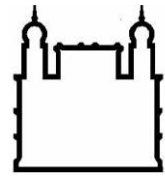




UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADA À PRODUÇÃO DE IFNG NA
RESPOSTA INICIAL À *LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

MARCIA WEBER CARNEIRO

**Salvador – Bahia – Brasil
2014**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADA À PRODUÇÃO DE IFNG NA
RESPOSTA INICIAL À *LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

MARCIA WEBER CARNEIRO

Orientadora: Prof^a Dr^a Camila Indiani

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Patologia
Humana para a obtenção do
grau de Doutor.

**Salvador – Brasil
2014**

Folha de Aprovação

FONTES DE FINANCIAMENTO
CNPq, FIOCRUZ, INCT-IMUNOLOGIA

AGRADECIMENTOS

Minha família, principalmente meu pai e meus irmãos, por sempre acreditarem e me darem força nas minhas escolhas, além dos valiosos conselhos. Vocês são meu porto seguro.

Dra. Camila Indiani de Oliveira pela excelente orientação e convivência enriquecedora nestes 8 anos. Obrigada por todo o aprendizado, não há palavras suficientes para agradecer tudo que fez por mim.

Dr. Jackson Costa, Dra. Aldina Barral, Manuela e Tiago Landim pela colaboração com os pacientes.

Aos pacientes que participaram deste estudo e aos voluntários.

Dr. Johan Van Weyenbergh por me receber em seu laboratório na Bélgica para que eu realizasse o treinamento do IPA.

Dr. Manoel Barral-Netto pelas contribuições.

INCT Imunologia- Dr. Edécio Cunha Neto pela colaboração com o software IPA.

Kyioshi Fukutani pelo apoio na realização do RT-PCR.

Aos amigos do LIM/LIP pela amizade e companheirismo no decorrer de todo o doutorado, principalmente Natalia Machado, Claire Santos, Melissa Abbehusen, Ricardo Khouri, Kyioshi Fukutani e Diego Moura.

Elze Leite e Andrezza Soares pela eficiência nos trabalhos da Secretaria.

Secretaria do curso de Pós-Graduação.

Ao pessoal da biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ.

Todos os professores, colegas e funcionários do CPqGM/FIOCRUZ.

Às agências financiadoras: CAPES e CNPQ.

Todos que participaram nesta minha trajetória de alguma forma.

“O primeiro passo para se chegar
a qualquer lugar é decidir que não
vais permanecer onde estás”
J. Morgan

CARNEIRO, Marcia Weber. Expressão gênica associada à produção de IFNG na resposta inicial à *Leishmania braziliensis*. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

RESUMO

Células de voluntários saudáveis, expostas *in vitro* a *Leishmania*, podem produzir altos níveis de IFNG na primeira exposição ao parasita, caracterizando os indivíduos como alto respondedores (AR), ou baixos níveis de IFNG, caracterizando os indivíduos baixo respondedores (BR). O objetivo deste estudo foi estudar o perfil de expressão gênica associado ao padrão de produção de IFNG de indivíduos AR e BR. Também avaliamos se as assinaturas gênicas identificadas nos indivíduos AR e BR se associam com o padrão de resposta imune observado em indivíduos de área endêmica identificada como subclínicos (SC) ou portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada (LC). Inicialmente, Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) de voluntários saudáveis foram estimuladas *in vitro* com *Leishmania braziliensis* e identificamos indivíduos AR (com produção de IFNG acima de 330 pg/ml) e indivíduos BR (com produção abaixo de 215 pg/ml). Em seguida, analisamos a expressão gênica desses indivíduos utilizando microarranjos e validamos a expressão de alguns genes por PCR em tempo real. Indivíduos AR apresentaram 32 moléculas moduladas significativamente, sendo que 27 foram moduladas positivamente e apenas 5 negativamente. Por outro lado, nos indivíduos BR, 28 moléculas foram moduladas significativamente, sendo 18 positivamente e 10 negativamente. Utilizando o programa IPA, as moléculas moduladas nos indivíduos AR foram associadas a uma rede envolvendo resposta antimicrobiana, resposta imune humoral e síntese de proteínas. Nestes indivíduos, a via de sinalização canônica mais significativa está associada com a comunicação entre o sistema imune inato e adaptativo. Em indivíduos BR, os genes significativamente modulados foram associados a uma rede envolvendo a resposta imune humoral, síntese de proteína e sinalização celular. Nestes indivíduos, a via canônica mais significativa está associada com a resposta de receptores do tipo Toll. Selecionamos um grupo de genes (*IFNG*, *IFI27*, *IL6*, *IRF1*, *TNF*, *IL10*, *CXCL10* e *JAK2*), entre os diferencialmente modulados, e a expressão desses foi validada por PCR em tempo real, tanto nos indivíduos AR quanto nos BR. Por fim, a expressão desses genes foi avaliada em CMSP de pacientes com LC e em indivíduos SC, após o estímulo com *L. braziliensis*. Assim, foi possível determinar uma assinatura no qual os indivíduos SC apresentam maior expressão ($p < 0.01$) de *CXCL10*, *IFI27* e *IL6*, como nos indivíduos AR, enquanto os pacientes com LC apresentam menor expressão dessas moléculas, como nos indivíduos BR. Deste modo, outras moléculas, que não as citocinas clássicas IFNG e IL10, podem ter seu perfil de expressão associado ao desenvolvimento ou não da LC.

Palavras-chaves: Leishmaniose Cutânea Localizada, *L. braziliensis*, PCR em tempo real, expressão gênica, redes, microarranjo

CARNEIRO, Marcia Weber. Gene expression associated to IFNG production at initial response to infection with *Leishmania braziliensis*. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

ABSTRACT

Naïve volunteers exposed to *Leishmania in vitro* can be high IFNG producers, characterizing a high-responder (HR), or low IFNG producers, characterizing a low-responder (LR). The purpose of this work is to characterize the gene expression profile associated to IFNG production in HR and LR individuals. Formerly, we analyzed if the gene signature identified could be associated with the pattern of immune response in individuals from endemic areas identified as subclinical (SC), or patients with Localized Cutaneous Leishmaniasis (LC). Initially, we stimulated Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) from healthy volunteers *in vitro* with *Leishmania braziliensis* where we identified HR (IFNG production above 330 pg/ml) and LR (IFNG production below 215 pg/ml). Next, we analyzed the expression of 314 genes using real time PCR arrays. HR presented 32 significantly modulated molecules, being 27 positively modulated and only 5 negatively modulated. Still, LR presented 28 significantly modulated molecules, and that 18 were positively modulated and 10 negatively. Employing Ingenuity software, we associated molecules detected in HR with network involving antimicrobial response, humoral immune response and protein synthesis. In these individuals, the most significant canonical pathway associated was the communication between innate and adaptive immune cells. In LR, there was an association of identified genes with humoral immune response, protein synthesis and cellular signaling network. In these individuals, the most significant canonical pathway associated was role of pattern recognition receptors. We selected a group of genes, between the most modulated genes (*IFNG*, *IFI27*, *IL6*, *IRF1*, *TNF*, *IL10*, *CXCL10* and *JAK2*), and their expression were validated by real time PCR, in both HR and LR individuals. At last, we analyzed the expression of this selected genes in PBMCs from patients with LC and in SC individual. In this manner, we were able to determine a signature that SC individual express more ($p < 0.01$) *CXCL10*, *IFI27* and *IL6*, as in HR, while LC patients express less, as in LR. This way, there are molecules, other than the classical IFNG and IL10, which correlates with disease progression or not.

Keywords: Localized Cutaneous Leishmaniasis, *L. braziliensis*, real time PCR, gene expression, networks, microarrays

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Reprodução da planilha de análise de dados do RT ² Profiler™ PCR Array.....	29
Figura 2	Genes modulados significativamente nos indivíduos AR e BR.....	31
Figura 3	Representação gráfica dos tipos de relação e da função dos genes analisados pelo IPA.....	35
Figura 4	Rede de resposta antimicrobiana, resposta imune humoral e síntese de proteínas.....	37
Figura 5	Rede de interação dos 32 genes modulados significativamente nos indivíduos AR.....	39
Figura 6	Detalhe da Via canônica associada à comunicação entre células do sistema imune inato e adaptativo.....	41
Figura 7	Rede de resposta imune humoral, síntese de proteínas e sinalização e interação entre células.....	43
Figura 8	Rede de interação dos 28 genes moduladas significativamente nos indivíduos BR.....	45
Figura 9	Detalhe da Via canônica associada com o papel dos receptores do tipo Toll.....	47
Figura 10	Validações por PCR em tempo real dos genes <i>CXCL10</i> , <i>TNF</i> e <i>IL6</i> , em indivíduos AR e BR.....	49
Figura 11	Validações por PCR em tempo real dos genes <i>IRF1</i> , <i>IFI27</i> e <i>IFNG</i> , em indivíduos AR e BR.....	50
Figura 12	Validações por PCR em tempo real dos genes <i>IL10</i> e <i>JAK2</i> , em indivíduos AR e BR.....	51
Figura 13	Expressão dos genes <i>CXCL10</i> , <i>IL6</i> e <i>IFI27</i> em indivíduos SC e em pacientes com LC por PCR em tempo real.....	52
Figura 14	Expressão dos genes <i>TNF</i> , <i>IRF1</i> e <i>JAK2</i> em indivíduos SC e em pacientes com LC por PCR em tempo real.....	53
Figura 15	Expressão dos genes <i>IFNG</i> e <i>IL10</i> em indivíduos SC e em pacientes com LC por PCR em tempo real.....	54
Figura 16	Produção de IFNG e IL10 em pacientes LC e em indivíduos SC.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produção de IFNG em voluntários saudáveis, após estímulo com <i>L. braziliensis</i>	28
Tabela 2	Genes com expressão modulada nos indivíduos AR.....	32
Tabela 3	Genes com expressão modulada nos indivíduos BR.....	33
Tabela 4	Genes cuja expressão foi modulada tanto nos indivíduos AR quanto BR.....	34
Tabela 5	Resumo da análise IPA mostrando as principais redes encontradas e as suas respectivas funções, em indivíduos AR.....	36
Tabela 6	Resumo da análise IPA mostrando as principais vias canônicas, a partir dos genes modulados significativamente nos indivíduos AR.....	40
Tabela 7	Resumo da análise IPA mostrando as principais redes encontradas e as suas respectivas funções, em indivíduos BR.....	42
Tabela 8	Resumo da análise IPA mostrando as principais vias canônicas, a partir dos genes modulados significativamente nos indivíduos BR.....	46
Tabela 9	Parâmetros clínicos e Epidemiológicos dos indivíduos SC e com LC.....	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	LEISHMANIOSES.....	12
1.2	ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	13
1.3	RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE.....	13
1.4	ASPECTOS MOLECULARES NA INTERAÇÃO PARASITO- HOSPEDEIRO.....	16
1.5	BIOLOGIA DE SISTEMAS: Análise de redes.....	18
2	JUSTIFICATIVA	19
3	OBJETIVO GERAL	21
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4	DESENHO EXPERIMENTAL	22
4.1	IDENTIFICAÇÃO DE INDIVÍDUOS AR E BR.....	22
4.2	VALIDAÇÃO DA ASSINATURA GÊNICA EM INDIVÍDUOS AR E BR.....	22
4.3	VALIDAÇÃO DA ASSINATURA GÊNICA PACIENTES COM LC E EM INDIVÍDUOS SC.....	22
5	MÉTODOS	23
5.1	ÁREA DE ESTUDO.....	23
5.2	SUJEITOS DA PESQUISA.....	23
5.3	CULTURA DE LEISHMANIA.....	23
5.4	OBTENÇÃO DE CÉLULAS E ESTÍMULO COM LEISHMANIA.....	24
5.5	DOSAGEM DE CITOCINAS.....	24
5.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR MEIO DE MICROARRANJOS.....	25
5.7	VALIDAÇÃO DOS GENES SIGNIFICATIVAMENTE MODULADOS.....	26
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
6	RESULTADOS	28
6.1	DEFINIÇÃO DE INDIVÍDUOS AR E BR.....	28
6.2	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA NOS INDIVÍDUOS AR E BR.....	29
6.3	ANÁLISES DAS MOLÉCULAS MODULADAS SIGNIFICATIVAMENTE NOS INDIVÍDUOS AR E BR.....	35
6.4	VALIDAÇÃO DOS GENES PRINCIPAIS.....	48
6.5	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES PRINCIPAIS E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM INDIVÍDUOS SC E PORTADORES DE LC.....	51
7	DISCUSSÃO	56
8	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICE 1.....	73
	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO.....	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que têm como agente etiológico os protozoários do gênero *Leishmania*. Estes protozoários são parasitos intracelulares obrigatórios, digenéticos (heteroxenos), encontrados na forma flagelada promastigota no trato digestivo do vetor flebotomíneo do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). No hospedeiro vertebrado, este parasito se encontra na forma amastigota, sem flagelo livre, no interior de células do sistema fagocítico mononuclear. A transmissão da *Leishmania* ocorre quando a fêmea do vetor flebotomíneo infectado, ao realizar seu repasto sangüíneo, pica um hospedeiro mamífero e inocula junto com a saliva as formas promastigotas metacíclicas na derme. Estas formas são fagocitadas por macrófagos e se instalam no interior do vacúolo parasitóforo. Dentro do vacúolo, o promastigota diferencia-se em amastigota, que prolifera por divisão binária. Após sucessivas divisões, o macrófago se rompe, liberando amastigotas que serão fagocitados por novas células, propagando a infecção no hospedeiro vertebrado (NEVES, 1998).

O gênero *Leishmania* pode ser dividido em dois subgêneros: o subgênero *Leishmania*, que engloba espécies do complexo *Leishmania donovani* e *Leishmania mexicana*, e o subgênero *Viannia* que engloba o complexo *Leishmania braziliensis* (LAINSON *et al.*, 1987). Existem aproximadamente 21 espécies de *Leishmania*, transmitidas por aproximadamente 30 espécies de flebotomos (revisado em CUNNINGHAM, 2002). As espécies de *Leishmania* que infectam o homem têm ampla distribuição mundial. Estão presentes em todos os continentes, com exceção da Oceania, e são endêmicas em 98 países das Américas do Sul e Central, África e Ásia. Mais de 90% dos casos de Leishmaniose Tegumentar (LT) ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Árabia Saudita, Brasil e Peru e mais de 90% dos casos de Leishmaniose Visceral (LV) ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, e Sudão. Estima-se que cerca de 40% do mundo possui áreas endêmicas para Leishmaniose. A incidência anual é de 0.7 a 1.2 milhões de novos casos de LT e 0.2 a 0.4 milhões novos casos de LV (OMS, 2014).

1.2 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é causada, no Brasil, pela *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (revisado em BARRAL *et al.*, 1995). Esta forma clínica apresenta um grande espectro de manifestações, sendo as principais formas a cutânea-localizada (LC) e a cutâneo-mucosa (LM). A LC é caracterizada por lesões isoladas ou escassas no local da picada do inseto vetor. Estas lesões podem se tornar ulceradas com o fundo necrótico e bordas elevadas e, ocasionalmente, lesões verrugosas são observadas (revisado em MARSDEN, 1986). Um achado clínico comum é a linfadenopatia regional, que pode proceder ao aparecimento das lesões (BOMFIM *et al.*, 2007). Alguns casos evoluem para a cura espontânea, entretanto, a maioria requer tratamento com drogas leishmanicidas (COSTA *et al.*, 1990; MARSDEN *et al.*, 1984). Pacientes com LC apresentam reação positiva ao teste cutâneo com antígeno de *Leishmania* (Teste de Montenegro), indicando que há uma resposta imune celular contra o parasito (CASTES *et al.*, 1983). Além da resposta celular, há o desenvolvimento de uma resposta humoral não protetora, que se inicia com a produção de IgM, seguida pela produção de IgG1, IgG2 e IgG3 (RODRIGUEZ *et al.*, 1996). A LM caracteriza-se por lesões agressivas na mucosa oral, levando à destruição do tecido orofaríngeo (revisado em CHANCE, 1981). O comprometimento das mucosas aparece normalmente anos após a lesão primária, por disseminação hematogênica. Pacientes com LM também apresentam o teste de Montenegro positivo (revisado em MARSDEN, 1986).

1.3 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE

A *Leishmania* é uma parasita intracelular obrigatório. Após a inoculação da *Leishmania* na derme do hospedeiro vertebrado pelo vetor, os parasitos são fagocitados por macrófagos residentes ou por neutrófilos recrutados pela picada do inseto, induzindo uma resposta inflamatória. Esta resposta inflamatória inicial pode determinar o sucesso da infecção (VENUPRASAD *et al.*, 2002). Macrófagos humanos e murinos podem ser ativados *in vitro* por IFNG, induzindo a atividade leishmanicida, responsável pelo controle da infecção (MURRAY *et al.*, 1981; NATHAN *et al.*, 1983). Assim, os linfócitos T modelam a resposta imune do hospedeiro através da liberação de citocinas, como IFNG, que direcionam a

resposta imune para o padrão de proteção e essa proteção depende da ativação dos macrófagos para eliminar os parasitas intracelulares (KAYE e SCOTT, 2011). Após a apresentação de antígenos via MHC classe I às células T CD8⁺ e via MHC classe II às células T CD4⁺, ocorre o desenvolvimento da resposta imune adaptativa, com consequente controle do patógeno e/ou o desenvolvimento da patologia (revisado em CARVALHO *et al.*, 2012). A produção de IL12 desempenha um papel importante pois ela induz a resposta do tipo Th1 e a produção de IFNG e TNFA por células T CD4⁺, as quais ativam os macrófagos para eliminação do parasita (ANTONELLI *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2011). As células T CD8⁺, por sua vez, podem desempenhar um papel na resposta imune protetora (DA-CRUZ *et al.*, 1994) ou podem contribuir na patologia observada na forma da LC (SANTOS *et al.*, 2013). Além da produção de citocinas, em menor quantidade do que as células T CD4⁺, as células T CD8⁺ expressam moléculas citolíticas como as granzimas e as perforinas. A progressão da lesão na LC foi associada com um aumento na frequência de granzima (FARIA *et al.*, 2009). Os fatores que influenciam o desfecho da infecção por *Leishmania* dependem da espécie do parasito e da resposta imunológica, mas a carga genética do hospedeiro também desempenha papel importante em determinar a resistência ou susceptibilidade à doença (ROSAS *et al.*, 2005).

Quanto às formas clínicas, Bacellar e colaboradores (BACELLAR *et al.*, 2002) encontraram um predomínio da resposta imune Th1 nos pacientes com LC e LM, caracterizada por uma alta produção de IFNG e TNFA, a qual não é modulada pelas citocinas IL10 ou TGFB. Outros investigadores detectaram claramente IL13 e IL4 após o desenvolvimento inicial da lesão, sugerindo que citocinas Th2 apresentam papel na imunorregulação inicial (VON STEBUT e UDEY, 2004). Além disso, CMSP de pacientes curados de LM e estimuladas com *L. braziliensis* apresentaram concentrações mais altas de IFNG e baixas de IL10 quando comparados com células de pacientes curados de LC (GOMES-SILVA *et al.*, 2007). Corroborando estes achados, Carvalho e colaboradores também demonstraram que pacientes com LM apresentam níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias do que pacientes com LC (CARVALHO *et al.*, 2007). Portanto, pacientes com LC apresentam um balanço na resposta imune inflamatória e anti-inflamatória, que permite o controle da infecção com minimização de danos teciduais. Por fim, no aspirado do linfonodo de drenagem da lesão de pacientes com LC, observou-se um aumento de IL10; tal citocina pode modular a resposta imune e favorecer a

persistência do parasito, justificando a existência de pacientes com LC crônica ou com LM (BOMFIM *et al.*, 2007).

