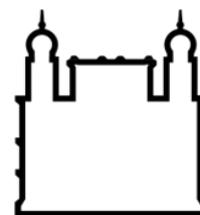




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Perfil de transcriptoma imune revela um mecanismo de degradação de matriz extracelular persistente na Leishmaniose Cutânea Humana

VALDOMIRO SILVEIRA MOITINHO JUNIOR

Salvador – Bahia

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**PERFIL DE TRANSCRIPTOMA IMUNE REVELA UM MECANISMO DE
DEGRADAÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR PERSISTENTE NA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA HUMANA**

VALDOMIRO SILVEIRA MOITINHO JUNIOR

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Khouri

Co-orientador: Dr. Kleverton Ribeiro

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-graduação em Patologia
humana para obtenção do grau de
Mestre.

Salvador – Bahia

2019

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

M528m Moitinho Junior, Valdomiro Silveira
Perfil de transcriptoma imune revela um mecanismo de degradação de matriz
extracelular na leishmaniose cutânea humana. / Valdomiro Silveira Moitinho
Junior. - 2019.
70 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Ricardo Khouri Cunha, Laboratório de
Enfermidades Infecciosas Transmitidas por Vetores.

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Faculdade de Medicina,
Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo
Cruz, 2019.

1. Leishmaniose Cutânea. 2. *L. braziliensis*. 3. Transcriptoma. 4. Genes.
I. Título.

CDU 616.993.161

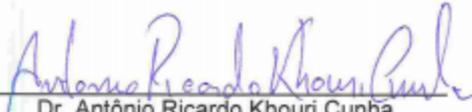
**"PERFIL DE TRANSCRIPTOMA IMUNE REVELA UM MECANISMO DE DEGRADAÇÃO DE MATRIZ
EXTRACELULAR NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA HUMANA"**

VALDOMIRO SILVEIRA MOITINHO JUNIOR

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 23 de março de 2018

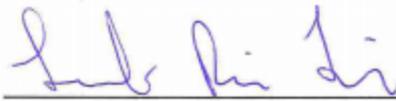
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Antônio Ricardo Khouri Cunha
Pesquisador
IGM - Fiocruz



Dra. Karine Araújo Damasceno
Pesquisadora
IGM - Fiocruz



Dr. Leonardo Paiva Farias
Pesquisador
IGM - Fiocruz

FONTES DE FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

BJT Ciências sem Fronteiras, CNPq

Universal, CNPq

Ao "Grande Arquiteto do Universo" pela dádiva da vida e por me acompanhar sempre nos momentos difíceis e felizes.

À minha esposa Patrícia Moitinho e ao meu filho Davi Moitinho pela paciência e apoio em meus períodos abstrusos e por serem o motivo pelo qual consigo continuar lutando.

À minha família, meus amigos e colegas de trabalho pelo carinho, atenção e incentivo. Por sempre me darem força e me apoiarem em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz (IGM-FIOCRUZ/BA) por disponibilizar toda sua incrível estrutura, pelo interesse nesse estudo e por oferecer cursos de pós-graduação de excelente qualidade.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia (PgPAT-FIOCRUZ/BA) e todos os funcionários pelo profissionalismo e apoio no decorrer do curso.

Ao Dr. Ricardo Khouri pela orientação, confiança, e oportunidade de aprender um novo mundo dentro da ciência.

Ao Dr. Kleverton Ribeiro pelo companheirismo, amizade, incentivo, comprometimento, por não poupar trabalho e empenho para que o resultado de todos os esforços seja um trabalho de qualidade à altura dessa instituição.

Ao IGM e aos seus Colaboradores, especialmente à Coordenação de Ensino da Pós-graduação em Patologia Humana e à Biblioteca pela atenção e apoio para a revisão deste presente trabalho.

Aos Colegas do Biotério, Vitor Maffili, Adriana Mendes, Fernanda Souza, Josilene de Jesus, Danielle Tavares, Rejane Marcia, Dayse Assis, Cristiano Souza e Damázio Vitorio pelo companheirismo diário.

Aos Professores, Aldina Barral, Manoel Barral-Netto, Camila Indiani, Cláudia Brodskyn pela orientação, convivência enriquecedora e pela contribuição intelectual de valor inestimável.

A Dra. Marilda Gonçalves pelo apoio profissional em toda a etapa do curso.

Aos colegas do grupo “Infect and Disease Prog” em especial a Cibele Orge, Maria da Purificação e Laise de Moraes.

Aos colegas do LEITV e LIB dos quais tive muito apoio técnico.

Aos alunos da pós-graduação pelo imenso apoio e preciosas amizades.

E aos demais, que de alguma forma contribuíram direta e indiretamente na elaboração deste trabalho.

MEU MUITO OBRIGADO!

MOITINHO-JUNIOR, Valdomiro Silveira. Perfil de transcriptoma imune revela um mecanismo de degradação de matriz extracelular na leishmaniose cutânea humana. 2019. 70 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose é uma zoonose amplamente disseminada em mais de 90 países, que já afeta 15 milhões de pessoas em todo o mundo e cresce a uma taxa de 1,6 milhão de novos casos por ano. A forma clínica mais frequente da doença é a leishmaniose cutânea localizada (LCL). Geralmente, pacientes acometidos por LCL apresentam uma única lesão que começa no local de entrada do parasito (*Leishmania braziliensis*), como pequenas pápulas que evoluem para nódulos e ulceram no centro. Alguns estudos têm buscado esclarecer os mecanismos que controlam o desenvolvimento destas lesões e a resposta imune envolvida. Neste sentido, técnicas de médio/alto rendimento têm revelado genes e mecanismos imunológicos importantes na progressão da doença. **OBJETIVO:** Identificar as principais moléculas e vias relacionadas à patogênese da leishmaniose cutânea humana *ex vivo* e definir, através de análise *in silico*, mecanismos de proteção/susceptibilidade. **MÉTODO:** Exploramos biópsias de lesões de pele usando técnicas de médio rendimento para quantificar a expressão de genes nCounter (NanoString) em pacientes recrutados durante visitas médicas a áreas endêmicas do Vale de Jiquiriçá, Bahia. Associamos as técnicas de citometria de fluxo *in silico* e o Ingenuity Pathway Analysis (IPA) para analisarmos a expressão gênica e os mecanismos biológicos envolvidos na LCL humana. **RESULTADOS:** A análise transcriptômica de 601 genes da resposta imune do hospedeiro, 4 genes de *Leishmania braziliensis* e 1 gene de *Staphylococcus aureus* foi capaz de diferenciar dois grupos de lesões com perfil de resposta imune distintos associado a presença ou ausência de *Leishmania braziliensis*. Dados clínicos epidemiológicos indicam que as lesões com presença de transcritos de *Leishmania braziliensis* são mais recentes do que as lesões que não foram detectados transcritos. A avaliação por citometria de fluxo *in silico* revelou um predomínio de células pertencente à imunidade inata em lesões com presença de transcritos de *Leishmania braziliensis* (iniciais) e predomínio de células da imunidade adaptativa em lesões que não foram detectados transcritos de *Leishmania braziliensis* (tardias). As análises de expressão gênica integrada do IPA revelaram principalmente um mecanismo contínuo de destruição da matriz extracelular. **CONCLUSÃO:** Nossos dados sugerem uma relação entre a assinatura transcriptômica de lesões iniciais com a presença do parasito e de células da resposta imune inata. Além disso, confirmamos a participação de vias associadas à inflamação na progressão da doença. Finalmente, revelamos a presença de uma via de degradação de matriz extracelular duradoura em lesões de pacientes com LCL.

Palavras chave: Leishmaniose Cutânea, *L. braziliensis*, Transcriptoma, NanoString, Genes.

MOITINHO-JUNIOR, Valdomiro Silveira. Immune transcriptome profiling reveals a mechanism of extracellular matrix degradation in human cutaneous leishmaniasis. 2019. 70 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador.

RESUMO

INTRODUCTION: Leishmaniasis is a zoonotic disease in more than 90 countries, which already affects 15 million people worldwide and grows at a rate of 1.6 million new cases per year. The most common clinical form of the disease is localized cutaneous leishmaniasis (LCL). Usually, patients with LCL present a single lesion that begins at the entry site of the parasite (*Leishmania braziliensis*), as small papules that develop into nodules and ulcerate in the center. Some studies have sought to clarify the mechanisms that control the development of these lesions and the immune response involved. In this sense, medium/high-throughput techniques have revealed important genes and immunological mechanisms in the progression of the disease. **AIM:** To identify the main molecules and pathways related to the pathogenesis of human cutaneous leishmaniasis *ex vivo* and to define, through *in silico* analysis, mechanisms of protection/susceptibility. **METHOD:** We explored skin lesion biopsies using medium-throughput techniques to quantify the expression of nCounter (NanoString) genes in patients recruited during medical visits to endemic areas of the Jiquiriçá Valley, Bahia. We associate *in silico* flow cytometry techniques and Ingenuity Pathway Analysis (IPA) to analyze the gene expression and the biological mechanisms involved in human LCL. **RESULTS:** Transcriptomic analysis of 601 genes of immune response, 4 genes of *Leishmania braziliensis* and 1 gene of *Staphylococcus aureus* was able to differentiate two groups of lesions with distinct immune response profiles associated with the presence or absence of *Leishmania braziliensis*. Epidemiological clinical data indicates that lesions with presence of *Leishmania braziliensis* transcripts are more recent than lesions that were not detected transcribed. The *in silico* flow cytometry evaluation revealed a predominance of cells belonging to the innate immunity in lesions with presence of *Leishmania braziliensis* transcripts (initial) and the predominance of adaptive immunity cells in lesions that were not detected *Leishmania braziliensis* (late) transcripts. The analyzes of integrated gene expression by IPA revealed mainly a continuous mechanism of extracellular matrix destruction. **CONCLUSION:** Our data suggest a relation between the transcriptomic signature of initial lesions with the presence of the parasite and the cells of the innate immune response. In addition, we confirmed the involvement of pathways associated with inflammation in the progression of the disease. Finally, we revealed the presence of a durable extracellular matrix degradation pathway in lesions of patients with LCL.

Key words: Cutaneous Leishmaniasis, *L. braziliensis*, Transcriptome, NanoString, Genes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida da <i>Leishmania spp.</i>	16
Figura 2. A Análises de agrupamento das amostras de biopsias de pele de doadores e normais e lesões cutâneas de pacientes com LCL.....	34
Figura 3. Comparação dos dados clínicos e epidemiológicos entre os grupos de lesões cutâneas de pacientes com LCL	35
Figura 4. Comparação dos dados de transcrito de <i>Leishmania spp.</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> entre os grupos de lesões cutâneas de pacientes com LCL	36
Figura 5. Citometria de fluxo <i>in silico</i>	38
Figura 6. Genes diferencialmente expressos entre os grupos de lesões cutâneas de pacientes com LCL.....	39
Figura 7. Análises de enriquecimento de vias	40
Figura 8. Análise de efeito regulatório demonstra uma degradação da matriz extracelular da pele durante a infecção por <i>L. braziliensis</i>	41
Figura 9. Infecção por <i>L. braziliensis</i> aumenta a expressão de GZMB.....	44
Figura 10. Mecanismo imunopatológico proposto de lesão cutânea causada por <i>L. braziliensis</i>	45

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com LCL incluídos no estudo33

Quadro 1. Genes relacionados a resposta imune humana, *Leishmania spp.* e *Staphylococcus aureus* avaliados no estudo.57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCL	Quimiocina (C-C motivo) ligante
CD	Grupo de diferenciação
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CTen	Enriquecimento do tipo celular
CXCL	Quimiocina (C-X-C motivo) ligante
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO-1	Heme oxigenase tipo 1
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFN- γ	Interferon- gama
IL	Interleucina
LC	Leishmaniose cutânea
LCDA	Leishmaniose cutânea difusa anérgica
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose disseminada
LM	Leishmaniose mucosa
LPG	Lipofosfoglicano
LR	Leishmaniose recidivante
LT	Leishmaniose tegumentar
LTB	Leucotrieno B
LV	Leishmaniose visceral
L VH	Leishmaniose visceral humana
MEC	Matriz extracelular
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF κ B	Fator nuclear kappa B
NK	Célula natural killer
NLRP3	Receptores NOD tipo 3
NO	Óxido nítrico
Nrf-2	Fator nuclear relacionado ao eritróide 2
O ₂ ⁻	Superóxido
OH	Hidroxila
OMICAS	Conjunto de técnicas genéticas de alto-rendimento
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PG	Prostaglandina
PGE-2	Prostaglandina E2
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PKR	Proteína quinase R
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RvD1	Resolvina da série D1
SOD1	Superóxido dismutase tipo I
TGF- β	Fator transformante de crescimento β / <i>Transforming growth factor β</i>
Th	Célula T auxiliadora / <i>T helper</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral – alpha
Tregs	Linfócitos T reguladores

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	LEISHMANIOSES	14
1.2	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO BRASIL	15
1.2.1	Epidemiologia	15
1.2.2	Ciclo Biológico da <i>Leishmania spp.</i>	15
1.3	FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	17
1.4	ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DA LESÃO CUTÂNEA	19
1.5	IMUNOPATOGENESE NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA	20
1.6	VIAS ASSOCIADAS A LEISHMANIOSE CUTÂNEA	23
1.6.1	Vias de Estresse Oxidativo	23
1.6.2	Vias Lipídicas	24
1.6.3	Vias dos Inflamossomas	25
1.7	OMICAS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	26
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	28
2.1	JUSTIFICATIVA	28
2.2	HIPÓTESE.....	28
3	OBJETIVOS	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	COMITÊ DE ÉTICA	30
4.2	POPULAÇÃO DO ESTUDO	30
4.3	BIÓPSIAS DE PACIENTES COM LCL	30
4.4	EXTRAÇÃO DE RNA	30
4.5	ENSAIOS DE NCOUNTER (NANOSTRING)	31
4.6	ANÁLISES DE ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL	32
4.7	ANÁLISES DE CITOMETRIA DE FLUXO <i>IN SILICO</i>	32
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5	RESULTADOS	33
5.1	CARACTERÍSTICAS DESCRITIVAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO	33
5.2	ASSINATURA TRANSCRIPTÔMICA IMUNE É CAPAZ DE DIFERENCIAR AS AMOSTRAS DE BIOPSIAS DE LESÕES CUTÂNEAS DE LCL EM DOIS GRUPOS	33
5.3	AS ASSINATURAS TRANSCRIPTÔMICAS IMUNES DE BIOPSIAS DE LESÕES CUTÂNEAS ESTÃO ASSOCIADAS A POPULAÇÕES CELULARES DA RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA	36

5.4	AS ASSINATURAS TRANSCRIPTÔMICAS IMUNES DE BIOPSIAS DE LESÕES CUTÂNEAS ESTÃO ASSOCIADAS A MECANISMOS BIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR	39
6	DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47
	APÊNDICE I	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses constituem um grupo específico de doenças causadas pela infecção de parasitos intracelulares pertencentes ao reino Protista, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*. Essa parasitose é transmitida por vetores flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (SACKS; KAMHAWI, 2001; GONTIJO; CARVALO, 2003; SILVEIRA *et al.*, 2009; GONZÁLEZ *et al.*, 2015) e possui caráter zoonótico, acometendo diversas espécies de animais domésticos, silvestres e o homem (DANTAS-TORRES, 2007; REITHINGER *et al.*, 2007; MODABBER *et al.*, 2007; WHO, 2010; WERNECK *et al.* 2011).

Essas enfermidades apresentam formas clínicas distintas que geralmente são reunidas em dois grupos principais: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT) (LAISON; SHAW, 1988). A leishmaniose visceral humana (LVH) é uma doença crônica, multifatorial e considerada a forma mais prejudicial da doença. No Brasil, é causada pela espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* e atinge órgãos vitais como baço, fígado, medula óssea e linfonodos, com reflexo em vários sistemas do organismo (GRAMICCIA; GRADONI, 2005; WHO, 2010). A leishmaniose tegumentar é causada por protozoários pertencentes aos complexos *Leishmania (Leishmania) e Leishmania (Viannia)*. Afeta, principalmente, a pele dos indivíduos e, em alguns casos, a mucosa, indo desde lesão única até quadros generalizados. A gravidade das expressões clínicas depende de fatores relacionados ao hospedeiro e ao parasito (GRIMALDI; TESH, 1993; MODABBER *et al.*, 2007; REITHINGER *et al.*, 2007).

As leishmanioses são doenças cosmopolitas, presentes em mais de 90 países, com cerca de 15 milhões de pessoas infectadas e 70 mil mortes por ano (DESJEUX, 2004; MURRAY *et al.*, 2005; REITHINGER *et al.*, 2007; ALVAR *et al.*, 2012). A forma visceral da doença concentra 90% dos casos em seis países, Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. Por outro lado, a forma tegumentar é amplamente distribuída, com um terço dos casos ocorrendo nas regiões da Bacia do Mediterrâneo, Ásia Central e Américas. Ambas as formas se encontram em franca expansão, sendo registrados cerca de 1,6 milhões de novos casos a cada ano (ALVAR *et al.*, 2012).

Em 2012 a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu as leishmanioses entre as 10 doenças infecciosas prioritárias para implementação de medidas de controle (WHO, 2012; ALVAR *et al.*, 2012). Atualmente, tem se destacado como um grave problema de saúde pública com altos índices de morbidades, podendo levar ao óbito em casos não tratados (GRAMICCIA; GRADONI, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Além disso, por afetar predominantemente

populações mais pobres e vulneráveis, as leishmanioses fazem parte do complexo de doenças tropicais negligenciadas (BRASIL, 2010).

1.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO BRASIL

1.2.1 Epidemiologia

A leishmaniose tegumentar afeta uma grande quantidade de países da América Latina (Brasil, Paraguai, Colômbia e Argentina), com uma taxa de incidência de 18,35 casos por 100.000 habitantes e um total de 46.082 casos registrados em 2015. O Brasil lidera a região em número de registros da doença com aproximadamente 40% de todos os casos ocorridos na América Latina, somando mais de 19 mil casos reportados em 2015 (OPAS, 2017).

Estudos recentes têm demonstrado a presença das leishmanioses em praticamente todo o Brasil (BRASIL, 2017; REIS *et al.*, 2017). Apesar do aumento da ocorrência de LT em várias regiões do país, o Nordeste ainda é uma preocupação para as autoridades sanitárias. Em 2015 ocorreram 5.152 casos da doença, o que representa 26% do total nacional. Neste mesmo ano, a Bahia identificou 2.175 casos, sendo o estado com maior número de registros da região e o 3º lugar no País (OPAS, 2017).

1.2.2 Ciclo Biológico da *Leishmania spp.*

No Brasil, as espécies implicadas na etiologia da LT são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (GUIMARÃES *et al.*, 2005; MODABBER *et al.*, 2007; REITHINGER *et al.*, 2007; AKHOUNDI *et al.* 2016). Seus vetores são flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, com destaque para as espécies *L. whitmani* e *L. intermedia* (AKHOUNDI *et al.*, 2016; TELES *et al.*, 2016).

A transmissão dos protozoários ocorre no momento em que o vetor realiza a hematofagia em um hospedeiro infectado, ingerindo juntamente com o sangue, células mononucleares contendo formas amastigotas dos parasitos (Figura 1) (RIBEIRO, 1995; HANDMAN; BULLEN, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2013). No trato digestivo do vetor as formas amastigotas sofrem um processo de transformação denominado metaciclogênese, gerando formas promastigotas infectantes (AKOPYANTS *et al.*, 2004; MONTALVO *et al.*, 2012). Em

um novo repasto sanguíneo, essas formas são inoculadas em um hospedeiro susceptível. No local da inoculação, as formas promastigotas são internalizadas de maneira ativa ou são fagocitadas por uma variedade de células do hospedeiro, como neutrófilos, células dendríticas e macrófagos (HANDMAN; BULLEN, 2002; PETERS *et al.*, 2008; BEATTIE; KAYE, 2011). Uma vez internalizados, os protozoários se transformam em formas amastigotas, se multiplicam por divisão binária dentro dos fagócitos e causam sua destruição (COURRET *et al.*, 2002; CAMPOS-PONCE *et al.*, 2005). Os parasitos livres são transportados pelo sistema circulatório para vários órgãos, inclusive a pele, onde permanecerão disponíveis para serem ingeridos por vetores fechando assim o ciclo (HANDMAN; BULLEN, 2002; REITHINGER *et al.*, 2007).

