



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



**AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE GENES
MACROFÁGICOS INFLUENCIADOS PELA INFECÇÃO
COM A *Leishmania (Viannia) braziliensis***

VIVIANE MAGALHÃES ANDRADE

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de
Saúde, SIBI - UFBA.

A553 Andrade, Viviane Magalhães

Avaliação da cinética de genes macrofágicos influenciados
pela infecção com a *Leishmania (Viannia) braziliensis*/ Viviane
Magalhães Andrade. – Salvador, 2013.

115 f.

Orientador: Prof. Dr. Nicolaus Albert Borges Schriefer

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Faculdade de Medicina da Bahia, 2013.

1. Infecção. 2. Genes. 3. Macrófagos. I. Schriefer, Nicolaus
Albert Borges. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.993.161



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE GENES
MACROFÁGICOS INFLUENCIADOS PELA INFECÇÃO
COM A *Leishmania (Viannia) braziliensis*

VIVIANE MAGALHÃES ANDRADE

Professor- orientador: Nicolaus Albert B. Schriefer

Professor co-orientador: Lucas Carvalho

Dissertação apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE (PPGCS), da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Salvador (Bahia), 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de Fevereiro de 1808 *
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde
Largo do Terreiro de Jesus, s/n – Pelourinho
40026-010 Salvador, Bahia, Brasil
Telfax: (55) (71) 3283-5582 – 3283-5567
www.fameb.ufba.br pos.saude@ufba.br



**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE ARGUIÇÃO E DEFESA
DE DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE.**

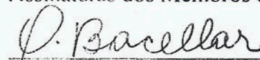
1 Aos 20 dias do mês de fevereiro de 2013, no horário das 09:00 horas, nas dependências do
2 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia da
3 Universidade Federal da Bahia, deu-se início à sessão pública para arguição e defesa da
4 dissertação intitulada "AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE GENES
5 MACROFÁGICOS INFLUENCIADOS PELA INFECÇÃO COM A *Leishmania*
6 (*Viannia*) *braziliensis*" apresentada pela pós-graduanda **Viviane Magalhães Andrade**. A
7 Comissão Examinadora aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências
8 da Saúde, conforme o que estabelecem o Regulamento Geral dos Cursos de Pós-Graduação da
9 Universidade Federal da Bahia e o Regimento do Programa de Pós-graduação em Ciências da
10 Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia, foi composta por: Profa. Dra. Maria Olívia Ramos
11 Bacellar, Doutora em Medicina - UFBA (Presidente); Profa. Dra. Silvane Maria Braga Santos,
12 Doutora em Imunologia – UEFS; Prof. Dr. Marcelo Távora Mira, Doutor em Bioquímica –
13 PUCPR e Prof. Dr. Nicolaus Albert Schriefer, Doutor em Imunologia – UFBA (suplente). Após
14 a apresentação da dissertação, a Comissão Examinadora realizou a arguição que foi respondida
15 *satisfatoriamente* (satisfatoriamente ou insatisfatoriamente) pela mestranda. A
16 dissertação apresentada foi considerada *aprovada* (aprovada ou reprovada). E, para
17 constar do processo de conclusão de curso e de colação de grau¹, a Comissão Examinadora
18 lavrou a presente Ata que é assinada por todos os seus membros. A Comissão Examinadora
19 aprova a dissertação:


20 (X) Com recomendações que devem ser incorporadas à versão final da dissertação.

21 () Sem recomendações de modificações da versão final.


22 **Será dado prazo máximo de 60 (sessenta) dias para entrega da versão final de modo a ser**
23 **concluído o processo de outorga do título de mestre.**

24 Assinaturas dos Membros da Banca Examinadora:

25  Maria Olívia Ramos Bacellar (Presidente)

26  Silvane Maria Braga Santos

27  Marcelo Távora Mira

28  Nicolaus Albert Schriefer (Suplente)

32 Ata Aprovada na Sessão do dia 20/02/2013

35 ¹ A emissão do diploma e do histórico escolar está condicionada à entrega, na Secretaria Acadêmica do
36 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, de quatro exemplares impressos da dissertação,
37 acompanhados de 4 versões completas em meio eletrônico (formato pdf) no **prazo máximo de 60 dias**.

FONTES DE FINANCIAMENTOS

NIH - National Institute of Health (Grant P50AI30639-16 e R03AI067663-02)

TMRC- Tropical Medicine Research Centers / National Institute of Health

CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

Dedico a Deus por me conceder esse momento especial, uma vitória,
e por ter me dado esse crescimento como pessoa e profissional.

Aos meus pais, Jomelice e José Leonildo, meu porto seguro,
meu alicerce, exemplos de pessoa. Amo!!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Nicolaus Albert B. Schriefer, pela aceitação no seu grupo de pesquisa, pela preciosa orientação, sapiência e competência perante este trabalho. Por ter adquirido o conhecimento e despertado em mim a palavra, ciência. Meu respeito, gratidão e admiração são eternos.

Ao Prof. Lucas Carvalho, pela boa co-orientação e conhecimento nos ensaios de *transwell*.

Ao Prof. Edgar Marcelino de Carvalho, chefe do Serviço de Imunologia (SIM), pela oportunidade oferecida para a realização desse trabalho e pela disponibilidade em atividades desenvolvidas no seu laboratório.

Aos médicos que trabalham na área endêmica de Corte de Pedra, pela geração de materiais para os experimentos.