Quanto ao sítio de infecção, observou-se que a lesão de pacientes com LC e LM apresenta uma intensa reação inflamatória, caracterizada por uma predominância de linfócitos e macrófagos, com poucos parasitas (BRENTANI *et al.*, 1991) e foi encontrado um predomínio de IFNG sobre IL4 (CACERES-DITTMAR *et al.*, 1993). A cura da infecção está associada à produção de IFNG, enquanto a presença de IL4 está associada com a persistência da lesão. Por outro lado, na lesão de pacientes com LM, foram encontradas células Th17 associadas com neutrófilos, o que sugere que a IL17 está envolvida na patogênese da forma mucosa (BOAVENTURA *et al.*, 2010). Também já foi demonstrado que, em biópsias da lesão de pacientes com LC, a expressão aumentada de granzima está correlacionada ao tamanho da lesão (SANTOS *et al.*, 2013) e os autores sugerem então que as células T CD8+ têm papel importante nessa patogênese. Já Novais e colaboradores (NOVAIS *et al.*, 2014) demonstraram uma maior expressão de genes associados a radicais reativos de oxigênio (ROS) em biópsias de pacientes com LC, quando comparado à pele normal, e que o ROS é capaz de inibir o crescimento das formas amastigotas em monócitos.

Existem ainda indivíduos residentes de área endêmica que não desenvolvem a doença, mas que são positivos para o teste de Montenegro: estes indivíduos são denominados subclínicos (SC) (FOLLADOR *et al.*, 2002). A ocorrência de indivíduos SC sugere que pessoas expostas ao parasita podem se infectar e não desenvolver a doença (BITTAR *et al.*, 2007a). Os indivíduos SC produzem baixos níveis de IFNG e TNFA quando comparados aos pacientes com LC (FOLLADOR *et al.*, 2002). Além disso, os indivíduos SC apresentam menor resposta linfoproliferativa e menor produção de IL10 quando comparados aos pacientes curados de LC (BITTAR *et al.*, 2007b). A ausência de doença em indivíduos SC pode ser explicada por sua capacidade de produzir níveis ideais de IL10. Estes níveis mantêm um equilíbrio entre as funções efetoras e reguladoras, capaz de controlar a infecção e de modular a resposta imune, impedindo que haja lesão tecidual (GIUDICE *et al.*, 2012). Todos estes estudos caracterizaram os indivíduos SC através da resposta positiva ao teste cutâneo para *Leishmania*. Porém, Schnorr e colaboradores demonstraram que, além deste teste, a produção de IFNG específico para *Leishmania* também deve ser avaliada nestes indivíduos (SCHNORR *et al.*, 2012).

1.4 ASPECTOS MOLECULARES NA INTERACAO PARASITO-HOSPEDEIRO

No caso das leishmanioses, a identificação de genes regulados após a infecção permite identificar mecanismos de sobrevivência deste parasito (AKOPYANTS *et al.*, 2004). Seguindo essa linha, Buates e Matlashewski foram os primeiros a caracterizar a modulação da expressão de genes em macrófagos murinos, durante a infecção com *L. donovani* (BUATES e MATLASHEWSKI, 2001). Eles avaliaram, por microarranjos, a expressão de 588 genes após 4 dias de infecção. Os autores encontraram 37% destes genes regulados negativamente e apenas oito com regulação positiva, ou seja, com aumento na expressão. Estes resultados reforçam a idéia de que o parasito desativa os macrófagos, permitindo assim sua sobrevivência. Rodriguez e colaboradores, também utilizando microarranjos, estudaram a expressão gênica de macrófagos murinos infectados com *L. chagasi*. Eles relataram que genes que codificam citocinas que participam da indução de resposta Th1 estão modulados negativamente. Por outro lado, genes associados à resposta Th2 estavam modulados positivamente. Assim, estes resultados sugerem que macrófagos infectados com *L. chagasi* apresentam perfil de ativação híbrido mais característico da via alternativa ou tipo II de ativação de macrófagos (RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Já Probst e colaboradores demonstraram que macrófagos de camundongos CBA infectados com *L. amazonenses* apresentam indução de genes relacionados com o metabolismo dos lipídeos, modulando assim os vacúolos parasitóforos permitindo sua sobrevivência. Já os macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados apresentaram indução de genes relacionados com apoptose e fagocitose, o que permitiria a resistência à infecção (PROBST *et al.*, 2012).

Em humanos, Dogra e colaboradores analisaram a diferença na expressão gênica de monócitos infectados por *L. major*, na presença ou não de IFNG, utilizando microarranjos. Houve uma diferença na expressão de 741 genes após a infecção por *L. major*, ao comparar com macrófagos não infectados. Na presença do IFNG, um número significativo de genes apresentou uma regulação alterada em mais de dez vezes. Entretanto, a presença do parasito inibiu esta resposta. Concluiu-se que a infecção por *L. major* modula significativamente a expressão gênica no

macrófago. Entre os genes identificados, foi possível destacar aqueles relacionados com a resposta imune inata, adesão celular, degradação proteossômica, expressão de receptores tipo Toll, moléculas de sinalização e metaloproteinases da matriz (DOGRA *et al.*, 2007).

Ramirez e colaboradores utilizaram a técnica de microarranjo para compreender as diferenças na expressão gênica de macrófagos humanos infectados com *L. panamensis* (RAMÍREZ *et al.*, 2012). Nas primeiras 24h de infecção, eles encontraram os maiores níveis de ativação e as mudanças foram predominantemente de regulação positiva. Os genes regulados positivamente estão relacionados com vias que envolvem o metabolismo de eicosanóides, estresse oxidativo, receptores do tipo Toll, etc. Este trabalho demonstrou que a resposta inicial dos macrófagos infectados é importante para o desenvolvimento de uma resposta protetora no sítio de infecção. Por outro lado, Lemaire e colaboradores avaliaram a expressão de microRNAs em macrófagos humanos infectados com *L. major* utilizando a técnica de microarranjo. MicroRNAs (miRNAs) são RNAs não codificantes que participam na regulação de quase todos processos celulares (BARBATO *et al.*, 2009). Eles encontraram alterações na expressão de 64 dos 365 miRNAs analisados. Estes 64 miRNAs se relacionam com respostas imune dependentes de TLR. Assim, os autores concluem que a infecção com *L. major* é capaz de regular os miRNAs e, com isso, a função dos macrófagos (LEMAIRE *et al.*, 2013).

Por PCR em Tempo Real, Teixeira e colaboradores demonstraram que biópsias de pacientes com LC apresentam aumento na expressão de *CCL2* e *CCL3*, quimiocinas responsáveis em atrair monócitos (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Outro trabalho demonstrou que o aumento na expressão gênica do *TLR9* nas lesões de pacientes com LC está associado com a formação de granuloma (TUON *et al.*, 2010). A maior expressão de *TLR9* em monócitos está associada com maior tamanho da lesão, apresentando papel importante na doença ativa (VIEIRA *et al.*, 2013). Mais recentemente, foi demonstrado que biópsias de pacientes com LC apresentam maior expressão de *IL10*, *TGF*, *IL4*, *TNFA*, *IFNG*, *IL12*, *CCL2*, *CCL3*, *CCL5* e *CXCL10*. Estas moléculas servem como biomarcadores de lesão recente e esse resultado sugere que o perfil de expressão gênica de citocinas e quimiocinas está associado com o tempo de evolução da lesão (COSTA-SILVA *et al.*, 2014).

Maretti-Mira e colaboradores utilizaram a técnica de RNAseq para comparar o transcriptoma de células de pacientes com LC e com LM, causadas pela *L. braziliensis* (MARETTI-MIRA *et al.*, 2012). Os indivíduos com LM têm menor expressão de genes relacionados com a resposta inflamatória e com a resposta imune, o que interfere com o controle da infecção. Por outro lado, os pacientes com LC apresentaram uma regulação positiva de genes envolvidos com atração de células da imunidade inata e de apresentação de antígenos. Assim, os autores demonstraram que existem diferenças importantes no padrão de expressão gênica em pacientes com diferentes formas clínicas da leishmaniose.

1.5 BIOLOGIA DE SISTEMAS: Análise de Redes

Dada a interdependência entre os componentes moleculares de uma célula, uma doença raramente é consequência de anormalidades em um único gene, mas sim de perturbações em uma rede intracelular complexa. A biologia de sistemas estuda sistemas biológicos através da perturbação sistemática (biologicamente, geneticamente ou quimicamente); monitorando genes, proteínas, e vias; integrando dados e formulando modelos matemáticos que descrevem a estrutura do sistema e a resposta individual a estas perturbações. Desta forma, a cascata de sinalização em uma célula, seja em condição patológica ou não, é visualizada como uma reação de vários passos que levam à construção de uma rede (IDEKER *et al.*, 2001). Assim, existem duas categorias de redes dentro uma célula ou organismo para a compreensão do que determina a expressão da doença: as redes moleculares e as redes fenotípicas. As redes moleculares incluem interação de proteínas (STELZL *et al.*, 2005), metabólitos (JEONG *et al.*, 2000), e redes regulatórias que incluem fatores de transcrição (CARNINCI *et al.*, 2005) e de RNA (LEWIS *et al.*, 2005). As redes fenotípicas incluem a co-expressão de redes, nas quais os genes estão conectados quando eles manifestam padrões de expressões similares entre duas doenças diferentes (STUART *et al.*, 2003), e redes genéticas no qual os genes se conectam definindo um fenótipo diferente daquele avaliado apenas através da alteração de um gene (BELTRAO *et al.*, 2010).

Em humanos, assim como em outros organismos, a maioria dos componentes celulares exercem suas funções através de interações com outros componentes

celulares, e a totalidade destas interações representam o *interatoma* humano. O potencial destas redes é infinito: existem aproximadamente 25000 genes que codificam produtos, cerca de mil metabólitos, e um indefinido número de diferentes proteínas e moléculas de RNA funcionais, e assim os componentes celulares que servem como nós nas redes podem facilmente exceder cem mil. O número de interações funcionais relevantes entre os componentes de uma rede provavelmente é muito maior e desconhecido (VENKATESAN *et al.*, 2009).

As ferramentas emergentes tais como sequenciamento de genomas em larga escala e sequenciamento de RNA, oferecem uma plataforma para explorar sistematicamente não apenas a complexidade de uma patologia em particular, mas também para identificar as relações moleculares nos diferentes fenótipos. Avanços nesta direção são essenciais para identificar novos genes relacionados às patologias, para desvendar a significância biológica de mutações e para identificar alvos de drogas e biomarcadores de doenças (BARABÁSI *et al.*, 2011). Desta forma, a biologia de sistemas aplicada às doenças humanas oferece uma abordagem única para a compreensão mais ampla do que acontece em diferentes situações patológicas.

2. JUSTIFICATIVA

Voltando à LC, Pompeu e colaboradores (2001) demonstraram a possibilidade de se prever a resposta imune à exposição a *L. amazonensis in vivo* a partir de resultados obtidos *in vitro*. Os autores verificaram que existem dois padrões de resposta imune na primeira exposição à *Leishmania*: um padrão no qual as células mononucleares do sangue periférico (CMSP), estimuladas *in vitro* com promastigotas de *L. amazonensis*, produziram grandes quantidades de IFNG (valores entre 505.6 a 1.299 pg/mL) [os indivíduos com este padrão de resposta foram denominados Alto Respondedores (AR)] e outro padrão segundo o qual os indivíduos produziram quantidades menores desta citocina (34.5 a 253 pg/mL) [denominados Baixo Respondedores (BR)]. Neste mesmo estudo, um segundo grupo de indivíduos foi imunizado com antígeno solúvel de *L. amazonensis* e foi avaliado quanto à sua capacidade de resposta após seis meses de vacinação. Neste

momento, os níveis de produção de IFNG apresentaram valores muito semelhantes entre os dois grupos. A grande diferença dos grupos foi a velocidade com que alcançaram uma resposta imune efetiva. Sendo assim, outra forma de classificação seria “Respondedores Rápidos” e “Respondedores Lentos”. Assim, respostas obtidas *in vitro* podem ser utilizadas para prever a resposta *in vivo*, uma vez que este modelo é capaz de mimetizar a resposta imune humana inicial ao parasito (POMPEU *et al.*, 2001).

Clarêncio e colaboradores (2006) demonstraram uma associação *in vivo* entre a quantidade de IFNG produzida por indivíduos AR e a expressão de *TCR V β 12* em voluntários imunizados com antígeno de *L. amazonensis*. Com base nestes dados, utilizando células de indivíduos residentes em área endêmica de LC, caracterizados previamente como AR, os autores confirmam que células infectadas com a *Leishmania* induzem ativação de células T e produção de IFNG (CLARENCIO *et al.*, 2006).

Já foi demonstrado que, na infecção por *M. tuberculosis*, os indivíduos que apresentam alta produção de IFNG *in vitro* apresentam menor chance de desenvolver uma doença ativa, enquanto os indivíduos que desenvolvem baixa produção desta citocina apresentam maior chance de desenvolver a doença (QUIROGA *et al.*, 2006). Assim, a avaliação da expressão gênica de células destes indivíduos, com diferentes produções de IFNG, pode fornecer dados importantes quanto aos mecanismos de proteção ou de susceptibilidade ao patógeno.

Diante do exposto acima, tornou-se interessante avaliar de maneira global se a resposta de indivíduos AR e BR podem ser definidas com base na expressão gênica, na infecção por *L. braziliensis*. Nosso objetivo foi identificar uma assinatura gênica nestes indivíduos e comparar a expressão desses genes em indivíduos com LC com indivíduos SC, residentes em área endêmica, sem histórico desta doença, porém reatores ao teste de Montenegro.

3. OBJETIVO GERAL

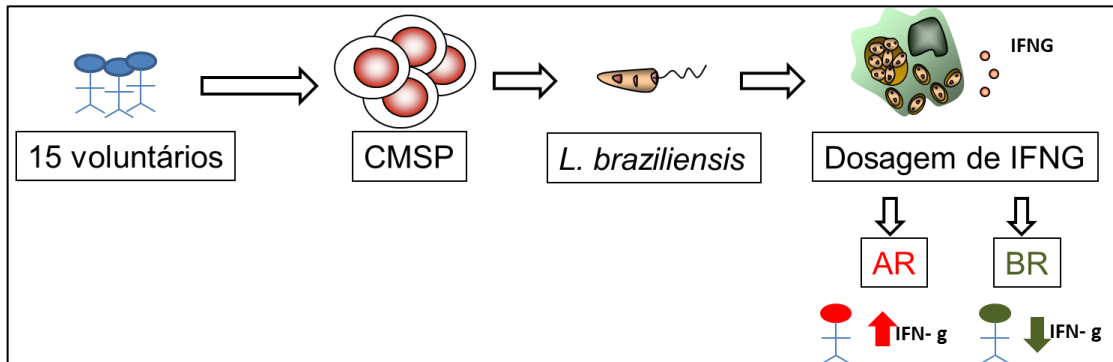
Caracterizar o perfil de expressão gênica em indivíduos AR e BR e associar esse perfil com a resposta à *L. braziliensis*, em pacientes portadores de LC ou sem manifestação clínica (SC).

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

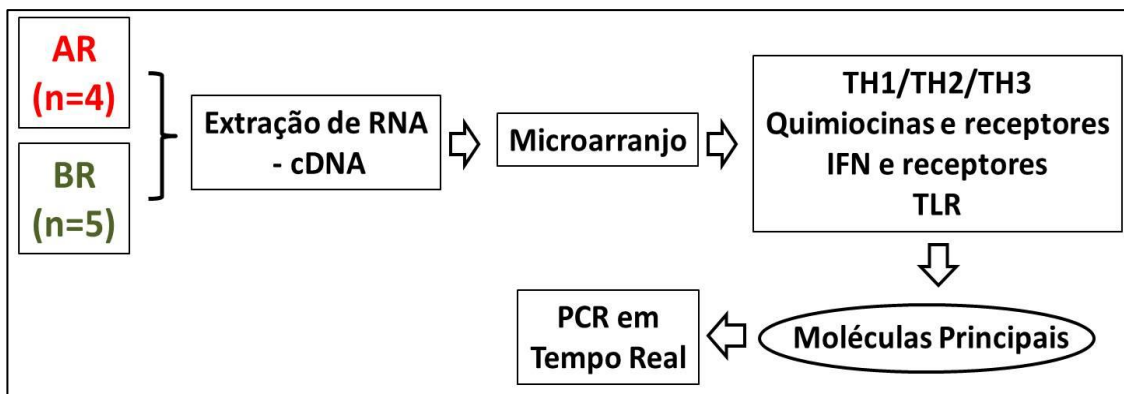
- 1) Identificar indivíduos que apresentam diferentes níveis de produção de IFNG (Alto respondedores - AR ou Baixo Respondedores - BR), após estímulo com *L. braziliensis*;
- 2) Determinar o perfil de expressão gênica de indivíduos AR e BR, após o estímulo com *L. braziliensis*, utilizando técnica de microarranjos;
- 3) Confirmar a expressão dos genes identificados em (2) por PCR em tempo real em indivíduos AR e BR;
- 4) Comparar a expressão dos genes identificados em (2) em indivíduos com LC e em indivíduos SC (residentes na área endêmica, sem histórico desta doença, porém reatores ao teste de Montenegro).

4. DESENHO EXPERIMENTAL

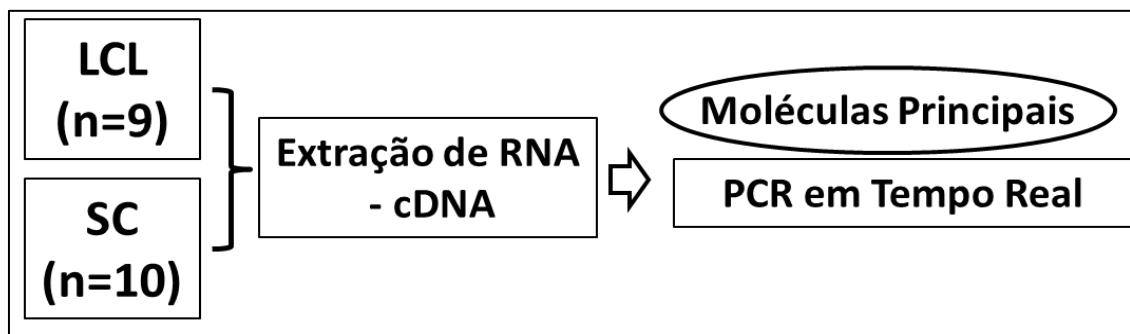
4.1 IDENTIFICAÇÃO DE INDIVÍDUOS AR E BR



4.2 VALIDAÇÃO DA ASSINATURA GÊNICA EM INDIVÍDUOS AR E BR



4.3 VALIDAÇÃO DA ASSINATURA GÊNICA PACIENTES COM LC E EM INDIVÍDUOS SC



5. MÉTODOS

5.1. ÁREA DE ESTUDO

Os pacientes com LC e os indivíduos SC foram recrutados no município de Jiquiriça, Bahia, onde a leishmaniose é endêmica. Jiquiriça situa-se no sudoeste da Bahia distando 258 km de Salvador. O município possui uma extensão territorial de aproximadamente 262 km², com clima tropical médio, temperatura média de 23°C e uma população de cerca de 14.000 habitantes.

5.2 SUJEITOS DA PESQUISA

Na etapa inicial do projeto, foram selecionados 15 indivíduos saudáveis, sem história prévia de infecção por *Leishmania*, residentes de Salvador, BA, uma área não endêmica para LT. Estes indivíduos apresentaram sorologia anti-*Leishmania* negativa. Na etapa posterior do trabalho, foram recrutados pacientes com LC e indivíduos SC. Os pacientes com LC foram selecionados conforme os critérios utilizados por Clarêncio *et al.* (2006). Todos os pacientes apresentaram lesões ativas, teste cutâneo (intra-dérmico de Montenegro) e sorologia anti-*Leishmania* positivos. Os indivíduos SC assintomáticos não possuíam histórico de lesões na pele sugestivas de Leishmaniose, mas possuíam teste de Montenegro positivo. Todos os participantes foram esclarecidos sobre a finalidade do estudo e os riscos inerentes aos procedimentos; todos concordaram em participar do trabalho e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (pareceres 79/2005 e 177/2008).