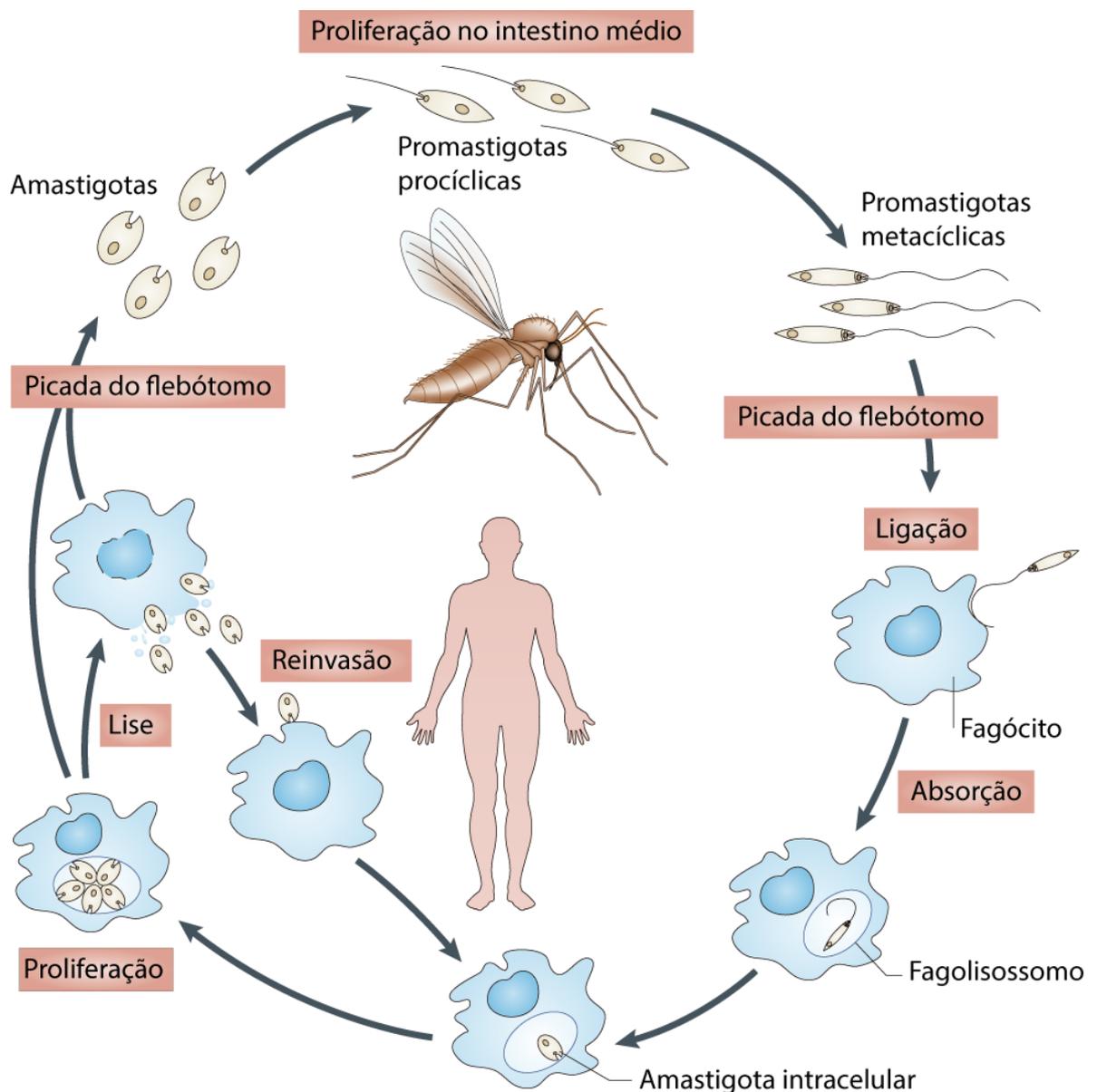


Figura 1. Ciclo de vida da *Leishmania* spp. Adaptado de Dalastra e Batistela Moreir (2011).

1.3 FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A complexa interação entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro gera uma gama de apresentações clínicas distintas de leishmaniose tegumentar (cutânea) com diferentes graus de gravidade e desfechos terapêuticos (BITTENCOURT *et al.*, 1990; BARRAL *et al.*, 1995; AMATO *et al.*, 2007; LESSA *et al.*, 2007). Atualmente, os critérios mais utilizados para essa classificação são as características clínico-histopatológicas, considerando parâmetros como: o tipo de lesão, resposta inflamatória, curso da doença e nível de destruição tecidual (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; REITHINGER *et al.*, 2007). Sendo assim, pode-se classificar a leishmaniose cutânea (LC) em cinco formas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose disseminada (LD), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose recidivante (LR) e leishmaniose cutânea difusa anérgica (LCDA) (LAINSON; SHAW, 1998; COSTA *et al.*, 2009; PACE, 2014; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

A LCL é a forma com maior número de casos no Brasil (BRASIL, 2017). Várias espécies são implicadas em sua etiologia, principalmente *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, e, com maior destaque, a *L. (V.) braziliensis* (REITHINGER *et al.*, 2007; ESPINOSA *et al.*, 2016). Geralmente os indivíduos apresentam uma ou poucas lesões que se iniciam no local de entrada do parasito, onde se observam pequenas pápulas que evoluem para nódulos e ulceram no centro (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). A resposta imune celular na LCL é do tipo Th1 (IFN- γ) com resultados de intradermoreação de Montenegro (IDRM) positivos (COSTA *et al.*, 2009a; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). A lesão frequentemente aparece nas partes expostas do corpo como face, membros superiores e inferiores acarretando em constrangimento ao paciente. Este quadro constantemente faz com que o indivíduo desenvolva uma aversão ao convívio em sociedade ampliando ainda mais o caráter social da doença (REITHINGER *et al.*, 2007; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). Além disso, as falhas terapêuticas e os efeitos tóxicos têm aumentado com tratamento à base de antimoniatos (MACHADO *et al.*, 2002, SANTOS *et al.*, 2004; LLANOS-CUENTAS *et al.*, 2008). Em alguns casos há necessidade de interrupção, temporária ou definitiva, do tratamento, devido a alterações cardíacas, renais, hepáticas e pancreáticas (BRASIL, 2010).

A leishmaniose disseminada (LD) está associada a infecção de parasitos das espécies *L. (V.) braziliensis* e a *L. (L.) amazonensis* e ocorre principalmente no estado da Bahia (COSTA *et al.*, 2009a; MACHADO *et al.*, 2011). Clinicamente, a doença se caracteriza pelo surgimento de múltiplas lesões com formatos distintos. Inicialmente as lesões são semelhantes às encontradas na LCL, com fundo granuloso e bordas elevadas, evoluindo para formas papulares e/ou acneiformes, acometendo a mucosa em 38% dos pacientes (GUIMARÃES *et al.*, 2005).

A resposta imune celular na LD é do tipo Th1 (IFN- γ) com resultados de IDRM positivos (COSTA *et al.*, 2009a; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). O tratamento com fármacos de primeira escolha tem altas taxas de falha terapêutica, alcançando até 75% no primeiro ciclo (MACHADO *et al.*, 2011).

A forma mucosa da doença possui atributos de cronicidade, com presença constante na América do Sul. Frequentemente é causada por parasitos das espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017). Ainda não existem fatores isolados que expliquem a sua ocorrência, mas, alguns critérios como sexo, idade, estado nutricional e esquema terapêutico estão relacionados. Contudo, já se sabe que, na maioria das vezes, a LM resulta da evolução de quadros de LCL (MACHADO-COELHO *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2009a; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). Os sítios mais atingidos incluem mucosa oral, nasal, lábios e faringe o que provoca quadros desfigurantes (AMATO *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2009a; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). A resposta imune celular na LM é do tipo Th1 com elevada produção de IFN- γ , apresentando resultados de IDRM positivos (GUIMARÃES *et al.*, 2005; MACHADO *et al.* 2007; COSTA *et al.*, 2009a). A falha terapêutica é observada em cerca de 40% dos casos tratados com antimônio pentavalente (MAILLO; VELEZ, 2013).

Por razões ainda desconhecidas, pacientes curados de LCL sofrem a reativação das lesões, culminando na leishmaniose recidivante (LR) (GANGNEUX, *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2009a; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). As espécies de protozoários envolvidas na etiologia da doença são *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (BITTENCOURT, *et al.*, 1993; COSTA *et al.*, 2009a). Observa-se lesões que surgem de uma área nodular, iniciando nas bordas ou no centro da lesão inicial, que geralmente não evolui para úlcera. Sua patogênese não foi totalmente elucidada, todavia, se sabe que o ressurgimento do parasito está imputado no mecanismo da enfermidade (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). Geralmente os pacientes com LR não respondem aos tratamentos convencionais. (MOMENI; AMINJAVAHERI, 1995; COSTA *et al.*, 2009a).

A apresentação difusa da LC é caracterizada pela ausência de resposta imune celular específica contra o parasito, recebendo também a denominação de leishmaniose cutânea difusa anérgica (LCDA) (GUIMARÃES *et al.*, 2005, MAILLO; VELEZ, 2013; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). No Brasil, a única espécie implicada como agente causador é a *L. (L.) amazonensis* (GUIMARÃES *et al.*, 2005; REIS *et al.*, 2008). É uma doença crônica com baixo número de casos, porém, apresentam quadros severos (COSTA *et al.*, 2009b). O desenvolvimento inicial é semelhante a quadros de LCL, entretanto, clinicamente são observados múltiplos nódulos unidos em placas, sem ulcerações e distribuídos por grandes

regiões do corpo do paciente, com a presença de muitos macrófagos parasitados (COSTA *et al.*, 2009; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). A resposta imune celular se caracteriza por pouca produção de IFN- γ e altos níveis de IL-4, apresentando resultados IDRM negativos (GUIMARÃES *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2009a). A administração do antimônio pentavalente no estágio inicial da LCDA geralmente torna-se eficiente, entretanto, em caso avançados não apresenta resultados positivos (MAILLO; VELEZ, 2013).

A grande quantidade de apresentações clínicas distintas da LC resultam de complexas interações entre parasito e o hospedeiro. O estudo sobre os fatores que controlam o curso e a dinâmica da doença são fundamentais para a compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão da enfermidade. A LCL é a forma mais prevalente da LC e muitas vezes a demora no seu tratamento resulta na evolução para formas mais complicadas. Sendo assim, a elucidação da imunopatogênese da LCL é crucial para o desenvolvimento de estratégias que possam auxiliar na prevenção e controle das outras formas de LC.

1.4 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DA LESÃO CUTÂNEA

Estudos que caracterizam histologicamente as lesões cutâneas causadas pela infecção por *L. braziliensis* ainda são escassos. A pele é um tecido composto por três camadas: epiderme, derme e hipoderme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A lesão provocada na LCL geralmente atinge as duas camadas superiores da pele, epiderme e derme, onde estão várias células do sistema imune (BARRAL-NETTO, *et al.* 1986; SCOTT; NOVAIS; 2016). A epiderme é formada por tecido epitelial estratificado organizado com filamentos de queratina que garantem a integridade e estabilidade dessa camada. A derme é formada por tecido conjuntivo onde se localizam capilares sanguíneos e linfáticos, glândulas secretoras e elementos estruturais que garantem a sustentação do tecido, a matriz extracelular (MEC), composta principalmente por elementos fibrilares, como o colágeno e a elastina (MENEZES; SARAIVA; ROCHA-AZEVEDO; 2016; TURNER; LIM; GRANVILLE; 2017).

O repasto sanguíneo provoca danos significativos à estrutura da pele, causando prejuízos nas duas camadas. Essa ação física provoca o início de um processo inflamatório local que é potencializado pela presença da saliva e do parasito (ANDRADE, *et al.*, 2007; OLIVEIRA; BRODSKY, 2012). A chegada de células inflamatórias estimula a ativação de várias vias de sinalização, abordadas anteriormente, que contribuem de uma maneira geral para a morte celular e a degradação da matriz extracelular. Esse quadro pode ser resultado da ação

de enzimas proteolíticas com destaque para as metaloproteinases, granzimas e enzimas produzidas pela *Leishmania* (ALMEIDA, *et al.*, 2017; TURNER; LIM; GRANVILLE; 2017). As metaloproteinases são conjunto de enzimas produzidas por neutrófilos, monócitos, macrófagos e fibroblastos responsáveis pela destruição do tecido em várias doenças, como artrite reumatoide, tuberculose, sarcoidose (CHANG, *et al.*, 1996; IVANIŠEVIĆ, *et al.*, 2017; GOSSAGE, *et al.*, 2018). Em pacientes infectados com *L. braziliensis* já foi demonstrado uma ligação direta entre a presença de metaloproteinase da matriz 1 (MMP1), dano tecidual e progressão da doença (NOVAIS *et al.*, 2015; ALMEIDA, *et al.*, 2017).

As granzimas são proteases produzidas por linfócitos T citotóxicos e células NK, e são capazes de degradar a MEC e regular indiretamente a inflamação (HIEBERT; GRANVILLE, 2012). Já foi demonstrado que indivíduos com altos níveis de granzima B possuem lesão cutâneas maiores, auxiliando na progressão da LCL, sugerindo a sua participação na imunopatogênese da doença (DANTAS *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2013).

Por fim, alguns componentes constitutivos de *Leishmania spp.* vêm sendo estudados e incriminados como fatores de virulência para a doença, com destaque para as metaloproteinase gp63 e os exossomos. Tem-se observado, *in vitro* e *in vivo*, que essas moléculas possuem papel fundamental nos estágios iniciais da infecção auxiliando na desorganização da MEC e facilitando a disseminação do parasito (MCGWIRE; CHANG; ENGMAN, 2003; ATAYDE, *et al.*, 2015; 2016).

1.5 IMUNOPATOGÊNESE NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

A infecção se inicia com a picada do vetor e a liberação dos parasitos no lago sanguíneo durante a hematofagia. A agressão tecidual associada à presença do parasito e a saliva do vetor provoca uma resposta inflamatória local com recrutamento celular (neutrófilos, monócitos e células dendríticas) (GIUDICE *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2016; CONCEIÇÃO *et al.*, 2016). Já foi demonstrado que a saliva do vetor potencializa a chegada das células inflamatórias no local da picada, favorecendo o estabelecimento da infecção nesse ambiente (KAMHAWI *et al.*, 2000; ANDRADE *et al.*, 2007). As células dendríticas locais migram e carregam parasitos para os linfonodos dos pacientes causando linfadenopatia (BARRAL *et al.*, 1992; BARRAL *et al.*, 1995) e contribuindo para o estabelecimento da resposta imune celular Th1 (LEON; LOPEZ-BRAVO; ARDAVIN, 2007; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

A migração celular para o ambiente da infecção por *Leishmania braziliensis* já foi demonstrada em camundongos em modelo de bolsão inflamatório e em modelo de lesão na

orelha (MATTE; OLIVIER, 2002; MOURA *et al.*, 2005). No bolsão inflamatório foi avaliado o recrutamento celular nas primeiras 48h após a infecção, com o pico de leucócitos ocorrendo 6h após a inoculação. Os neutrófilos e eosinófilos foram as células mais frequentes nas primeiras 6h tendo um declínio drástico após 12h de infecção. Ao contrário, os macrófagos e linfócitos, apesar de serem observados desde o início da infecção, tiveram um pico 12h após a inoculação, com uma queda acentuada após 24h (MATTE; OLIVIER, 2002). Em outro estudo utilizando o mesmo modelo de bolsão inflamatório, analisando três e quinze dias após a infecção com *L. braziliensis*, Teixeira *et al.*, (2005) observaram um perfil celular também composto por polimorfonucleares e macrófagos. Teixeira *et al.*, (2005) demonstraram que o recrutamento de neutrófilos e eosinófilos nesse modelo foi controlado principalmente pela produção de CXCL1. Por outro lado, o recrutamento de macrófagos e linfócitos foi relacionado com o aumento de expressão das quimiocinas CCL2 e CCL3. Além disso, foi observado o recrutamento de células natural killer (NK) através da CXCL10.

O modelo de infecção experimental por *L. braziliensis* na orelha de camundongos BALB/c atualmente é bastante estudado por apresentar características semelhantes ao desenvolvimento da doença em humanos. Esse modelo apresenta disseminação do parasito para linfonodo, desenvolvimento de lesão ulcerada e alta cura, semelhante à da infecção natural em humanos, possibilitando a descoberta de novas moléculas candidatas a vacina e novos alvos terapêuticos (SANTOS *et al.*, 2014; CELES, *et al.*, 2016; CUNHA, *et al.*, 2018). Nesse modelo se verificou, na segunda semana após a infecção, um infiltrado com pouca quantidade de células, com predominância de células mononucleares, presença de polimorfonucleares e macrófagos infectados. Na quarta semana se observou um aumento no número de células no infiltrado inflamatório com grande quantidade de neutrófilos, monócitos e linfócitos, além de presença massiva de células densamente parasitadas. As células prevalentemente encontradas entre a sétima e a nona semana foram polimorfonucleares, mononucleares e plasmócitos, com presença de fibroblastos que iniciam o processo de cicatrização finalizado na décima semana. Durante esse período a presença do parasito no linfonodo se mantém constante, porém, na orelha não foi identificado parasito após a oitava semana da infecção. Essa destruição do parasito foi associada a produção de IFN- γ pelos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ (MOURA *et al.*, 2005).

Estudos abordando os primeiros estágios da infecção em humanos ainda são raros, haja visto que a suspeita da doença pelo paciente ocorre após a identificação da lesão (NOVAIS *et al.*, 2014; SALDANHA *et al.*, 2017). Consideram-se como lesões iniciais aquelas em formato de pápulas que surgem entre uma e duas semanas após a picada do vetor. A lesão tardia se

caracteriza pela presença de ulcera com fundo necrótico, bordas elevadas e surge em torno de 30 dias após a picada (DANTAS *et al.*, 2013; NOVAIS *et al.*, 2014; SALDANHA *et al.*, 2017).

Em 2010, Campanelli *et al.*, (2010) avaliaram o perfil celular em biópsia de lesões iniciais (<30) e tardias (>60 dias) de pacientes com LCL. A autora demonstrou um maior infiltrado inflamatório nas lesões tardias, com diferença estatisticamente significativa maior para linfócitos T CD3⁺ e CD4⁺ e uma tendência de aumento para linfócitos T CD8⁺. Não foi observada diferença estatísticas quando comparado as populações de linfócitos B (CD19⁺), macrófagos (CD14⁺) e células dendríticas (CD1a⁺). Através da citometria de fluxo foi demonstrado que os linfócitos da lesão inicial expressavam mais CXCR3, enquanto que nas lesões tardias os linfócitos expressavam mais CCR4. Além disso, foi demonstrado uma presença acentuada de linfócitos expressando IFN- γ nos dois grupos, contudo a lesão tardia apresentava mais linfócitos expressando IL-10 e TGF- β . Resultados similares sobre a presença de linfócitos T CD4⁺ expressando IL-10 e TGF- β com função regulatória em lesões de pacientes com LCL já foi demonstrado anteriormente (CAMPANELLI *et al.*, 2006).

Em estudo realizado em Corte de Pedra (BA), Saldanha *et al.*, (2017) estudaram lesões iniciais (<30 dias) e tardias (>30 dias) de pacientes infectados com *L. braziliensis*. A autora demonstrou uma presença estatisticamente significativa do parasito nas lesões iniciais, ocorrendo o desaparecimento do patógeno ao longo do curso da doença. Histologicamente os dois tipos de lesões possuíam padrão semelhante, com macrófagos dispersos por toda a área da lesão, linfócitos B concentrados ao centro e os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ amplamente distribuídos pela lesão. No entanto, lesões tardias apresentaram uma quantidade maior de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ estatisticamente significante. Enquanto que o número de linfócitos B CD20⁺ não diferiu entre os grupos.

O papel dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ da lesão de pacientes com LCL foi investigado em outros estudos. Observou-se que as células CD4⁺ IFN- γ ⁺ exercem um papel protetor mediando a morte do parasito in vitro (SANTOS *et al.*, 2013). Avaliando células CD8⁺, Santos *et al.*, (2013) demonstraram o papel de células CD8⁺ granzima B⁺ na morte de células infectadas, enquanto Dotiwala *et al.*, (2016) demonstraram que essas células são capazes de eliminar diretamente os parasitos intracelulares através de perforina, granzulina e granzimas. Além disso, existe uma correlação positiva entre a presença de células CD8⁺ granzima B⁺ e o tamanho da lesão, comprovando seu papel deletério na LCL (DANTAS *et al.*, 2013).

