al. Possible recruitment of peripheral blood CXCR3+ CD27+ CD19+ B cells to the liver of chronic hepatitis C patients. *J Interferon Cytokine Res* 2010; 30(4):243-252.

Morozova O, Hirst M, Marra MA. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2009; 10:135-151.

Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 2008; 5(7):621-628.

Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14(2):155-174.

Motsinger A, Haas DW, Stanic AK, Van Kaer L, Joyce S, Unutmaz D. CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. *J Exp Med* 2002; 195(7):869-879.

Muller I, Kropf P, Louis JA, Milon G. Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. *Infect Immun* 1994; 62(6):2575-2581.

Muraille E, De Trez C, Brait M, De Baetselier P, Leo O, Carlier Y. Genetically resistant mice lacking MyD88-adaptor protein display a high susceptibility to *Leishmania major* infection associated with a polarized Th2 response. *J Immunol* 2003; 170(8):4237-4241.

Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, O'Shea M, Ward R, Atkinson S et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 732:31-41.

Murray HW, Hariprasad J, Fichtl RE. Treatment of experimental visceral leishmaniasis in a T-cell-deficient host: response to amphotericin B and pentamidine. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(7):1504-1505.

Murray HW, Oca MJ, Granger AM, Schreiber RD. Requirement for T cells and effect of lymphokines in successful chemotherapy for an intracellular infection. Experimental visceral leishmaniasis. *J Clin Invest* 1989; 83(4):1253-1257.

Nagalakshmi U, Waern K, Snyder M. RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis. *Curr Protoc Mol Biol* 2010; Chapter 4:Unit-13.

Nagase H. Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration. *Cell Res* 1998; 8(3):179-186.

Nagase H, Ogata Y, Suzuki K, Enghild JJ, Salvesen G. Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biochem Soc Trans* 1991; 19(3):715-718.

Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274(31):21491-21494.

Nakajima H, Samaridis J, Angman L, Colonna M. Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain. *J Immunol* 1999; 162(1):5-8.

Nolte MA, van Olfen RW, van Gisbergen KP, van Lier RA. Timing and tuning of CD27-CD70 interactions: the impact of signal strength in setting the balance between adaptive responses and immunopathology. *Immunol Rev* 2009; 229(1):216-231.

Novoa R, Bacellar O, Nascimento M, Cardoso TM, Ramasawmy R, Oliveira WN et al. IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection. *Parasite Immunol* 2011; 33(2):132-136.

Okada A, Tomasetto C, Lutz Y, Bellocq JP, Rio MC, Basset P. Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound healing: evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of pro-gelatinase A. *J Cell Biol* 1997; 137(1):67-77.

Okwor I, Uzonna J. Persistent parasites and immunologic memory in cutaneous leishmaniasis: implications for vaccine designs and vaccination strategies. *Immunol Res* 2008; 41(2):123-136.

Oliveira JM, Fernandes AC, Dorval ME, Alves TP, Fernandes TD, Oshiro ET et al. [Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43(2):188-193.

Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA, Da Cruz AM, Fernandes O, Moreira J et al. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int J Dermatol* 2000; 39(7):506-514.

Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, da Costa SC, Pirmez C. Intralesional therapy of American cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazil--an area of *Leishmania (V.) braziliensis* transmission. *Int J Dermatol* 1997; 36(6):463-468.

Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(2):293-305.

Orteu CH, Poulter LW, Rustin MH, Sabin CA, Salmon M, Akbar AN. The role of apoptosis in the resolution of T cell-mediated cutaneous inflammation. *J Immunol* 1998; 161(4):1619-1629.

Papa S, Zazzeroni F, Bubici C, Jayawardena S, Alvarez K, Matsuda S et al. Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat Cell Biol* 2004; 6(2):146-153.

Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Ota N, Ouyang W, Hu Y. The IL-17 family cytokines in immunity and disease. *J Clin Immunol* 2010; 30(2):185-195.

Penela P, Murga C, Ribas C, Salcedo A, Jurado-Pueyo M, Rivas V et al. G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) in migration and inflammation. *Arch Physiol Biochem* 2008; 114(3):195-200.

Petit-Bertron AF, Fitting C, Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Adherence influences monocyte responsiveness to interleukin-10. *J Leukoc Biol* 2003; 73(1):145-154.