5.3 CULTURA DE LEISHMANIA

As formas promastigotas de *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/01/BA788) (DE MOURA *et al.*, 2005) foram cultivadas em meio Schneider (Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, L-glutamina (2mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100µg/ml), a 23°C (Invitrogen).

5.4 OBTENÇÃO DE CÉLULAS E ESTÍMULO COM *L. braziliensis*

O sangue periférico (20 ml) de cada voluntário saudável foi coletado em tubo de heparina e foi separado por gradiente de Ficoll (*GE Health Care*) através de centrifugação a 1500 rpm por 30 minutos em centrífuga não refrigerada. O anel contendo as CMSP foi coletado e transferido para um novo tubo. As células foram lavadas duas vezes com salina e contadas em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 ml de meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 10% de soro humano (AB), penicilina (100U/ml) e estreptomicina (1%) (Invitrogen). Para o estímulo, as células foram ajustadas para a concentração de $3 \times 10^6/500 \mu\text{l}$, por poço, utilizando placa de 24 poços. As culturas foram realizadas em triplicata.

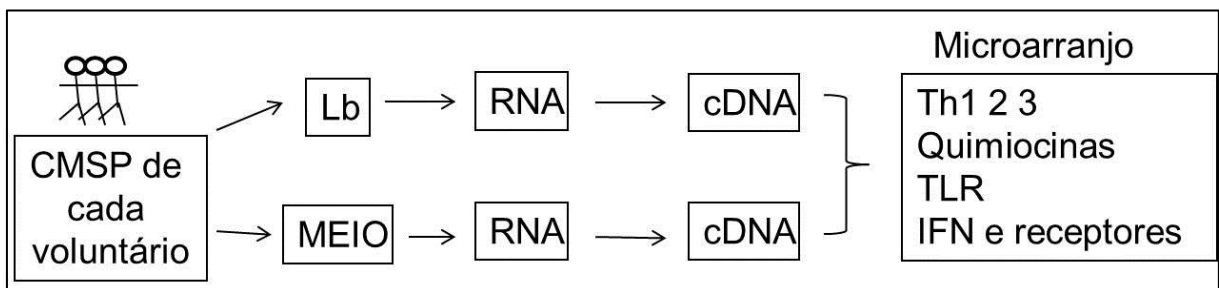
As células foram estimuladas com: Fitohemaglutinina (PHA) (Invitrogen) (10 $\mu\text{l/ml}$) ou *L. braziliensis* ($3 \times 10^6/\text{poço}$). Como controle negativo, as células foram mantidas na ausência de estímulo. A placa foi cultivada por 72 horas em estufa a 37°C. Após este período, o sobrenadante foi coletado e estocado no - 20°C em tubos de polipropileno. Para cada indivíduo AR ou BR, as culturas com PHA, *L. braziliensis* e controle foram realizadas em triplicata. O mesmo procedimento foi utilizado para a obtenção e estimulação de CMSP de pacientes com LC ou de indivíduos SC (reatores para o teste de Montenegro).

5.5 DOSAGEM DE CITOCINAS

A quantificação das citocinas presentes nos sobrenadantes das culturas de CMSP foi feita por ELISA (IFNG e IL10), utilizando kits comerciais, seguindo-se as instruções dos fornecedores. A dosagem de IFNG no sobrenadante foi utilizada para determinar os indivíduos alto (AR) e baixo respondedores (BR). Assim, uma diferença acima de 330 pg/ml entre culturas controle e culturas estimuladas com *L. braziliensis* caracterizou um indivíduo AR; enquanto que uma diferença abaixo de 215 pg/ml caracterizou um indivíduo BR.

5.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR MEIO DE MICROARRANJOS

Inicialmente, amostras de nove indivíduos (quatro com perfil AR e cinco com perfil de BR) foram utilizadas em ensaios com microarranjos. Para isso, as CMSP de indivíduos AR e BR foram estimuladas com *L. braziliensis* ou foram mantidas sem estímulo, como descrito acima. Após 72h, o RNA total de cada cultura foi extraído usando o kit *RNeasy Protect Mini* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. A integridade do RNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose e a concentração foi determinada em um espectrofotômetro. O RNA total (500ng) foi empregado na síntese do cDNA (ImProm-II, Promega), conforme instruções do fabricante. O cDNA obtido foi utilizado em ensaios de PCR em tempo real, utilizando-se kits comerciais de arranjos (RT² Profiler genes, SuperArray Bioscience), seguindo-se as instruções dos fornecedores. Foram utilizados os kits específicos para sinalização de quimiocinas, IFN e seus receptores, receptores do tipo Toll e de resposta Th1/Th2, conforme mostrado abaixo.



No total foram analisados 352 genes, 314 genes foram avaliados unicamente e 38 genes foram analisados em mais de um microarranjo. Para a análise da expressão gênica, foi utilizado o método comparativo (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), conforme instruído pelos fabricantes. O aumento ou a diminuição na expressão gênica foi determinado por $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(alvo)} - \Delta Ct_{(controle)}$. Os resultados foram expressos como o número de vezes em que a expressão gênica das células estimuladas com *L. braziliensis* aumentou ou diminuiu em relação à expressão gênica observada nas células não estimuladas.

5.7 VALIDAÇÃO DOS GENES SIGNIFICATIVAMENTE MODULADOS

Para validação dos genes significativamente modulados, identificados nos microarranjos, foram realizadas reações de PCR em tempo real. Para isso, novas culturas de CMSP (de indivíduos AR e BR) foram estimuladas com *L. braziliensis*, como descrito anteriormente, o RNA total foi extraído e o cDNA resultante foi empregado em ensaios de PCR em tempo real. Os iniciadores foram desenhados pelo programa Primer Express (Applied Biosystems, EUA). Foram utilizados os seguintes iniciadores: IL10- 5'-CCAGGGCACCCAGTCTGA-3' e 5'-TCGGAGATCTCGAAGCATGTT-3'; TNF: 5'-CCTGCCCAATCCCTTTATT-3' e 5'-CCAATTCTCTTTTTGAGCCAGAA-3'; IFNG- 5'-TGGCTTAATTCTCTCGGAAACG-3' e 5'-TTTTACATATGGGTCCTGGCAGTA-3'; CXLC10- 5'-TGAAAAGAAGGGTGAGAAGAGATG-3' e 5'-CCTTTCCTTGCTAACTGCTTTCAG-3'; IL6- 5'-CCGGGAACGAAAGAGAAGCT-3' e 5'-GCGCTTGTGGAGAAGGAGTT-3'; IRF1- 5'-TCCAGCACTGTCGCCATGT-3' e 5'-TGTCCGGCACAACCTTCCA-3'; IFI27- 5'-TGTCATTGCGAGGTTCTACTAGCT-3' e 5'-CCCCTGGCATGGTTCTCTT-3'; e JAK2- 5'-CCTCCAGCCGTGCTTGAA-3' e 5'-TCCAGTCTGATTACCTGCTTTCTTC-3'.

O ensaio de PCR em tempo real também foi empregado para a validação dos genes selecionados nas amostras de RNA obtidas das culturas de CMSP de pacientes com LC e de indivíduos SC. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços, utilizando o reagente "SYBR-Green PCR Master MIX" (Applied Biosystems) e o equipamento "Perkin-Elmer ABI Prism 7500 Sequence Detection System". A reação foi realizada em 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C, de acordo com o manual do fabricante ABI PRISM 7500. Cada amostra foi amplificada em triplicata. O método comparativo foi utilizado para determinação da expressão gênica como descrito acima. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção e estimulação de RNA de CMSP de pacientes com LC ou de indivíduos SC (reatores para o teste de Montenegro).

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação da produção de IFNG entre indivíduos AR e BR, foram empregados um teste não paramétrico (Mann-Whitney). A análise das diferenças

entre a expressão dos genes foi realizada através do software “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis” disponível no site: <http://www.superarray.com/pcrarraydataanalysis.php>. Foram considerados significantes os valores de expressão gênica cuja diferença entre culturas estimuladas com *L. braziliensis* versus culturas não estimuladas foi $p < 0,05$. Os genes diferencialmente expressos foram carregados no *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA, Ingenuity Systems Inc.) para a geração de redes as quais permitem relacioná-los com funções biológicas, vias de sinalização, etc. O IPA determina níveis de significância dispostos como pontuações pelo teste de Fisher e o valor de 2 indica que existe 1 em 100 chances de que aquelas moléculas analisadas estão juntas em uma rede aleatória. O programa também gera vias de sinalização canônicas significativas ($p < 0,05$) que estejam associadas aos dados analisados. Assim, as vias com genes altamente interconectados são identificados por estatística utilizando a seguinte equação:

$$\text{Escore} = -\log_{10} \left(1 - \sum_{i=0}^{f-1} \frac{C(G,i)C(N-G,s-i)}{C(N,s)} \right)$$

Nessa equação, N é o número de genes na rede, na qual G é o número de genes centrais nos nós, para uma via de s genes, na qual f são genes centrais. C(n,k) é o coeficiente binomial. Foram consideradas redes estatisticamente significante aquelas cujo escore foi maior que 5 ($p < 10^{-5}$).

As diferenças na expressão gênica encontrada nos ensaios de PCR em tempo real realizados com os indivíduos AR e BR (etapa de validação), assim como em indivíduos SC ou com LC foram avaliadas por testes não-paramétricos (Mann Whitney), utilizando o programa Prism (GraphPad Software, V 6.0.)

6. RESULTADOS

6.1 DEFINIÇÃO DE INDIVÍDUOS AR E BR

Inicialmente, identificamos indivíduos com respostas diferentes ao estímulo com *L. braziliensis*, ou seja, indivíduos que, em um primeiro contato com o parasita, produzem mais ou menos IFNG. Assim, coletamos as CMSP de quinze indivíduos saudáveis, estimulamos as células *in vitro* com *L. braziliensis* e a presença de IFNG foi determinada por ELISA, no sobrenadante das culturas (Tabela 1). Portanto, identificamos quatro indivíduos denominados Alto Respondedores (AR), cuja produção de IFNG foi entre 334- 9752 pg/ml e cinco indivíduos denominados Baixo Respondedores (BR), cuja produção de IFNG foi entre 5,88- 215 pg/ml.

Tabela 1. Produção de IFNG em voluntários saudáveis, após estímulo com *L. braziliensis*

Voluntário	IFNG pg/ml	
	Experimento 1	Experimento 2
AR		
1	1688,94	*
2	1206	426,91
3	9752,27	334,8
4	*	443,53
BR		
5	65,9	115,78
6	233	211,3
7	34,84	88,03
8	*	5,88
9	*	84,81

(*) Não foi realizada repetição.

6.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA NAS CÉLULAS DOS INDIVÍDUOS AR E BR.

A partir da identificação dos indivíduos AR e BR, avaliamos o perfil de expressão gênica desses indivíduos. Para isso, obtivemos o RNA das culturas de CMSP estimuladas com *L. braziliensis* e das culturas não estimuladas e esse RNA foi utilizado em ensaios de PCR em tempo real empregando placas de microarranjos contendo genes relativos à resposta Th1/Th2/Th3, receptores TLR, IFN e receptores e Quimiocinas. Por meio da ferramenta de análise incluída no programa (Figura 1), obtivemos o valor de expressão de cada gene analisado (*Fold Up- or Down-regulation*).

	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Well	AVG ΔC_t (Ct(GOI) - Ave Ct (HKG))		$2^{-\Delta C_t}$		Fold Change	T-TEST	Fold Up- or Down- Regulation
2		Test Sample	Control Sample	Test Sample	Control Sample	Test Sample /Control Sample	p value	Test Sample /Control Sample
3	A01	8,20	8,41	3,4E-03	2,9E-03	1,15	0,476166	1,15
4	A02	9,20	8,74	1,7E-03	2,3E-03	0,73	0,554448	-1,38
5	A03	-2,49	0,39	5,6E+00	7,6E-01	7,35	0,160304	7,35
6	A04	4,86	3,39	3,5E-02	9,5E-02	0,36	0,093211	-2,76
7	A05	7,53	9,73	5,4E-03	1,2E-03	4,59	0,204829	4,59
8	A06	3,87	4,06	6,9E-02	6,0E-02	1,14	0,500754	1,14
9	A07	5,17	5,39	2,8E-02	2,4E-02	1,16	0,687043	1,16
10	A08	5,52	7,06	2,2E-02	7,5E-03	2,90	0,239678	2,90
11	A09	5,53	10,43	2,2E-02	7,3E-04	29,86	0,009020	29,86
12	A10	10,53	11,83	6,7E-04	2,8E-04	2,45	0,213837	2,45
13	A11	3,18	8,09	1,1E-01	3,7E-03	29,93	0,075554	29,93
14	A12	4,20	5,73	5,5E-02	1,9E-02	2,89	0,138319	2,89
15	B01	8,19	8,73	3,4E-03	2,4E-03	1,45	0,026096	1,45
16	B02	7,51	8,05	5,5E-03	3,8E-03	1,45	0,191127	1,45
17	B03	6,19	6,06	1,4E-02	1,5E-02	0,91	0,804081	-1,10
18	B04	7,85	7,73	4,3E-03	4,7E-03	0,92	0,655386	-1,09
19	B05	5,52	6,06	2,2E-02	1,5E-02	1,45	0,193649	1,45

Figura 1. Reprodução da planilha de análise de dados do RT² Profiler™ PCR Array. AVG ΔC_t : média dos valores de expressão de cada gene (linhas) no grupo teste (Coluna C) e no grupo controle (Coluna D). $2^{-\Delta C_t}$: valores de expressão gênica da amostra teste (Coluna E) e da amostra controle (Coluna F) em relação à expressão dos genes endógenos. *Fold change* representa o valor de expressão de cada gene na amostra teste normalizado pelo valor da amostra controle.

Como mostrado na Figura 1, o valor da amostra teste (*test sample*) corresponde à média da expressão gênica encontrada nas culturas individuais de

CMSP estimuladas com *L. braziliensis* enquanto as amostras controle (*control sample*) correspondem à média das culturas individuais não estimuladas. Cada linha da tabela corresponde à um gene no microarranjo. Por exemplo, para o gene A01, temos inicialmente a média dos resultados de expressão desse gene no grupo teste (estimulado com *L. braziliensis*; Coluna C) e no grupo controle (sem estímulo, Coluna D). Em seguida, cada grupo (teste e controle) foi normalizado em relação aos genes endógenos através do $2^{\Delta Ct}$ (Coluna E). Os microarranjos contêm 6 genes endógenos: Gliceraldeído 3 fosfato (*GAPDH*), Titin (*TTN*), Actina beta (*ACTB*), Microglobulina beta 2 (*B2M*), Hipoxantina (*HPRT1*) e Proteína ribossomal grande PO (*RPLPO*). O *fold change* [(Coluna G) calculado por $(2^{-\Delta\Delta Ct})$] indica o valor de expressão de cada gene na amostra teste normalizado pelo valor da amostra controle. O teste T (Coluna H) foi calculado a partir das replicatas nos grupos teste e controle e, por fim, o *fold regulation* (Coluna I) representa o resultado do *fold-change* de forma biologicamente significativa. Um *Fold-change* >1 indica regulação positiva e <1 indica regulação negativa. Ou seja, o ΔCt consiste na quantificação relativa da expressão em um gene alvo relativo a um gene controle. Neste caso, o valor é determinado em quantas vezes um determinado gene contido no microarranjo sofreu modulação para mais ou para menos, diante da exposição à *L. braziliensis*, em relação ao mesmo gene na ausência de estímulo.

Deste modo, dos 314 genes avaliados empregando os quatro microarranjos diferentes (Th1/Th2/Th3, receptores TLR, IFN e receptores e Quimiocinas), identificamos 32 genes modulados significativamente nos indivíduos AR e 28 genes modulados significativamente nos indivíduos BR (Figura 2). Além disso, encontramos 12 genes cuja modulação foi encontrada tanto em indivíduos AR e em indivíduos BR (Figura 2). Desta forma, podemos observar que os indivíduos AR possuem mais genes modulados do que os indivíduos BR. Dentre as 32 moléculas encontradas nos indivíduos AR, apenas 5 foram moduladas negativamente e a maioria, 27, foi modulada positivamente. Por outro lado, dentre as 28 moléculas moduladas nos indivíduos BR, 10 foram moduladas negativamente e 18 positivamente.

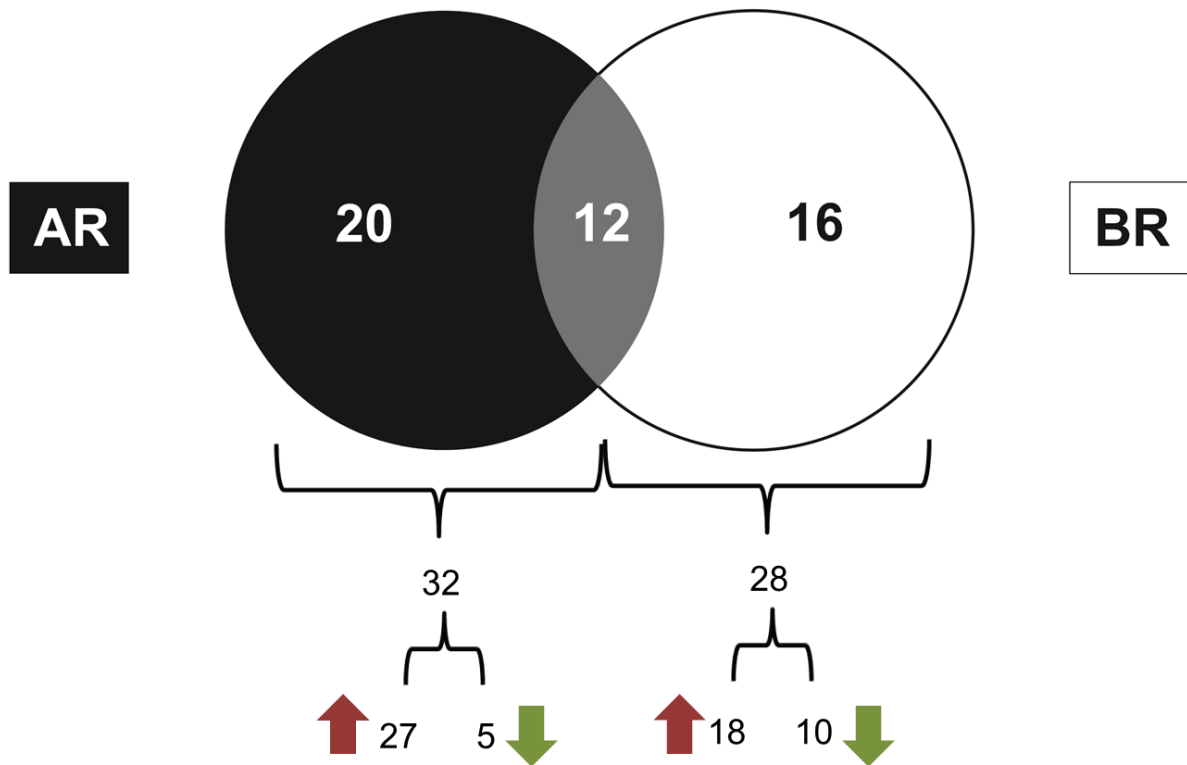


Figura 2. Genes modulados significativamente nos indivíduos AR e BR. A análise de expressão gênica nas CMSP estimuladas com *L. braziliensis* foi realizada através do programa de análise contido no RT² Profiler™ PCR Array. Foram avaliados 314 genes diferentes e os números de genes modulados está representado numericamente para os indivíduos AR (em vermelho) e para os indivíduos BR (em verde) e em comum entre os dois grupos (interseção). Os números abaixo (32 e 28) indicam o total de genes modulados significativamente e, por fim, o número de genes com modulação positiva (flecha vermelha) ou modulação negativa (flecha verde).