1.6 VIAS ASSOCIADAS A LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Durante a infecção, o hospedeiro induz vias que podem contribuir para a resolução ou favorecimento da doença (MUXEL *et al.*, 2017). Dentre as vias que já foram estudadas se destacam: as vias de estresse oxidativo, as vias lipídicas e as vias dos inflamosomas (GREGORY; OLIVIER; 2005; LIMA-JUNIOR *et al.* 2013).

1.6.1 Vias de Estresse Oxidativo

Após a fagocitose de *Leishmania spp.* por macrófagos, ocorre a ativação destas células, com internalização do parasito no fagossomo e posterior fusão destes com os lisossomos formando os fagolisossomos. A ativação dos macrófagos leva à liberação de radicais livres de oxigênio (ROS) (McBRIDE; BORUTAITE; BROWN, 1999). Essas moléculas são resultantes do metabolismo do oxigênio que depende do complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NADPH oxidase). As enzimas NADPH oxidase estão ligadas à membrana plasmática das células e, quando os fagócitos são ativados, elas são liberadas no citoplasma gerando superóxido (O_2^-) (MILLER *et al.*, 2000; ASSCHE *et al.*, 2011). O catabolismo do O_2^- dá origem a outras moléculas como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH), peroxinitrito ($ONOO^-$) e óxido nítrico (NO). Essas moléculas atuam na destruição de patógenos intracelulares, porém, se produzida em quantidade excessivas, podem levar à morte celular (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007).

A produção de enzimas antioxidantes é o principal mecanismo de defesa que protege o organismo frente à destruição inespecífica causada pelo aumento indiscriminado de ROS (FERREIRA; MATSUBARA, 2007). Entretanto, essa resposta acaba sendo permissiva para a sobrevivência de parasitos intracelulares como a *Leishmania spp.* Nesse contexto, já foi demonstrado que a infecção por *L. amazonensis* leva à produção de interferons do tipo I, principalmente interferon-beta ($IFN-\beta$) que ativa a sinalização via proteína quinase R (PKR). A PKR induz a produção de fator nuclear relacionado ao eritróide 2 (Nrf-2) que é a molécula responsável pela sinalização para a produção das enzimas antioxidantes como a hemoxigenase e a superóxido dismutase tipo I (SOD1) (VIVARINI *et al.*, 2011; 2017). Vários estudos têm demonstrado que altos níveis de enzimas antioxidantes estão associados ao favorecimento da doença e dificuldades terapêuticas (ZAMBRANO-VILLA *et al.*, 2002; VIVARINI *et al.*, 2011; KHOURI *et al.*, 2014).

Heme oxigenase (HO-1) é uma enzima constitutiva da maioria das células e responsável pelo catabolismo da heme, um radical livre que provoca quadros inflamatórios em diversos distúrbios patológicos (LARSEN *et al.*, 2012). Na leishmaniose tem se demonstrado que níveis aumentados de HO-1 favorecem a persistência da infecção por *L. infantum* (LUZ *et al.*, 2012). A análise de pacientes com leishmaniose visceral revelou que o aumento de HO-1 provoca a destruição de fagócitos (neutrófilos) e diminuição dos níveis de O_2^- aumentando a sobrevivência do parasito e, conseqüentemente, a manutenção da infecção (QUINTELA-CARVALHO *et al.*, 2017).

Já foi demonstrado que a SOD reduz os níveis de O_2^- favorecendo a infecção de macrófagos humanos por *L. braziliensis* de maneira dependente de IFN- β (KHOURI *et al.*, 2009). Além disso, nosso grupo demonstrou uma associação entre os altos níveis de SOD1 plasmático à falha terapêutica na leishmaniose cutânea (KHOURI *et al.*, 2014). Esses achados têm gerado interesse na realização de estudos abordando o papel da SOD1 na evolução da doença e como alvo terapêutico para tratamento da leishmaniose (CELES *et al.*, 2016). Vivarini *et al.*, (2011) demonstraram que os níveis de SOD1 e de IFN- β são dependentes da via de sinalização PKR e na manutenção da infecção. Além disso, o aumento da expressão de PKR foi relacionado com o aumento de gravidade da LCL, comprovando a relevância dessa via na infecção por *L. amazonensis* (VIVARINI *et al.*, 2017).

1.6.2 Vias Lipídicas

Os eicosanoides são moléculas lipídicas essenciais para a manutenção da homeostase celular. Seu metabolismo envolve diversas enzimas, com destaque para as cicloxigenases e as lipoxigenases. As cicloxigenases são responsáveis pela produção das prostaglandinas (PGs) e as lipoxigenases produzem os leucotrienos (LTBs). Vários trabalhos têm investigado o papel das PGs e LTBs na infecção por *Leishmania spp.* (TAVARES *et al.*, 2014; RODIGUES *et al.*, 2015; CHAVES; CANETTI; COUTINHO-SILVA, 2016).

Já foi demonstrado que moléculas presentes na saliva de flebotomíneos (maxidilan por exemplo) promove o aumento da produção de PGE2 nas células do hospedeiro, gerando uma resposta anti-inflamatória e beneficiando a sobrevivência de *L. infantum* (ARAÚJO-SANTOS *et al.*, 2014). O LTB4, por outro lado, está envolvido no desenvolvimento de uma resposta pró-inflamatória, com produção de óxido nítrico e destruição de parasitos intracelulares por neutrófilos (TAVARES *et al.*, 2014). Moléculas do próprio parasito como o Lipofosfoglicano (LPG) pode estimular a produção de NF κ B, que ativa as lipoxigenases e desencadeiam a

produção de LTB₄ (TAVARES *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2017). Estudos recentes também têm demonstrado que a produção de corpos lipídicos (Lipid bodies) por *L. infantum* levam à produção de prostaglandina F₂ α (PGF₂ α), mediador lipídico que garante a sobrevivência intracelular do parasito (ARAÚJO-SANTOS, *et al.*, 2014; 2017).

França-costa *et al.*, (2015) avaliaram transcritos de RNA mensageiro (RNAm) em lesão de pacientes com LCL com até 2 meses de progressão da doença. A análise por nCounter (NanoString) revelou que diversos genes (PGESm, PTGER3, PGDS, PTGFR, PTGS1 e ALOX5a) estão ligados a via de sinalização dos eicosanóides, com destaque para PGESm. Foi demonstrado que a PGE₂ tem papel fundamental na ativação das vias lipídicas, através do aumento da expressão do receptor EP3. Esse acréscimo está diretamente envolvido na patogênese da doença, resultando em quadros clínicos mais graves, com estímulo da sobrevivência do parasito intracelular. Além disso, se observou que pacientes com LCL possuem altas concentrações plasmáticas de PGE₂.

Outro mediador lipídico envolvido na infecção por *Leishmania spp.* é a resolvina da série D1 (RvD1). Já foi demonstrado, *in vitro*, que a inibição desta molécula leva a uma redução da carga parasitária em macrófagos humanos infectados com *Leishmania amazonensis*. Já em pacientes com LCL, registrou-se uma correlação positiva entre o número de lesões e a concentração plasmática de RvD1 (MALTA-SANTOS *et al.*, 2017).

Apesar de ainda existirem mecanismos pouco compreendidos no papel das moléculas lipídicas, esses achados comprovam que as moléculas lipídicas exercem papéis fundamentais na modulação da relação parasito/hospedeiro, estimulando o interesse do estudo dos lipídios para o conhecimento da dinâmica da infecção ou como potenciais alvos terapêuticos (ARAÚJO-SANTOS *et al.*, 2014; MALTA-SANTOS *et al.*, 2017).

1.6.3 Vias dos Inflamossomas

Outra via importante da imunopatogênese na leishmaniose é a via do inflamossoma. Essa via é formada por um conjunto de proteínas citoplasmáticas que reconhecem estruturas antigênicas, provocando ativação de resposta imune e indução de um processo inflamatório. De maneira simplificada, a *Leishmania spp.* é reconhecida por receptores tipo *toll* que ativam as proteínas MAPK que iniciam a produção de componentes pró-inflamatório, como receptores NOD tipo 3 (NLRP3) e pró-IL-1 β . A presença do parasito também leva a produção de ROS que é importante para a ativação do inflamossoma NLRP3 que ativa a caspase-1 que cliva pró-IL-

1 β liberando IL-1 β . A IL-1 β estimula a ação das células TCD8⁺ e recrutam neutrófilos, monócitos e macrófagos (LIMA-JUNIOR *et al.* 2013; SANTOS *et al.* 2017).

Novais *et al.*, (2017) demonstram que a inibição genética e farmacológica da via NLRP3 do inflamossoma em modelo murino diminuem os efeitos deletérios da infecção sem alterar a resposta imunoprotetora controlada pelo IFN- γ . Resposta semelhante foi observada em lesão de pacientes infectados por *L. braziliensis* com diminuição da produção de IL-1 β pelo bloqueio da via NLRP3. Esses dados sugerem que a ativação dessa via culmina na ação citotóxica das células TCD8⁺, principal causa de danos teciduais na doença.

1.7 OMICAS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Devido à grande complexidade da doença com a participação de diversas células executando múltiplas funções e sendo influenciadas por várias vias de sinalizações, a compreensão dos mecanismos que envolvem a dinâmica da doença é fundamental. Atualmente, tem se estudado melhor as flutuações da resposta imune durante a progressão de doenças infecciosas. Esta melhora tem sido associada aos avanços alcançados com as técnicas genéticas de alto-rendimento “OMICAS”. A união entre o aumento da capacidade de armazenamento de dados, a velocidade de processamento de dados dos novos computadores e o desenvolvimento de novos softwares para análises destes dados, culminam no que se chama de bioinformática. Estes avanços estão permitindo revelar novos biomarcadores, alvos terapêuticos e antígenos candidatos à vacina em diferentes patologias através de assinaturas gênicas (identificação de um único gene, conjunto de genes, rede gênica e/ou rede gênica diferencial) (STURDEVANT *et al.*, 2010; FRÜH; FINLAY; MCFADDEN, 2010; BUONAGURO *et al.*, 2011; ZENG *et al.*, 2013).

Para realizar estudos de médio/alto rendimento de expressão genica existem hoje diferentes técnicas disponíveis. As três mais utilizadas são RNA-seq, Microarranjo e NanoString (ALTENBUCHINGER *et al.*, 2017). A decisão de qual das técnicas será utilizada envolve diversos critérios, com destaque para o custo, a quantidade de amostra e o nível de sensibilidades da análises.

Financeiramente, a técnica com menor custo é o microarranjo, seguido pelo NanoString e RNA-seq, que pode custar até quatro vezes mais que as outras duas técnicas. Em relação a quantidade de material genético exigida para realizar as análises, a técnica do microarranjo é que mais necessita, seguida pelo RNA-seq e pelo NanoString. Finalmente, a técnica com maior sensibilidade nas análises é a NanoString, seguido pelo RNA-seq e microarranjo.

O microarranjo tem como vantagem a possibilidade de se estudar vários genes de maneira simultânea. Suas desvantagens estão na limitação de não avaliar moléculas de duas espécies diferente (hospedeiro-parasito) e a baixa reprodutibilidade dos seus resultados (JUNG; SOHN, 2014; CHEN *et al.*, 2016).

O RNA-seq tem como vantagens: 1) a capacidade de analisar um universo maior de moléculas por amostra, independente de os genes serem da mesma espécie ou não e 2) permitir a quantificação da expressão gênica mesmo em transcritos com baixos níveis de expressão, sendo útil na identificação de mutações e splicing alternativos. Uma de suas desvantagens é a limitação de avaliar pequenas quantidades de material genético, necessitando de um custo maior por amostra (COSTA-SILVA *et al.*, 2017; TACHIBANA, 2015).

A técnica de NanoString permite a avaliação de pequenas quantidades de RNAm, possibilitando encontrar diferenças sutis entre amostras. Além disso, a técnica possui alta reprodutibilidade e flexibilidade, admitindo a avaliação de material genético de espécies diferentes na mesma análise. Possui como limitação, testar poucas moléculas por amostra, entre 600 e 800 genes. (GEISS *et al.*, 2008; KULKARNI, 2011; CHEN *et al.*, 2016).

Um dos primeiros trabalhos publicados utilizando expressão gênica em leishmanioses cutânea foi o de Oliveira *et al.*, (2015) que descreveu o papel da citocinas IL-2, na infecção por *Leishmania braziliensis*. Foram estudados transcritos de RNA por microarranjo em lesões de pacientes infectados com *L. braziliensis*. Observou-se que os genes relacionados a via do IL-2 eram altamente transcritos nessas lesões.

Outra contribuição foi realizada por Novais *et al.* (2017) que identificou o papel das células CD8⁺ e do inflamossoma na infecção por *Leishmania braziliensis*. Em modelo murino foi observada uma forte dependência entre a ativação do inflamossoma através da IL-1 β e a citotoxicidade das células CD8⁺. Padrão semelhante foi encontrado em análise de lesão de pacientes com LCL. A avaliação por microarranjo demonstrou que o perfil de expressão genica foi semelhantes ao observado no modelo murino e diferiu do apresentado em lesões de pele de outras doenças (NOVAIS *et al.*, 2015).

Por fim, Christensen *et al.* (2016) estudaram a expressão gênica em lesões de pacientes com LCL causada por *L. braziliensis* utilizando RNA-seq. Foi demonstrado que a resposta imune dos pacientes diferiu entre os que possuíam ou não transcritos do parasito na lesão. A presença de transcritos do parasito direcionou a resposta imune dos pacientes para a produção de linfócitos B, sugerindo uma forte influência dos genes do parasito no desenvolvimento da resposta do hospedeiro.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

2.1 JUSTIFICATIVA

Acreditamos que o melhor entendimento dos processos iniciais da resposta imune que precedem o surgimento da lesão pode ajudar a compreender melhor o papel dos fatores imunológicos no controle da parasitemia, formação da lesão, cura espontânea e falha terapêutica.

2.2 HIPÓTESE

O perfil transcricional da resposta imune da lesão tecidual de pacientes com LCL é diferente de acordo com o tempo de lesão, presença de parasito, resposta inflamatória e destruição tecidual.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Identificar as principais moléculas e vias relacionadas à patogênese da leishmaniose *ex vivo* e identificar, através de análise *in silico*, mecanismos de proteção/susceptibilidade.

3.2 ESPECÍFICOS

- Identificar, através de ensaios de expressão gênica de médio rendimento, as principais moléculas expressas em biópsias de pacientes com LCL;
- Identificar vias e moléculas candidatas a alvos terapêuticos e/ou biomarcadores de evolução da doença na resposta imune humana através das análises funcionais de genes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COMITÊ DE ÉTICA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (CEP) do IGM, conforme parecer de número 900.199/2014. Todos os procedimentos com os pacientes seguiram as Diretivas e Normas Regulamentadoras da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96) do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Os participantes do estudo foram informados sobre a atividade a ser realizada, assim como, assinaram e receberam uma cópia do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido);

4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Para esse estudo foram recrutados 9 pacientes com infecção por *Leishmania braziliensis*, oriundos de postos de saúde nas áreas endêmicas do Vale de Jiquiriçá, Bahia. Para a inclusão foram avaliados parâmetros com característica de LCL; pacientes com nódulos linfáticos palpáveis (diâmetro >1cm), pápulas, lesões cutâneas com fundo de necrotismo e bordas elevadas, IDRМ positivo, não ter apresentado a doença anteriormente e sem tratamento inicial. Os indivíduos foram analisados e registrados de acordo com a data de diagnóstico e de início da lesão, sexo, idade, evolução e tratamento.

4.3 BIÓPSIAS DE PACIENTES COM LCL

A biópsia de material para estudo foi realizada após anestesia local com lidocaína a 2%, e com auxílio de “punch”. Foi retirada de cada paciente aproximadamente 4mm da borda da lesão leishmaniotica. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido até o momento da extração de RNA.

4.4 EXTRAÇÃO DE RNA

As extrações do RNA das amostras biológicas foram realizadas utilizando o kit micro RNeasy (Qiagen, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Em microtubos de

1,5mL, os materiais biológicos foram macerados em 350µL do tampão RLT β-mercaptoetanol com auxílio de um pistilo. O macerado foi passado 20x por uma agulha (21G, BD) para rompimento completo do tecido e centrifugado por 3 minutos em 12.000xg. O sobrenadante (300µL) foi transferido para outro tubo, onde se adicionou 350µL de etanol 70% e homogeneizou-se 10x com a pipeta. Em seguida, as amostras foram aplicadas em uma coluna, centrifugadas a 8.000xg por 1 minuto e o líquido do tubo coletor da coluna descartado. A coluna foi lavada com 350µL de tampão de lavagem RW1. O tratamento com a DNase foi realizado com aplicação de 10µL da enzima e 70µL do tampão RDB no centro da membrana por 15 minutos. Realizou-se nova lavagem com tampão RW1. Adicionou-se 500µL do tampão RPE, centrifugou-se a 8.000xg por 1 minuto e descartou o líquido. Posteriormente, adicionou-se 500µL de etanol 80%, centrifugou-se a 8.000xg por 2 minutos e descartou o líquido e o tubo coletor. Novamente centrifugou-se a 12.000xg por 5 minutos com a tampa aberta, descartou o tubo e em um novo tubo realizou-se a eluição do RNA com 14µL de água livre de RNase. O RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Nanodrop 1000) e a integridade do RNA analisada pelo Bioanalyzer. Logo após a extração, o RNA foi congelado em freezer -80°C até a realização dos ensaios de nCounter (Nanostring) (Anexo I).

4.5 ENSAIOS DE NCOUNTER (NANOSTRING)

A análise de expressão genica, foi realizada na plataforma de genômica funcional da VIB/Universidade Católica de Leuven (Bélgica). A técnica utilizada foi a nCounter (NanoString Technologies) que utiliza sondas específicas com “código de barra” (barcode) fluorescente para quantificar RNAm em multiplex. O processo utiliza duas sondas, uma que captura o RNAm de interesse pela sequência complementar e a outra conectada a um código de barras que identifica o alvo por hibridação específica. As sondas são misturadas com o material genético e as moléculas de interesse são identificadas pelas cores geradas e a expressão é dada pela contagem do número de cores para cada RNAm em uma única reação. Para este estudo foi construído um painel com 621 genes (601 genes alvos *Homo sapiens*, 15 genes endógenos *Homo sapiens*, 4 genes de *Leishmania spp.*, 1 gene de *Staphylococcus aureus*).

4.6 ANÁLISES DE ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL

O programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA) foi utilizado para gerar redes e análises de enriquecimento funcional (QIAGEN Inc.). O IPA ajuda a analisar grandes bancos de dados obtidos nos ensaios de médio/alto rendimento (microarranjo, proteômica, genômica, etc.), fornecendo informações sobre sistemas biológicos e químicos. O IPA é capaz de identificar interações moleculares e químicas, fenótipos celulares e processos de doença presentes no seu sistema a partir de uma variedade de plataformas experimentais implementados no programa.

4.7 ANÁLISES DE CITOMETRIA DE FLUXO *IN SILICO*

CIBERSORT (Newman *et al.*, 2015) e CTen (Shoemaker *et al.*, 2012) permitem uma quantificação com precisão dos níveis relativos de tipos celulares distintos a partir dados de transcriptoma. O CIBERSORT utiliza os dados quantitativos dos transcritos detectados por nCounter NanoString das amostras de biópsias de pele normal ou lesão de pacientes com leishmaniose. O CTen utiliza a lista de genes mais importantes gerado a partir de análises comparativas (Fold Change) e/ou de agrupamento (PCA e eigenvectors) de cada grupo estudado.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os múltiplos testes T foram utilizados de acordo com o teste de homoscedastic para a variância: múltiplo teste T foi corrigido por método de duas etapas (Two-stage step-up) de Benjamini, Krieger e Yekutieli. Foi considerado o nível de significância do valor de q de 1% (software GraphPad Prism 7.0).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DESCRITIVAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Para todos os nove pacientes selecionados para este estudo, foram coletados dados sobre gênero (56% mulheres), idade (mediana=42,0 anos, IQR = 13,0-48,5), tamanho da lesão (mediana=2 cm, IQR = 1,5-2,25) e duração do tratamento (mediana=3 meses, IQR=2-4,5). Para sete pacientes, a duração da doença foi auto-referida (mediana=60 dias, IQR 30-60) (Tabela 1). Quatro biópsias de pele de cirurgia plástica foram incluídas no estudo para normalização de análise de expressão gênica.