Petzl-Erler ML, Belich MP, Queiroz-Telles F. Association of mucosal leishmaniasis with HLA. *Hum Immunol* 1991; 32(4):254-260.

Phillips R, Svensson M, Aziz N, Maroof A, Brown N, Beattie L et al. Innate killing of *Leishmania donovani* by macrophages of the splenic marginal zone requires IRF-7. *PLoS Pathog* 2010; 6(3):e1000813.

Pinheiro NF, Jr., Hermida MD, Macedo MP, Mengel J, Bafica A, dos-Santos WL. *Leishmania* infection impairs beta 1-integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 2006; 74(7):3912-3921.

Pirmez C. Immunopathology of American cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87 Suppl 5:105-109.

Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceicao-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 1993; 91(4):1390-1395.

Purdy AK, Campbell KS. Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR). *Cancer Biol Ther* 2009; 8(23):2211-2220.

Qi H, Ji J, Wanasen N, Soong L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 2004; 72(2):988-995.

Quiding-Jarbrink M, Smith DA, Bancroft GJ. Production of matrix metalloproteinases in response to mycobacterial infection. *Infect Immun* 2001; 69(9):5661-5670.

Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 2010; 26(6):841-842.

Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, Nagase H, French DL, Quigley JP. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* 1999; 274(19):13066-13076.

Reichel CA, Rehberg M, Bihari P, Moser CM, Linder S, Khandoga A et al. Gelatinases mediate neutrophil recruitment in vivo: evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV remodeling. *J Leukoc Biol* 2008; 83(4):864-874.

Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:151-177.

Rifas L, Halstead LR, Peck WA, Avioli LV, Welgus HG. Human osteoblasts in vitro secrete tissue inhibitor of metalloproteinases and gelatinase but not interstitial collagenase as major cellular products. *J Clin Invest* 1989; 84(2):686-694.

Rincon M, Flavell RA, Davis RA. The JNK and P38 MAP kinase signaling pathways in T cell-mediated immune responses. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(9):1328-1337.

Rivera-Marrero CA, Schuyler W, Roser S, Ritzenthaler JD, Newburn SA, Roman J. M. tuberculosis induction of matrix metalloproteinase-9: the role of mannose and receptor-mediated mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282(3):L546-L555.

Rivera-Marrero CA, Schuyler W, Roser S, Roman J. Induction of MMP-9 mediated gelatinolytic activity in human monocytic cells by cell wall components of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb Pathog* 2000; 29(4):231-244.

Rocha FJ, Schleicher U, Mattner J, Alber G, Bogdan C. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. *Infect Immun* 2007; 75(8):3823-3832.

Rocha RA, Sampaio RN, Guerra M, Magalhaes A, Cuba CC, Barreto AC et al. Apparent Glucantime failure in five patients with mucocutaneous leishmaniasis. *J Trop Med Hyg* 1980; 83(4):131-139.

Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macedo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65(5):456-465.

Romero GA, Lessa HA, Orge MG, Macedo VO, Marsden PD. [Treatment of mucosal leishmaniasis with aminosidine sulfate: results of two year follow-up]. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31(6):511-516.

Sakthianandeswaren A, Curtis JM, Elso C, Kumar B, Baldwin TM, Lopaticki S et al. Fine mapping of *Leishmania major* susceptibility Locus *Imr2* and evidence of a role for *Fli1* in disease and wound healing. *Infect Immun* 2010; 78(6):2734-2744.

Sakthianandeswaren A, Elso CM, Simpson K, Curtis JM, Kumar B, Speed TP et al. The wound repair response controls outcome to cutaneous leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(43):15551-15556.

Salhi A, Rodrigues V, Jr., Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR et al. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol* 2008; 180(9):6139-6148.

Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401(6754):708-712.

Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 187(6):875-883.

Salo T, Makela M, Kylmaniemi M, Autio-Harmanen H, Larjava H. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest* 1994; 70(2):176-182.

Saravia NG, Weigle K, Segura I, Giannini SH, Pacheco R, Labrada LA et al. Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection--reactivation or reinfection? *Lancet* 1990; 336(8712):398-402.