Na Tabela 2, observamos os 20 genes modulados significativamente apenas nos indivíduos AR. Observamos que 18/20 genes sofreram modulação positiva: a expressão de *CCL7*, *IL8*, *IFI44L*, *IL1B*, *CSF2*, *F3* e *IL1A* foi modulada acima de dez vezes. A expressão de *IFIT2*, *PTGS2*, *TNF*, *CXCL1*, *JAK2*, *STAT1* e *IL7* foi modulada entre cinco e dez vezes. A expressão dos genes *IL31RA*, *JUN*, *RIPK2* e *ELK1* foi modulada abaixo de 5 vezes e, por fim, a expressão dos genes *LY96* e *CMKLR1* foi negativamente modulada.

Tabela 2. Genes com expressão modulada nos indivíduos AR.

Abreviatura	Nome do Gene	Valor de p^*	Valor de Expressão**
<i>CCL7</i>	Ligante de quimiocina 7	0,049	127,58
<i>IL8</i>	Interleucina 8	0,007	73,73
<i>IFI44L</i>	Ligante da proteína indutora de IFN 44	0,018	49,57
<i>IL1B</i>	Interleucina 1 beta	0,008	36,76
<i>CSF2</i>	Fator estimulador de colônia 2	0,009	29,86
<i>F3</i>	Fator de coagulação 3	0,03	11,96
<i>IL1A</i>	Interleucina 1 alfa	0	11,61
<i>IFIT2</i>	Proteína indutora de IFN com tetratricopeptídeo repetidos 2	0,016	9,53
<i>PTGS2</i>	Prostaglandina-endoperoxido sintase 2	0,01	9,2
<i>TNF</i>	Fator de necrose tumoral	0	7,33
<i>CXCL1</i>	Ligante de quimiocina 1	0,047	6,77
<i>JAK2</i>	Quinase Janus 2	0,042	6,41
<i>STAT1</i>	Transdutor e ativador de sinal 1	0,007	6,37
<i>IL7</i>	Interleucina 7	0,021	5,1
<i>IL31RA</i>	Receptor de interleucina 31 alfa	0,037	3,75
<i>JUN</i>	Protooncogene Jun	0,04	2,89
<i>RIPK2</i>	Receptor de interação serina-treonina proteína quinase 2	0,006	2,32
<i>ELK1</i>	Fator de transcrição da família ET 1	0,026	1,45
<i>LY96</i>	Antígeno linfocítico 96	0,009	-2,19
<i>CMKLR1</i>	Receptor de quimiocina 1	0,044	-6,66

* expressão gênica significativamente diferente entre culturas estimuladas com *L. braziliensis* e culturas mantidas na ausência de estímulo

**(*Fold up- or down-regulation*).

Na Tabela 3, mostramos os 16 genes modulados significativamente nos indivíduos BR. Observamos que 9/16 genes sofreram modulação positiva. A expressão dos genes *IL9*, *IFI44* e *IFIT1* foi modulada acima de dez vezes; a expressão dos genes *IL2RA* e *TNFSRF9* foi modulada entre cinco e dez vezes e a expressão dos genes *TLR2*, *IFITM2*, *LAG3* e *IL3RA* foi modulada abaixo de 5 vezes. Por fim, a expressão de 7/16 genes (*IL5RA*, *TLR4*, *MAPK8*, *IL10*, *STAT6* e *CD14*) foi negativamente modulada. De modo geral, os indivíduos BR apresentaram um padrão de expressão misto, com genes regulados tanto positivamente quanto negativamente, diferente dos indivíduos AR que apresentam predominantemente genes regulados positivamente.

Tabela 3. Genes com expressão modulada nos indivíduos BR.

Abreviatura	Nome do gene	Valor de p^*	Valor de expressão**
<i>IL9</i>	Interleucina 9	0,002	25,37
<i>IFI44</i>	Proteína indutora de IFN 44	0,01	21,17
<i>IFIT1</i>	Proteína indutora de IFN com tetratricopeptídeo repetidos 1	0,0014	12,11
<i>IL2RA</i>	Receptor de interleucina 2 alfa	0,02	9,61
<i>TNFSRF9</i>	Superfamília de receptores de fatores de necrose tumoral, membro 9	0,0054	6,09
<i>TLR2</i>	Receptor do tipo Toll 2	0,0029	4,44
<i>IFITM2</i>	Proteína transmembrana indutora de IFN 2	0,0124	3,99
<i>LAG3</i>	Gene de ativação de linfócitos 3	0,011	3,83
<i>IL-3RA</i>	Receptor de interleucina 3 alfa	0,0008	3,44
<i>MAF</i>	Oncogene homólogo de fibrosarcoma	0,027	-1,66
<i>IL5RA</i>	Receptor de interleucina 5 alfa	0,0261	-2,36
<i>TLR4</i>	Receptor do tipo Toll 4	0,04	-2,64
<i>MAPK8</i>	Quinase ativadora de mitógeno 8	0,022	-3,3
<i>IL10</i>	Interleucina 10	0,018	-6,67
<i>STAT6</i>	Transdutor e ativador de sinal 6	0,03	-8,4
<i>CD14</i>	Molécula CD14	0,031	-13,24

* expressão gênica significativamente diferente entre culturas estimuladas com *L. braziliensis* e culturas mantidas na ausência de estímulo

***(Fold up- or down-regulation)*.

Na Tabela 4, listamos os 12 genes modulados significativamente tanto por indivíduos AR quanto BR. Notamos que a expressão dos genes *IFNG*, *CXCL10*, *IFI27*, *IL6* e *LTA* foi modulada acima de dez vezes. A expressão dos genes *MX1* e *IRF1* foi modulada entre cinco e dez vezes. A expressão dos genes *OAS1* e *IFIH1* foi modulada abaixo de 5 vezes e, por fim, a expressão dos genes *CD180*, *LY86* e *TLR5* foi negativamente modulada. É possível observar que a expressão de *IFNG* valida os resultados encontrados anteriormente quanto à produção desta citocina, por ELISA (Tabela 1). Os indivíduos AR apresentam maior expressão de *IFNG* e, paralelamente, produziram mais *IFNG* do que os indivíduos BR. Os genes relacionados à via do IFN também estão mais expressos nos indivíduos AR, como *IFI27* e *IRF1*. Além disso, há maior expressão de genes relacionados a resposta pró-inflamatória quando comparado aos indivíduos BR, como a *IL6*.

Tabela 4. Genes cuja expressão foi modulada tanto nos indivíduos AR quanto BR

Abreviatura	Nome do gene	AR*	BR
<i>IFNG</i>	Interferon gama	319,71	48,46
<i>CXCL10</i>	Ligante 10 (C-X-C) quimiocina	67,99	63,64
<i>IFI27</i>	Proteína indutora de IFN alfa 27	55,08	4,58
<i>IL6</i>	Interleucina 6	52,26	12,47
<i>LTA</i>	Linfotoxina alfa	11,58	6,08
<i>MX1</i>	Mixovírus resistente 1	9,56	5,27
<i>IRF1</i>	Fator regulador de IFN 1	7,34	2,63
<i>OAS1</i>	Sintetase Oligoadenilada	3,16	2,3
<i>IFIH1</i>	Helicase C domínio 1 indutor de IFN	3,56	3,02
<i>CD180</i>	Molécula CD180	-5,52	-5,28
<i>LY86</i>	Antígeno linfocítico 86	-3,48	-5,22
<i>TLR5</i>	Receptor do tipo Toll 5	-14,24	-13,58

* expressão gênica significativamente diferente entre culturas estimuladas com *L. braziliensis* e culturas mantidas na ausência de estímulo (*Fold up- or down-regulation*).

6.3 ANÁLISES DAS MOLÉCULAS MODULADAS SIGNIFICATIVAMENTE NOS INDIVÍDUOS AR E BR

Os genes diferentemente expressos nos indivíduos AR e BR foram organizados em redes de interação utilizando o *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). Este software consiste em um banco de dados contendo informações atualizadas de mais de 20,000 genes e proteínas de mamíferos, além de 1.4 milhões de interações biológicas e 100 vias canônicas que incorporam mais de 6000 genes. Estas informações são integradas em bancos de dados importantes, como o *Entrez-Gene*. Os dados experimentais são fornecidos ao programa e utilizados para a construção de redes, levando em consideração vias canônicas, interações biológicas relevantes e os processos celulares e patológicos. Assim, a partir dos conjuntos de genes modulados significativamente foram geradas as redes de interação. Para melhor compreensão do significado das relações entre os genes e as funções dos mesmos, apresentamos uma legenda para os símbolos utilizados pelo IPA.

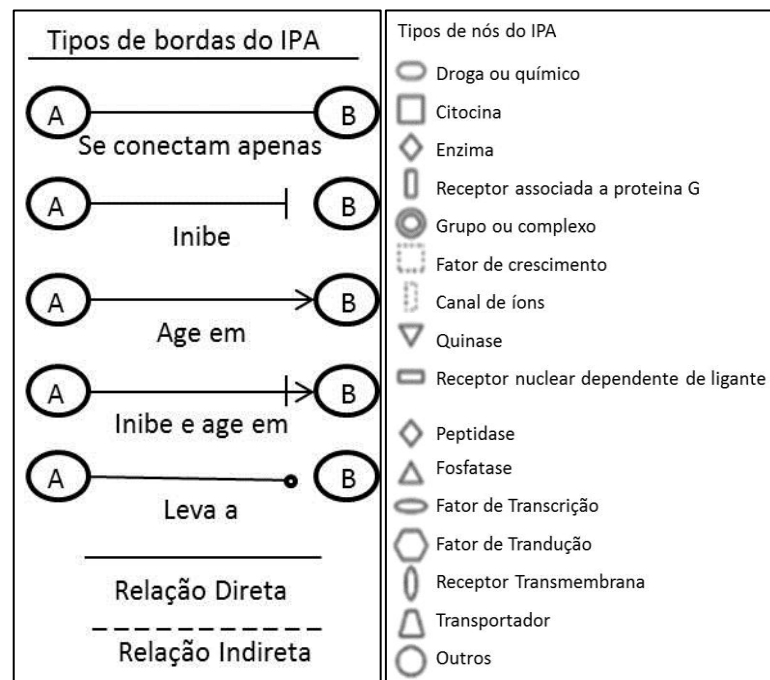



Figura 3. Representação gráfica dos tipos de relação e da função dos genes analisados pelo IPA.

A partir dos dados fornecidos, o programa analisa as redes com maior escore. O programa leva em consideração o número de moléculas que estão envolvidas na rede e o número de relações biológicas entre elas e outras moléculas, que não estão

contidas nos dados fornecidos. Primeiramente, analisamos a interação entre os genes modulados significativamente nas células dos indivíduos AR somente (n= 20; Tabela 1) e aqueles modulados tanto em indivíduos AR quanto em indivíduos BR (n= 12, Tabela 3), totalizando 32 moléculas. O IPA mostrou que a rede mais importante (escore 14) está associada com as seguintes funções: resposta antimicrobiana, resposta imune humoral e síntese de proteínas (Tabela 5).

Tabela 5 - Resumo da análise IPA mostrando as principais redes encontradas e as suas respectivas funções, em indivíduos AR.

Top Networks		
ID	Associated Network Functions	Score
1	Antimicrobial Response, Humoral Immune Response, Protein Synthesis	14
2	Gene Expression, Cell Cycle, Inflammatory Disease	12
3	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cellular Movement, Hematological System Development and Function	11
4	Cell Morphology, Inflammatory Response, Cancer	11
5	Cell Morphology, Cellular Development, Connective Tissue Development and Function	8

(c) 2000-2013 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved. 1 

Como mostrado na Figura 4, a rede com maior escore contém dez moléculas dentre as 32 identificadas anteriormente (Tabelas 2 e 4). Centralmente na rede encontramos *CXCL10*, que se associa indiretamente com outras moléculas como *IFNB*, *JAK* e *NFκB*, demonstrando um papel importante desta molécula na resposta à *L. braziliensis*. Além disso, esta molécula se associa diretamente com *NFκB* e com *IgG2a*. Mais periféricamente, encontramos uma relação direta entre *LY86* e *CD180* e indireta entre *IFNB*, *IFIT2* e *MX1*. Por outro lado, *STAT1* e *LY96* não possuem uma relação próxima com as outras moléculas moduladas, porém há uma relação por meio de moléculas intermediárias.

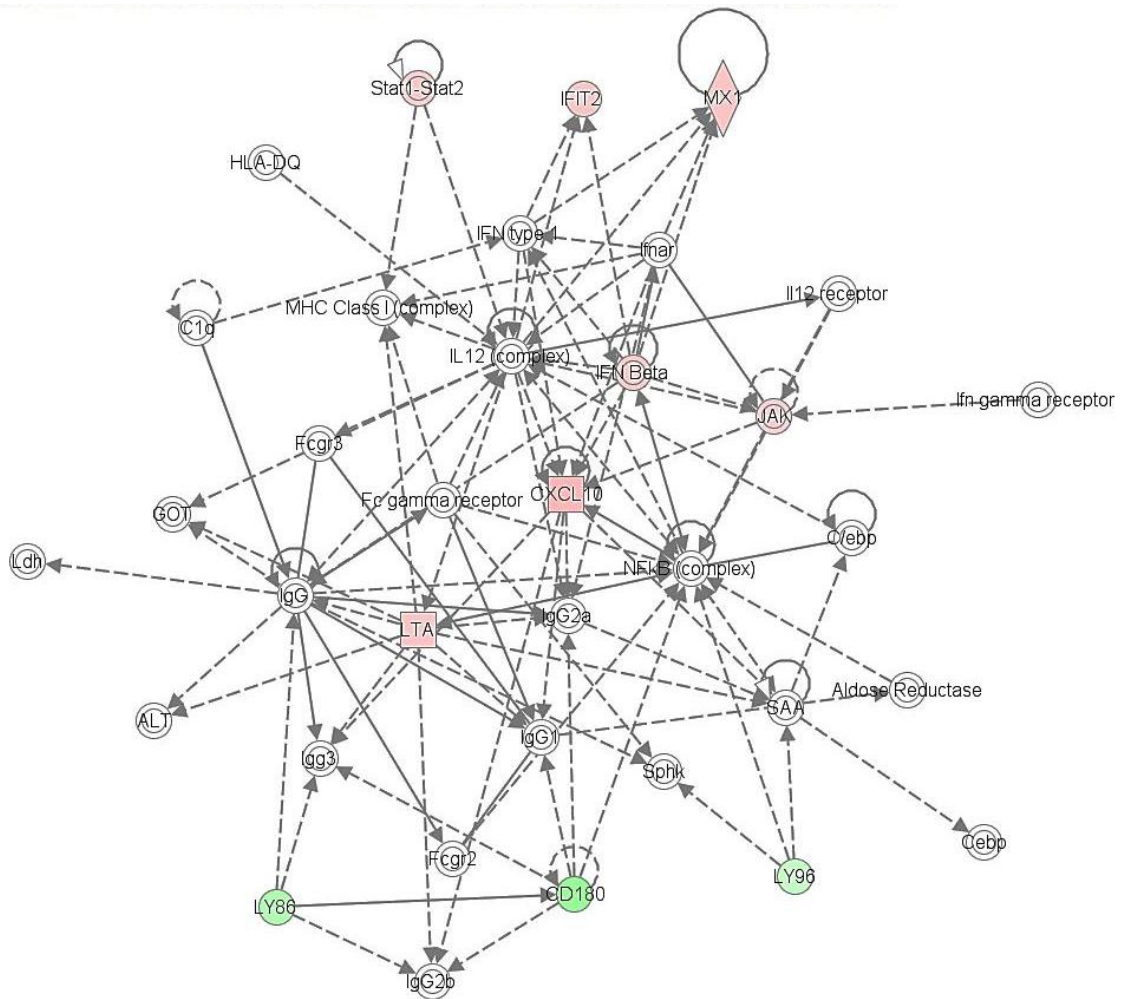


Figura 4. Rede de resposta antimicrobiana, resposta imune humoral e síntese de proteínas. Os genes são coloridos de acordo com a intensidade na diferença da expressão: símbolos em vermelho indicam aumento de expressão, símbolos em verde indicam inibição da expressão. Os nós são apresentados com diferentes formatos, pois representam a classe funcional do produto daquele gene. As bordas com linhas pontilhadas indicam relações indiretas, enquanto as de linhas contínuas indicam relações diretas. As moléculas em branco são incluídas pelo programa, mas não fazem parte do conjunto de genes identificados nos indivíduos AR.

A partir das cinco redes fornecidas pelo IPA, fizemos uma junção das mesmas para criar uma única rede e, nessa rede, mantivemos apenas as 32 moléculas moduladas significativamente nos indivíduos AR (Tabela 2 e 4). Como mostrado na Figura 5, as moléculas centrais são *IL6*, *TNF*, e *JAK2*. Todas elas se associam direta ou indiretamente com as outras 28 moléculas presentes na rede: *TNF* se associa diretamente com *IL6*, *JAK2* e *CXCL10* e todas elas se associam, mais externamente, com *STAT1*. Por outro lado, as mesmas se relacionam diretamente com *TLR5*, que está em posição mais externa na rede. Dentre as moléculas analisadas, a expressão de *CMKLR1*, *LY96*, *TLR5*, *CD180* e *LY86* foi modulada negativamente e as mesmas encontram-se em posição mais periférica na rede. Todas as outras moléculas presentes na rede estão reguladas positivamente.

analisadas estiverem relacionadas à uma determinada via canônica, mais significativa essa via se torna. Nos indivíduos AR, a via canônica mais significativa ($p < 1,37E-13$) está associada com a comunicação entre células do sistema imune inato e adaptativo (Tabela 6).

Tabela 6 - Resumo da análise IPA mostrando as principais vias canônicas, a partir dos genes modulados significativamente nos indivíduos AR.

Top Canonical Pathways		
Name	p-value	Ratio
Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	1,37E-13	9/109 (0,083)
TREM1 Signaling	2,6E-13	8/71 (0,113)
IL-17 Signaling	1,38E-12	8/74 (0,108)
Glucocorticoid Receptor Signaling	2,32E-12	11/294 (0,037)
Role of Hypercytokinemia/hyperchemokemia in the Pathogenesis of Influenza	2,84E-12	7/44 (0,159)

Como mostrado na Figura 6, essa via possui nove moléculas encontradas no conjunto de genes fornecidos ($n= 32$) do total de 109 genes presentes na via ($Ratio= 0,083$). O *IFNG* aparece com um papel central nessa via, sendo o mediador entre a resposta imune inata e adaptativa, capaz de induzir uma resposta imune celular e a polarização para resposta imune adaptativa (áreas em destaque na Figura 6). Desta forma, os indivíduos AR apresentam uma assinatura gênica com moléculas mais moduladas positivamente do que negativamente e relacionadas com a indução de uma resposta imune celular do tipo Th1, predominantemente.