Tabela 1. Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com LCL incluídos no estudo

	LCL
Gênero – Feminino (%) (n=9)	56 (5/9)
Idade (anos) (n=9)	42 (13-48.5)
Duração da doença (dias) (n=7)	60 (30-60)
Tamanho da lesão (cm) (n=9)	2 (1.5-2.25)
Duração do tratamento (meses) (n=9)	3 (2-4.5)

5.2 ASSINATURA TRANSCRIPTÔMICA IMUNE É CAPAZ DE DIFERENCIAR AS AMOSTRAS DE BIÓPSIAS DE LESÕES CUTÂNEAS DE LCL EM DOIS GRUPOS

A manifestação clínica da LCL e a progressão da doença estão fortemente associadas à resposta imune do hospedeiro, à carga parasitária e à infecção secundária. Devido a isso, decidimos realizar um experimento de expressão gênica de médio rendimento, avaliando 601 genes alvos humanos envolvidos na resposta imune, quatro genes da *Leishmania spp.* e um gene de *Staphylococcus aureus*. Inicialmente, avaliamos se a assinatura transcriptômica imune seria capaz de identificar as amostras de pele de cirurgia plástica e de biópsias de lesão de pacientes com LCL. Surpreendentemente, os métodos de Agrupamento Hierárquico (HC) e Análise de Componentes Principais (PCA), foram capazes de separar as amostras em três grupos: 1x grupo com amostras de pele normal e 2x grupos distintos com amostras de biópsias de lesão cutânea causada por *Leishmania braziliensis* (Figura 2).

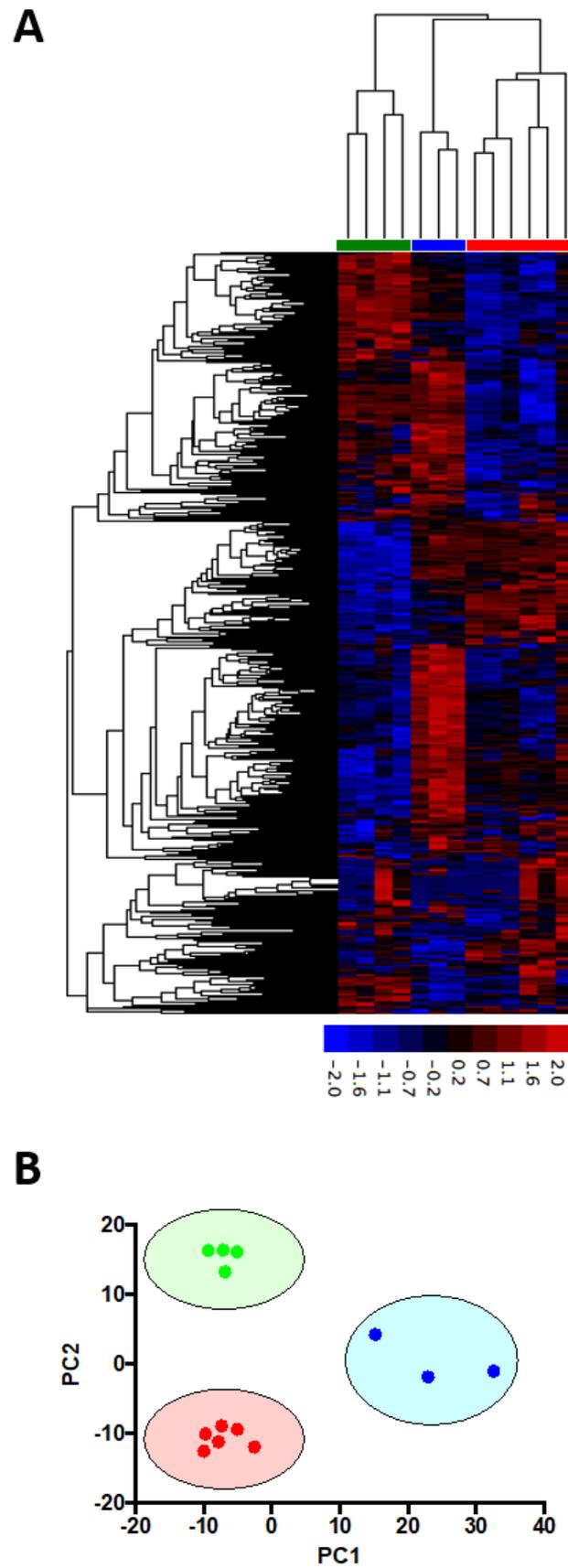


Figura 2. A Análises de agrupamento das amostras de biopsias de pele de doadores normais e lesões cutâneas de pacientes com LCL. A) Agrupamento Hierárquico (HC), a escala de intensidade de cor de azul, preto e vermelho indica os valores de Z score referente a quantidade de transcritos detectados, a barra verde = doador normal, azul = grupo 1 LCL, vermelho = grupo 2 LCL. B) Análise de componentes principais (PCA), o círculo verde = doador normal, azul = grupo 1 LCL, vermelho = grupo 2 LCL.

Com base nos achados das análises de agrupamento acima, avaliamos as diferenças clínicas, epidemiológicas (idade, gênero, tempo de doença, tamanho da lesão e tempo de cura) e de transcritos de *Leishmania spp.* e *Staphylococcus aureus* entre os dois grupos formados por amostras de biopsias de lesão cutânea de pacientes com LCL. As amostras do grupo 1 apresentaram menor tempo da doença (grupo 1, mediana=30 dias; grupo 2, mediana=60 dias), menor tamanho da lesão (grupo 1, mediana=1cm; grupo 2, mediana=2cm) e idade (grupo 1, mediana=18 anos; grupo 2, mediana=43,5 anos) (Figura 3). Contudo, não foram observadas diferenças expressivas no tempo de cura e gênero. Além disso, detectamos a presença significativa de transcrição do parasito no grupo 1, mas não no grupo 2, em comparação com o controle (One-way ANOVA, *L. spp.* HSP70 $p=0,0001$; *L. spp.* Arginase $p=0,0001$; *L. spp.* NT2 $p=0,0001$). Entretanto, o grupo 2 apresentou transcritos de *Staphylococcus aureus*, indicando uma infecção secundária para o grupo 2 (Figura 4).

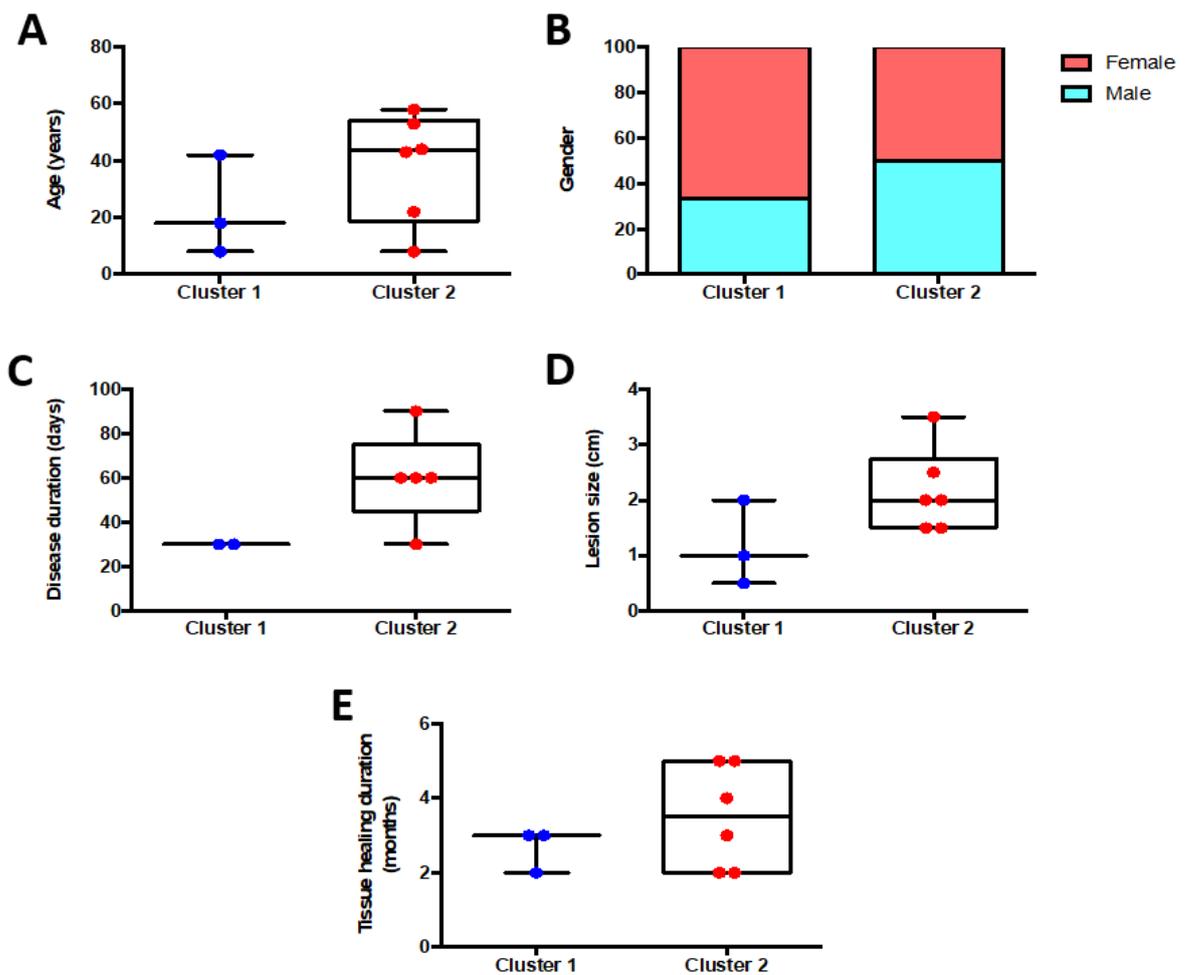


Figura 3. Comparação dos dados clínicos e epidemiológicos entre os grupos de lesões cutâneas de pacientes com LCL. A) Idade (anos). B) Gênero. C) Tempo de doença (dias). D) Tamanho da lesão (cm). E) Tempo de cura (meses). Os valores quantitativos (A, C-E) foram representados através de gráfico de box plot e dot plot e a comparação estatística por teste de Mann-Whitney (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$). O valor qualitativo (B) foi representado por gráfico de barra para representação gráfica da porcentagem de amostras e a comparação estatística por teste de Fisher (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$).

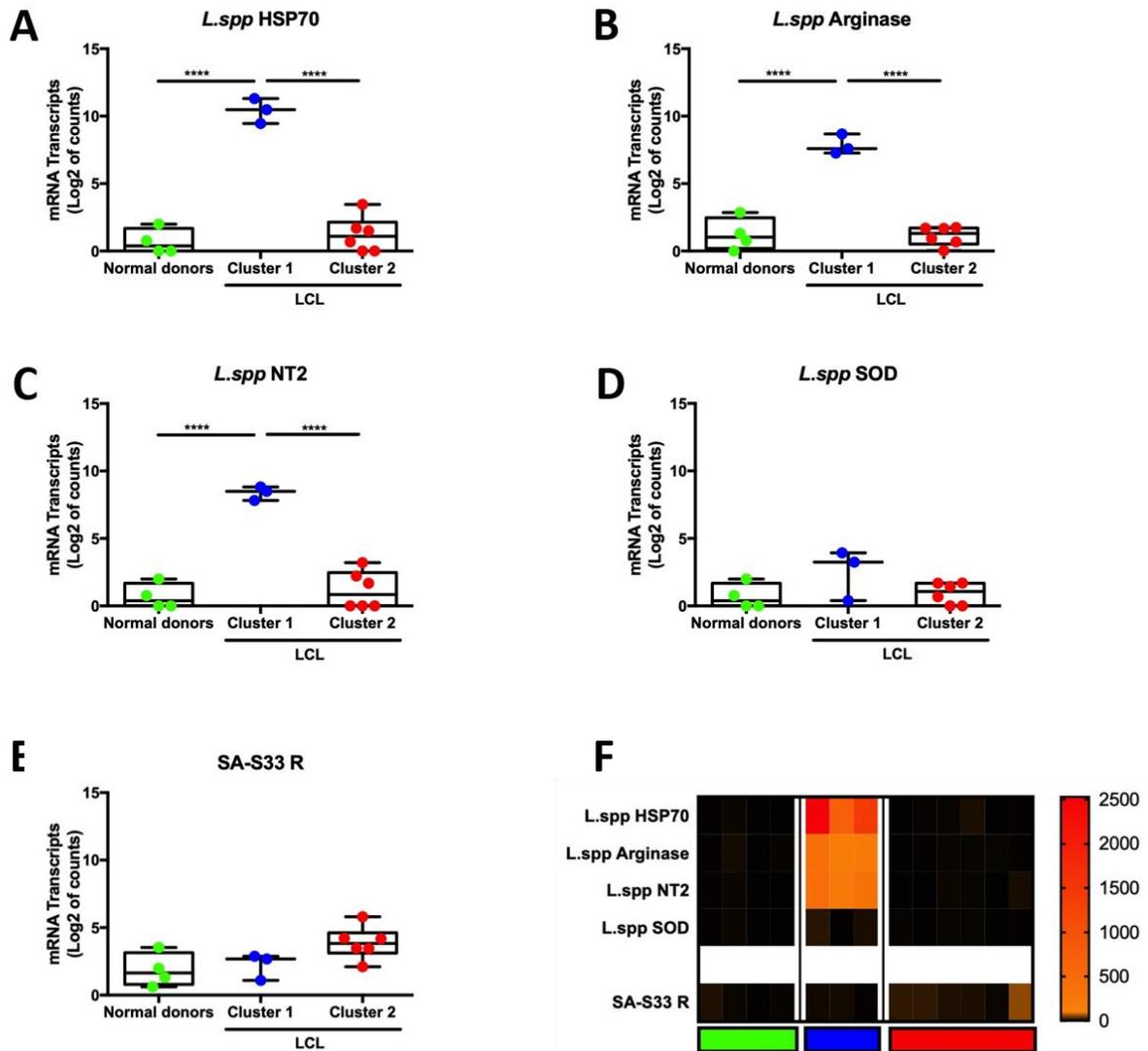
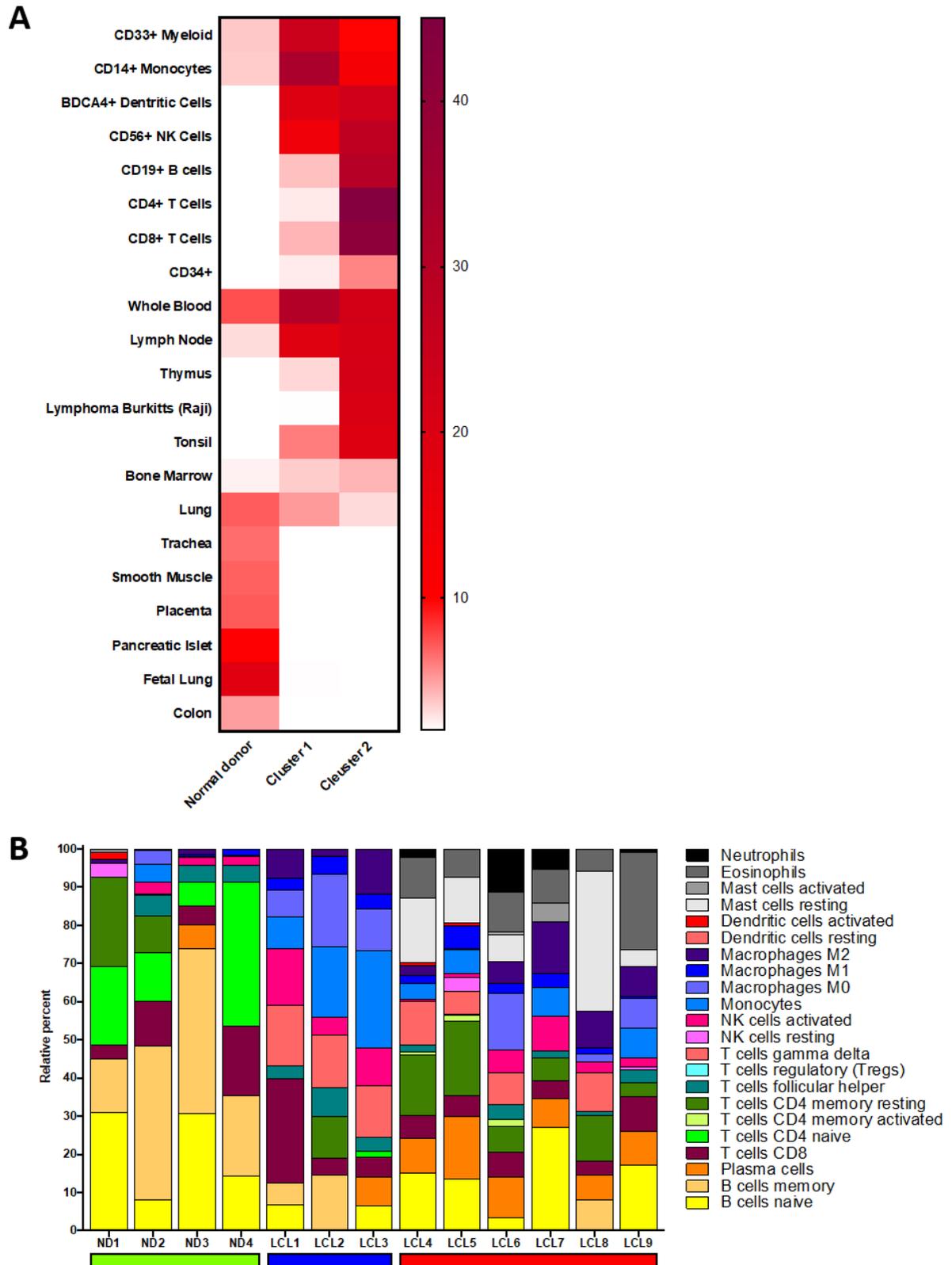


Figura 4. Comparação dos dados de transcrito de *Leishmania spp.* e *Staphylococcus aureus* entre os grupos de lesões cutâneas de pacientes com LCL. A) *Leishmania spp.* HSP70. B) *Leishmania spp.* Arginase. C) *Leishmania spp.* NT2. D) *Leishmania spp.* SOD. E) *Staphylococcus aureus* SA-S33R. F) Mapa de calor representando a contagem de cópias de RNAm para cada amostra. Os valores quantitativos (A-E) foram representados através de gráfico de box plot e dot plot e a comparação estatística por teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

5.3 AS ASSINATURAS TRANSCRIPTÔMICAS IMUNES DE BIÓPSIAS DE LESÕES CUTÂNEAS ESTÃO ASSOCIADAS A POPULAÇÕES CELULARES DA RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA

Para confirmar os achados acima, que indicam que as lesões com presença de transcritos de *L. braziliensis*, são lesões iniciais (menores e com menor tempo de doença), utilizamos a citometria de fluxo *in silico* para caracterizar a população celular nas biópsias. Para isso, utilizamos dois programas que usam algoritmos distintos para identificar populações celulares *in silico*: 1) CTen e 2) CIBERSORT. Utilizando o Cten, identificamos no grupo 1 uma

população celular associada à imunidade inata (monócitos CD14⁺, Células Dendríticas BDCA4⁺ e Células NK CD56⁺), enquanto que no grupo 2 identificamos células da imunidade adaptativa (células B CD19⁺, células T CD4⁺ e células T CD8⁺) (Figura 5). Utilizando o CIBERSORT, confirmamos no grupo 1 uma população celular associada à imunidade inata (monócitos, macrófagos M0 e Células NK ativadas), enquanto que no grupo 2, identificamos células da imunidade adaptativa e polimorfonucleares (Plasmócitos, células T CD4⁺ de memória em repouso, e células T CD8⁺, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos) (Figura 5). Assim a assinatura transcriptômica imune está associada a populações celulares de resposta imune inata nas lesões com menor tempo de doença e presença de transcritos de *L. braziliensis*, e populações celulares de resposta imune adaptativa nas lesões com maior tempo de doença e sem transcritos de *L. braziliensis*. A identificação de polimorfonucleares no grupo 2 pode ser explicada pela infecção secundária por *Staphylococcus aureus*.