Aos colegas do SIM, pelo convívio e trocas de idéias, em especial ao laboratório de Parasitologia Molecular, composta por Kátia Salgado, Angela Giudice, Thaís Delavechia, Lilian Medina e a Anselmo Souza, obrigada pelo apoio, incentivo e ambiente agradável com toda alegria para se conviver no laboratório.

A Rosana, a quem eu sou muito grata, pela valiosa ajuda nos experimentos, paciência, pelas discussões do trabalho e pelo carinho.

As amigas, Juliana e Silvana, pela paciência, amizade, companhia, pelo convívio do dia-a-dia e além deste. Obrigada por todos os bons momentos alegres que vivemos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – PPGCS, pela valiosa contribuição para o crescimento do conhecimento.

Aos meus pais, que esteve comigo sempre e que me incentivaram diante das minhas metas, serei grata hoje e sempre, por tudo.

A meus irmãos, Larissa e José Leonildo, meus verdadeiros amigos e companheiros. Família que é à base da vida. Amo.

A toda minha família, tios (as), primos (as), sobrinhos (as), por todo o carinho e companhia.

Meu namorado, Daniel, pela companhia, paciência, alegria, carinho, força e dedicação em todos os momentos.

E a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma neste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD4	Marcador de diferenciação 4
cDNA	DNA complementar
Células Th1	Linfócitos T auxiliares do tipo 1
Células Th2	Linfócitos T auxiliares do tipo 2
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CO ₂	Gás carbônico
CSF	Fator Estimulador de Colônia
DALY	Anos de Vida Perdidos Ajustados por Incapacidade (<i>Disability Adjusted Life of Years</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Monócitos
HBSS	Solução salina balanceada de Hank
HEPES	4 - (2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina-10
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
kDNA	Ácido desoxirribonucléico de cinetoplasto
LC	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose disseminada
LIT	Meio de cultura com infusão de fígado e triptose
LM	Leishmaniose mucosa
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
MDM	Macrófago derivado de monócito
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
MOI	Multiplicidade de infecção
RNA _m	RNA mensageiro
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ m	Micrometro
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B	Fator nuclear <i>kappa</i> B
Ng	Nanograma
NNN	Meio de cultura de Nicolle, Novy e McNeal
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	Meio de cultura de células
RT-qPCR	Reação de transcriptase reversa seguida de PCR em tempo real
TGFβ	Fator transformador de crescimento beta
TLR	<i>Toll like</i> receptor
TNF	Fator de necrose tumoral

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Número médio de formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* por macrófago infectado. Pág. 44
- Figura 2.** Percentual de MDM infectados, após incubação com *L. (V.) braziliensis* na razão de dois parasitos para cada macrófago. Pág. 45
- Figura 3:** Comportamento da expressão de 21 alvos gênicos observado durante a cinética de infecção dos MDM e comparados com o ponto de 4h. Pág. 51
- Figura 4:** (A) Percentual de MDM infectados, após incubação com *L. (V.) braziliensis* em MOI de 2:1 e 10:1. (B) Número médio de formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* por MDM infectados em MOI de 2:1 e 10:1. Pág. 54
- Figura 5:** (A) Genes reprimidos durante a infecção de MDM com *L. (V.) braziliensis*. (B) Genes induzidos durante a infecção de MDM com *L. (V.) braziliensis*. Pág. 55
- Figura 6:** Expressão dos genes HSPA1A (4h), MT1M (4h), TLR8 (16h) e LRRK2 (16h) em MDM não infectados com *L. (V.) braziliensis*, co-cultivados em ensaios de *transwell* com MDM infectados com *L. (V.) braziliensis* em MOI de 2:1 e 10:1. Pág. 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos funcionais e descrições dos 21 genes de macrófagos derivados de monócitos humanos cujas cinéticas de expressão foram avaliadas no presente estudo. Pág. 46

Tabela 2: Expressão de 21 genes significativamente afetados após a infecção dos MDM com *L. (V.) braziliensis* dos clados A e B de Corte de Pedra – Ba. Pág. 48

Tabela 3: A significância, valor de p – analisado por Anova dos 21 genes, calculado entre os quatro pontos da infecção dos MDM pela *L. (V.) braziliensis*, e seus períodos de ocorrência. Pág. 50

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

I. RESUMO	15
ABSTRACT	
II. OBJETIVOS.....	17
II.1. OBJETIVO GERAL	
II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
III. INTRODUÇÃO	18
IV. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
IV.1. A LEISHMANIOSE	
IV.2. O AGENTE ETIOLÓGICO	
IV.3. EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	
IV.4. CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO	
IV.5. ASPECTOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS DA LTA CAUSADA PELA <i>L.(V.) braziliensis</i>	
IV.6. A INTERAÇÃO ENTRE A <i>LEISHMANIA</i> E A CÉLULA HOSPEDEIRA	
IV.7. EFEITOS SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA CAUSADOS PELA <i>LEISHMANIA</i> NOS MACRÓFAGOS INFECTADOS	
V. HIPÓTESE	33
VI. JUSTIFICATIVA	34
VII. DESENHO DO ESTUDO E MÉTODOS.....	36
VII.1. DESENHO DO ESTUDO	
VII.2. RECRUTAMENTO DE DOADORES DE MACRÓFAGOS VOLUNTÁRIOS E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	
VII.3. CARACTERIZAÇÃO DOS DOADORES	
VII.4. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	
VII.5. PARASITAS	
VII.6. ISOLAMENTO DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO COMO FONTES DE MACRÓFAGOS (MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONÓCITOS-MDM)	
VII.7. INFECÇÕES DE MDM COM ISOLADOS DE <i>L.(V.) braziliensis</i>	
VII.8. ENSAIOS EM CÂMARA DO TIPO <i>TRANSWELL</i> PARA A AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS, CO-CULTIVADOS COM MACRÓFAGOS INFECTADOS	
VII.9. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE ALVOS SELECIONADOS NAS CÉLULAS INFECTADAS COM PROMASTIGOTAS DE <i>L.(V.) braziliensis</i> POR qPCR	
VII.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	
VIII. RESULTADOS	44
VIII.1. CINÉTICA DA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR <i>L.(V.) braziliensis</i>	
VIII.2. EXPRESSÃO GÊNICA	
VIII.3. COMPARAÇÃO DOS GRAUS DE INFECÇÃO DOS MDM E EXPRESSÃO DOS 21 GENES ESTUDADOS ENTRE OS MDM INFECTADOS COM <i>L.(V.) braziliensis</i> NAS PROPORÇÕES DE 2:1 E 10:1	
VIII.4. EFEITO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM <i>L.(V.) braziliensis</i> SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS	
IX. DISCUSSÃO.....	57
X. CONCLUSÃO	66
XI. REFERÊNCIAS.....	67
XII. ANEXOS	74