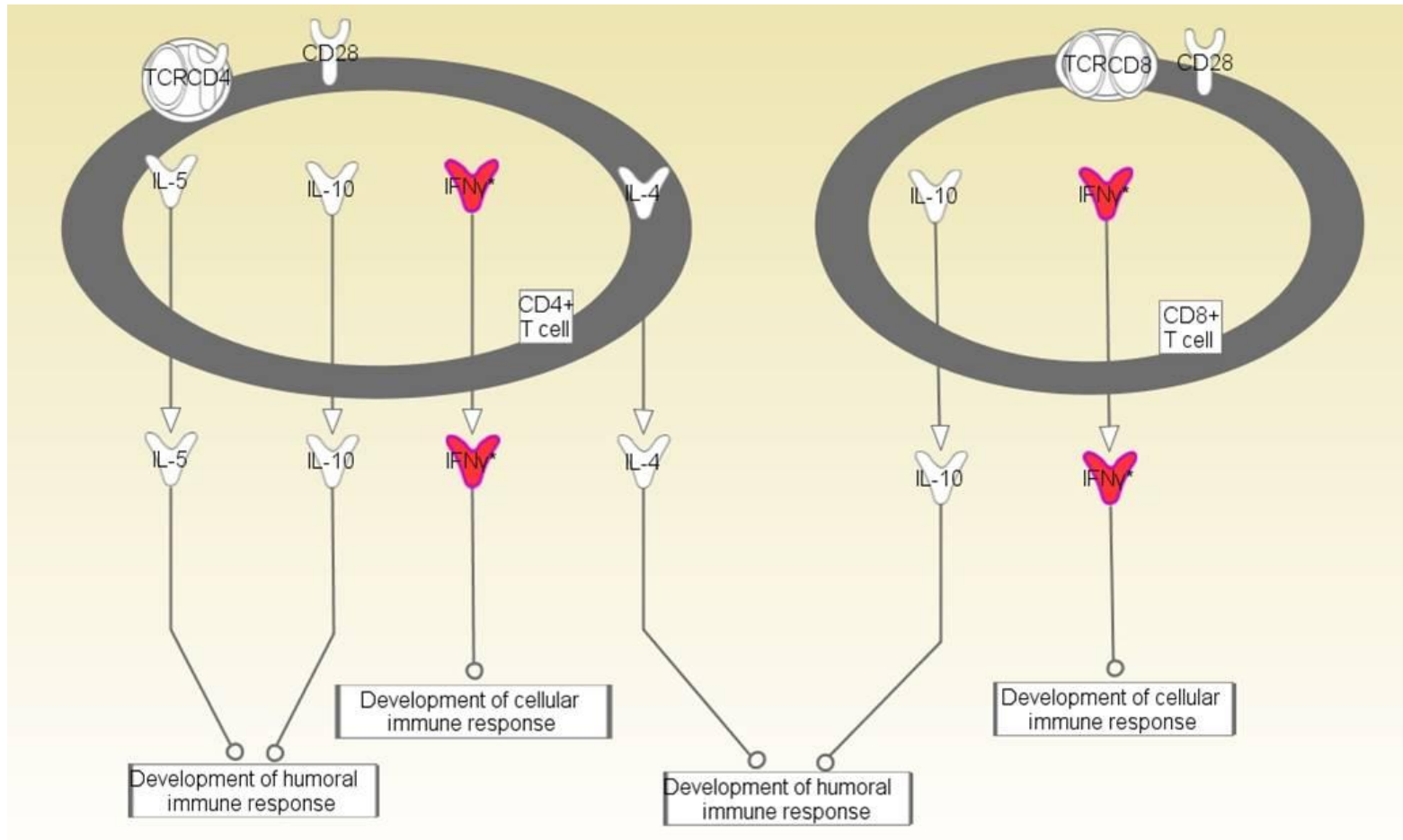



Figura 6. Detalhe da Via canônica associada à comunicação entre células do sistema imune inato e adaptativo. As moléculas em branco são aquelas presentes na rede, mas que não estão incluídas nos dados analisados. Os genes são coloridos de acordo com a intensidade de diferença na expressão: símbolos em vermelho indicam aumento da expressão, símbolos em verde indicam inibição da expressão. Os nós são apresentados com diferentes formatos, pois representam a classe funcional do produto daquele gene. As bordas com linhas pontilhadas indicam relações indiretas, enquanto as de linhas contínuas indicam relações diretas.

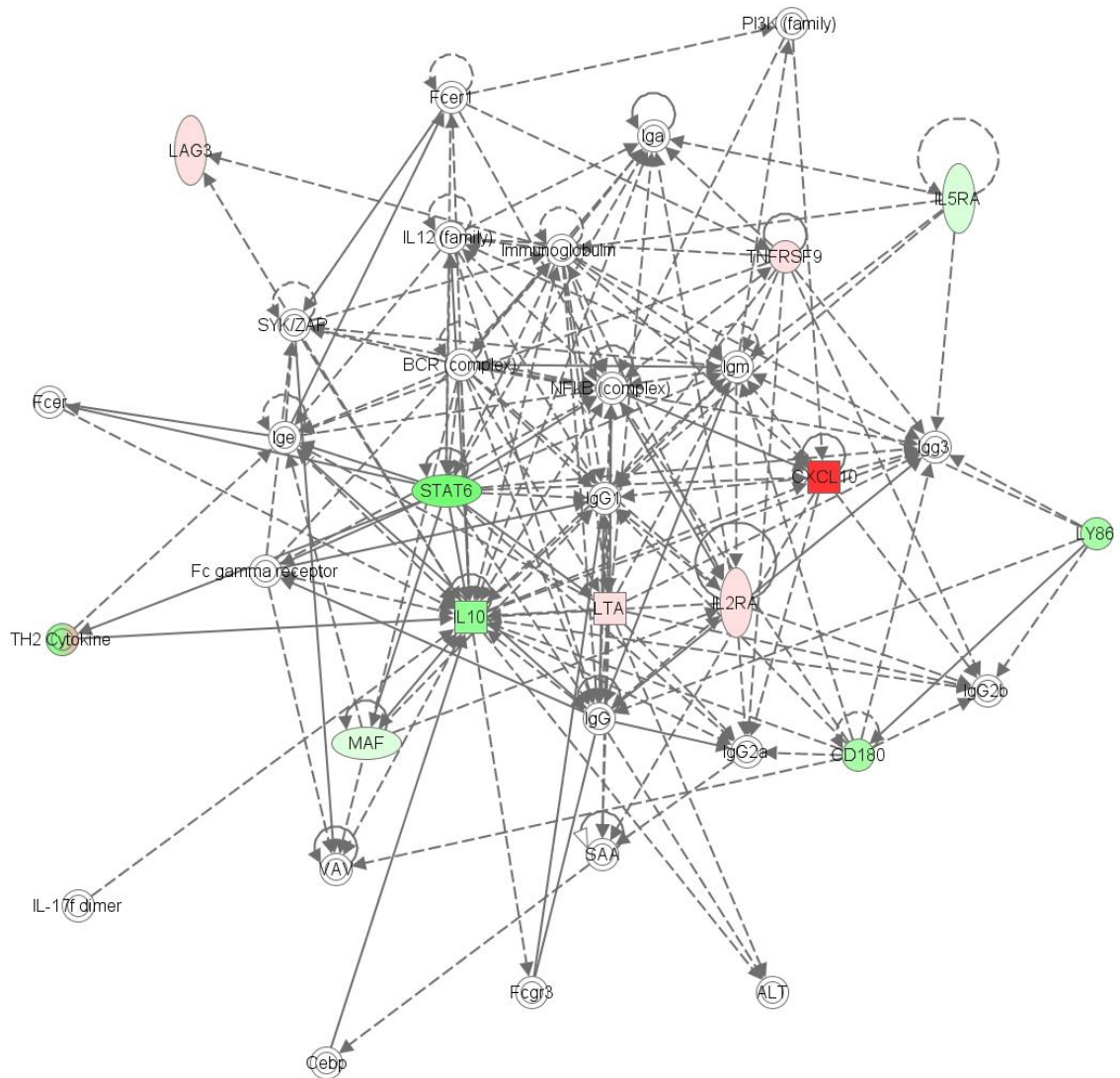
Em paralelo, também avaliamos as moléculas moduladas significativamente nos indivíduos BR somente (n= 16; Tabela 2) e os genes modulados também em indivíduos AR (n= 12, Tabela 3), totalizando 28 moléculas. Com esse conjunto de dados, o IPA detectou quatro redes, sendo que a mais importante (escore 23) está associada com as seguintes funções: resposta imune humoral, síntese de proteínas e sinalização e interação entre células (Tabela 7).

Tabela 7 - Resumo da análise IPA mostrando as principais redes encontradas e as suas respectivas funções, em indivíduos BR.

Top Networks		
ID	Associated Network Functions	Score
1	Humoral Immune Response, Protein Synthesis, Cell-To-Cell Signaling and Interaction	23
2	Infectious Disease, Antimicrobial Response, Inflammatory Response	23
3	Cell Death and Survival, Cellular Function and Maintenance, Cell-To-Cell Signaling and Interaction	8
4	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cellular Growth and Proliferation, Cellular Development	5

(c) 2000-2014 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved. 1 

Como mostrado na Figura 7, a rede com maior escore contém onze moléculas dentre as 28 identificadas anteriormente (Tabelas 2 e 4). De modo mais central na rede encontramos moléculas como *NFkB* e *IgG1*. Ambas se relacionam diretamente com *STAT6*, *IL10*, *CXCL10*, *LTA* e *IL2RA*, que se encontram mais externamente. A *IL10* se relaciona com a maior parte das moléculas da rede, principalmente com *NFkB* e *IgG1*, tanto direta quanto indiretamente, apontando um papel importante desta citocina nos indivíduos BR. Mais externamente na rede, encontramos uma relação direta entre *LY86* e *CD180*, indireta entre *TNFRSF9* e *CXCL10* e entre *MAF* e *IL10*. Por outro lado, *LAG3* e *IL5RA* não possuem uma relação próxima com as outras moléculas moduladas, porém há uma relação através de moléculas intermediárias.



© 2000-2013 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 7. Rede de resposta imune humoral, síntese de proteínas e sinalização e interação entre células. Os genes são coloridos de acordo com a intensidade na diferença da expressão: símbolos em vermelho indicam aumento de expressão, símbolos em verde indicam inibição da expressão. Os nós são apresentados com diferentes formatos, pois representam a classe funcional do produto daquele gene. As bordas com linhas pontilhadas indicam relações indiretas, enquanto as de linhas contínuas indicam relações diretas. As moléculas em branco são incluídas pelo programa, mas não fazem parte do conjunto de genes identificados nos indivíduos AR.

A partir das quatro redes fornecidas pelo IPA, fizemos uma junção das mesmas para criar uma única rede e, nessa rede, mantivemos apenas as 28 moléculas moduladas significativamente nos indivíduos BR. Como mostrado na Figura 8, as moléculas mais centrais são *IL6*, *IFNG* e *TLR2/4*. Todas elas se

associam indireta ou indiretamente umas com as outras e, principalmente, com a *IL10*, que se encontra mais externamente na rede, Estas moléculas também se associaram com grupo de moléculas *STAT* (este grupo engloba *STAT1*, *2*, *3*, *4*, *5* e *6*). Esta rede apresenta um perfil misto, tanto com moléculas moduladas negativamente como *IL10*, *CD14* e *TLR4* quanto com moléculas moduladas positivamente como *IFNG*, *IL6*, *CXCL10* e indutores de IFN como o *IFI27* e *IFI44*.

Também avaliamos as vias canônicas de sinalização que estão associadas com o conjunto de dados fornecidos dos indivíduos BR. Assim, a via canônica mais significativa ($p < 1,28E-12$) está associada com o papel dos receptores do tipo Toll (Tabela 8).

Tabela 8 - Resumo da análise IPA mostrando as principais vias canônicas, a partir dos genes modulados significativamente nos indivíduos BR.

Top Canonical Pathways		
Name	p-value	Ratio
Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses	1,28E-12	8/109 (0,073)
IL-12 Signaling and Production in Macrophages	1,94E-11	8/157 (0,051)
Altered T Cell and B Cell Signaling in Rheumatoid Arthritis	4,51E-11	7/100 (0,07)
Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	6,77E-11	7/112 (0,062)
Interferon Signaling	1,6E-09	5/36 (0,139)

Como mostrado na Figura 9, essa via possui oito moléculas encontradas no conjunto de genes fornecidos ($n= 28$) do total de 109 genes presentes na via ($Ratio= 0,073$). Os receptores do tipo Toll, como o TLR2 e o TLR5, possuem papel central, induzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias como *IL6* (em destaque na figura 9). Desta forma, os indivíduos BR apresentaram uma assinatura gênica com moléculas moduladas positivamente e negativamente, e relacionadas com vias que induzem a ativação de NF κ B, e transcrição de citocinas pró-inflamatórias como *IL6*, demonstrando um papel predominante da resposta imune inata nestes indivíduos.

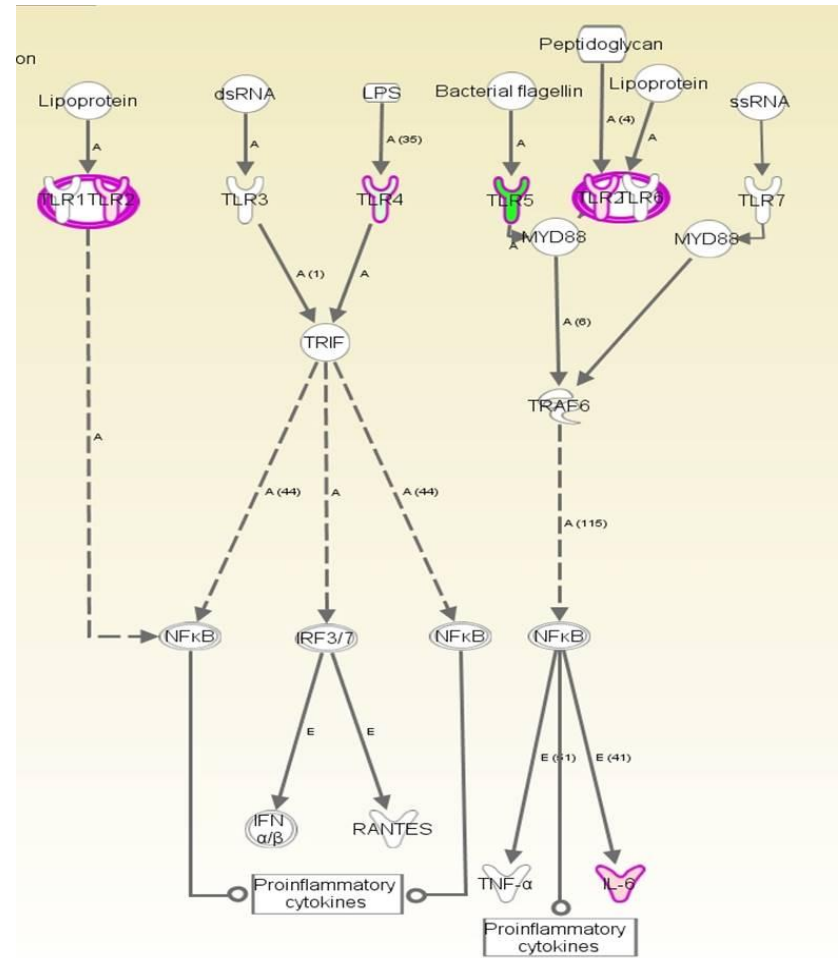


Figura 9. Detalhe da Via canônica associada com o papel dos receptores do tipo Toll. Os genes são coloridos de acordo com a intensidade na diferença da expressão: símbolos em vermelho indicam aumento da expressão, símbolos em verde indicam inibição da expressão. Os nós são apresentados com diferentes formatos pois representam a classe funcional do produto daquele gene. As bordas com linhas pontilhadas indicam relações indiretas, enquanto as de linhas contínuas indicam relações diretas.

6.4 VALIDAÇÃO DOS GENES PRINCIPAIS

Em seguida, passamos para a etapa de validação dos genes modulados significativamente, segundo os microarranjos. Para essa etapa, selecionamos um grupo de genes cuja diferença de expressão foi superior a duas vezes, com localização central nas redes de interação geradas pelo IPA (Figuras 4 e 5 para indivíduos AR; e 7 e 8 para indivíduos BR) e relacionados à resposta imune. Assim, o grupo de genes selecionados para validação foi composto por: *IFNG*, *IFI27*, *IL6*, *IRF1*, *TNF*, *IL10*, *CXCL10*, e *JAK2*, denominados genes principais.

Coletamos novamente CMSP dos indivíduos AR e BR, identificados anteriormente, e as células foram estimuladas com *L. braziliensis*. O RNA total foi então submetido a ensaios de PCR em tempo real, empregando iniciadores específicos para cada gene selecionado. Os indivíduos AR apresentaram uma expressão mais elevada de *CXCL10* (Figura 10A), *TNF* (Figura 10B) e *IL6* (Figura 10C) quando comparados aos indivíduos BR, corroborando os resultados encontrados nos microarranjos (Tabelas 2, 3 e 4).

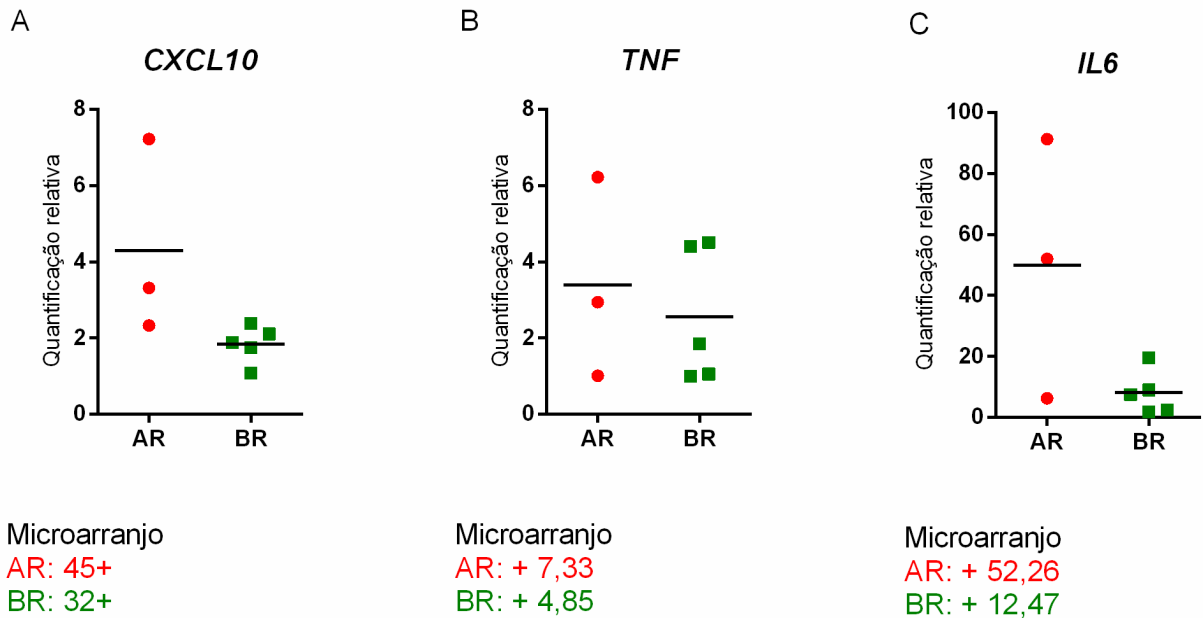


Figura 10. Validações por PCR em tempo real dos genes *CXCL10*, *TNF* e *IL6*, em indivíduos AR e BR. As CMSP dos indivíduos AR e BR foram estimuladas com *L. braziliensis* e o cDNA foi empregado em ensaios de PCR em tempo real utilizando iniciadores específicos para cada gene mostrado. Os valores de expressão de cada gene estão mostrados para cada grupo de células de indivíduos AR e BR, individualmente. Os valores medianos de expressão, obtidos nos microarranjos, estão mostrados no canto inferior esquerdo.

O mesmo padrão foi encontrado para a expressão de *IRF1* (Figura 11A), *IFI27* (Figura 11B) e *IFNG* (Figura 11C), novamente corroborando os resultados encontrados nos microarranjos (Tabelas 2, 3 e 4).