5.4 AS ASSINATURAS TRANSCRIPTÔMICAS IMUNES DE BIÓPSIAS DE LESÕES CUTÂNEAS ESTÃO ASSOCIADAS A MECANISMOS BIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR

Para entender melhor os mecanismos biológicos associados à progressão da doença na leishmaniose, decidimos investigar o enriquecimento de vias no conjunto de genes significativamente expressos ($\text{LogFC} \geq 2$ e $\text{FDR} = 0,01$) entre os grupos. Primeiro, comparamos a expressão gênica de todos os pacientes LCL versus doador normal para identificar assinaturas relacionadas com doença independente do tempo da lesão. Então, comparamos lesões com transcritos de *L. braziliensis* e sem transcritos de *L. braziliensis* versus biópsias de pele do doador normal para identificar assinaturas associadas à infecção por *L. braziliensis*.

Finalmente, comparamos biópsias de lesões de pacientes com LCL com presença de transcritos de *L. braziliensis* versus biópsias de lesões de pacientes com LCL sem transcritos de *L. braziliensis* para identificar diferenças específicas entre as biópsias de lesões LCL aqui classificadas (Figura 6).

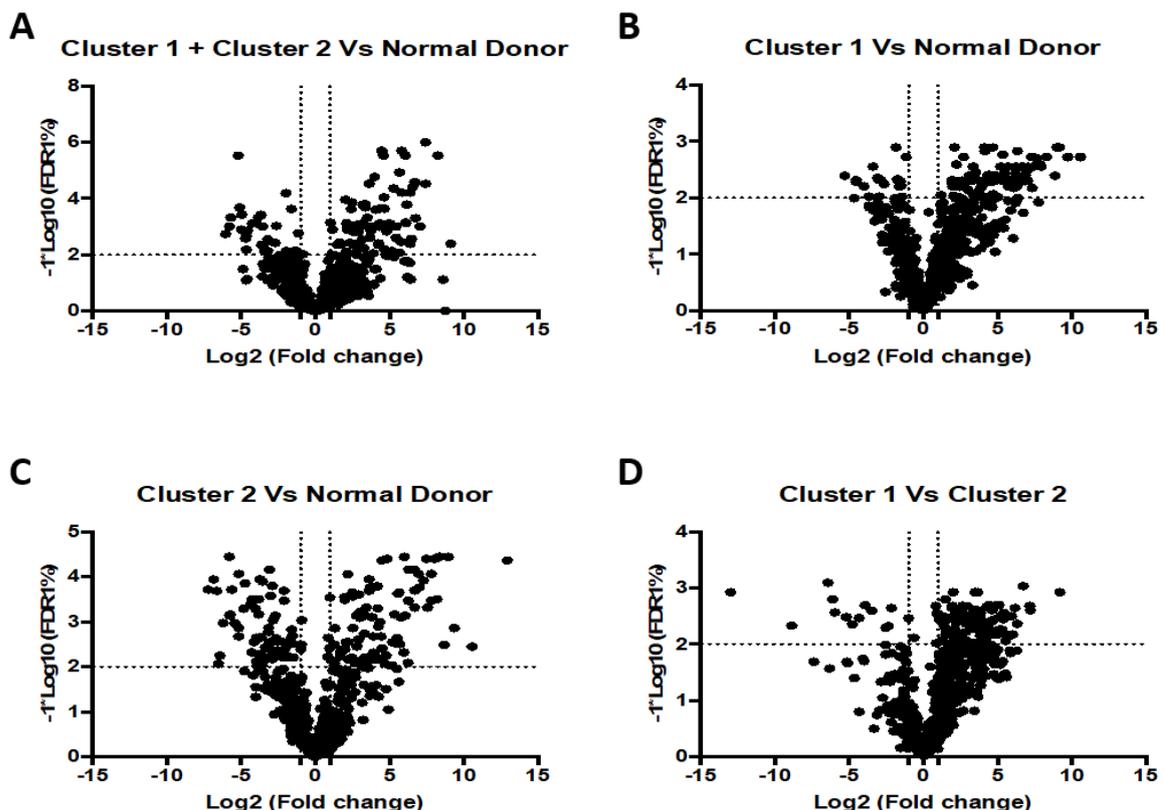


Figura 6. Genes diferencialmente expressos entre os grupos de lesões cutâneas de pacientes com LCL. A) LCL total versus doador normal B) Grupo 1 versus doador normal C) Grupo 2 versus doador normal D) Grupo 1 versus grupo 2. Os valores de Log do Fold Change (eixo Y) e $-\text{Log}_{10}$ do valor de q (FDR) (eixo X) foram representados através de gráfico de Volcano plot.

A análise através do IPA revela a inibição da via canônica de sinalização SAPK/JNK e a ativação da via canônica de sinalização IL-8 em todas as comparações. Por outro lado, a via canônica de sinalização do IFN e a via canônica do Inflamossoma foram ativadas apenas em lesões LCL com transcritos de *L. braziliensis*. Confirmando os achados usando análise de vias canônicas, a análise de reguladores upstream identificou uma ativação de IFNAR e inibição de CD200, TRIM24 e IL10RA em lesões de LCL com transcritos de *L. braziliensis* (Figura 7). De forma importante, há uma inibição de COL18A1, VCAN, NEUROG1 e ativação de IL4, HRG e ALOX15 durante toda a progressão da doença. Finalmente, a análise de doenças e funções revelaram vasculogênese e movimento de células epiteliais com ativação de fagócitos em lesões de LCL com transcritos de *L. braziliensis* (Figura 7).

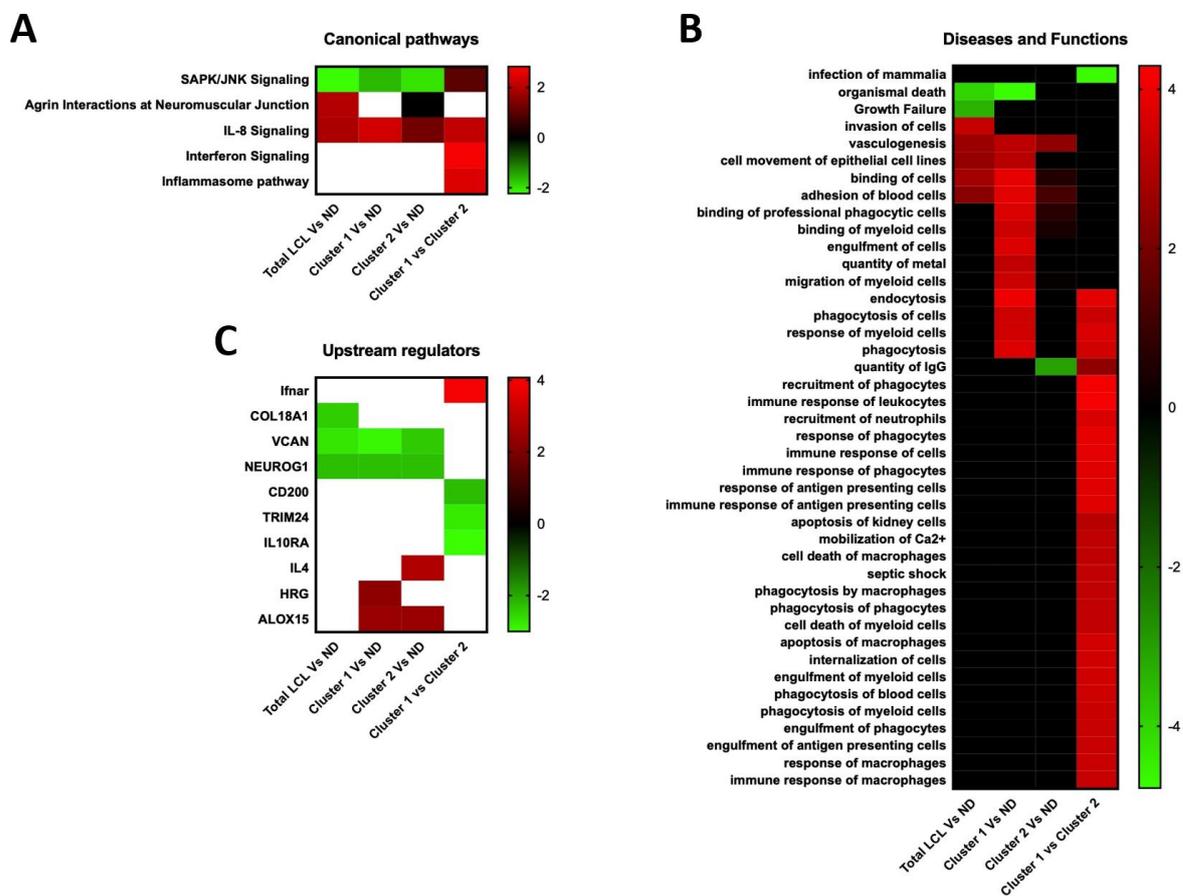


Figura 7. Análises de enriquecimento de vias. Mapa de calor representando as predições significativas do IPA para A) Vias canônicas b) Moléculas reguladoras e c) Doenças e funções. A escala de cor variando de verde, preto e vermelho, representa a variação de escores z de -4 (reguladores negativos = verde) a +4 (reguladores positivos = vermelho). A cor branca representa ausência de associação estatística, $-\log_{10}$ de valor de $p < 1,3$.

Integrando as análises de expressão gênica, regulador upstream e doenças e funções, o IPA confirmou o papel dos reguladores upstream e os genes que foram regulados para a ativação das diferentes funções, demonstrando um processo de destruição da matriz extracelular (VCAN e COL18A1) associado à movimento celular e inflamação desde o início da formação de lesão e permanecendo durante a progressão da doença (Figura 8).

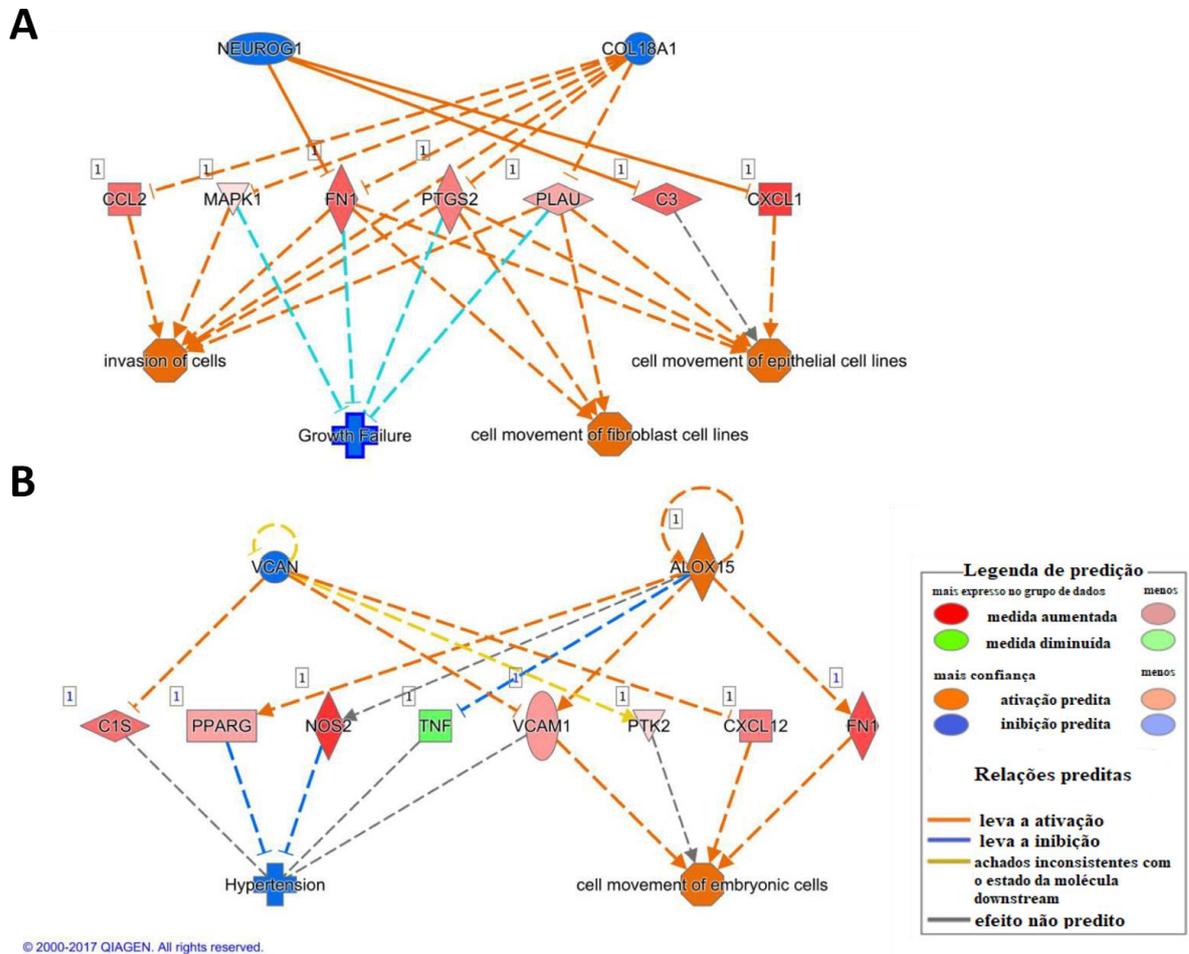


Figura 8. Análise de efeito regulatório demonstra uma degradação da matriz extracelular da pele durante a infecção por *L. braziliensis*. A) LCL total versus doador normal (escore de consistência de 7,181) e B) Grupo 2 versus doador normal (escore de consistência de 1,767).

6 DISCUSSÃO

Compreender os padrões de expressão da lesão cutânea é crucial para permitir a descoberta de biomarcadores ou alvos terapêuticos para LCL. A combinação de dados clínicos e parâmetros de expressão gênica possibilita um estudo mais completo das consequências da progressão da doença em LCL. Alguns estudos têm sido realizados com a abordagem de transcriptoma em leishmaniose cutânea por diferentes técnicas, entretanto, alguns mecanismos imunológicos ainda não foram totalmente elucidados (NOVAIS *et al.*, 2015; CHRISTENSEN *et al.*, 2016; SALDANHA *et al.*, 2017). Nosso estudo surge como uma alternativa às abordagens tradicionais, através da implementação da técnica nCounter (NanoString) para análise transcricional de lesões de pacientes com LCL. Apesar desta técnica avaliar um número limitado de genes, ela possui alta sensibilidade e reprodutibilidade nas análises, característica fundamental para estudos que almejam observar as diferenças entre variáveis biológicas de forma mais clara.

Vários estudos vêm sendo executados com intuito de caracterizar as lesões de pacientes com LCL de acordo com a evolução da lesão, apresentações clínicas, histológicas e transcricionais. Atualmente, a classificação mais aceita é a divisão em lesões iniciais e tardias (ESTERRE *et al.*, 1992, DANTAS *et al.*, 2013; SALDANHA *et al.*, 2017). Em nossos resultados, os padrões de expressão de genes em lesões de pacientes observados permitiram agrupamento similar, revelando uma modulação transcriptômica subjacente durante LCL. Esses resultados contrastam com estudos anteriores que não foram capazes de distinguir genes pela análise de transcriptoma ligados aos dois estágios de desenvolvimento da lesão, iniciais e tardias (NOVAIS *et al.*, 2015; CHRISTENSEN *et al.*, 2016).

Nossos dados mostram que nos pacientes com lesões com presença de transcritos de *Leishmania spp.*, a assinatura transcriptômica imunológica estava relacionada com um menor tamanho de lesão, menor tempo de evolução, e associada a assinatura de células pertencentes à resposta imunológica inata (monócitos, células dendríticas e células NK). Esses achados corroboram com estudos histológicos que encontraram um padrão celular semelhante a lesões iniciais (ESTERRE *et al.*, 1992, DANTAS *et al.*, 2013; SALDANHA *et al.*, 2017). Além disso, Christensen *et al.*, (2016) ressaltou a importância da presença de transcritos do parasito no desenvolvimento da resposta imune durante a infecção. Nos pacientes com lesões sem presença de transcritos de *Leishmania spp.*, se observou uma assinatura imunológica de células relacionadas com a resposta imune adaptativa (linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e linfócitos B). Vários trabalhos têm demonstrado o predomínio desses tipos celulares em paciente com lesões tardias

(DANTAS *et al.*, 2013; CARDOSO *et al.*, 2015; NOVAIS *et al.*, 2015; SALDANHA *et al.*, 2017).

A presença de bactérias em lesões cutâneas por *Leishmania spp.* tem sido relatado em alguns estudos (ZIAEI, H; SADEGHIAN, G; HEJAZI. 2008; YEHA, *et al.*, 2017). Vera *et al.*, (2001), com predominância de *Staphylococcus aureus* (SALGADO *et al.*, 2016). Nossos resultados demonstram a presença de transcrito gênico de *Staphylococcus aureus* com destaque para lesões tardias de pacientes com LCL contribuindo com a inflamação. Esses dados indicam a necessidade da realização de mais estudos sobre o papel desses microrganismos no desenvolvimento da lesão.

Na análise de enriquecimento foram identificadas e descritas vias associadas diretamente com a patogênese da leishmaniose. As que mais se destacaram foram: SAPK/JNK, IL-8, IFN, inflamossoma, moléculas de sinalização, IL-10, IL-4, ALOX15.

A via de sinalização SAPK/JNK está envolvida na ativação da resposta oxidativa pela produção de ROS. Filardy *et al.*, (2014) observaram que durante a infecção por *L. major* em modelo experimental ocorria uma ativação da via SAPK/JNK, fato também observado em nossos experimentos, principalmente na lesão de pacientes com transcrito de *L. braziliensis*. A ativação dessa via provoca uma diminuição na produção de ROS favorecendo a sobrevivência do parasito. Ao contrário, já foi demonstrado por Carneiro *et al.*, (2016) que a presença de IL-8, uma citocina pró-inflamatória, tem papel fundamental na resolução da infecção por *L. braziliensis*. Nossos resultados estão de acordo com esses achados, pois em todos os pacientes foi observado o aumento dos níveis de IL-8.

Nossas descobertas confirmam que a sinalização de IFN- γ e a via do inflamossoma foram ativadas apenas em lesões iniciais. A sinalização de IFN- γ foi associada à carga de parasitos e a sinalização de inflamossoma associada à duração da doença. Resultado semelhante foi observado por Christensen *et al.*, (2016) que demonstrou a presença de altos níveis IFN- γ em lesões de paciente com presença de parasito. Novais *et al.*, (2015) também encontrou uma associação direta ente altos níveis de IFN- γ e a patogênese da doença. Também detectamos a ativação do IFNAR e a inibição de CD200, TRIM24 e IL-10RA em pacientes com LCL inicial. Outras vias que também são implicadas com a progressão da doença são IL-4 e IL-10 (PROBS *et al.*, 2012; SCOTT; NOVAIS, 2016;). Em nossos resultados identificamos uma ativação dessas duas vias acompanhando a evolução da doença.

As lipoxigenases são enzimas que atuam no catabolismo do ácido araquidônico produzindo os leucotrienos. Membros da família ALOX tem sido relacionada com a regulação de resposta pró-inflamatória. Já foi demonstrado por França-costa *et al.*, (2015) que a expressão gênica de lipoxigenases da família ALOX é reduzida em pacientes com leishmaniose mucosa

comparado a pacientes com LCL. Em nosso estudo a expressão gênica de ALOX15 foi aumentada em lesões iniciais e tardias, sugerindo uma relação direta com a progressão da doença.

Por fim, o nosso estudo demonstrou aumento da degradação da matriz extracelular indicado através da identificação dos genes VCAN e COL18A1 nas análises de enriquecimento de vias. A degradação desses genes induz uma amplificação da inflamação, vasculogênese e movimento celular desde o início da formação da lesão. Dentre as possíveis moléculas que estão envolvidas na degradação da MEC, contribuindo para formação de lesão crônica na pele, as granzimas possuem papel central (HIEBERT; GRANVILLE, 2012; TURNER; LIM; GRANVILLE, 2017). Nosso estudo permitiu identificar a presença de Células NKs e T CD8⁺ nas lesões de pacientes com LCL, principais produtoras de Granzima B (figura 9). Já foi confirmado em estudos anteriores que a presença de células T CD8⁺ Granzima B⁺ contribui para o desenvolvimento da lesão, retardando a cicatrização (DANTAS *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2013; CARDOSO *et al.*, 2015), mas o mecanismo envolvido ainda estava incompreensível. Além disso, dados não publicados (Figura 10) revelam que os linfonodos desses pacientes possuem uma assinatura imunológica Th1 fortemente associada as células CD4⁺ e CD8⁺ e, provavelmente, são essas as células que retornam ao local da lesão e estimulam a produção de moléculas que contribuem para a degradação tecidual na lesão.