I. RESUMO

Leishmania (Viannia) braziliensis é a principal causa da leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Brasil. *L. (V.) braziliensis* causa três formas de leishmaniose na Bahia: cutânea localizada (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada (LD). Como passo inicial para a melhor compreensão dos eventos parasita-hospedeiro que podem ajudar a determinar o desfecho da infecção, avaliamos o padrão de expressão gênica global em macrófagos derivados de monócitos (MDM) de voluntários saudáveis infectados com parasitas isolados das três formas clínicas de LTA. Uma multiplicidade de infecção de 2 parasitas por MDM foi usada na análise de microarranjo de DNA proveniente dos MDM no ponto de 4h de infecção. Nesse ponto de tempo, aproximadamente 80% dos MDM em cultura foram infectados, com uma média de cinco parasitas por célula hospedeira. Mais de 500 *genes* do hospedeiro, pertencentes a diferentes grupos funcionais, apresentou mudanças significativas em seu comportamento, onde a grande maioria se mostrou reprimido nos MDM infectados. Para validar os achados gerais e estender as análises a pontos de tempo posteriores, realizamos uma avaliação cinética (30 min, 4, 24 e 48 horas pós-infecção), utilizando duas cepas do parasita. Avaliou-se a expressão por PCR em tempo real de 21 transcritos, representando as diversas classes de *genes* afetados no estudo inicial. Os níveis de infecção dos MDM permaneceram estáveis ao longo da avaliação cinética. Aproximadamente 80% dos MDM foram infectados nas culturas, no entanto, o número de parasitas por MDM aumentou constantemente desde cerca de 5 no ponto de tempo de 4 horas a cerca de 20 parasitas por célula. Em relação a expressão gênica, a 4h os níveis dos 21 transcritos avaliados na validação foram semelhantes aos do estudo original. Ao comparar os pontos de 4h contra 24h, oito do total de *genes* afetados (IL-10RB, MyD88H, PARK7, TRERF1, UBC, NDUFA11, NUP214, NUP62) mostraram uma mudança significativa nos seus níveis de expressão. Na avaliação cinética estendida até 48h pós-infecção encontrou mudanças significativas em algum ponto em oito dos 21 *genes*. Entre estes, seis *genes* são semelhantes aos pontos de comparação entre 4 e 24 horas (IL-10RB, MyD88H, PARK7, UBC, NDUFA11, NUP214), enquanto dois mostraram alterações significativas após o ponto 24h (MT1M foi induzida e NUB1 foi reprimida) correspondendo a funções importantes relacionadas com a resposta celular a alterações ambientais. Nos ensaios de *transwell* houve uma supressão dos *genes* nas duas condições, 2:1 e 10:1, demonstrando que a passagem de partículas solúveis na membrana da câmara implicou na interação das moléculas das células resultando em modificações na sua expressão gênica. No seu conjunto, os dados indicam que, durante a interação inicial entre *L. (V.) braziliensis* e o macrófago hospedeiro há uma supressão geral dos principais processos na célula, o que pode ser importante para o parasita estabelecer a infecção. No entanto a compreensão precisa da relação hospedeiro-parasita requer uma avaliação completa, incluindo vários pontos de tempo ao longo do processo infeccioso.

Palavras- chave: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, infecção, *genes*, macrófagos.