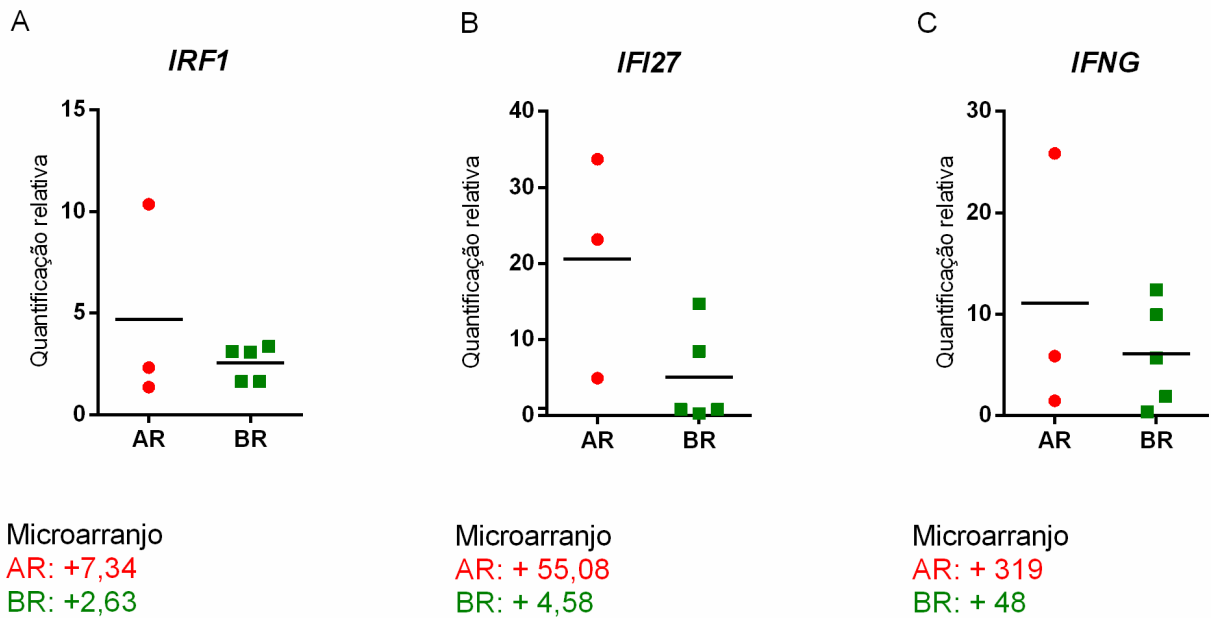


Figura 11. Validações por PCR em tempo real dos genes *IRF1*, *IFI27* e *IFNG*, em indivíduos AR e BR. As CMSP dos indivíduos AR e BR foram estimuladas com *L. braziliensis* e o cDNA foi empregado em ensaios de PCR em tempo real utilizando iniciadores específicos para cada gene mostrado. Os valores de expressão de cada gene estão mostrados para cada grupo de células de indivíduos AR e BR, individualmente. Os valores medianos de expressão, obtidos nos microarranjos, estão mostrados no canto inferior esquerdo.

Com relação a *IL10* (Figura 12A) encontramos sua expressão aumentada nos indivíduos BR enquanto que, no microarranjo, a expressão de *IL10* foi suprimida. Por outro lado, tanto os indivíduos AR quanto os indivíduos BR apresentaram expressão aumentada de *JAK2* (Figura 12B).

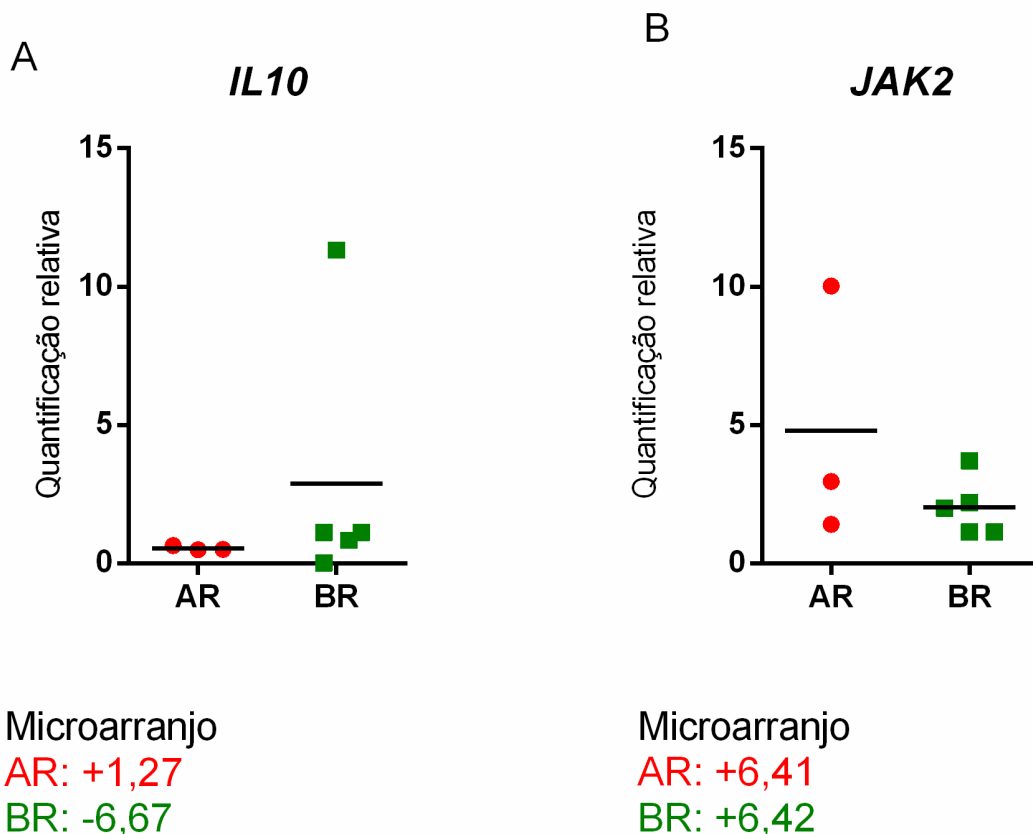


Figura 12. Validações por PCR em tempo real dos genes *IL10* e *JAK2* em indivíduos AR e BR. As CMSP dos indivíduos AR e BR foram estimuladas com *L. braziliensis* e o cDNA foi empregado em ensaios de PCR em tempo real utilizando iniciadores específicos para cada gene mostrado. Os valores de expressão de cada gene estão mostrados para cada grupo de células de indivíduos AR e BR, individualmente. Os valores medianos de expressão, obtidos nos microarranjos, estão mostrados no canto inferior esquerdo.

6.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES PRINCIPAIS E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM INDIVÍDUOS SC E PORTADORES DE LC.

A partir da validação dos genes principais nos indivíduos AR e BR, partimos para a avaliação desses mesmos genes em pacientes com LC e em indivíduos SC. Nossa hipótese é que indivíduos AR apresentam perfil de expressão gênica distinto dos indivíduos BR e este perfil pode ser associado ao desfecho clínico da doença. Para testar essa hipótese, avaliamos dez indivíduos de área endêmica, sem histórico da doença, positivos para o teste de Montenegro, denominados subclínicos (SC). Avaliamos também nove indivíduos com LC. Todos os pacientes com LC apresentaram pelo menos uma lesão ativa. Encontramos também uma diferença

significativa na reatividade ao teste de Montenegro entre pacientes com LC e indivíduos SC. Os dados demográficos e clínicos desses indivíduos estão mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Parâmetros clínicos e Epidemiológicos dos indivíduos SC e com LC

Características	Indivíduos SC	Pacientes com LC
Sexo M:F	4:6	4:5
Idade, média± SD padrão anos	29,3± 20,97	44,56±18,58
Número de lesões ativas, média	-	2,7
Tamanho DTH, média	0.41x0.44	0.92x0.92*

As CMSP dos pacientes com LC e dos indivíduos SC foram coletadas e estimuladas com *L. braziliensis*. Em seguida, o RNA foi extraído e empregado em ensaios de PCR em tempo real, utilizando iniciadores específicos. Os indivíduos SC apresentaram maior expressão de *CXCL10* (Figura 13A), *IL6* (Figura 13B) e *IFI27* (Figura 13 C) quando comparados aos pacientes com LC e esta diferença foi significativa.

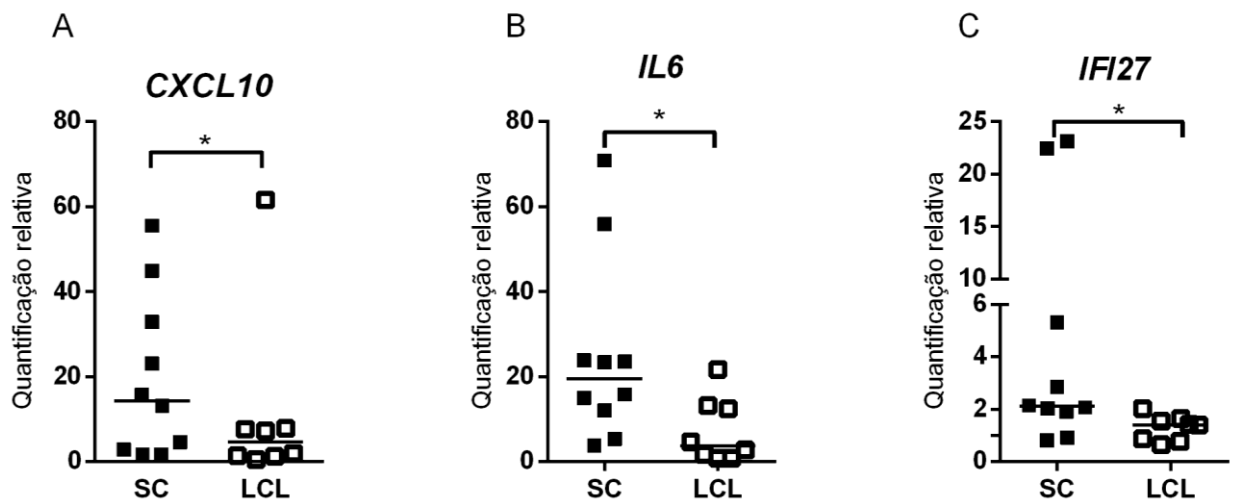


Figura 13. Expressão dos genes *CXCL10*, *IL6* e *IFI27* em indivíduos SC e em pacientes com LC por PCR em tempo real. As CMSP dos indivíduos SC e pacientes com LC foram estimuladas com *L. braziliensis* e o cDNA foi empregado em ensaios de PCR em tempo real utilizando iniciadores específicos para cada gene mostrado. Os valores de expressão de cada gene estão mostrados para cada indivíduo individualmente, indicando o valor de mediana.

Por outro lado, não encontramos diferenças significativas na expressão de *TNF*, *IRF1* e *JAK2* comparando indivíduos SC e pacientes com LC (Figuras 14 A, B e C; respectivamente), apenas uma tendência de maior expressão nos indivíduos SC.

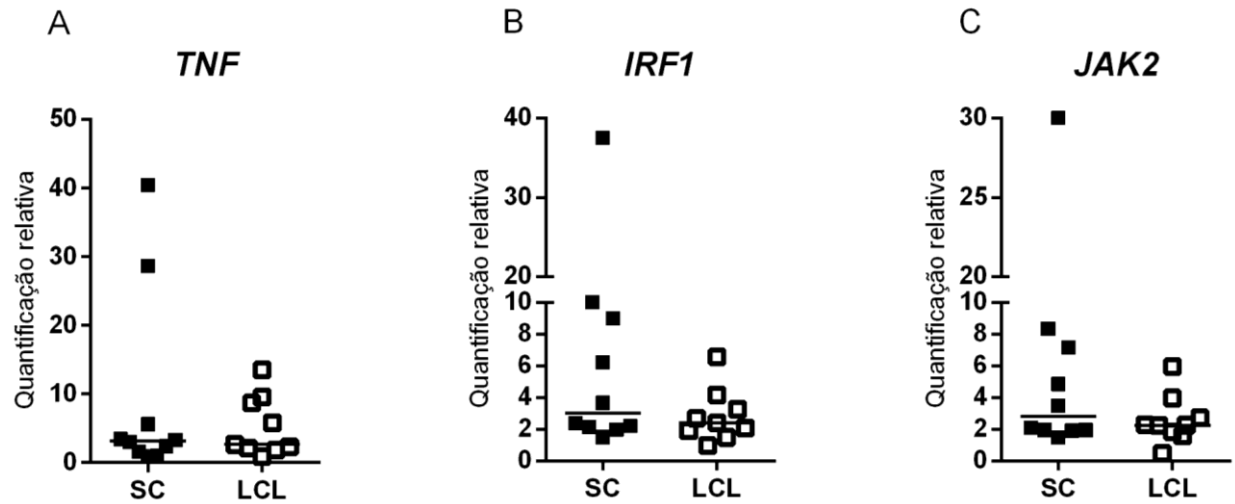


Figura 14. Expressão dos genes *TNF*, *IRF1* e *JAK2* em indivíduos SC e em pacientes com LC por PCR em tempo real. As CMSP dos indivíduos SC e pacientes com LC foram estimuladas com *L. braziliensis* e o cDNA foi empregado em ensaios de PCR em tempo real utilizando iniciadores específicos para cada gene mostrado. Os valores de expressão de cada gene estão mostrados para cada indivíduo individualmente, indicando o valor de mediana.

Com relação ao *IFNG* (Figura 15A), encontramos uma expressão maior nos pacientes com LC do que nos indivíduos SC e esta diferença foi significativa. Por outro lado, a expressão de *IL10* foi significativamente maior nos indivíduos SC comparado aos pacientes com LC (Figura 15B).

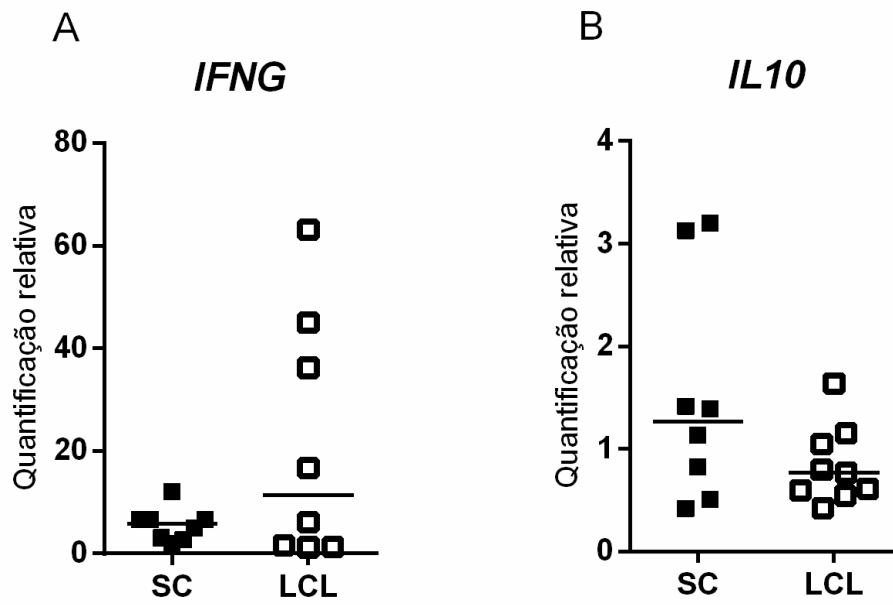


Figura 15. Expressão dos genes *IFNG* e *IL10* em indivíduos SC e em pacientes com LC por PCR em tempo real. As CMSP dos indivíduos SC e pacientes com LC foram estimuladas com *L. braziliensis* e o cDNA foi empregado em ensaios de PCR em tempo real utilizando iniciadores específicos para cada gene mostrado. Os valores de expressão de cada gene estão mostrados para cada indivíduo individualmente, indicando o valor de mediana.

Ao avaliarmos a produção de IFNG por ELISA, corroboramos os achados de expressão gênica (Figura 15A), pois vimos uma maior produção nos pacientes com LC do que nos indivíduos SC (Figura 16A). Por outro lado, na produção de IL10, vimos uma maior produção nos indivíduos SC do que nos pacientes com LC (Figura 16B), também confirmando os achados de expressão gênica (Figura 15B).

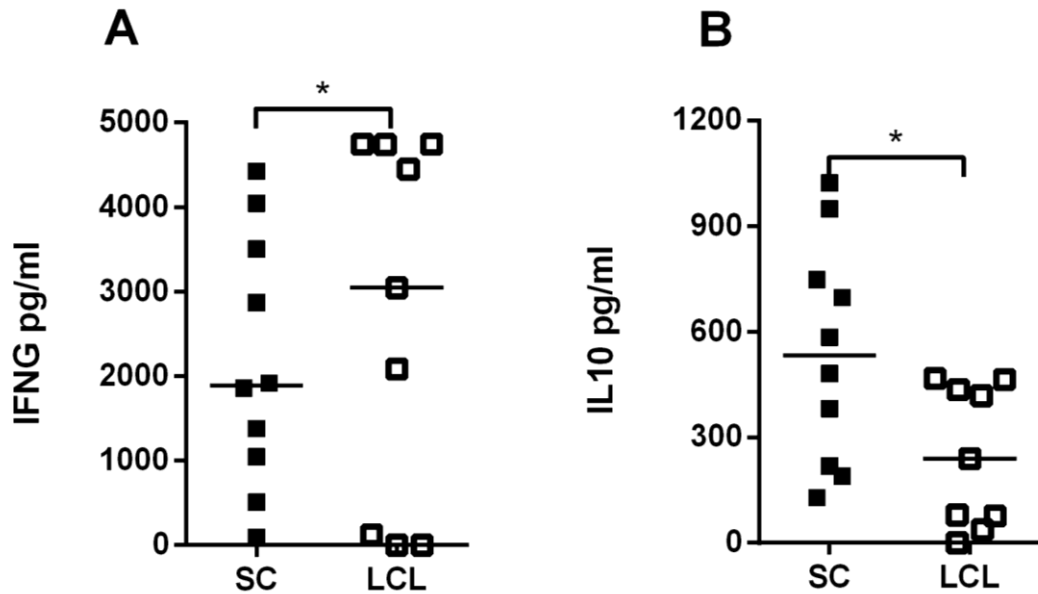


Figura 16. Produção de IFNG e IL10 em em indivíduos SC e em pacientes com LC. As CMSP dos indivíduos SC e pacientes com LC foram estimuladas com *L. braziliensis* e a presença de citocinas foi determinada por ELISA, no sobrenadante das culturas. Os valores obtidos para cada indivíduo estão mostrados individualmente. * $p < 0.05$.

7. DISCUSSÃO

No presente trabalho, buscamos caracterizar o perfil de expressão gênica associado ao padrão de produção de IFNG de indivíduos AR e BR. Para isso, CMSP de voluntários saudáveis foram estimuladas *in vitro* com *L. braziliensis* e a produção de IFNG foi determinada nos sobrenadantes de cultura. Em seguida, analisamos a expressão gênica das células estimuladas, utilizando microarranjos, e validamos a expressão de determinados genes por PCR em tempo real. Posteriormente, avaliamos se as assinaturas gênicas identificadas em indivíduos AR e BR se associam com o padrão de resposta imune observado em indivíduos de área endêmica identificados como subclínicos (SC) ou em portadores de Leishmaniose Cutânea Localizada (LC). Para isso, CMSP obtidas de pacientes com LC e indivíduos SC foram estimuladas *in vitro* com *L. braziliensis* e a expressão de um grupo de genes, significativamente modulados nos indivíduos AR e BR, foi avaliada por PCR em tempo real.

Ao estimularmos CMSP de voluntários saudáveis com *L. braziliensis*, encontramos indivíduos que produzem alta quantidade de IFNG, denominados AR, e indivíduos que produzem baixa quantidade de IFNG, denominados BR. Pompeu e colaboradores, utilizando *L. amazonensis*, também verificaram estes dois padrões de resposta imune na primeira exposição à *Leishmania*: alta e baixa produção de IFNG (POMPEU *et al.*, 2001). Nosso próximo passo foi estudar o padrão de expressão gênica desses indivíduos. Nos indivíduos AR, a expressão das seguintes moléculas foi modulada significativamente: citocinas (*IFNG*, *IL1A*, *IL1B*, *IL6*, *IL7*, *IL8*, e *TNF*), receptores (*IL31RA*), fatores de transcrição (*IRF1* e *STAT1*), enzimas (*PTGS2*), quinases (*JAK2* e *RIPK2*). De modo geral, os indivíduos AR apresentaram um predomínio de moléculas moduladas positivamente.

Já foi demonstrado que a ativação de *STAT1* e *JAK2* induz a expressão de *IFNG* e *TNF* e, por sua vez, das quimiocinas *CXCL1* e *CXCL10* (HIROI e OHMORI, 2003). Estes fatores de transcrição estão modulados positivamente nos indivíduos AR. Além disso, o *STAT1* também estimula a expressão dos genes *OAS1* e *IRF1* (HU *et al.*, 2005), que também apresentaram expressão aumentada nos indivíduos AR. Nos indivíduos AR, o *TNF* está modulado positivamente e esse induz a expressão de *IFN* do tipo I e citocinas pró-inflamatórias, via *IRF1* (YARILINA *et al.*, 2008), contribuindo assim para a assinatura dos indivíduos AR.