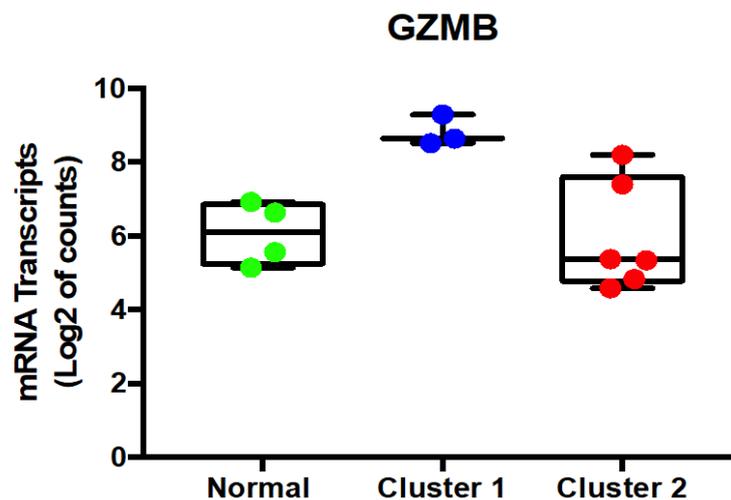


Figura 9. Infecção por *L. braziliensis* aumenta a expressão de GZMB. Os valores quantitativos foram representados através de gráfico de box plot e dot plot e a comparação estatística por teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

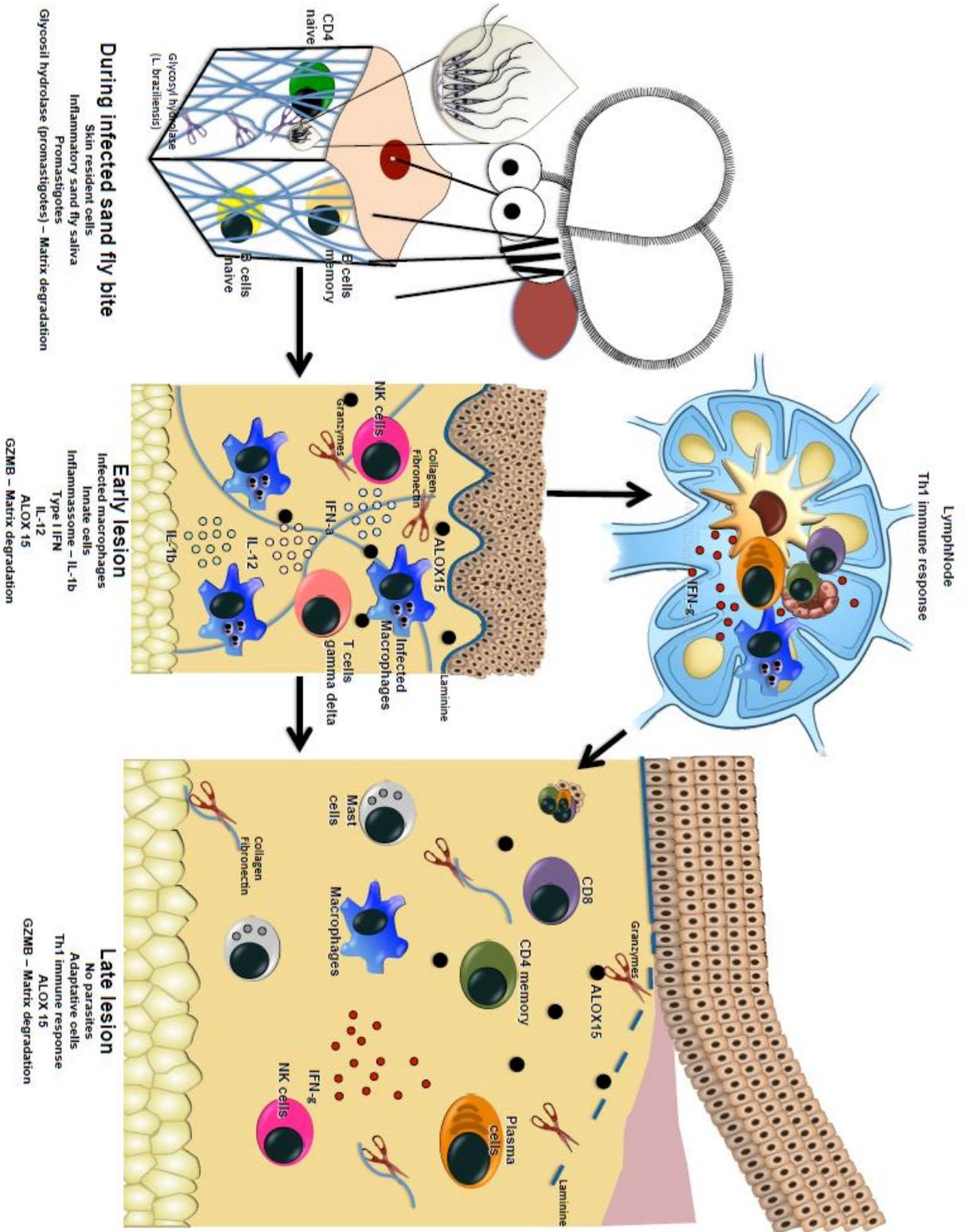


Figura 10. Mecanismo imunopatológico proposto de lesão cutânea causada por *L. braziliensis*.

7 CONCLUSÃO

Nosso estudo verificou que as diferentes assinaturas transcriptômicas de lesões de pacientes com LCL causada por *L. braziliensis* estão associadas com a presença ou ausência de patógeno e não necessariamente com o tempo de lesão. Foi confirmado que lesões iniciais, com presença do patógeno, estão mais relacionadas com a presença de células da resposta imune inata e lesões tardias, sem a presença do patógeno, com células da resposta imune adaptativa. A utilização de técnicas de médio rendimento permitiu a confirmação da participação das vias do estresse oxidativo, dos lipídios e do inflamossoma na progressão da lesão, como já discutido em outros trabalhos. Surpreendentemente, revelamos a presença de uma via de degradação de matriz extracelular em lesões de LCL possivelmente associada com a ação de células citotóxicas e granzima B.

REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI, M. *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 3, 2016.
- AKOPYANTS, N. S. *et al.* Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 1, n. 136, p. 71-86, 2004.
- ALMEIDA, L. *et al.*, Analysis of expression of FLI1 and MMP1 in American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* infection. **Infect. Genet. Evol.**, v. 49, p. 212-220, 2017.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, v. 7, n. 5, 2012.
- ALVAR, J. *et al.* The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, n. 2, p. 334–359, 2008.
- AMATO, V. S. *et al.*, Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, n. 2, p. 266-274, 2007.
- ANDRADE, B. B. *et al.*, Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. **Scand. J. Immunol.**, v. 66, n. 2-3, p. 122-127, 2007.
- ARAÚJO-SANTOS, T. *et al.*, Anti-parasite therapy drives changes in human visceral leishmaniasis-associated inflammatory balance. **Sci Rep.**, v. 7, p. 1-8, 2017.
- ARAÚJO-SANTOS, T. *et al.*, Prostaglandin E2/leukotriene B4 balance induced by *Lutzomyia longipalpis* saliva favors *Leishmania infantum* infection. **Parasit. & Vectors**, v. 7, n. 601, p. 1-8, 2014.
- ASSCHE, T. V. *et al.*, *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Rad. Biol. & Med.**, v. 51, p. 337–351, 2011.
- ATAYDE, V. D. *et al.*, Exosome secretion by the parasitic protozoan *Leishmania* within the sand fly midgut. **Cell Rep.**, v. 13, n. 15, p. 957-967, 2015.
- ATAYDE, V. D. *et al.*, *Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. **Cell. Immunol.**, v. 309, p. 7-18, 2016.
- BARRAL, A. *et al.*, Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, n. 3, p. 256-259, 1995a.
- BARRAL, A. *et al.*, Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous, infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, n. 5, p. 587-592, 1992.
- BARRAL, A. *et al.*, Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. **Int. J. Dermatol.**, v. 34, p. 474-479. 1995b.

- BARRAL-NETTO, M. *et al.* Immunology of cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 19, n. 3 p. 173-191, 2017.
- BEATTIE, L.; KAYE, P. M. *Leishmania*–host interactions: what has imaging taught us? **Cell. Microbiol.**, v. 13, n. 11, p. 1659–1667, 2011.
- BHARDWAJ, S. *et al.*, *Leishmania* interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2010, p. 1–13, 2010.
- BITTENCOURT, A. L. *et al.*, Distinct ultrastructural aspects in different biopsies of a single patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz**, v. 85, n. 1, p. 53-59. 1990.
- BITTENCOURT, A. L. *et al.*, Leishmaniasis recidiva cutis in american cutaneous leishmaniasis, **Int. J. Dermatol.**, v. 32, n. 11, p. 802-805, 1993.
- BOAVENTURA, V. S. *et al.*, Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. **Eur. J. Immunol.**, v. 40, p. 2830–2836, 2010.
- BOGDAN, C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. **Cell. Infect. Microbiol.**, v. 2, p. 1–9, 2012.
- BRASIL, Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Rev. Saúde Públ.**, v. 44, n. 1, p. 200-202, 2010.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, SVS. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/imagens/pdf/2017/marco/03/LT-Graficos-e-Mapas.pdf>. Acesso em: 03 set 2018.
- BUONAGURO, L. *et al.*, Systems biology applied to vaccine and immunotherapy development. **BMC Systems Biol.**, v. 5, n.146, p. 1-11, 2011.
- CAMPANELLI, A. P. *et al.*, CD4⁺CD25⁺ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. **J. Infect Dis.**, v. 193, p. 1313–1322. 2006.
- CAMPANELLI, A. P. *et al.*, Chemokines and chemokine receptors coordinate the inflammatory immune response in human cutaneous leishmaniasis. **Human Immunol.**, v.71, p. 1220–1227, 2010.
- CAMPOS-PONCE, M. *et al.*, *Leishmania chagasi/infantum*: further investigations on *Leishmania* tropism in atypical cutaneous 30 and visceral leishmaniasis foci in Central America. **Exp. Parasitol.**, v. 109, p. 209–219, 2005.
- CARDOSO, T. M. Protective and pathological functions of cd8⁺ t cells in *Leishmania braziliensis* infection. **Infect. Immun.**, v. 83, n. 3, p. 898 –906, 2015.
- CARVALHO, A. K. *et al.*, Differential recruitment of dendritic cells subsets to lymph nodes correlates with a protective or permissive t-cell response during *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Mediators Inflamm.**, v. 2016, p. 1-12, 2016.

CELES, F. S. *et al.*, DETC-based bacterial cellulose biocuratives for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Scientific Rep.**, v. 6, p. 1-11, 2016.

CHAVES, M. M; CANETTI, C; COUTINHO-SILVA R; Crosstalk between purinergic receptors and lipid mediators in leishmaniasis. **Parasit. & Vectors**, v. 9, n. 489, p. 1-9, 2016.

CHEN, X. *et al.* Comparison of nanostring nCounter® data on ffpe colon cancer samples and affymetrix microarray data on matched frozen tissues. **Plos One**, v. 11, n. 5, p. 1-13, 2016.

CHRISTENSEN, S. M. *et al.* Meta-transcriptome profiling of the human-*Leishmania braziliensis* cutaneous lesion. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 9, p. 1-17, 2016.

CONCEIÇÃO, J. *et al.*, Characterization of neutrophil function in human cutaneous leishmaniasis caused by *leishmania braziliensis*. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 5, p. 1-19, 2016.

COSTA, J. M. *et al.* Clinical modalities, diagnosis and therapeutic approach of the *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, n. 3, p. 256-259, 1995.

COSTA, J. M. *et al.* Diffuse cutaneous Leishmaniasis (dcl) in brazil after 60 years of your first description. **Gaz Méd. Bahia**, v. 79, n. 5, p. 16–24, 2009b.

COSTA-SILVA, J. *et al.* RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. **Plos One**, v. 12, n. 12, 1-18, 2017.

COURRET, N. *et al.* Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. **J. Cell Sci.**, v. 115, n. 11, p. 2303–2316, 2002.

CUNHA, J. M. *et al.*, Immunization with ljm11 salivary protein protects against infection with *Leishmania braziliensis* in the presence of *Lutzomyia longipalpis* saliva. **Acta Trop.**, n. 177, p. 164-170, 2018.

DALASTRA, M.; BATISTELA MOREIR, M. A. Euthanasia for the Zoonosis Control Program. In: **Euthanasia - The “Good Death” Controversy in humans and animals**. [s.l.] InTech, 2011.

DANTAS, M. L. *et al.*, CD8+ T cells in situ in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 46, n. 6, p. 728–734, 2013.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Vet. Parasitol.**, v. 149, n. 3-4, p. 139–146, 2007.

DESJEUX, P, Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, p. 305-318, 2004.

DESJEUX. P, Leishmaniasis. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p.692, 2004.

ESPINOSA, O. A. *et al.* An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, p. 1-13, 2016.

ESTERRE, P. *et al.* Cell populations in the lesion of human cutaneous leishmaniasis: a light microscopic, immunohistochemical and ultrastructural study. **Virch. Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.**, v. 421, n. 3, p. 239-247, 1992.

FERREIRA, A. L. A; MATSUBARA L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FRANÇA-COSTA, J. *et al.*, Differential expression of the eicosanoid pathway in patients with localized or mucosal cutaneous leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 213, p. 1143-1147, 2016.

FRÜH, K; FINLAY, B; MCFADDEN, G; On the road to systems biology of hostpathogen interactions. **Future Microbiol.**, v. 5, n. 2, p. 131-133, 2010.

GANGNEUX, J. P. *et al.* Recurrent american cutaneous leishmaniasis, **Emerg. Infect Dis.**, v. 13, n. 9, p. 1436-1438, 2007.

GEISS, G. K. *et al.* Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. **Nature Biotechnol.**, v. 26, n. 3, p. 317-326, 2008.

GIUDICE, A. *et al.*, Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. **Infect Dis.**, v. 12, n. 75, p. 1-9, 2012.

GONTIJO, B; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Uberaba, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GONZÁLEZ, U. *et al.* Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. **Cochrane Libr.**, n. 8, p. 103, 2015.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **Int. j. Parasitol.**, v. 33, n. 10, p. 1027-1034, 2003.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic Leishmaniasis and approaches to disease control. **Int. J. Parasitol.**, v. 35, p. 1169–1180, 2005.

GREGORY, D. J; OLIVIER, M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. **Parasitology**, v. 130, n. 1, p. 27-35, 2005.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, n. 3, p. 230–250, 1993.

GUIMARÃES, L. H. *et al.*, Aspectos clínicos da leishmaniose tegumentar, **Gaz. Méd. Bahia**, v. 75, n. 1, p. 66-74, 2005.

HANDMAN, E; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitol.**, v. 18. N. 8, p. 332-334, 2002.

HIEBERT, P. R; GRANVILLE, D. J. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. **Trends Mol. Med.**, v. 18, n. 12, p. 732-741, 2012.

- JUNG, S; SOHN I. Statistical issues in the design and analysis of ncounter projects. **Cancer Inform.**, v. 13, n. 7, p. 35-43, 2014.
- JUNQUEIRA, L. C. U; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 18, p. 524.
- KAMHAWI, S. *et al.*, The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. **Microbes Infect.**, v. 2, n. 14, p. 1765-1773, 2000.
- KAYE, P.; SCOTT, P; Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.
- KHOURI, R. *et al.*, IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 182, n. 4, p. 2525-2531, 2009.
- KHOURI, R. *et al.*, Sod1 plasma level as a biomarker for therapeutic failure in cutaneous leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 2014, n. 210, p. 306-310, 2014.
- KULKARNI, M. M. Digital multiplexed gene expression analysis using the NanoString nCounter system. **Curr. Prot. Mol. Biol.**, v. 25, n. 10, p. 10-17, 2011.
- LAINSON R, SHAW J. J. New world leishmaniasis the neotropical *leishmania* species. **Topley & Wilson's Microbiology And Microbial Infections**, v. 5, n. 9, p. 242-266, 1998.
- LARSEN, R. *et al.*, Heme cytotoxicity and the pathogenesis of immune-mediated inflammatory diseases. **Front. Pharmacol.**, v.2, n. 77, p. 1–17, 2012.
- LEON, B; LOPEZ-BRAVO, M; ARDAVIN, C; Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective t helper 1 responses against *Leishmania*. **Immunity**, v. 26, p. 519-531, 2007.
- LESSA, M. M. *et al.*, Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Braz. J. Otorhinolaryngol.**, V. 73, n. 6, p. 843-847.2007.
- LIMA, J. B. *et al.*, *Leishmania infantum* lipophosphoglycan induced-Prostaglandin E2 production in association with PPAR- γ expression via activation of Toll like receptors-1 and 2. **Sci Rep.**, v. 7, p. 1-11, 2017.
- LIMA-JUNIOR, D. S. *et al.* Inflammasome-derived IL-1beta production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p. 909–915, 2013.
- LLANOS-CUENTAS *et al.*, 2008; Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, p. 223-231, 2008.
- LUZ, N. F. *et al.*, Heme oxygenase-1 promotes the persistence of *Leishmania chagasi* infection. **J. Immunol.**, v. 188, n. 9, p. 4460-4467, 2012.

- MACHADO, P. R. *et al.* Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 105, n. 8, p. 438-444, 2011.
- MACHADO, P. R. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer, **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p. 69-73, 2002.
- MACHADO, P. R. L. *et al.*, Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. **Infect. Dis. Soc. Am.**, v.44, p. 788-793, 2007.
- MACHADO-COELHO, G. L. *et al.*, Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 99, n. 1, p. 55–61, 2005.
- MAILLO, B. M.; VÉLEZ, R. L. Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Drugs**, V. 73, n. 17, p. 1889-1920, 2013.
- MALTA-SANTOS, H. *et al.*, Resolvin D1 drives establishment of *Leishmania amazonensis* infection. **Sci. Rep.**, v. 7, p. 1-8, 2017.
- MATTE, C.; OLIVIER, O.; *Leishmania*-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 673–681, 2002.
- MCBRIDE, A. G.; BORUTAITE, V.; BROWN, G. C. Superoxide dismutase and hydrogen peroxide cause rapid nitric oxide breakdown, peroxynitrite production and subsequent cell death. **Bioch. Biophys. Acta.**, v. 1454, n. 3, p. 275-288, 1999.
- MCGWIRE, B. S; CHANG, K; ENGMAN, D. M. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. **Infect Immune**, v. 71, n. 2, p. 1008-1010, 2003.
- MENEZES, J. P; SARAIVA E. M; ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasit. & Vectors**, v. 9, n. 264, p. 1-8, 2016.
- MILLER, M. A. *et al.*, Inducible resistance to oxidant stress in the protozoan *Leishmania chagasi*. **J. B. C.**, v. 275, p. 33883-33889, 2000.
- MODABBER, F. *et al.* Consultative meeting to develop a strategy for treatment of cutaneous leishmaniasis. **Kinetoplastid Biol. Dis.**, v. 6, n3, 2007.
- MOMENI, A. Z. M. D.; AMINJAVAHERI, M. M.D. Treatment of recurrent cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Dermatol.**, v. 34, n. 2, p. 129-133, 1995.
- MONTALVO, A. M. *et al.*, Leishmaniasis diagnosis: going from microscopic observation of parasite to DNA detection., **Rev. Cuba. Med. Trop.**, Habana, v.64, n. 2, 2012.
- MOURA, T. R. *et al.*, Toward a novel experimental model of infection to study american cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 9, p. 5827-5834, 2005.