ABSTRACT

Leishmania (Viannia) braziliensis is the major cause of American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Brazil. *L. (V.) braziliensis* causes three forms of leishmaniasis in Bahia: localized cutaneous (CL), mucosal (ML) and disseminated leishmaniasis (DL). As an initial step for the improved understanding of the host-parasite events that may help determine the outcome of infection, we evaluated the global gene expression pattern in healthy volunteers monocyte derived macrophages (MDM) infected with parasites isolated from the three outcomes of ATL. A multiplicity of infection of 2 parasites per MDM was used. The DNA micorarray analyses employed total RNA collected from the MDM at 4h of infection. At that time point, approximately 80% of the MDM in the cultures were infected, with an average five parasites per host-cell. Over five hundred host genes, belonging to different functional groups, presented significant changes in their behavior, the large majority being repressed in infected MDM. To validate the general findings and extend the analyses to later time points, we performed a kinetic evaluation (30 min, 4, 24 and 48 hours post-infection), using two strains of the parasite. We assessed expression by real-time PCR of 21 transcripts, representing the diverse classes of genes affected in the initial study. The levels of MDM infection remained stable throughout the kinetics evaluation. Approximately 80% of the MDM were infected in the cultures. However the numbers of parasites per MDM increased steadily from approximately 5 at the 4h time point to around 20 parasites per cell. Regarding gene expression, at 4h the levels of the 21 transcripts evaluated in the validation were similar to those in the original study. During later time points, though, part of the transcripts kept levels similar to those at 4h, but some presented significant changes in their behaviors. When comparing the points of 4h *versus* 24h, eight of the total affected genes (IL-10RB, MyD88H, PARK7, TRERF1, UBC, NDUFA11, NUP214, NUP62) showed a significant change in their expression levels, indicating significant changes to its transcripts levels over time of infection. In extended kinetic evaluation until 48h post-infection found significant changes at some point in eight of the 21 genes. Among these six genes are similar to the points of comparison between 4 and 24h (IL-10RB, MyD88H, PARK7, UBC, NDUFA11, NUP214), while two showed significant changes after point 24h (MT1M was induced and NUB1 was repressed) corresponding to important functions related to cellular response to environmental changes. In the *Transwell* assays, there was suppression of genes under the two conditions, 2:1, 10:1, showing that the passage of particles soluble membrane of the molecules involved in the interaction of cells resulting in changes in gene expression. Altogether the data indicate that during the early interaction between *L. (V.) braziliensis* and the host macrophage there is a general suppression of major processes in the cell, which may be important for the parasite to establish infection. However accurate understanding of the host-parasite relationship requires a thorough evaluation, including several time-points throughout the infective process.

II. OBJETIVOS

II.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a cinética da expressão de 21 *genes* relacionados a importantes processos da célula hospedeira, que se mostraram significativamente afetados quando esta é infectada com a *L. (V.) braziliensis*; e avaliar se as expressões desses *genes* também são afetadas em macrófagos não infectados, co-cultivados com os infectados.

II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

II.2.1 Avaliar a cinética de expressão de 21 *genes* em macrófagos infectados em diferentes razões de 2:1 e 10:1 (promastigota/ macrófago) com duas cepas de *L. (V.) braziliensis*, uma representante de cada forma clínica (LD e LC).

II.2.2 Comparar as expressões dos *genes* entre macrófagos infectados com *L. (V.) braziliensis* nas proporções 2:1 e 10:1.

II.2.3 Avaliar a expressão de 21 *genes* em macrófagos não infectados co-cultivados com macrófagos infectados na razão de 2:1 (promastigota/ macrófago) com duas cepas de *L. (V.) braziliensis*.

III. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são responsáveis por aproximadamente 3,5 milhões de DALYs (anos saudáveis perdidos por incapacidade ou morte precoce) (Mathers et al, 2007), e ocorrem nas faixas tropicais e subtropicais do globo, com prevalência anual de 12 milhões de casos (Desjeux P, 1992). Existe uma substancial variabilidade entre os seus agentes etiológicos com ao menos 15 espécies descritas (Thomaz-Soccol, 1993; Thomaz-Soccol et al, 1993). A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal espécie envolvida em uma das formas clínicas de doenças, Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Três formas principais de LTA podem ser causadas por esse parasita: Leishmaniose Cutânea (LC), forma localizada que é comumente limitada a uma ou poucas úlceras de pele (Azulay, RD & DR Azulay Jr, 1995), Leishmaniose Disseminada (LD), em que as lesões são encontradas em mais de uma área do corpo do indivíduo acometido e podem ser precedidas por febre transitória (Carvalho et al, 1994; Costa et al, 1986; Lessa, 2007); e Leishmaniose Mucosa (LM), que afeta, sobretudo, boca, nariz e mucosa faríngea, e que pode levar a lesões desfigurantes da face, além de destruição grave em boca, laringe e faringe (Marsden, PD. 1986; Turetz et al, 2002). Todas as formas de LTA são iniciadas quando as formas promastigotas do parasita são introduzidas na pele de um hospedeiro pelo flebótomo do gênero *Lutzomyia*, invadem as células fagocíticas e se multiplicam. Depois disso, os parasitas se convertem na sua forma amastigota intracelular, e residem principalmente em macrófagos (Azulay, RD & DR Azulay Jr, 1995; Murray et al, 2005).

A forte associação entre espécies de parasito e formas de doença sugere um papel proeminente do conteúdo genético do microorganismo sobre as manifestações clínicas e possivelmente no prognóstico das infecções. A espécie *L.(V.) braziliensis* apresenta um elevado grau de polimorfismo genético e fenotípico, que é acompanhado por um espectro de apresentações clínicas no hospedeiro humano, incluindo as acima mencionadas LC, LM e LD (Kahl et al, 1991; Gomes et al, 1995; Saravia et al, 1998; Ishikawa et al, 2002; Saravia et al, 2002; Cupolillo et al, 2003; Schriefer et al, 2004). Os estudos experimentais mostram que *L. (V.) braziliensis* isoladas de pacientes de diferentes formas de leishmaniose se comportam diferentemente em modelos animais (Kahl et al, 1991; de Oliveira et al, 2004). Reforçando essas evidências, estudos epidemiológicos têm mostrado associações entre cepas parasitárias desta espécie e formas de LTA (Saravia et al, 1998; Queiroz S.L & Batista A.A, 1999; Schriefer et al, 2004).

Tais observações servem de base a nossos estudos, e nos levam à hipótese de que comportamentos biológicos distintos entre as cepas pertencentes às diferentes subpopulações de *L. (V.) braziliensis* induzem padrões de expressão gênica específicos nas células infectadas, os quais podem ser em parte responsáveis pelos vários desfechos clínicos da LTA.