Já foi evidenciado que o IFNG e o TNF induzem a atividade leishmanicida (GREEN *et al.*, 1990; MURRAY *et al.*, 1985; NATHAN *et al.*, 1983), e que a produção de NO pelos macrófagos é um dos mecanismos utilizados no controle da infecção (MUKBEL *et al.*, 2007). Ainda, nos indivíduos AR, a *IL1B* está positivamente modulada e leva a ativação do inflamossoma, que possui um papel crucial no controle da *Leishmania*, através da produção de NO (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2013). O IFNG, juntamente com o TNF, por outro lado, podem prevenir a proliferação de células T e suprimir o desenvolvimento de células T patogênicas (revisado em MELLOR e MUNN, 2004). Assim, nos indivíduos AR, a maior expressão do IFNG e do TNF pode controlar a proliferação de células inflamatórias e, ao mesmo tempo, induzir a destruição do parasita, via NO. Assim, os indivíduos AR apresentam um perfil de resposta imune protetor.

A quimiocina CCL7, ou MCP-3 em humanos, é responsável em atrair monócitos especificamente (VAN DAMME *et al.*, 1992), e está relacionada com a resposta Th2 e a imunização com antígenos de *Leishmania* em combinação com esta quimiocina induz uma resposta Th2 não protetora (SEREZANI *et al.*, 2002). Ainda, Katzman e Fowell demonstraram que, na infecção por *L. major* no modelo murino, há um aumento na expressão de CCL7 no sítio de infecção (KATZMAN e FOWELL, 2008). A expressão de CCL7 está aumentada nos indivíduos AR, sugerindo que há modulação na resposta pró-inflamatória, uma vez que estes indivíduos apresentam uma resposta imune mista (Th1 e Th2), e não apenas uma resposta Th1.

A IL8 é uma citocina responsável por recrutar neutrófilos e induzir a fagocitose (BAGGIOLINI *et al.*, 1989; GAINET *et al.*, 1998). A produção de IL8 induzida por *Leishmania* provavelmente facilita a fagocitose do parasita e pode ter um papel importante na resposta inicial ao parasita. Assim, Afonso e colaboradores demonstraram que a interação de neutrófilos necróticos com macrófagos infectados com *L. amazonensis* induz a morte do parasita (AFONSO *et al.*, 2008).

Nos indivíduos BR também foram expressas, de maneira significativa, diferentes categorias de moléculas: citocinas (*IFNG*, *IL6*, *IL9* e *LTA*), receptores (*IL2RA*, *IL3RA*, *IL5RA*, *TLR2*, e *TNFSRF9*), fatores de transcrição (*IRF1*), enzimas (*IFIH1*, *MX1* e *OAS1*), quinases, entre outros. A expressão de citocinas pró-inflamatórias (*IFNG*, *IL6*, *TNF*, *IFI27*) foi menor nos indivíduos BR do que nos AR e,

de modo geral, os indivíduos BR apresentaram tanto moléculas moduladas positivamente, quanto negativamente.

Células Th1 controlam a resposta à *L. major* por meio da produção de IL10 (revisado em OGARRA e VIEIRA, 2007). Como a *IL10* está suprimida nos indivíduos BR, sugerimos que a resposta imune não está sendo regulada nestes indivíduos. Além disso, a *STAT6* está modulada negativamente nos indivíduos BR, sugerindo uma supressão da resposta Th2 nestes indivíduos, pois a indução de uma resposta do tipo Th2 depende da presença de *STAT6* (MAIER *et al.*, 2012). Ainda, a IL9 é uma citocina relacionada com a resposta Th2 (POSTMA *et al.*, 1995) e já foi demonstrado uma associação entre os níveis desta citocina produzida por CMSPs de pacientes asmáticos com os níveis de IgE específico para alergia (DEVOS *et al.*, 2006). Estes achados sugerem que a IL9 possui um papel importante na patogênese da asma. Por outro lado, a IL9 teve sua produção associada com células T regulatórias (LU *et al.*, 2006). Nos indivíduos BR, a expressão de *IL9* está aumentada, podendo controlar os níveis de IFNG (expresso em menor nível) e, pode estar associada com a indução de uma resposta Th2 não protetora.

Nos indivíduos BR, também encontramos uma expressão positiva do *IFITM2*, que faz parte de uma família de genes induzidos por IFNs (FRIEDMAN *et al.*, 1984). Foi demonstrado que *IFITM2* inibe o crescimento celular e induz a apoptose dependente de caspase e independente da p53 (DANIEL-CARMI *et al.*, 2009). Assim, esta molécula pode estar apresentando um papel regulador nestes indivíduos. Ainda, já foi demonstrado que o TLR2 reconhece o LPG de *L. major*, reduzindo a resposta leishmanicida por meio da inibição da expressão de *TLR9*, o qual está associado com susceptibilidade à infecção (SRIVASTAVA *et al.*, 2013). Este receptor também apresentou expressão aumentada nos indivíduos BR, podendo contribuir para uma resposta não protetora nestes indivíduos.

A biologia de sistemas integra dados de genômica, proteômica, etc, para descrever as interações destes diferentes sistemas, com a finalidade de prever seu comportamento (IDEKER *et al.*, 2001). Uma das aplicações é a busca de uma assinatura gênica para prever a resposta à vacinas (NAKAYA e PULENDRAN, 2012). Assim, foram identificados biomarcadores (assinaturas moleculares) que podem prever a magnitude das respostas humoral e de células T CD8⁺ induzidas pela vacinação com a vacina para febre amarela YF-17D (QUEREC *et al.*, 2009). Em paralelo, foi possível gerar novas hipóteses a respeito do mecanismo de ação da

vacina (GAUCHER *et al*, 2008). Nakaya e colaboradores (2011) aplicaram a biologia de sistemas para analisar a resposta imune inata e adaptativa induzida por duas vacinas contra a influenza em humanos. Os autores realizaram ensaios clínicos de vacinação em voluntários saudáveis utilizando o vírus inativo (TIV) ou o vírus ativo atenuado (LAIV). Os autores determinaram que CMSPs de indivíduos imunizados com LAIV expressaram genes envolvidos com a resposta de IFN do tipo I. Por outro lado, na vacina TIV, houve a indução de genes do fator de transcrição XBP-1 e de genes correlacionados a IgG, essenciais para resposta protetora. Ficou demonstrado que o TIV é capaz de induzir a resposta humoral mais inicialmente, demonstrando assim maior eficiência da vacina inativa do que da viva atenuada, pois já foi determinado que o sucesso da vacina depende do aumento nos níveis de anticorpos contra o vírus (NAKAYA *et al.*, 2011).

Em nosso trabalho, observamos que as moléculas moduladas significativamente nos indivíduos AR estão associadas com a resposta antimicrobiana, a resposta imune humoral e a síntese de proteínas. Nessa rede, chama a atenção a posição central de *CXCL10* (modulado positivamente), *IFNB*, *IgG2a* e *JAK2* (todos também modulados positivamente). *CXCL10* é capaz de atrair células T efetoras para sítios de inflamação e esta quimiocina é estimulada pelo IFNG (DUFOUR *et al*, 2002). Também já foi demonstrado que o *CXCL10* é capaz de induzir a expressão de *JAK2* que, juntamente com IFNG, induzem *STAT1* e moléculas regulatórias (revisado em WILDNER e KAUFMANN, 2013). Interessantemente, já foi demonstrado que o IFNB é capaz de modular a resposta imune na infecção por *M. tuberculosis* pela expressão de *CXCL10* (LANDE *et al.*, 2013). Na infecção por Leishmania, Khouri e colaboradores demonstraram que o IFNB inibe a SOD1 e assim a atividade leishmanicida nos macrófagos humanos (KHOURI *et al.*, 2009), possuindo um papel deletério no controle da infecção. Na rede dos indivíduos AR, existe uma relação indireta muito próxima entre estas moléculas que estão moduladas positivamente, demonstrando assim um papel importante para o desenvolvimento da resposta imune celular, enquanto na rede dos indivíduos BR estas moléculas estão distantes.

Nos indivíduos BR encontramos uma rede envolvida com a resposta imune humoral, a síntese de proteínas e a sinalização celular, na qual os genes centrais foram *IgG1*, *NFκB*, *IL10* (suprimido) e *CXCL10* (modulado positivamente). Observamos na rede uma relação direta do *CXCL10*, *IL10* e *IgG1* com *NFκB*, um

fator de transcrição que, apesar de não ter sido uma das moléculas avaliadas, possui um papel central na rede. A ativação do NFκB está relacionada com o desenvolvimento e maturação de células B, além da troca de isotipo de anticorpos, podendo assim estar induzindo a resposta imune humoral (revisado em LIANG, ZHOU e SHEN, 2004). O *IgG1* é a molécula central na rede dos indivíduos BR e se relaciona diretamente com *IL10*, que nestes indivíduos está suprimida. Células Th2 geram sinais que facilitam o desenvolvimento de resposta com anticorpos IgG1, são essenciais na proteção contra helmintos e na asma. Células Th2 podem produzir IL10 (SOUSSI-GOUNNI *et al.*, 2001) e a supressão de IL10 pode estar permitindo o desenvolvimento de uma resposta imune humoral nos indivíduos BR. Rodriguez e colaboradores observaram que nos pacientes com LC, há o desenvolvimento de uma resposta imune humoral e que a mesma não está associada com proteção. (RODRÍGUEZ *et al.*, 1996).

Nos indivíduos AR, a via canônica mais significativa apresentou genes envolvidos com a comunicação entre células do sistema imune e os genes principalmente envolvidos nessa resposta foram *IFNG*, *TNFA* e *IL8*. Já se sabe que o IFNG possui papel importante na ativação de macrófagos, eliminação do parasita e na indução de uma resposta imune celular protetora na LCL. Porém, nos indivíduos BR, a via canônica mais significativa apresentou genes relacionados com o reconhecimento de antígenos via TLR, com a produção de citocinas e com a resposta imune inata. Os genes principalmente envolvidos nesta resposta foram *TLR2*, *TLR5*, *TLR4* e *IL10*. Já foi demonstrado que o TLR2 reconhece LPG de *L. major*, e reduz a resposta leishmanicida por meio da inibição de TLR9 (SRIVASTAVA *et al.*, 2013). Na via canônica, o *TLR2* está induzido, enquanto os *TLR4* e *TLR5* estão suprimidos. Esta modulação dos TLR pode estar interferindo na apresentação de antígenos e na resposta imune inata.

Desta forma, vemos uma assinatura diferenciada entre indivíduos AR e BR, não apenas na expressão gênica, mas também nas funções associadas. Em um trabalho recente, foi mostrado que pacientes com LC apresentaram uma regulação positiva de genes envolvidos com atração de células da imunidade inata e com a apresentação de antígenos (MARETTI-MIRA *et al.*, 2012). Por outro lado, os pacientes com LM apresentaram poucos genes relacionados com a resposta imune, sugerindo um controle insuficiente da infecção.

A partir da análise conjunta dos resultados determinamos um grupo de moléculas cuja expressão foi significativa (mais de 2 *fold change*) e as quais apresentaram papel central nas redes de interação (*IFNG*, *IFI27*, *IL6*, *IRF1*, *TNF*, *IL10*, *CXCL10* e *JAK2*). As mesmas foram validadas em ensaios de PCR em tempo real. Não foi possível validar aquelas com valor de expressão negativo: *JAK2* e *IL10*. Contudo, Morey e colaboradores demonstraram que existem fatores que influenciam a correlação dos resultados de microarranjos com PCR em tempo real (MOREY *et al.*, 2006). Eles evidenciaram que a correlação diminui com valores de expressão negativos, o que explicaria a dificuldade na validação das moléculas com valores de expressão negativos.

Na última etapa do trabalho, avaliamos se a assinatura gênica em indivíduos AR e BR poderia ser associada com o padrão de resposta imune observado em indivíduos SC ou em pacientes com LC. Essa avaliação consistiu em determinar a expressão das moléculas principais (*IFNG*, *IFI27*, *IL6*, *IRF1*, *TNF*, *IL10*, *CXCL10* e *JAK2*) em indivíduos SC e em pacientes com LC. Os indivíduos AR apresentam expressão aumentada de *TNF*, *IFNG*, *JAK2*, entre outras. Assim, hipotetizamos que essa resposta estaria associada com o desenvolvimento de uma resposta adaptativa, capaz de controlar a infecção, como observado nos indivíduos sem doença (SC).

De fato, encontramos nos indivíduos SC uma assinatura pró-inflamatória, com expressão aumentada de *IFI27*, *IL6* e *CXCL10*. Esta assinatura pode ser associada com as funções relacionadas aos indivíduos AR. Embora a expressão dos genes *IRF1*, *JAK2* e *TNF* tenha sido maior nos indivíduos SC, essa diferença não foi significativa quando comparada à observada nos pacientes com LC. Suomela e colaboradores (SUOMELA *et al.*, 2004) demonstraram que a expressão de *IFI27* está aumentada na pele de pacientes com psoríase, em eczema crônico e em câncer de pele, sendo um marcador de proliferação epitelial e câncer.

Na leishmaniose, Castellucci e colaboradores demonstraram que polimorfismos no gene da *IL6* estão associados ao risco de desenvolvimento da forma mais grave da doença, a LM, mas não da LC (CASTELLUCCI *et al.*, 2006). Como a expressão de *IL6* foi modulada tanto em indivíduos AR quanto em BR, podemos também sugerir uma associação entre assinatura gênica e desfecho clínico (SC x LC). O mesmo pode ser proposta para *CXCL10*, a qual apresentou expressão aumentada na lesão tecidual (RITTER e KÖRNER, 2002). Os indivíduos BR apresentaram um perfil de expressão de *IL9* e receptores da imunidade inata

como o *TLR2*, caracterizando os pacientes com LC. Nos pacientes com LC, a expressão de *IFI27*, *IL6* e *CXCL10* está diminuída e podemos associar esse padrão com a assinatura dos indivíduos BR.

Quanto ao IFNG, os indivíduos SC apresentaram menor expressão quando comparados com os pacientes com LC. Assim, não foi possível associar esse padrão com o observado nos indivíduos AR e BR. Porém, temos de considerar a questão temporal. Os indivíduos SC e os pacientes com LC possuem tempos distintos de exposição à *Leishmania*, o que pode influenciar diretamente a habilidade de produzir IFNG. Postulamos que os indivíduos AR possuem uma produção de IFNG elevada inicialmente e que esta diminui posteriormente, caracterizando o indivíduo SC. Já foi demonstrado que os indivíduos SC produzem níveis mais baixos de IFNG (FOLLADOR *et al.*, 2002). Por outro lado, os pacientes com LC possuem elevada produção de IFNG no momento em que estão com lesão ativa (CARVALHO *et al.*, 1985; COUTINHO *et al.*, 1996; MELBY *et al.*, 1994).

Quando avaliamos a expressão de *IL10*, encontramos maior expressão nos indivíduos SC do que nos pacientes com LC. Rocha e colaboradores compararam a produção de citocinas em pacientes com LC inicial (tamanho da lesão menor de 60 dias) e tardio (tamanho da lesão maior que 60 dias). Os autores demonstraram que, no início, os pacientes apresentam maior produção de *IL10*, quando comparados com os pacientes tardios, e que a regulação negativa de *IL10* nos pacientes tardios pode facilitar a multiplicação do parasita. Muitos trabalhos já demonstraram *in vitro* que os indivíduos SC produzem baixos níveis de IFNG e TNFA (FOLLADOR *et al.*, 2002; NOVOA *et al.*, 2011), assim como uma maior produção de *IL10*, quando comparados aos pacientes com LC (BITTAR *et al.*, 2007b). Assim, a expressão de *IL10* possui um potente papel supressor da resposta imune na Leishmaniose, limitando o dano tecidual (BERG *et al.*, 1995). Essa ideia está de acordo com o perfil de expressão de *IL10* encontrado nos indivíduos AR e com a supressão na expressão de *IL10* nos indivíduos BR e com a menor produção de *IL10* nos pacientes com LC.

Ainda, a análise da expressão gênica nas lesões de pacientes com LC demonstrou aumento de RNAm associados a uma resposta Th1 (*IFNG*, *TNF*) e, em menor extensão, *IL10*. Em outros estudos com pacientes com LC, foi encontrado o mesmo padrão: maior expressão de *IFNG* e menor de *IL10* (CÁCERES-DITTMAR *et al.*, 1993) assim como expressão de *IL1A*, *IL6*, *IL10*, *IFNG* e *TNF* (MELBY *et al.*,

1994). Em biópsias de pacientes com LC, observou-se maior expressão de *TNF*, *IFNG*, *IL10*, *IL1B*, *IL8* e do fator de transcrição *IRF1* (KATARA *et al.*, 2013). A presença destas moléculas pró-inflamatórias suporta a extensa inflamação que causa o dano tecidual na LC. A predominância de citocinas do tipo 1 na lesão de pacientes com LC está associada a patologia da doença (COUTINHO *et al.*, 1996).

Por fim, outro ponto importante foi a expressão de *TLR2* e *IL9*. Como já dito anteriormente, estas duas moléculas possuem papel no desenvolvimento de uma resposta Th2 e na propagação da infecção, tendo um papel não protetor (POSTMA *et al.*, 1995; SRIVASTAVA *et al.*, 2013). Ambas encontram-se com expressão aumentada nos indivíduos BR e podem também corroborar a associação entre assinatura gênica no indivíduo BR e nos pacientes com LC.

8. CONCLUSÃO

- Existem indivíduos que respondem, no primeiro contato com *L. braziliensis*, com alta produção de IFNG (AR) ou baixa produção de IFNG (BR).
- Os indivíduos AR e BR apresentam assinaturas gênicas diferentes (funções associadas, vias de sinalização e redes de interação).
- Associamos o padrão de expressão gênica de *IFI27*, *IL6*, *IL10* e *CXCL10* dos indivíduos AR com o observado nos indivíduos SC.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- 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*. *Molecular Biochemical Parasitology*, v. 136, n. 1, p. 71-86, 2004.
- AFONSO, L. *et al.* Interactions with Apoptotic but Not with Necrotic Neutrophils Increase Parasite Burden in Human Macrophages Infected with *Leishmania Amazonensis*. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 84, n.2, p. 389-396, 2008.
- ANTONELLI, L. R. V. *et al.* Antigen Specific Correlations of Cellular Immune Responses in Human Leishmaniasis Suggests Mechanisms for Immunoregulation. *CLinical and Experimental Immunology*, v. 136, n.2, p.341-438, 2004.
- BACELLAR, O. *et al.* Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 12, p. 6734–40, 2002.
- BAGGIOLINI, M., WALZ, A. e KUNKEL, S.L. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *Journal Clinical Investigation*, v. 84, p.1045-1049, 1989.
- BARABÁSI, A. L., GULBAHCE, N. E LOSCALZO J. Network Medicine: A Network-Based Approach to Human Disease. *Nature Reviews Genetics*, v. 12, n.1, p. 56–68, 2011.
- BARBATO, C. *et al.* Computational challenges in miRNA predictions: to be or not to be a true target. *Journal of Biomedicine Biotechnology*, 2009.
- BELTRAO, P., GERARD C., e KROGAN, N.J. Quantitative Genetic Interactions Reveal Biological Modularity. *Cell*, v. 141, n. 5, p. 739–45, 2010.
- BERG, D. J. *et al.* Interleukin 10 but Not Interleukin 4 Is a Natural Suppressant of Cutaneous Inflammatory Responses. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 182, n. 1, p. 99–108, 1995.
- BITTAR, R. C. *et al.* T-Cell Responses Associated with Resistance to *Leishmania* Infection in Individuals from Endemic Areas for *Leishmania* (Viannia) *Braziliensis*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 5, p. 625–30, 2007a.
- T-Cell Responses Associated with Resistance to *Leishmania* Infection in Individuals from Endemic Areas for *Leishmania* (Viannia) *Braziliensis*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 5, p. 625–30, 2007b.