- MURRAY, H. W. *et al.*, Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p.1561-1577. 2005.
- MUXEL, S. M. *et al.*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. **Sci Rep.**, v. 7, p. 1-15, 2017.
- NOVAIS, F. O. *et al.*, CD8+ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 β production. **Plos Pathog.**, v. 13, n. 2, p. 1-21, 2017.
- NOVAIS, F. O. *et al.*, Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. **J. Invest. Dermatol.**, v. 135, n. 1, p. 94-101, 2015.
- OLIVEIRA, C. I; BRODSKYN, C, The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Immunobiology**, v. 3, n. 145, p. 1-9, 2012.
- OLIVEIRA, J. M. *et al.*, Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 43, n. 2, p. 188-193, 2010.
- OLIVEIRA, P. R. S. *et al.*, IL2RA genetic variants reduce il-2-dependent responses and aggravate human cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 194, n. 6, p. 2664-2672, 2015.
- OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Leishmanioses: informe epidemiológico nas Américas**. 2017 Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754. Acesso em 03 set 2018.
- PACE, D. Leishmaniasis. **J. Infect.**, v. 69, n. 1, p. 10-18, 2014.
- PACHER, P; BECKMAN, J. S; LIAUDET L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol. Rev.**, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.
- PETERS, N. C. *et al.* *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008.
- PROBST, C. M. *et al.* A comparison of two distinct murine macrophage gene expression profiles in response to *Leishmania amazonensis* infection. **BMC Microbiol.**, v. 12, n. 22, p. 1-12, 2012.
- QUINTELA-CARVALHO, G. *et al.*, Heme drives oxidative stress-associated cell death in human neutrophils infected with *Leishmania infantum*. **Front. Immunol.**, v. 8, p. 1-12, 2017.
- REIS, L. de C. *et al.* Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous Leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 5, p. 439-443, 2008.
- REIS, L. L. D, *et al.*, Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 50, n. 5. P. 638-645, 2017.
- REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous *Leishmaniasis*. **Lancet Infect Dis.**, v. 7, n. 6, p. 581-596, 2007.

- REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 404.
- RIBEIRO, J. M. C. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infect. Agents Dis.**, v. 4, n. 3, p. 143-152, 1995.
- RODIGUES, I. A. *et al.*, Natural products: insights into leishmaniasis inflammatory response. **Mediat. Inflamm.**, v. 2015, p. 1-12, 2015.
- SACKS, D; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 55, p. 453-83, 2001.
- SALDANHA, M. G. *et al.*, Characterization of the histopathologic features in patients in the early and late phases of cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 96, n. 3, p. 645-652, 2017.
- SALGADO, V. R. *et al.*, The microbiological signature of human cutaneous leishmaniasis lesions exhibits restricted bacterial diversity compared to healthy skin. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 4, p. 241-251. 2016.
- SANTOS, C. S. *et al.*, CD8⁺ granzyme B⁺ – Mediated tissue injury vs. CD4⁺ IFN γ ⁺ – mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 133, n. 6, p. 1533-1540, 2013.
- SANTOS, D. *et al.* IL-1 β production by intermediate monocytes is associated with immunopathology in cutaneous leishmaniasis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 17, p. 33242-33246, 2017.
- SANTOS, D. M. *et al.*, Chemotherapeutic potential of 17-aag against cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 10, p. 1-9, 2014.
- SANTOS, J. B; *et al.* Antimony plus recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied topically in low doses enhances healing of cutaneous leishmaniasis ulcers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study, **J. Infect Dis.**, v. 190, n. 10, p. 1793-1796, 2004.
- SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, n. 6, p. 1296, 2017.
- SCOTT, P; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 581-592, 2016.
- Shoemaker, J. E. *et al.* CTen: a web-based platform for identifying enriched cell types from heterogeneous microarray data. **BMC Genomics**, 13, 460, 2012.
- SILVEIRA, *et al.* Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 31, n. 5, p. 423-431, 2009.
- SILVEIRA, F. T. *et al.* Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

- STURDEVANT, D. E. *et al.* Host-microbe interaction systems biology: lifecycle transcriptomics and comparative genomics. **Future Microbiol.**, v. 5, n. 2, p. 205-219, 2010.
- TACHIBANA, C. Transcriptomics today: Microarrays, RNA-seq, and more. **Science**, p. 544-546, 2015.
- TAVARES, N. M. *et al.*, Degranulating neutrophils promote leukotriene b4 production by infected macrophages to kill *Leishmania amazonensis* parasites. **J. Immunol.**, v. 196, n. 4, p. 1865-1873, 2016.
- TAVARES, N. M. *et al.*, Understanding the mechanisms controlling *Leishmania amazonensis* infection *in vitro*: the role of ltb4 derived from human neutrophils. **J. Infect. Dis.**, v. 210, p. 656-666, 2014.
- TEIXEIRA, M. J. *et al.*, Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 62, p. 1191–1195, 2005.
- TELES, C. B. *et al.* Phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) diversity and their *Leishmania* DNA in a hot spot of American cutaneous leishmaniasis human cases along the Brazilian border with Peru and Bolivia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 7, p. 423–432, 2016.
- TURNER, C. T; LIM, D; GRANVILLE D. J, Granzyme B in skin inflammation and disease. **Matrix Boil.**, v. 53, n. 17, p. 1-15, 2017.
- VERA, L. A. Evaluation of the secondary bacterial infection's influence on the evolution of cutaneous leishmaniasis in Corte de Pedra, Bahia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, n. 3, p. 233-237, 2001.
- VIVARINI, A. C. *et al.*, Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) via TLR2. **Faseb J.**, v. 25, p. 4162-4173, 2011.
- VIVARINI, A. C. *et al.*, Systems approach reveals nuclear factor erythroid 2-related factor 2/protein kinase r crosstalk in human cutaneous leishmaniasis. **Front. Immunol.**, v. 8, p. 1-18, 2017.
- WERNECK, G. L; HASSELMANN, M. H; GOUVEA, T. G. Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil. **Ciênc. Saúde Col.**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 1, p. 39-62, 2011.
- YEHIA, H. M. *et al.* *In vitro* and *In vivo* Control of secondary bacterial infection caused by *Leishmania major*. **Int. J. Environ. Res. Publ. Health**, v. 14, n. 777, p. 1-16, 2017.
- ZAMBRANO-VILLA, S. *et al.* How protozoan parasites evade the immune response. **Trends Parasitol.**, v. 18, n. 6, p. 272-278, 2002.
- ZENG, T. *et al.*, Network biomarkers reveal dysfunctional gene regulations during disease progression. **FEBS J.**, v. 280, n. 22, p. 5682-5695, 2013.

ZIAEI, H; SADEGHIAN, G; HEJAZI, S. Distribution frequency of pathogenic bacteria isolated from cutaneous leishmaniasis lesions. **Korean. J. Parasitol.**, v. 46, n. 3, p. 191-193, 2008.

APÊNDICE I

Quadro 1. Genes relacionados a resposta imune humana, *Leishmania spp.* e *Staphylococcus aureus* avaliados no estudo.

Specie	CodeClass	Name	Accession
Human	Endogenous	ABCB1	NM_000927.3
Human	Endogenous	ABL1	NM_005157.3
Human	Endogenous	ADA	NM_000022.2
Human	Endogenous	AHR	NM_001621.3
Human	Endogenous	AICDA	NM_020661.1
Human	Endogenous	AIRE	NM_000383.2
Human	Endogenous	ALOX15	NM_001140.3
Human	Endogenous	ALOX5	NM_000698.2
Human	Endogenous	APP	NM_000484.3
Human	Endogenous	ARG1	NM_000045.2
Human	Endogenous	ARG2	NM_001172.3
Human	Endogenous	ARHGDI1	NM_001175.4
Human	Endogenous	ATG10	NM_001131028.1
Human	Endogenous	ATG12	NM_004707.2
Human	Endogenous	ATG16L1	NM_198890.2
Human	Endogenous	ATG5	NM_004849.2
Human	Endogenous	ATG7	NM_001136031.2
Human	Endogenous	ATM	NM_000051.3
Human	Endogenous	B2M	NM_004048.2
Human	Endogenous	B3GAT1	NM_018644.3
Human	Endogenous	BATF	NM_006399.3
Human	Endogenous	BATF3	NM_018664.2
Human	Endogenous	BAX	NM_138761.3
Human	Endogenous	BCAP31	NM_005745.7
Human	Endogenous	BCL10	NM_003921.2
Human	Endogenous	BCL2	NM_000657.2
Human	Endogenous	BCL2L1	NM_138621.4
Human	Endogenous	BCL3	NM_005178.2
Human	Endogenous	BCL6	NM_001706.2
Human	Endogenous	BID	NM_001196.2
Human	Endogenous	BLNK	NM_013314.2
Human	Endogenous	BST1	NM_004334.2
Human	Endogenous	BST2	NM_004335.2
Human	Endogenous	BTK	NM_000061.1
Human	Endogenous	BTLA	NM_181780.2
Human	Endogenous	C14orf166	NM_016039.2
Human	Endogenous	C1QA	NM_015991.2
Human	Endogenous	C1QB	NM_000491.3

Human	Endogenous	C1QBP	NM_001212.3
Human	Endogenous	C1R	NM_001733.4
Human	Endogenous	C1S	NM_001734.2
Human	Endogenous	C2	NM_000063.3
Human	Endogenous	C3	NM_000064.2
Human	Endogenous	C4A/B	NM_007293.2
Human	Endogenous	C4BPA	NM_000715.3
Human	Endogenous	C5	NM_001735.2
Human	Endogenous	C6	NM_000065.2
Human	Endogenous	C7	NM_000587.2
Human	Endogenous	C8A	NM_000562.2
Human	Endogenous	C8B	NM_000066.2
Human	Endogenous	C8G	NM_000606.2
Human	Endogenous	C9	NM_001737.3
Human	Endogenous	CAMP	NM_004345.3
Human	Endogenous	CARD9	NM_052813.4
Human	Endogenous	CASP1	NM_001223.3
Human	Endogenous	CASP10	NM_032977.3
Human	Endogenous	CASP2	NM_032982.2
Human	Endogenous	CASP3	NM_032991.2
Human	Endogenous	CASP8	NM_001228.4
Human	Endogenous	CCBP2	NM_001296.3
Human	Endogenous	CCL11	NM_002986.2
Human	Endogenous	CCL13	NM_005408.2
Human	Endogenous	CCL15	NM_032965.3
Human	Endogenous	CCL16	NM_004590.2
Human	Endogenous	CCL18	NM_002988.2
Human	Endogenous	CCL19	NM_006274.2
Human	Endogenous	CCL2	NM_002982.3
Human	Endogenous	CCL20	NM_004591.1
Human	Endogenous	CCL22	NM_002990.3
Human	Endogenous	CCL23	NM_145898.1
Human	Endogenous	CCL24	NM_002991.2
Human	Endogenous	CCL26	NM_006072.4
Human	Endogenous	CCL3	NM_002983.2
Human	Endogenous	CCL4	NM_002984.2
Human	Endogenous	CCL5	NM_002985.2
Human	Endogenous	CCL7	NM_006273.2
Human	Endogenous	CCL8	NM_005623.2
Human	Endogenous	CCND3	NM_001760.2
Human	Endogenous	CCR1	NM_001295.2
Human	Endogenous	CCR10	NM_016602.2
Human	Endogenous	CCR2	NM_001123041.2
Human	Endogenous	CCR5	NM_000579.1

Human	Endogenous	CCR6	NM_031409.2
Human	Endogenous	CCR7	NM_001838.2
Human	Endogenous	CCR8	NM_005201.2
Human	Endogenous	CCRL1	NM_016557.2
Human	Endogenous	CCRL2	NM_003965.4
Human	Endogenous	CD14	NM_000591.2
Human	Endogenous	CD160	NM_007053.2
Human	Endogenous	CD163	NM_004244.4
Human	Endogenous	CD164	NM_006016.4
Human	Endogenous	CD19	NM_001770.4
Human	Endogenous	CD1A	NM_001763.2
Human	Endogenous	CD1D	NM_001766.3
Human	Endogenous	CD2	NM_001767.3
Human	Endogenous	CD209	NM_021155.2
Human	Endogenous	CD22	NM_001771.2
Human	Endogenous	CD24	NM_013230.2
Human	Endogenous	CD244	NM_016382.2
Human	Endogenous	CD247	NM_198053.1
Human	Endogenous	CD27	NM_001242.4
Human	Endogenous	CD274	NM_014143.3
Human	Endogenous	CD276	NM_001024736.1
Human	Endogenous	CD28	NM_001243078.1
Human	Endogenous	CD34	NM_001025109.1
Human	Endogenous	CD36	NM_001001548.2
Human	Endogenous	CD3D	NM_000732.4
Human	Endogenous	CD3E	NM_000733.2
Human	Endogenous	CD3EAP	NM_012099.1
Human	Endogenous	CD4	NM_000616.4
Human	Endogenous	CD40	NM_001250.4
Human	Endogenous	CD40LG	NM_000074.2
Human	Endogenous	CD44	NM_001001392.1
Human	Endogenous	CD45R0	NM_080921.3
Human	Endogenous	CD45RA	NM_002838.4
Human	Endogenous	CD45RB	ENST00000367367.1
Human	Endogenous	CD46	NM_172350.1
Human	Endogenous	CD48	NM_001778.2
Human	Endogenous	CD5	NM_014207.2
Human	Endogenous	CD53	NM_001040033.1
Human	Endogenous	CD55	NM_000574.3
Human	Endogenous	CD58	NM_001779.2
Human	Endogenous	CD59	NM_000611.4
Human	Endogenous	CD6	NM_006725.3
Human	Endogenous	CD7	NM_006137.6
Human	Endogenous	CD70	NM_001252.2

Human	Endogenous	CD74	NM_001025159.1
Human	Endogenous	CD79A	NM_001783.3
Human	Endogenous	CD79B	NM_021602.2
Human	Endogenous	CD80	NM_005191.3
Human	Endogenous	CD81	NM_004356.3
Human	Endogenous	CD82	NM_002231.3
Human	Endogenous	CD83	NM_004233.3
Human	Endogenous	CD86	NM_175862.3
Human	Endogenous	CD8A	NM_001768.5
Human	Endogenous	CD8B	NM_004931.3
Human	Endogenous	CD9	NM_001769.2
Human	Endogenous	CD96	NM_005816.4
Human	Endogenous	CD97	NM_078481.2
Human	Endogenous	CD99	NM_002414.3
Human	Endogenous	CDH5	NM_001795.3
Human	Endogenous	CDKN1A	NM_000389.2
Human	Endogenous	CEACAM1	NM_001712.3
Human	Endogenous	CEACAM6	NM_002483.4
Human	Endogenous	CEACAM8	NM_001816.3
Human	Endogenous	CEBPB	NM_005194.2
Human	Endogenous	CFB	NM_001710.5
Human	Endogenous	CFD	NM_001928.2
Human	Endogenous	CFH	NM_001014975.2
Human	Endogenous	CFI	NM_000204.3
Human	Endogenous	CFP	NM_002621.2
Human	Endogenous	CHUK	NM_001278.3
Human	Endogenous	CIITA	NM_000246.3
Human	Endogenous	CISH	NM_145071.2
Human	Endogenous	CLEC4A	NM_194448.2
Human	Endogenous	CLEC4E	NM_014358.2
Human	Endogenous	CLEC5A	NM_013252.2
Human	Endogenous	CLEC6A	NM_001007033.1
Human	Endogenous	CLEC7A	NM_197954.2
Human	Endogenous	CLU	NM_001831.2
Human	Endogenous	CMKLR1	NM_004072.1
Human	Endogenous	CR1	NM_000651.4
Human	Endogenous	CR2	NM_001006658.1
Human	Endogenous	CRADD	NM_003805.3
Human	Endogenous	CSF1	NM_000757.4
Human	Endogenous	CSF1R	NM_005211.2
Human	Endogenous	CSF2	NM_000758.2
Human	Endogenous	CSF2RB	NM_000395.2
Human	Endogenous	CSF3R	NM_156038.2
Human	Endogenous	CTLA4_all	NM_005214.3

Human	Endogenous	CTLA4-TM	NM_005214.3
Human	Endogenous	CTNNB1	NM_001098210.1
Human	Endogenous	CTSC	NM_001814.4
Human	Endogenous	CTSG	NM_001911.2
Human	Endogenous	CTSS	NM_004079.3
Human	Endogenous	CUL9	NM_015089.2
Human	Endogenous	CX3CL1	NM_002996.3
Human	Endogenous	CX3CR1	NM_001337.3
Human	Endogenous	CXCL1	NM_001511.1
Human	Endogenous	CXCL10	NM_001565.1
Human	Endogenous	CXCL11	NM_005409.4
Human	Endogenous	CXCL12	NM_000609.5
Human	Endogenous	CXCL13	NM_006419.2
Human	Endogenous	CXCL2	NM_002089.3
Human	Endogenous	CXCL9	NM_002416.1
Human	Endogenous	CXCR1	NM_000634.2
Human	Endogenous	CXCR2	NM_001557.2
Human	Endogenous	CXCR3	NM_001504.1
Human	Endogenous	CXCR4	NM_003467.2
Human	Endogenous	CXCR6	NM_006564.1
Human	Endogenous	CYBB	NM_000397.3
Human	Endogenous	DEFB1	NM_005218.3
Human	Endogenous	DEFB103A	NM_001081551.2
Human	Endogenous	DEFB103B	NM_018661.3
Human	Endogenous	DEFB4A	NM_004942.2
Human	Endogenous	DPP4	NM_001935.3
Human	Endogenous	DUSP4	NM_057158.2
Human	Endogenous	EBI3	NM_005755.2
Human	Endogenous	EDNRB	NM_003991.2
Human	Endogenous	EGR1	NM_001964.2
Human	Endogenous	EGR2	NM_000399.3
Human	Endogenous	EIF2AK2	NM_002759.1
Human	Endogenous	ENTPD1	NM_001098175.1
Human	Endogenous	EOMES	NM_005442.2
Human	Endogenous	ETS1	NM_005238.3
Human	Endogenous	FADD	NM_003824.2
Human	Endogenous	FAS	NM_000043.3
Human	Endogenous	FASLG	NM_000639.1
Human	Endogenous	FCAR	NM_133280.1
Human	Endogenous	FCER1A	NM_002001.2
Human	Endogenous	FCER1G	NM_004106.1
Human	Endogenous	FCGR1A/B	NM_000566.3
Human	Endogenous	FCGR2A	NM_021642.3
Human	Endogenous	FCGR2A/C	NM_201563.4

Human	Endogenous	FCGR2B	NM_001002273.1
Human	Endogenous	FCGR3A/B	NM_000570.4
Human	Endogenous	FCGRT	NM_004107.4
Human	Endogenous	FKBP5	NM_001145775.1
Human	Endogenous	FN1	NM_212482.1
Human	Endogenous	FOXP3	NM_014009.3
Human	Endogenous	FYN	NM_002037.3
Human	Endogenous	GATA3	NM_001002295.1
Human	Endogenous	GBP1	NM_002053.1
Human	Endogenous	GBP5	NM_052942.3
Human	Endogenous	GFI1	NM_005263.2
Human	Endogenous	GNLY	NM_006433.2
Human	Endogenous	GP1BB	NM_000407.4
Human	Endogenous	GPI	NM_000175.2
Human	Endogenous	GPR183	NM_004951.3
Human	Endogenous	GZMA	NM_006144.2
Human	Endogenous	GZMB	NM_004131.3
Human	Endogenous	GZMK	NM_002104.2
Human	Endogenous	HAMP	NM_021175.2
Human	Endogenous	HAVCR2	NM_032782.3
Human	Endogenous	HFE	NM_139011.2
Human	Endogenous	HLA-A	NM_002116.5
Human	Endogenous	HLA-B	NM_005514.6
Human	Endogenous	HLA-C	NM_002117.4
Human	Endogenous	HLA-DMA	NM_006120.3
Human	Endogenous	HLA-DMB	NM_002118.3
Human	Endogenous	HLA-DOB	NM_002120.3
Human	Endogenous	HLA-DPA1	NM_033554.2
Human	Endogenous	HLA-DPB1	NM_002121.4
Human	Endogenous	HLA-DQA1	NM_002122.3
Human	Endogenous	HLA-DQB1	NM_002123.3
Human	Endogenous	HLA-DRA	NM_019111.3
Human	Endogenous	HLA-DRB1	NM_002124.2
Human	Endogenous	HLA-DRB3	NM_022555.3
Human	Endogenous	HMOX1	NM_002133.1
Human	Endogenous	HRAS	NM_005343.2
Human	Endogenous	ICAM1	NM_000201.2
Human	Endogenous	ICAM2	NM_000873.3
Human	Endogenous	ICAM3	NM_002162.3
Human	Endogenous	ICAM4	NM_001039132.1
Human	Endogenous	ICAM5	NM_003259.3
Human	Endogenous	ICOS	NM_012092.2
Human	Endogenous	ICOSLG	NM_015259.4
Human	Endogenous	IDO1	NM_002164.3