Como primeiro passo na abordagem desta hipótese, nosso grupo realizou recentemente um estudo de avaliação da expressão gênica global em macrófagos humanos infectados com diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis* (trabalho submetido, em revisão, no anexo I desta dissertação). Esse estudo demonstrou que: (1) a maioria dos genes da célula hospedeira foi reprimida; (2) os genes significativamente induzidos em geral correspondiam a proteínas de

resposta ao stress celular; (3) diversos alvos significativamente afetados eram pertencentes a importantes processos celulares; (4) macrófagos infectados com parasitas associados às formas metastáticas de LTA (i.e. LM e LD) apresentaram padrões significativamente mais semelhantes de expressão gênica que se comparados com os macrófagos infectados com o parasita associado à LC. Tais achados reforçam, portanto a nossa hipótese.

Devido à limitação imposta pelo excesso de sangue por doador necessário para a avaliação simultânea e paralela da expressão gênica global nos macrófagos infectados com três isolados distintos de *L. (V.) braziliensis*, no estudo de Sousa et al foi necessário se restringir a análise a um único ponto no tempo. Foi escolhido o ponto de 4h pós infecção, sob o raciocínio de que representaria eventos precoces da interação parasito-hospedeiro, cujos desdobramentos influenciariam tanto o sucesso da infecção quanto o grau de disseminação da doença a partir do local de inoculação do parasita na pele do hospedeiro.

No presente estudo, avaliamos os comportamentos cinéticos de 21 alvos que apresentaram alteração significativa de suas expressões nas células infectadas em Sousa et al, empregando apenas dois isolados proveniente de pacientes com LC e LD de *L. (V.) braziliensis* nos experimentos e RT-qPCR. Os pontos de avaliação foram 30 minutos, 4h, 24h e 48 horas. As expressões desses 21 alvos foram avaliadas tanto nas células infectadas quanto em macrófagos não infectados co-cultivadas simultaneamente através de ensaios de “*transwell*”. Com isso, buscamos avaliar se os eventos ocorridos após a infecção se mantêm estáveis, e se as células infectadas influenciam a expressão desses genes nas células não infectadas.

IV. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

IV.1 A Leishmaniose

O primeiro a observar o parasita do gênero *Leishmania* foi Cunningham (1885), na Índia, em casos de leishmaniose visceral. No Brasil, as lesões cutâneas e nasofaríngeas só foram confirmadas pela primeira vez em 1909 por Lindenberg, que encontrou formas de *Leishmania* idênticas a *Leishmania tropica* causadora da leishmaniose do Velho Mundo. Os parasitas foram encontrados em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do estado de São Paulo. Gaspar Vianna o batizou de *L. (V.) braziliensis*, por considerar o parasita diferente da *L. tropica*. Até a década de setenta, no Brasil, todos os casos de LTA eram atribuídos a *L. (V.) braziliensis*. Contudo, seis espécies de *Leishmania*, pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, já foram identificadas no Brasil como causadoras de LTA humana (Gontijo B. & Carvalho M.L.R, 2003; Basano A.S & Camargo L.M.A, 2004) .

As leishmanioses acometem o homem e outros vertebrados. Dependendo da espécie infectante envolvida e de outros fatores associados, como a imunidade do hospedeiro, podem se manifestar com eventos clínicos bastante diversos, que em sua vertente tegumentar variam desde lesões brandas que se curam espontaneamente até lesões destrutivas ou desfigurantes em pele e mucosas (Grimaldi G, Jr.& Tesh RB, 1993; Chang et al, 1999). Essas doenças são responsáveis por aproximadamente 3,5 milhões de DALYs (anos saudáveis perdidos por incapacidade ou morte precoce)

(Mathers et al, 2007), e ocorrem nas faixas tropicais e subtropicais do globo, com prevalência anual de 12 milhões de casos (Desjeux, P. 1992). Estima-se que aproximadamente 2 milhões de novos casos, entre eles 1,6 milhões de casos de leishmaniose tegumentar e 500.000 de leishmaniose visceral, ocorram anualmente no mundo inteiro (Murray et al, 2005; OMS, 2012).

A leishmaniose tegumentar é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma das seis doenças infecto-parasitárias de maior importância em saúde pública no mundo, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades. Durante os últimos 10 anos, as regiões endêmicas foram se expandindo, proporcionando um aumento acentuado no número de casos registrados da doença (Brasil, MS, 2007).

A leishmaniose permanece em grande parte despercebida, sobretudo porque as pessoas mais afetadas vivem em áreas remotas e o stigma social associado às deformidades e cicatrizes desfigurantes causadas pela doença mantém os pacientes recolhidos. A leishmaniose é uma doença negligenciada, que leva a importante redução da produtividade econômica das regiões do país, sendo necessário investir em ações que estejam voltadas para o diagnóstico precoce e tratamento dos casos detectados para o melhor controle da endemia, diminuindo assim os prejuízos gerados e o impacto em saúde pública (Desjeux P, 2004; Reithinger R & Dujardin JC, 2007; OMS, 2012;).

A *L. (V.) braziliensis*, pertence ao subgênero *Leishmania Viannia* e é a principal causa da LTA. Essa espécie de parasito causa pelo menos três tipos clínicos de doença tegumentar: Leishmaniose cutânea (LC), mucosa (LM) e disseminada (LD). A principal característica que diferencia essas três formas

clínicas é o grau de disseminação do microorganismo, com manifestações de doenças limitadas ou distantes do local da inoculação original (Machado et al, 2011).