- BOAVENTURA, V. S. *et al.* Human Mucosal Leishmaniasis: Neutrophils Infiltrate Areas of Tissue Damage That Express High Levels of Th17-Related Cytokines. *European Journal of Immunology*, v. 40, n. 10, p. 2830–6, 2010.
- BOMFIM, G. *et al.* Cellular analysis of cutaneous Leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 77, n. 5, p. 854-859, 2007.
- BUATES, S. e MATLASHEWSKI, G. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. *The Journal of Immunology*, v. 166, p.3416-22, 2001.
- BRENTANI, R. R. Cell Matrix Interactions. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 86, p. 51–9, 1991.
- CÁCERES-DITTMAR, G. *et al.* Determination of the Cytokine Profile in American Cutaneous Leishmaniasis Using the Polymerase Chain Reaction. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 91, n. 3, p. 500–5, 1993.
- CARNINCI, P. *et al.* The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome. *Science*, v. 309, n. 5740, p. 1559–63, 2005.
- CARVALHO, E.M. *et al.* Cell mediated immunity in American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Journal Immunology*, v. 135, p. 4144-8, 1985.
- CARVALHO, L. P. *et al.* Differential Immune Regulation of Activated T Cells between Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis as a Model for Pathogenesis. *Parasite Immunology*, v. 29, n.5, p. 251-8, 2007.
- CARVALHO, L. P. *et al.* Protective and Pathologic Immune Responses in Human Tegumentary Leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, v. 3, n. 301, 2012.
- CASTES, M. *et al.* Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clinical Immunology Immunopathology*, v.27, n.2, p.176-86, 1983.
- CASTELLUCCI, L. *et al.* IL6 -174 G/C Promoter Polymorphism Influences Susceptibility to Mucosal but Not Localized Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 194, n. 4, p. 519–27, 2006.
- CHANCE, M. L. The six diseases of WHO. Leishmaniasis. *Brasilian Medicine Journal*, v. 283, n. 6301, p. 1245-1247, 1981.
- CLARÊNCIO, J. *et al.* Characterization of the T-Cell Receptor Vbeta Repertoire in the Human Immune Response against *Leishmania* Parasites. *Infection and Immunity*, v. 74, n. 8, p. 4757–65, 2006.

- COSTA, J. M. *et al.* Spontaneous healing of Leishmaniasis caused by *Leishmania Viannia braziliensis* in cutaneous lesions. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, v. 23, n. 4, p. 205-208, 1990.
- COSTA-SILVA, M. F. *et al.* Gene Expression Profile of Cytokines and Chemokines in Skin Lesions from Brazilian Indians with Localized Cutaneous Leishmaniasis. *Molecular Immunology*, v. 57, n. 2, p. 74–85, 2014.
- COUTINHO, S. G., T-Cell Responsiveness of American Cutaneous Leishmaniasis Patients to Purified *Leishmania Pifanoi* Amastigote Antigens and *Leishmania Braziliensis* Promastigote Antigens: Immunologic Patterns Associated with Cure. *Experimental Parasitology*, v. 84, n. 2, p.144–55, 1996.
- CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Experimental Molecular Pathology*, v.72, n.2, p.132-41, 2002.
- DA-CRUZ, A. M. *et al.* and S G Coutinho. 1994. *Leishmania*-Reactive CD4+ and CD8+ T Cells Associated with Cure of Human Cutaneous Leishmaniasis. *Infection and Immunity*, v. 62, n. 6, p. 2614–8, 1994.
- DANIEL-CARMI, V. *et al.* The human 1-8D gene (IFTM2) is a novel p53 independent pro-apoptotic gene. *International Journal of Cancer*, v.12, p. 2810-9, 2009.
- DE MOURA, T. R. *et al.* Toward a Novel Experimental Model of Infection to Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania Braziliensis*. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 9, p. 5827–34, 2005.
- DEVOS, S. *et al.* Allergen induced interleukin-9 production in vitro: correlation with atopy in human adults and comparison with interleukin-5 and interleukin-13. *Clinical Experimental Allergy*, v. 36, p. 174- 182, 2006.
- DOGRA, N. *et al.* *Leishmania major* abrogates gamma interferon-induced gene expression in human macrophages from a global perspective. *Infection and Immunity*, v. 75, p. 3506-15, 2007.
- DUFOUR, J. *et al.* IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *Journal of Immunology*, v. 168, p. 3195-204, 2002.
- FARIA, D. R. *et al.* , Recruitment of CD8(+) T Cells Expressing Granzyme A Is Associated with Lesion Progression in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v. 31, n. 8, p. 432–9, 2009.
- FOLLADOR, I. *et al.* Epidemiologic and Immunologic Findings for the SubLClinical Form of *Leishmania Braziliensis* Infection. *CLinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 34, n. 11, p. 54-8, 2002.

- FRIEDMAN, R.L. *et al.* Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. *Cells*, v.38, p. 745-755, 1984.
- GAINET, J. S. *et al.* Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. *Laboratory Investigation*, v. 78, p. 755-762, 1998.
- GAUCHER, D. *et al.* Yellow fever vaccines induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *Journal Experimental Medicine*, v.205, p.3119-31, 2008.
- GIUDICE, A. *et al.* Macrophages Participate in Host Protection and the Disease Pathology Associated with *Leishmania Braziliensis* Infection. *BMC Infectious Diseases*, v. 12, n. 1, p.75, 2012.
- GOMES-SILVA, A. *et al.* Can Interferon-Gamma and Interleukin-10 Balance Be Associated with Severity of Human *Leishmania (Viannia) Braziliensis* Infection?. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 149, n. 3, p. 440–4, 2007.
- GREEN, S.J. *et al.* Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania* major amastigotes by an l-arginine–dependent killing mechanism. *Journal Immunology*, v. 144, p. 278–283, 1990.
- HIROI, M. e OHMORI, Y. The transcriptional coactivator CREB-binding protein cooperates with STAT1 and NF-kappa B for synergistic transcriptional activation of the CXC ligand 9/monokine induced by interferon-gamma gene. *Journal Biology and Chemistry*, v. 278, p. 651-60, 2003.
- HU, X. *et al.* IFNG primed macrophages exhibit increased CCR2-dependent migration and altered IFNG responses mediated by STAT1. *J. Immunology*, v. 175, p. 3637-47, 2005.
- IDEKER, T., GALITSKI, T. e HOOD, L. A New Approach to Decoding Life: Systems Biology. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v. 2, p. 343–72, 2001.
- JEONG, H. *et al.* , B Tombor, R Albert, Z N Oltvai, and A L Barabási. 2000. “The Large-Scale Organization of Metabolic Networks. *Nature*, v. 407, n. 6804, p. 651–4, 2000.
- KATARA, G. *et al.* Analysis of Localized Immune Responses Reveals Presence of Th17 and Treg Cells in Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania Tropica*. *BMC Immunology*, v. 14, n. 1, p. 52, 2013.
- KATZMAN, S.D. e FOWELL, D.J. Pathogen-imposed skewing of mouse chemokine and cytokine expression at the infected tissue site. *Journal of Clinical Investigation*, v. 118, n.2, p. 801-11, 2008.

- KAYE, P. e SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the Host-Pathogen Interface. *Nature Reviews. Microbiology*, v. 9, n. 8, p. 604–15, 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. *Journal Immunology*, v. 182, p. 2525-31, 2009.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. e SILVEIRA, F. T. Dermal and visceral Leishmaniasis and their causative agents. *Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, n. 4, p. 702-703, 1987.
- LANDE, R. *et al.* IFN-alpha beta released by Mycobacterium tuberculosis-infected human dendritic cells induces the expression of CXCL10: selective recruitment of NK and activated T cells. *The Journal of Immunology*, v. 170, n.3, p. 1174-82, 2003.
- LEMAIRE, J. MicroRNA Expression Profile in Human Macrophages in Response to Leishmania Major Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 10, p. 2478, 2013.
- LEWIS, B. P., BURGE, C.B., e BARTEL D.V. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates That Thousands of Human Genes Are microRNA Targets. *Cell*, v. 120, n. 1, p.15–20, 2005.
- LIANG, Y., ZHOU Y., e SHEN, P. NFkB and its Regulation Of The Immune System. *Cellular and Molecular Immunology*, v. 1, n. 5, p. 343-50, 2004.
- LIMA-JUNIOR *et al.* Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide–mediated resistance to Leishmania. *Nature*, v. 19, n.7, p. 909-17, 2013.
- LIN, R.J. *et al.* Distinct Antiviral Roles for Human 2',5'-Oligoadenylate Synthetase Family Members against Dengue Virus Infection. *Journal of Immunology*, v. 183, n. 12, p. 8035–43, 2009.
- LIVAK, K. J. e SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408. 2001.
- LU, L.F. *et al.* Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature*, v. 442, p. 997–1002, 2006.
- MARETTI-MIRA, A. C. *et al.* Transcriptome Patterns from Primary Cutaneous Leishmania Braziliensis Infections Associate with Eventual Development of Mucosal Disease in Humans. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 9, p.1816, 2012.
- MAIER, E., DUSCHL, A. e HOREJS-HOECK, J. STAT6-dependent and independent mechanisms in Th2 polarization. *European Journal Immunology*, v. 42, n. 11, p. 2827-33, 2012.

- MARSDEN, P. D. Mucosal Leishmaniasis. Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 80, n. 6, p. 859-876, 1986.
- MARSDEN, P. D. *et al.* Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis braziliensis* skin ulcers. Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 78, n. 4, p. 561-562. 1984.
- MELBY, P.C. *et al.* Increased Expression of Proinflammatory Cytokines in Chronic Lesions of Human Cutaneous Leishmaniasis. Infection and Immunity, v. 62, n. 3, p. 837-42, 1994.
- MELLOR, A.L. e MUNN, D.H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. Nature Review Immunology, v. 4, p. 762-74, 2004.
- MOREY, J.S., RYAN, J.C. e DOLAH F.M.V. Microarray Validation: Factors Influencing Correlation between Oligonucleotide Microarrays and Real-Time PCR. Biological Procedures Online, v. 8, p. 175-93, 2006.
- MUKBEL, R.M. *et al.* Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. American Journal Tropical Medicine and Hygiene, v. 76, p. 669-75, 2007.
- MURRAY, H. W. Interaction of *Leishmania* with a macrophage cell line. Correlation between intracellular killing and the generation of oxygen intermediates. Journal Experimental Medicine, v.153, n.6, p.1690-5, 1981.
- NAKAYA, H.I. e PULENDRAN B. Systems Vaccinology: Its Promise and Challenge for HIV Vaccine Development. Current Opinion in HIV and AIDS, v. 7, n. 1, p. 24-31, 2012.
- NAKAYA, H.I. *et al.* Systems Biology of Vaccination for Seasonal Influenza in Humans. Nature Immunology, v. 12, n. 8, p. 786-95, 2011.
- NATHAN, C. F. *et al.* Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. Journal Experimental Medicine, v. 158, n. 3, p. 670-689, 1983.
- NEVES, D. P., Ed. Parasitologia humana. São Paulo: Editora Atheneu, 9 ed. 1998.
- NOVAIS, F.O. *et al.* Human Classical Monocytes Control the Intracellular Stage of *Leishmania Braziliensis* by Reactive Oxygen Species. The Journal of Infectious Diseases, 2014.
- NOVOA, R. *et al.* IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* infections. Parasite Immunology, v.2, p. 132-6, 2011.
- OGARRA, A. e VIEIRA, P. TH1 cells control themselves by producing interleukin- 10. Nature Review Immunology, v.7, n.6, p. 425-8, 2007.

- OLIVEIRA, F. Lesion Size Correlates with Leishmania Antigen-Stimulated TNF-Levels in Human Cutaneous Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 85, n. 1, p. 70–3, 2011.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Leishmaniasis. Disponível em: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/index.html. Acesso em 13 Mar 2014.
- POMPEU, M.M. *et al.* Differences in Gamma Interferon Production in Vitro Predict the Pace of the in Vivo Response to Leishmania Amazonensis in Healthy Volunteers. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 12, p. 7453–60, 2001.
- POSTMA, D.S. *et al.* Genetic susceptibility to asthma- bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *New England Journal of Medicine*, v. 333, p. 894-900, 1995.
- PROBST, C.M. *et al.* A comparison of two distinct murine macrophage gene expression profiles in response to Leishmania amazonensis infection. *BioMed Central Microbiology*, v. 12, 2012.
- QUEREC, T.D. *et al.* System biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nature Immunology*, v.10, p. 116-25, 2009.
- QUIROGA, M. *et al.* Inducible costimulator: a modulator of IFN-gamma production in human tuberculosis. *The Journal of Immunology*, v. 176, p. 5965-74, 2006.
- RAMÍREZ, C. *et al.* Human Macrophage Response to L. (Viannia) Panamensis: Microarray Evidence for an Early Inflammatory Response. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 10, p. 1866, 2012.
- REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous Leishmaniasis. *Lancet Infectious Disease*, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.
- RITTER, U. e KÖRNER, H. Divergent Expression of Inflammatory Dermal Chemokines in Cutaneous Leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v. 24, n. 6, p. 295–301, 2002.
- RODRÍGUEZ, V.M. *et al.* The IgG Isotypes of Specific Antibodies in Patients with American Cutaneous Leishmaniasis; Relationship to the Cell-Mediated Immune Response. *Parasite Immunology*, v. 18, n. 7, p. 341–5, 1996.
- RODRIGUEZ, N. *et al.* Novel Program of Macrophage Gene Expression Induced by Phagocytosis of Leishmania chagasi. *Infection and Immunity*, v. 72, p. 2111-22, 2004.
- ROSAS, L.E. *et al.* Genetic Background Influences Immune Responses and Disease Outcome of Cutaneous L. Mexicana Infection in Mice. *International Immunology*, v. 17, n. 10, p. 1347–57, 2005.

- SANTOS, C.S. *et al.* CD8(+) Granzyme B(+)-Mediated Tissue Injury vs. CD4(+)IFN γ (+)-Mediated Parasite Killing in Human Cutaneous Leishmaniasis. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 133, n. 6, p.1533–40, 2013.
- SCHNORR, D. *et al.* IFNG Production to Leishmania Antigen Supplements the Leishmania Skin Test in Identifying Exposure to L. Braziliensis Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 12, p.1947, 2012.
- SEREZANI, C. *et al.* Evaluation of the murine immune response to Leishmania meta 1 antigen delivered as recombinant protein or DNA vaccine. *Vaccine*, v.20, p. 3755-63, 2002.
- SOUSSI-GOUNNI, A., KONTOLEMOS, M. e HAMID, Q. Role of IL-9 in the pathophysiology of allergic diseases. *Journal Allergy Clinical Immunology*, v. 107, p. 575–582, 2001.
- SRIVASTAVA, S. *et al.* Leishmania expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 172, p. 403-9, 2013.
- STELZL, U. *et al.* A Human Protein-Protein Interaction Network: A Resource for Annotating the Proteome. *Cell*, v. 122, n. 6, p. 957–68, 2005.
- STUART, J.M. *et al.* A Gene-Coexpression Network for Global Discovery of Conserved Genetic Modules. *Science*, v. 302, n. 5643, p. 249–55, 2003.
- SUOMELA, L. *et al.* Interferon alpha-inducible protein 27 (IFI27) is upregulated in psoriatic skin and certain epithelial cancers. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 122, p. 717-21, 2004.
- TEIXEIRA, M.J. *et al.* Distinct Leishmania Braziliensis Isolates Induce Different Paces of Chemokine Expression Patterns. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 2, p.1191–5, 2005.
- TUON, F.F. *et al.* The Expression of TLR9 in Human Cutaneous Leishmaniasis Is Associated with Granuloma. *Parasite Immunology*, v. 32, p. 769–772, 2010.
- VAN DAMME, J. *et al.* Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *Journal Experimental Medicine*, v. 176, p. 59-65, 1992.
- VENKATESAN, K. *et al.* An Empirical Framework for Binary Interactome Mapping. *Nature Methods*, v. 6, n. 1, p. 83–90, 2009.
- VENUPRASAD, K. *et al.* Human neutrophil-expressed CD28 interacts with macrophage B7 to induce phosphatidylinositol 3-kinase-dependent IFN-gamma secretion and restriction of Leishmania growth. *Journal of Immunology*, v. 169, p. 920-8, 2002.

- VIEIRA, E.L.M. *et al.* Immunoregulatory Profile of Monocytes from Cutaneous Leishmaniasis Patients and Association with Lesion Size. *Parasite Immunology*, v. 35, n. 2, p. 65–72, 2013.
- VON STEBUT, E. e UDEY, M.C. Requirements for Th1-Dependent Immunity against Infection with *Leishmania Major*. *Microbes and Infection*, v. 6, n. 12, p.1102–9, 2004.
- WILDNER, G. e KAUFMANN, U. What causes relapses of autoimmune diseases? The etiological role of autoreactive T cells. *Autoimmunity Review*, v. 12, P. 1070-75, 2013.
- YARILINA, A. *et al.* TNF activates na IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokine and STAT1-dependent type I interferons responses. *Nature Immunology*, v.9, p. 378-87, 2008.

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar do estudo intitulado de: Estágios iniciais da resposta imune humana contra *Leishmania braziliensis*: Diferenças na expressão gênica de indivíduos alto respondedores e baixo respondedores

Primeiro você precisa saber que:

- A sua participação deve ser inteiramente voluntária;
- Você pode decidir não tomar parte no estudo, ou se retirar dele a qualquer tempo. Em qualquer caso, você não perderá qualquer benefício a que tem direito;
- Você não terá nenhum benefício direto participando. Esta pesquisa poderá nos dar informação para ajudar outras pessoas no futuro.

Descreveremos, a seguir, este projeto de pesquisa. Antes de decidir tomar parte, faça as perguntas que desejar, discuta as suas dúvidas sobre o projeto com qualquer pessoa da FIOCRUZ, sua família ou amigos, seu médico ou outro profissional da saúde.

O DNA é uma molécula longa, com formato parecido com o de uma escada, que contém a informação necessária para a vida de todo ser vivo. A *Leishmania* é um microorganismo que causa uma doença chamada leishmaniose em humanos e animais.

O objetivo deste estudo será observar alguns aspectos do seu DNA depois de colocar células do seu sangue na presença da *Leishmania*.

Caso você participe, coletaremos até seis tubos de sangue (60ml). Você poderá ter algum desconforto quando receber uma picada para colher o sangue do seu braço e poderá ocorrer um hematoma. Realizaremos sorologia para HIV / AIDS.

Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, preservando assim, sua identidade.

Também solicitamos a sua autorização para congelar as células obtidas e utilizá-las em estudos que dêem continuidade a este trabalho, sem que você seja comunicado novamente, desde que o novo estudo obtenha parecer favorável por um comitê de ética em pesquisa responsável. Seja qual for o caso, o sigilo e a confidencialidade das informações referentes à sua participação continuarão preservados.

Coloque este documento em local seguro e o consulte a qualquer momento. Tendo qualquer dúvida, não hesite em contatar o pesquisador Manoel Barral-Netto, na FIOCRUZ, através do telefone: 71-3176-2279.

Para notificação de qualquer situação de anormalidade que não puder ser resolvida pelo pesquisador poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, pelo telefone (71) 3176-2285.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO

TÍTULO DO PROJETO: Estágios iniciais da resposta imune humana contra *Leishmania braziliensis*: Diferenças na expressão gênica de indivíduos alto respondedores e baixo respondedores

E, li e/ou ouvi o esclarecimento sobre o projeto e compreendi a função do estudo, e qual procedimento eu serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Sei também que meu material poderá ser estocado para utilização em estudos futuros, desde que seja autorizado por um comitê de ética em pesquisa. Diante desse entendimento eu concordo em participar do estudo.

Assinatura do Voluntário	Data

Assinatura do Pesquisador	Data

Assinatura da Testemunha	Data