Schneider MA, Meingassner JG, Lipp M, Moore HD, Rot A. CCR7 is required for the in vivo function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 2007; 204(4):735-745.

Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Karrer S, Landthaler M, Babilas P. Oxygen in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol* 2010; 163(2):257-268.

- Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraeve W, Pirmez C, Grimaldi G, Jr. et al. Detection of Leishmania DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J Infect Dis* 1998; 178(3):911-914.
- Seitz HM, Camenisch TD, Lemke G, Earp HS, Matsushima GK. Macrophages and dendritic cells use different Axl/Mertk/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells. *J Immunol* 2007; 178(9):5635-5642.
- Seta N, Kuwana M. Derivation of multipotent progenitors from human circulating CD14+ monocytes. *Exp Hematol* 2010; 38(7):557-563.
- Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: X. Some observations of intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1975; 69(3):323-335.
- Shiroishi M, Tsumoto K, Amano K, Shirakihara Y, Colonna M, Braud VM et al. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(15):8856-8861.
- Sorsa T, Salo T, Koivunen E, Tyynela J, Konttinen YT, Bergmann U et al. Activation of type IV procollagenases by human tumor-associated trypsin-2. *J Biol Chem* 1997; 272(34):21067-21074.
- Souza AS, Giudice A, Pereira JM, Guimaraes LH, de Jesus AR, de Moura TR et al. Resistance of Leishmania (Viannia) braziliensis to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF-alpha production. *BMC Infect Dis* 2010; 10(1):209.
- Spath GF, Beverley SM. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective Leishmania metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp Parasitol* 2001; 99(2):97-103.
- Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surg* 1998; 176(2A Suppl):26S-38S.

Stanietsky N, Mandelboim O. Paired NK cell receptors controlling NK cytotoxicity. *FEBS Lett* 2010; 584(24):4895-4900.

Stearns ME, Wang M, Hu Y, Garcia FU, Rhim J. Interleukin 10 blocks matrix metalloproteinase-2 and membrane type 1-matrix metalloproteinase synthesis in primary human prostate tumor lines. *Clin Cancer Res* 2003; 9(3):1191-1199.

Steigerwald M, Moll H. *Leishmania major* modulates chemokine and chemokine receptor expression by dendritic cells and affects their migratory capacity. *Infect Immun* 2005; 73(4):2564-2567.

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17:463-516.

Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* 2008; 1(27):re6.

Stutte S, Quast T, Gerbitzki N, Savinko T, Novak N, Reifenberger J et al. Requirement of CCL17 for. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(19):8736-8741.

Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA et al. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 2004; 172(7):4410-4417.

Teles RM, Teles RB, Amadeu TP, Moura DF, Mendonca-Lima L, Ferreira H et al. High matrix metalloproteinase production correlates with immune activation and leukocyte migration in leprosy reactional lesions. *Infect Immun* 2010; 78(3):1012-1021.

Thomas R, Matthias T, Witte T. Leukocyte immunoglobulin-like receptors as new players in autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 2010; 38(2-3):159-162.

Titus RG, Lima GC, Engers HD, Louis JA. Exacerbation of murine cutaneous leishmaniasis by adoptive transfer of parasite-specific helper T cell populations capable of mediating *Leishmania major*-specific delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 1984; 133(3):1594-1600.

- Tomlinson ML, Garcia-Morales C, Abu-Elmagd M, Wheeler GN. Three matrix metalloproteinases are required in vivo for macrophage migration during embryonic development. *Mech Dev* 2008; 125(11-12):1059-1070.
- Toriseva M, Kahari VM. Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(2):203-224.
- Trinchieri G, Gerosa F. Immunoregulation by interleukin-12. *J Leukoc Biol* 1996; 59(4):505-511.
- Tuon FF, Gomes-Silva A, Da Cruz AM, Duarte MI, Neto VA, Amato VS. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. *Clin Immunol* 2008; 128(3):442-446.
- Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis* 2002; 186(12):1829-1834.
- van Lieshout AW, van d, V, le Blanc LM, Roelofs MF, Schreurs BW, van Riel PL et al. Novel insights in the regulation of CCL18 secretion by monocytes and dendritic cells via cytokines, toll-like receptors and rheumatoid synovial fluid. *BMC Immunol* 2006; 7:23.
- Van Seventer GA, Shimizu Y, Horgan KJ, Shaw S. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol* 1990; 144(12):4579-4586.
- Vargas-Inc, Xin L, Soong L. *Leishmania braziliensis* infection induces dendritic cell activation, ISG15 transcription, and the generation of protective immune responses. *J Immunol* 2008; 180(11):7537-7545.
- Vieira-Goncalves R, Pirmez C, Jorge ME, Souza WJ, Oliveira MP, Rutowitsch MS et al. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *Int J Dermatol* 2008; 47(9):926-932.