IV.2 O Agente Etiológico

A *L. (V.) braziliensis* é um protozoário digenético. Pertence à ordem *Kinetoplastida*, apresenta um único flagelo, responsável pela locomoção, e uma única mitocôndria, que forma uma estrutura chamada cinetoplasto. Esses parasitos pertencem à família *Trypanosomatidae*, da qual fazem parte outros membros que causam importantes doenças em seres humanos, como o *Trypanosoma cruzi* (BASANO et al, 2004).

As espécies até então reconhecidas e associadas com doença em seres humanos no Velho Mundo são as pertencentes ao complexo *L. donovani* (*L. donovani* e *L. infantum*), responsáveis pela leishmaniose visceral, além da *L. aethiopica*, *L. major* e *L. tropica*, responsáveis pela leishmaniose tegumentar. No Novo Mundo, as espécies de leishmania estão contidas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. As espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* são: *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis* e *L. (L.) major símile* (Silveira et al, 2004; Dantas-Torres F, 2006). As espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) amazonensis* (Gontijo B. & Carvalho M.L.R , 2003).

Este parasita possui duas formas evolutivas principais. A forma aflagelada, denominada de amastigota, é arredondada ou ovóide e mede, conforme a espécie, de 3-6 µm de comprimento por 2-4 µm de largura. As

amastigotas podem ser vistas nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (homem e outros vertebrados suscetíveis) (Grimaldi G, Jr. & Tesh R.B, 1993). A forma flagelada, denominada promastigota, é móvel, extracelular e mais freqüentemente encontrada no hospedeiro invertebrado, mais precisamente, no tubo digestivo do flebotomíneo. As promastigotas são alongadas, com 10-15 μm de comprimento por 2-3,5 μm de largura, apresentam cinetoplasto anterior ao núcleo e flagelo livre, geralmente mais longo que o corpo, que envolve da extremidade anterior do parasito (Marzochi, 2002).

IV.3 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana

A LTA se distribui amplamente nas Américas, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, abrangendo todos os países, exceto o Uruguai e o Chile. No Brasil, a doença é considerada uma das afecções dermatológicas de maior atenção, tendo o número de casos crescido progressivamente durante os últimos anos, em praticamente todos os Estados (Brasil MS, 2007).

A distribuição da leishmaniose tem sofrido mudanças no decorrer dos anos. Inicialmente, a LTA era considerada uma doença ocupacional que acometia indivíduos na área rural, mas atualmente vem invadindo áreas urbanas (OLIVEIRA et al, 2004). As mudanças dos hábitos humanos associadas a alterações do meio ambiente têm contribuído para mudar os padrões de transmissão e elevar a prevalência da LTA. Os dados disponíveis sugerem que alguns dos parasitos e seus vetores possam adaptar-se às mudanças ecológicas como o desmatamento e a urbanização (Cupolillo et al, 1998).

As espécies de *Leishmania* consideradas de importância médica apresentam características comuns, de relevância epidemiológica, que contribuem para a sua propagação, como: (1) serem restritas às regiões tropicais e subtropicais do planeta; (2) apresentarem ciclos zoonóticos envolvendo animais selvagens e domésticos; (3) em sua maioria, infectarem pessoas residentes em áreas rurais ou que tenham contato com áreas silvestres (Cupolillo et al,1998; Oliveira et al, 2004).

Existem pelo menos 20 espécies distintas de *Leishmania* patogênicas para o homem. No Brasil, foram identificadas sete espécies que se encontram inseridas nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, dentre as quais se destacam três principais espécies causadoras da LTA: *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. A LTA tem uma ampla distribuição geográfica, tendo a espécie *L. (V.) braziliensis* bastante prevalente no estado da Bahia, ocorrendo, em áreas de atividades agrícolas. As espécies *L. (V) lainsoni*, *L. (V) naiffi*, *L. (V) shawi* e *L. (V) lindenberg* foram encontradas em estados das regiões Norte e Nordeste (Brasil MS, 2007).

IV.4 Ciclo Biológico e Transmissão

A Leishmaniose é uma infecção zoonótica, cujo ciclo de vida do parasito envolve hospedeiros vertebrados e invertebrados. As promastigotas das *Leishmania sp.* são transmitidas aos vertebrados através da picada das fêmeas de diversas espécies de flebotomos (Ordem *Díptera*, Família *Psychodidae*, Sub-Família *Phlebotominae*) dos gêneros *Lutzomyia*, no Novo Mundo, e *Phlebotomus*, no Velho Mundo.

Como acontece para as demais espécies do parasita, *L. (V.) braziliensis* possui um ciclo vital digenético alternando entre o estágio promastigota, que é a forma flagelada presente no estômago do inseto transmissor, e a amastigota sem flagelo, encontrada no interior dos macrófagos em hospedeiros vertebrados. Além dos macrófagos, outros fagócitos também podem ser infectados pelo parasita. Dentre eles, as células dendríticas e os neutrófilos.

Cinco dias após o repasto sanguíneo do flebotomíneo em um hospedeiro infectado as formas amastigotas se transformam em promastigotas no intestino médio de vetor. As promastigotas se multiplicam por fissão binária, migrando posteriormente pelo o tubo digestivo e atingindo o aparelho picador sugador do inseto. Durante novo repasto sanguíneo em outro hospedeiro, a fêmea do flebotomíneo inocula as formas promastigotas metacíclicas na pele do vertebrado, que são englobadas por macrófagos do hospedeiro. Nas células fagocitárias do hospedeiro, os parasitos se transformam em amastigotas, que se multiplicam por fissão binária dentro dos vacúolos parasitóforos. Então, a célula infectada se rompe, liberando as amastigotas, que são novamente fagocitadas por outros macrófagos e tornam a se multiplicar no interior deles. O ciclo recomeça quando nova fêmea de flebotomíneo se infecta durante repasto nesse hospedeiro vertebrado infectado, ingerindo seus macrófagos cheios de amastigotas do parasito (Lainson, R. S. & J.J., 1987).