Human	Endogenous	IFI16	NM_005531.1
Human	Endogenous	IFI35	NM_005533.3
Human	Endogenous	IFIH1	NM_022168.2
Human	Endogenous	IFIT2	NM_001547.4
Human	Endogenous	IFITM1	NM_003641.3
Human	Endogenous	IFNA1/13	NM_024013.1
Human	Endogenous	IFNA2	NM_000605.3
Human	Endogenous	IFNA4	NM_021068.2
Human	Endogenous	IFNAR1	NM_000629.2
Human	Endogenous	IFNAR2	NM_000874.3
Human	Endogenous	IFNB1	NM_002176.2
Human	Endogenous	IFNG	NM_000619.2
Human	Endogenous	IFNGR1	NM_000416.1
Human	Endogenous	IGF2R	NM_000876.1
Human	Endogenous	IKBKAP	NM_003640.3
Human	Endogenous	IKBKB	NM_001556.1
Human	Endogenous	IKBKE	NM_014002.2
Human	Endogenous	IKBKG	NM_003639.2
Human	Endogenous	IKZF1	NM_006060.3
Human	Endogenous	IKZF2	NM_016260.2
Human	Endogenous	IKZF3	NM_183232.2
Human	Endogenous	IL10	NM_000572.2
Human	Endogenous	IL10RA	NM_001558.2
Human	Endogenous	IL11RA	NM_147162.1
Human	Endogenous	IL12A	NM_000882.2
Human	Endogenous	IL12B	NM_002187.2
Human	Endogenous	IL12RB1	NM_005535.1
Human	Endogenous	IL13	NM_002188.2
Human	Endogenous	IL13RA1	NM_001560.2
Human	Endogenous	IL15	NM_172174.1
Human	Endogenous	IL16	NM_004513.4
Human	Endogenous	IL17A	NM_002190.2
Human	Endogenous	IL17B	NM_014443.2
Human	Endogenous	IL17F	NM_052872.3
Human	Endogenous	IL18	NM_001562.2
Human	Endogenous	IL18R1	NM_003855.2
Human	Endogenous	IL18RAP	NM_003853.2
Human	Endogenous	IL19	NM_013371.3
Human	Endogenous	IL1A	NM_000575.3
Human	Endogenous	IL1B	NM_000576.2
Human	Endogenous	IL1R1	NM_000877.2
Human	Endogenous	IL1R2	NM_173343.1
Human	Endogenous	IL1RAP	NM_002182.2
Human	Endogenous	IL1RL1	NM_016232.4

Human	Endogenous	IL1RL2	NM_003854.2
Human	Endogenous	IL1RN	NM_000577.3
Human	Endogenous	IL2	NM_000586.2
Human	Endogenous	IL20	NM_018724.3
Human	Endogenous	IL21	NM_021803.2
Human	Endogenous	IL21R	NM_021798.2
Human	Endogenous	IL22	NM_020525.4
Human	Endogenous	IL22RA2	NM_181310.1
Human	Endogenous	IL23A	NM_016584.2
Human	Endogenous	IL23R	NM_144701.2
Human	Endogenous	IL26	NM_018402.1
Human	Endogenous	IL27	NM_145659.3
Human	Endogenous	IL28A	NM_172138.1
Human	Endogenous	IL28A/B	NM_172139.2
Human	Endogenous	IL29	NM_172140.1
Human	Endogenous	IL2RA	NM_000417.1
Human	Endogenous	IL2RB	NM_000878.2
Human	Endogenous	IL2RG	NM_000206.1
Human	Endogenous	IL3	NM_000588.3
Human	Endogenous	IL32	NM_001012633.1
Human	Endogenous	IL4	NM_000589.2
Human	Endogenous	IL4R	NM_000418.2
Human	Endogenous	IL5	NM_000879.2
Human	Endogenous	IL6	NM_000600.1
Human	Endogenous	IL6R	NM_000565.2
Human	Endogenous	IL6ST	NM_002184.2
Human	Endogenous	IL7	NM_000880.2
Human	Endogenous	IL7R	NM_002185.2
Human	Endogenous	IL8	NM_000584.2
Human	Endogenous	IL9	NM_000590.1
Human	Endogenous	ILF3	NM_001137673.1
Human	Endogenous	INrf2 KLHL19	NM_012289.3
Human	Endogenous	IRAK1	NM_001569.3
Human	Endogenous	IRAK2	NM_001570.3
Human	Endogenous	IRAK3	NM_007199.1
Human	Endogenous	IRAK4	NM_016123.1
Human	Endogenous	IRF1	NM_002198.1
Human	Endogenous	IRF3	NM_001571.5
Human	Endogenous	IRF4	NM_002460.1
Human	Endogenous	IRF5	NM_002200.3
Human	Endogenous	IRF7	NM_001572.3
Human	Endogenous	IRF8	NM_002163.2
Human	Endogenous	IRGM	NM_001145805.1
Human	Endogenous	ITGA2B	NM_000419.3

Human	Endogenous	ITGA4	NM_000885.4
Human	Endogenous	ITGA5	NM_002205.2
Human	Endogenous	ITGA6	NM_000210.1
Human	Endogenous	ITGAE	NM_002208.4
Human	Endogenous	ITGAL	NM_002209.2
Human	Endogenous	ITGAM	NM_000632.3
Human	Endogenous	ITGAX	NM_000887.3
Human	Endogenous	ITGB1	NM_033666.2
Human	Endogenous	ITGB2	NM_000211.2
Human	Endogenous	ITLN1	NM_017625.2
Human	Endogenous	ITLN2	NM_080878.2
Human	Endogenous	JAK1	NM_002227.1
Human	Endogenous	JAK2	NM_004972.2
Human	Endogenous	JAK3	NM_000215.2
Human	Endogenous	KCNJ2	NM_000891.2
Human	Endogenous	KIR_Activating_Subgroup_1	NM_001083539.1
Human	Endogenous	KIR_Activating_Subgroup_2	NM_014512.1
Human	Endogenous	KIR_Inhibiting_Subgroup_1	NM_014218.2
Human	Endogenous	KIR_Inhibiting_Subgroup_2	NM_014511.3
Human	Endogenous	KIR3DL1	NM_013289.2
Human	Endogenous	KIR3DL2	NM_006737.2
Human	Endogenous	KIR3DL3	NM_153443.3
Human	Endogenous	KIT	NM_000222.2
Human	Endogenous	KLRAP1	NR_028045.1
Human	Endogenous	KLRB1	NM_002258.2
Human	Endogenous	KLRC1	NM_002259.3
Human	Endogenous	KLRC2	NM_002260.3
Human	Endogenous	KLRC3	NM_007333.2
Human	Endogenous	KLRC4	NM_013431.2
Human	Endogenous	KLRD1	NM_002262.3
Human	Endogenous	KLRF1	NM_016523.1
Human	Endogenous	KLRF2	NM_001190765.1
Human	Endogenous	KLRG1	NM_005810.3
Human	Endogenous	KLRG2	NM_198508.2
Human	Endogenous	KLRK1	NM_007360.1
Human	Endogenous	LAG3	NM_002286.5
Human	Endogenous	LAIR1	NM_002287.3
Human	Endogenous	LAMP3	NM_014398.3
Human	Endogenous	LCK	NM_005356.2
Human	Endogenous	LCP2	NM_005565.3
Human	Endogenous	LEF1	NM_016269.3
Human	Endogenous	LGALS3	NM_001177388.1
Human	Endogenous	LIF	NM_002309.3
Human	Endogenous	LILRA1	NM_006863.1

Human	Endogenous	LILRA2	NM_006866.2
Human	Endogenous	LILRA3	NM_006865.3
Human	Endogenous	LILRA4	NM_012276.3
Human	Endogenous	LILRA5	NM_181879.2
Human	Endogenous	LILRA6	NM_024318.2
Human	Endogenous	LILRB1	NM_001081637.1
Human	Endogenous	LILRB2	NM_005874.1
Human	Endogenous	LILRB3	NM_006864.2
Human	Endogenous	LILRB4	NM_001081438.1
Human	Endogenous	LILRB5	NM_001081442.1
Human	Endogenous	LITAF	NM_004862.3
Human	Endogenous	LTA	NM_000595.2
Human	Endogenous	LTB4R	NM_181657.3
Human	Endogenous	LTB4R2	NM_019839.4
Human	Endogenous	LTBR	NM_002342.1
Human	Endogenous	LTF	NM_002343.2
Human	Endogenous	LY96	NM_015364.2
Human	Endogenous	MAF	NM_005360.4
Human	Endogenous	MALT1	NM_006785.2
Human	Endogenous	MAP4K1	NM_007181.3
Human	Endogenous	MAP4K2	NM_004579.2
Human	Endogenous	MAP4K4	NM_004834.3
Human	Endogenous	MAPK1	NM_138957.2
Human	Endogenous	MAPK11	NM_002751.5
Human	Endogenous	MAPK14	NM_001315.1
Human	Endogenous	MAPKAPK2	NM_004759.3
Human	Endogenous	MARCO	NM_006770.3
Human	Endogenous	MASP1	NM_139125.3
Human	Endogenous	MASP2	NM_139208.1
Human	Endogenous	MBL2	NM_000242.2
Human	Endogenous	MBP	NM_002385.2
Human	Endogenous	MCL1	NM_021960.3
Human	Endogenous	MIF	NM_002415.1
Human	Endogenous	MLKL	NM_001142497.1
Human	Endogenous	MME	NM_000902.2
Human	Endogenous	MR1	NM_001531.2
Human	Endogenous	MRC1	NM_002438.2
Human	Endogenous	MS4A1	NM_152866.2
Human	Endogenous	MSR1	NM_002445.3
Human	Endogenous	MT1G	NM_005950.1
Human	Endogenous	MUC1	NM_001018017.1
Human	Endogenous	MX1	NM_002462.2
Human	Endogenous	MYD88	NM_002468.3
Human	Endogenous	NCAM1	NM_000615.5

Human	Endogenous	NCF4	NM_000631.4
Human	Endogenous	NCR1	NM_004829.5
Human	Endogenous	NFATC1	NM_172389.1
Human	Endogenous	NFATC2	NM_012340.3
Human	Endogenous	NFATC3	NM_004555.2
Human	Endogenous	NFE2L2	NM_006164.3
Human	Endogenous	NFIL3	NM_005384.2
Human	Endogenous	NFKB1	NM_003998.2
Human	Endogenous	NFKB2	NM_002502.2
Human	Endogenous	NFKBIA	NM_020529.1
Human	Endogenous	NFKBIZ	NM_001005474.1
Human	Endogenous	NLRP3	NM_001079821.2
Human	Endogenous	NOD1	NM_006092.1
Human	Endogenous	NOD2	NM_022162.1
Human	Endogenous	NOS2	NM_000625.4
Human	Endogenous	NOTCH1	NM_017617.3
Human	Endogenous	NOTCH2	NM_024408.3
Human	Endogenous	NT5E	NM_002526.2
Human	Endogenous	ODC	NM_002539.1
Human	Endogenous	PAX5	NM_016734.1
Human	Endogenous	PDCD1	NM_005018.1
Human	Endogenous	PDCD1LG2	NM_025239.3
Human	Endogenous	PDCD2	NM_144781.2
Human	Endogenous	PDGFB	NM_033016.2
Human	Endogenous	PDGFRB	NM_002609.3
Human	Endogenous	PECAM1	NM_000442.3
Human	Endogenous	PGAM5	NM_138575.3
Human	Endogenous	PIGR	NM_002644.2
Human	Endogenous	PLA2G2A	NM_000300.2
Human	Endogenous	PLA2G2E	NM_014589.1
Human	Endogenous	PLAU	NM_002658.2
Human	Endogenous	PLAUR	NM_001005376.1
Human	Endogenous	PML	NM_002675.3
Human	Endogenous	POU2F2	NM_002698.2
Human	Endogenous	PPARG	NM_015869.3
Human	Endogenous	PPBP	NM_002704.2
Human	Endogenous	PRDM1	NM_001198.3
Human	Endogenous	PRF1	NM_005041.3
Human	Endogenous	PRKCD	NM_006254.3
Human	Endogenous	PSMB10	NM_002801.2
Human	Endogenous	PSMB5	NM_001130725.1
Human	Endogenous	PSMB7	NM_002799.2
Human	Endogenous	PSMB8	NM_004159.4
Human	Endogenous	PSMB9	NM_002800.4

Human	Endogenous	PSMC2	NM_002803.3
Human	Endogenous	PSMD7	NM_002811.3
Human	Endogenous	PTAFR	NM_000952.3
Human	Endogenous	PTGER4	NM_000958.2
Human	Endogenous	PTGS2	NM_000963.1
Human	Endogenous	PTK2	NM_005607.3
Human	Endogenous	PTPN2	NM_002828.2
Human	Endogenous	PTPN22	NM_015967.4
Human	Endogenous	PTPN6	NM_002831.5
Human	Endogenous	PTPRC_all	NM_080921.2
Human	Endogenous	PYCARD	NM_013258.3
Human	Endogenous	RAF1	NM_002880.2
Human	Endogenous	RAG1	NM_000448.2
Human	Endogenous	RAG2	NM_000536.3
Human	Endogenous	RARRES3	NM_004585.3
Human	Endogenous	RELA	NM_021975.2
Human	Endogenous	RELB	NM_006509.2
Human	Endogenous	RIPK1	NM_003804.3
Human	Endogenous	RIPK2	NM_003821.5
Human	Endogenous	RIPK3	NM_006871.3
Human	Endogenous	RORC	NM_001001523.1
Human	Endogenous	RUNX1	NM_001754.4
Human	Endogenous	S100A8	NM_002964.3
Human	Endogenous	S100A9	NM_002965.2
Human	Endogenous	S1PR1	NM_001400.3
Human	Endogenous	sCTLA4	NM_001037631.1
Human	Endogenous	SELE	NM_000450.2
Human	Endogenous	SELL	NR_029467.1
Human	Endogenous	SELPLG	NM_003006.3
Human	Endogenous	SERPING1	NM_000062.2
Human	Endogenous	SH2D1A	NM_001114937.2
Human	Endogenous	SIGIRR	NM_021805.2
Human	Endogenous	SKI	NM_003036.2
Human	Endogenous	SLAMF1	NM_003037.2
Human	Endogenous	SLAMF6	NM_001184714.1
Human	Endogenous	SLAMF7	NM_021181.3
Human	Endogenous	SLC2A1	NM_006516.2
Human	Endogenous	SMAD3	NM_005902.3
Human	Endogenous	SMAD5	NM_005903.5
Human	Endogenous	SMS	NM_004595.2
Human	Endogenous	SOCS1	NM_003745.1
Human	Endogenous	SOCS3	NM_003955.3
Human	Endogenous	SOD1	NM_000454.4
Human	Endogenous	SOD2	NM_000636.2

Human	Endogenous	SPP1	NM_000582.2
Human	Endogenous	SRC	NM_005417.3
Human	Endogenous	SRM	NM_003132.2
Human	Endogenous	STAT1	NM_007315.2
Human	Endogenous	STAT2	NM_005419.2
Human	Endogenous	STAT3	NM_139276.2
Human	Endogenous	STAT4	NM_003151.2
Human	Endogenous	STAT5A	NM_003152.2
Human	Endogenous	STAT5B	NM_012448.3
Human	Endogenous	STAT6	NM_003153.3
Human	Endogenous	SYK	NM_003177.3
Human	Endogenous	TAGAP	NM_054114.3
Human	Endogenous	TAL1	NM_003189.2
Human	Endogenous	TAP1	NM_000593.5
Human	Endogenous	TAP2	NM_000544.3
Human	Endogenous	TAPBP	NM_003190.4
Human	Endogenous	TBK1	NM_013254.2
Human	Endogenous	TBX21	NM_013351.1
Human	Endogenous	TCF4	NM_003199.1
Human	Endogenous	TCF7	NM_003202.2
Human	Endogenous	TFRC	NM_003234.1
Human	Endogenous	TGFB1	NM_000660.3
Human	Endogenous	TGFBI	NM_000358.2
Human	Endogenous	TGFBR1	NM_004612.2
Human	Endogenous	TGFBR2	NM_001024847.1
Human	Endogenous	THY1	NM_006288.2
Human	Endogenous	TICAM1	NM_014261.1
Human	Endogenous	TIGIT	NM_173799.2
Human	Endogenous	TIRAP	NM_148910.2
Human	Endogenous	TLR1	NM_003263.3
Human	Endogenous	TLR2	NM_003264.3
Human	Endogenous	TLR3	NM_003265.2
Human	Endogenous	TLR4	NM_138554.2
Human	Endogenous	TLR5	NM_003268.3
Human	Endogenous	TLR7	NM_016562.3
Human	Endogenous	TLR8	NM_016610.2
Human	Endogenous	TLR9	NM_017442.2
Human	Endogenous	TMEM173	NM_198282.1
Human	Endogenous	TNF	NM_000594.2
Human	Endogenous	TNFAIP3	NM_006290.2
Human	Endogenous	TNFAIP6	NM_007115.2
Human	Endogenous	TNFRSF10C	NM_003841.3
Human	Endogenous	TNFRSF11A	NM_003839.2
Human	Endogenous	TNFRSF13B	NM_012452.2

Human	Endogenous	TNFRSF13C	NM_052945.3
Human	Endogenous	TNFRSF14	NM_003820.2
Human	Endogenous	TNFRSF17	NM_001192.2
Human	Endogenous	TNFRSF1B	NM_001066.2
Human	Endogenous	TNFRSF4	NM_003327.2
Human	Endogenous	TNFRSF8	NM_152942.2
Human	Endogenous	TNFRSF9	NM_001561.4
Human	Endogenous	TNFSF10	NM_003810.2
Human	Endogenous	TNFSF11	NM_003701.2
Human	Endogenous	TNFSF12	NM_003809.2
Human	Endogenous	TNFSF13B	NM_006573.4
Human	Endogenous	TNFSF15	NM_001204344.1
Human	Endogenous	TNFSF4	NM_003326.2
Human	Endogenous	TNFSF8	NM_001244.3
Human	Endogenous	TOLLIP	NM_019009.2
Human	Endogenous	TP53	NM_000546.2
Human	Endogenous	TRAF1	NM_005658.3
Human	Endogenous	TRAF2	NM_021138.3
Human	Endogenous	TRAF3	NM_145725.1
Human	Endogenous	TRAF4	NM_004295.2
Human	Endogenous	TRAF5	NM_004619.3
Human	Endogenous	TRAF6	NM_145803.1
Human	Endogenous	TREM1	NM_001242589.1
Human	Endogenous	TREM2	NM_018965.2
Human	Endogenous	TYK2	NM_003331.3
Human	Endogenous	TYROBP	NM_003332.2
Human	Endogenous	UBE2L3	NM_198157.1
Human	Endogenous	VCAM1	NM_001078.3
Human	Endogenous	VTN	NM_000638.3
Human	Endogenous	XBP1	NM_005080.2
Human	Endogenous	XCL1	NM_002995.1
Human	Endogenous	XCR1	NM_005283.2
Human	Endogenous	ZAP70	NM_001079.3
Human	Endogenous	ZBTB16	NM_006006.4
Human	Endogenous	ZEB1	NM_001128128.1
Human	Housekeeping	ABCF1	NM_001090.2
Human	Housekeeping	ALAS1	NM_000688.4
Human	Housekeeping	EEF1G	NM_001404.4
Human	Housekeeping	G6PD	NM_000402.2
Human	Housekeeping	GAPDH	NM_002046.3
Human	Housekeeping	GUSB	NM_000181.1
Human	Housekeeping	HPRT1	NM_000194.1
Human	Housekeeping	OAZ1	NM_004152.2
Human	Housekeeping	POLR1B	NM_019014.3

Human	Housekeeping	POLR2A	NM_000937.2
Human	Housekeeping	PPIA	NM_021130.2
Human	Housekeeping	RPL19	NM_000981.3
Human	Housekeeping	SDHA	NM_004168.1
Human	Housekeeping	TBP	NM_001172085.1
Human	Housekeeping	TUBB	NM_178014.2
Leishmania	Endogenous	Arginase L mexicana	LmxM_34_1480.1
Leishmania	Endogenous	HSP70	XM_003392632.1
Leishmania	Endogenous	Lm - sod_mexicana_3	LmxM_31_1830.1
Leishmania	Endogenous	NT2	XM_001686717.1
Staphylococcus	Endogenous	SA-S33 R - complete sequence	NR_037007.1