von Bredow DC, Cress AE, Howard EW, Bowden GT, Nagle RB. Activation of gelatinase-tissue-inhibitors-of-metalloproteinase complexes by matrilysin. *Biochem J* 1998; 331 ( Pt 3):965-972.

Vulcano M, Struyf S, Scapini P, Cassatella M, Bernasconi S, Bonecchi R et al. Unique regulation of CCL18 production by maturing dendritic cells. *J Immunol* 2003; 170(7):3843-3849.

Walton BC, Chinel LV, Eguia O. Onset of espundia after many years of occult infection with *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 1973; 22(6):696-698.

Wang J, Wicker LS, Santamaria P. IL-2 and its high-affinity receptor: genetic control of immunoregulation and autoimmunity. *Semin Immunol* 2009; 21(6):363-371.

Wang L, Feng Z, Wang X, Wang X, Zhang X. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics* 2010; 26(1):136-138.

Weckroth M, Vaheri A, Lauharanta J, Sorsa T, Konttinen YT. Matrix metalloproteinases, gelatinase and collagenase, in chronic leg ulcers. *J Invest Dermatol* 1996; 106(5):1119-1124.

Weigel MM, Armijos RX, Zurita C, Racines J, Reddy A, Mosquera J. Nutritional status and cutaneous leishmaniasis in rural Ecuadorian children. *J Trop Pediatr* 1995; 41(1):22-28.

Weigle KA, Valderrama L, Santrich C, Saravia NG. Recurrences of tegumentary leishmaniasis. *Lancet* 1985; 2(8454):557-558.

Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem* 1996; 271(17):10079-10086.

Will H, Atkinson SJ, Butler GS, Smith B, Murphy G. The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem* 1996; 271(29):17119-17123.

Woehrl B, Klein M, Rupprecht TA, Schmetzer H, Angele B, Hacker H et al. CXCL16 contributes to neutrophil recruitment to cerebrospinal fluid in pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 2010; 202(9):1389-1396.

Woessner JF, Jr. The family of matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 732:11-21.

Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol* 1993; 101(1):64-68.

Xin HM, Peng YZ, Yuan ZQ, Guo H. In vitro maturation and migration of immature dendritic cells after chemokine receptor 7 transfection. *Can J Microbiol* 2009; 55(7):859-866.

Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol* 2007; 211(1):19-26.

Yoshida H, Nakaya M, Miyazaki Y. Interleukin 27: a double-edged sword for offense and defense. *J Leukoc Biol* 2009; 86(6):1295-1303.

Zagorska A, Deak M, Campbell DG, Banerjee S, Hirano M, Aizawa S et al. New roles for the LKB1-NUAK pathway in controlling myosin phosphatase complexes and cell adhesion. *Sci Signal* 2010; 3(115):ra25.

Zajtchuk JT, Casler JD, Netto EM, Grogl M, Neafie RC, Hessel CR et al. Mucosal leishmaniasis in Brazil. *Laryngoscope* 1989; 99(9):925-939.

Zhang L, Ran L, Garcia GE, Wang XH, Han S, Du J et al. Chemokine CXCL16 regulates neutrophil and macrophage infiltration into injured muscle, promoting muscle regeneration. *Am J Pathol* 2009; 175(6):2518-2527.

Zhao YG, Xiao AZ, Newcomer RG, Park HI, Kang T, Chung LW et al. Activation of pro-gelatinase B by endometase/matrixlysin-2 promotes invasion of human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2003; 278(17):15056-15064.

## **8. ANEXOS**

Em anexo, encontram-se o artigo publicado e o artigo submetido a partir dos dados obtidos nesta tese.