IV.5 Aspectos Clínicos e Imunológicos da LTA causada pela *L. (V.) braziliensis*

Como já mencionado, a *L. (V.) braziliensis* pode causar LC, LM e LD. A LC é comumente limitada a uma ou poucas úlceras de pele (Azulay, RD & DR

Azulay Jr., 1995). Tais lesões podem ser acompanhadas de intensa adenopatia regional, apresentando-se ulceradas, com bordas elevadas e endurecidas (Silveira et al, 2004). A LD caracteriza-se pelo aparecimento de uma única lesão inicial ulcerada em pele, seguida, após um período de poucos dias a semanas, pelas lesões disseminadas do tipo ulceradas e não ulceradas, distribuídas em diversas áreas do corpo, como a face, tórax, abdome e membros superiores e inferiores dos pacientes, que podem também apresentar febre e astenia (Costa et al, 1986; Carvalho et al, 1994; Turetz et al, 2002). A LM pode levar a lesões desfigurantes da face, além de destruição grave em boca, laringe e faringe (Kahl et al, 1991; Lessa et al, 2007). A perfuração do septo nasal é a complicação mais comum na LM, podendo também haver envolvimento do palato, úvula, faringe, laringe e cordas vocais. A doença pode progredir, algumas raras vezes chegando a ser fatal (Choi CM & Lerner E.A., 2001). A forma mucocutânea ocorre predominantemente na América do Sul e muitas vezes mostra-se de difícil tratamento (Carvalho et al, 2004).

Nas leishmanioses, a resposta imune é predominantemente mediada por células, a qual envolve todos os mecanismos associados à cura, proteção ou ao agravamento da doença. A função dos linfócitos T com fenótipo CD4+ (Th1 e Th2) é importante na instalação da doença. Os linfócitos Th1 produzem interferon gama (IFN- γ), interleucina (IL-2), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral (TNF), que levam à ativação de macrófagos e a destruição dos parasitas. Por outro lado, os Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10, que inibem a ativação de macrófagos (Coutinho et al, 1996).

Pacientes com LC apresentam uma imunidade celular preservada, com uma resposta imune do tipo Th1 moderada e bem regulada frente aos antígenos de *Leishmania*, o que se verifica pela positividade ao teste cutâneo de resposta tardia, a intradermorreação de Montenegro (Bittencourt A. L. & Barral A., 1991). Esses pacientes produzem níveis elevados de interferon-gama (IFN- γ), citocina que induz a ativação de macrófagos quando expostos aos antígenos do parasita (Bacellar et al, 2002).

Os indivíduos acometidos pela LM apresentam uma forte imunidade celular representada por intensa reação de hipersensibilidade do tipo tardia contra antígenos de *Leishmania*, consistindo-se num pólo responsivo caracterizado pela produção exacerbada das citocinas pró-inflamatórias TNF α e IFN- γ contra os antígenos parasitários (Carvalho et al, 1995; Bacellar et al, 2002). Este exagero na produção das citocinas do tipo Th1 está associado também a uma produção relativamente baixa de IL-10, citocina capaz de modular a resposta e inibir a ativação de macrófagos (Bacellar et al, 2002).

As células da resposta imune dos pacientes com LD produzem níveis menores de TNF e IFN- γ , e níveis mais elevados da citocina IL-10 frente à estimulação com antígenos de *Leishmania* quando comparados aos pacientes com LC (Turetz et al, 2002; Machado P. R. & Penna G., 2012).

Para o tratamento da LTA, a droga de primeira escolha ainda é o antimonial pentavalente, que é encontrado na forma de antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime). Este medicamento está indicado para tratamento de todas as formas de leishmaniose tegumentar, embora as formas mucosas exijam maior atenção, já que os pacientes podem apresentar respostas mais

lentas e maior possibilidade de resistência. A administração é por via parenteral e a ocorrência de efeitos colaterais pelo seu uso é relatada. A resposta ao esquema terapêutico varia consideravelmente de acordo com a espécie envolvida, a resposta imune do hospedeiro e a forma clínica ou estágio da doença (Grimaldi G, Jr., Tesh R.B, 1993).

A Anfotericina B é a droga de segunda linha para o tratamento da LTA. É um antibiótico que também possui ação leishmanicida, empregado quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial, ou na impossibilidade de seu uso, sendo a melhor opção para os pacientes com LM não responsivos à terapia convencional (Grimaldi G, Jr. & Tesh R.B, 1993; Choi CM & Lerner E.A., 2001).

IV.6 A interação entre a *Leishmania* e a célula hospedeira

A *Leishmania* desencadeia uma série de eventos importantes ao penetrar no hospedeiro vertebrado. Por ser um parasito intracelular, são muitas interações que acontecem nesse momento entre ele e os diferentes tipos celulares da primeira linha de defesa do hospedeiro (Ravasi et al, 2007).

As alterações induzidas nas células da resposta imune chegam, muitas vezes, a modificar o fenótipo e a função celular, causando um estado de adaptação ou de ativação. Tais modificações são desencadeadas pela interação de diferentes moléculas presentes na célula hospedeira e no parasito, que interferem nas vias de sinalização intracelular, como também pelos sinais gerados a partir de fatores endógenos ou estímulos exógenos do microambiente formado (Ravasi et al, 2007).

Os macrófagos constituem o principal tipo celular que é infectado por *Leishmania*, a sua função é essencial para o desfecho da infecção no hospedeiro, pois os parasitas vivem e se proliferam nos macrófagos. Estas células são especializadas na fagocitose e têm um importante papel na detecção e eliminação dos microorganismos patogênicos (Stout R.D & Suttles J, 2004; Mosser D.M & Edwards JP, 2008). Os macrófagos produzem óxido Nítrico (NO), principal mediador citotóxico e citostático contra patógenos intracelulares (Queiroz S.L & Batista A.A, 1999; Dusse et al, 2003).

A modulação da resposta imune é uma fase importante para evitar a patologia mediada pela resposta imune celular que observamos na leishmaniose tegumentar. Os mecanismos da resposta imune dos macrófagos direcionados contra os parasitos, que são ativados de maneira forte e efetiva, resultando numa intensa resposta inflamatória e numa alta expressão de moléculas reativas no sítio de lesão, necessitam de um controle, que acontece inicialmente pela produção de citocinas imunossupressivas como IL-10 e TGF- β (Bogdan C., 2008).

Quando as promastigotas são fagocitadas pelo macrófago, os parasitos desencadeiam uma série de alterações morfológicas e bioquímicas no interior da célula, e permanecem dentro de um fagolisossoma, chamado de vacúolo parasitóforo, que os separa do citoplasma celular (Bogdan C., 2008). A *Leishmania* consegue desenvolver diversos mecanismos de defesa capazes de subverter a capacidade microbicida do macrófago, conseguindo sobreviver no ambiente potencialmente tóxico formado e multiplicar-se até a ruptura da célula, quando então são liberadas para infectar outros macrófagos, propagando deste modo à infecção (Olivier et al, 2005).

As formas promastigotas que não forem internalizadas serão destruídas no meio extracelular pela resposta inata, havendo a liberação de partículas antigênicas que serão apresentadas ao sistema imune, gerando assim a resposta imune específica. Os macrófagos participam na apresentação de antígeno e na ativação da resposta imune adaptativa. Em contrapartida, as amastigotas têm a persistência e manipulam a célula hospedeira visando à sua sobrevivência. *Leishmania spp.* é também capaz de manter um pH intracelular neutro, com ambiente ácido existente no interior do fagolisossomo aumentando a sobrevivência no interior destas células (Basu M.K & Ray M , 2005).

IV.7 Efeitos sobre a expressão gênica causados pela *leishmania* nos macrófagos infectados

A infecção de macrófagos com um parasita, tal como *Leishmania*, é um acontecimento complexo, envolvendo múltiplos processos celulares (incluindo indução de sinalização celular), que resultam da expressão de citocinas e quimiocinas, que influenciam o impacto sobre a indução da resposta imunológica (imunidade adaptativa) do hospedeiro. Embora o estudo de Ramírez et al, em MDM infectados com *L. (V.) panamensis* tenha observado poucos transcritos reprimidos, teve uma relevância pelo fato de que estes genes codificam principalmente moléculas envolvidas na regulação da sinalização celular (proteína-quinases, fosfatases) ou no transporte molecular (Ramírez et al, 2012). Assim os parasitos alteram vias para facilitar sua sobrevivência na célula.

Em Sousa et al (anexo 1), entre os transcritos dos macrófagos que foram significativamente afetados pela infecção por *L. (V.) braziliensis*, ocorreu

a repressão da expressão da maioria deles por influência do parasito. Alguns genes, cuja expressão foi reprimida em maior extensão, codificam para as proteínas envolvidas na propagação do sinal, na função mitocondrial e vias de apoptose. Curiosamente, entre os genes cuja expressão foi induzida, se encontram os que codificam proteínas envolvidas na proteção ao estresse. Alguns dos transcritos que foram significativamente modulados negativamente codificam para receptores de superfície, para proteínas envolvidas na sinalização intracelular, para reguladores de transcrição ou proteínas envolvidas na permeabilidade nuclear. Isto sugere que pode haver uma supressão geral de vias de transdução de sinais a partir do ambiente extracelular, facilitando a sobrevivência do parasito na célula hospedeira.

Buates S. & Matlashewski G., realizaram um estudo infectando macrófagos de camundongos com *L. donovani*, e observaram uma supressão geral da expressão gênica, tendo 37% dos genes expressos detectáveis reprimidos durante a infecção, também resultou na indução de vários genes, alguns dos quais seria de esperar que favorecessem o processo de infecção, incluindo os genes do MIP, uma vez que seus produtos podem desempenhar um papel importante no recrutamento de novos macrófagos para o local da infecção. A diminuição da regulação de alguns genes e a repressão de muitas proteínas que são importantes na via de transmissão de sinais intracelulares, provavelmente reduzem a capacidade da célula em funcionar normalmente, modulando, portanto para um ambiente favorável ao parasito.

V. HIPÓTESE

Isolados de *L. (V.) braziliensis* pertencentes a diferentes clados, levam a possíveis modificações da expressão de genes (indução/repressão) em macrófagos, ao longo de suas infecções, parte das quais deve acontecer já no início da interação entre o parasita e a célula hospedeira.

O desdobramento da interação parasito-hospedeiro influenciaria tanto no sucesso da infecção quanto no grau de disseminação da doença a partir do local de inoculação do parasita na pele do hospedeiro.

VI. JUSTIFICATIVA

Em um estudo realizado por Sousa et al (submetido) foi avaliado a expressão gênica global em macrófagos humanos infectados com diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis* originadas de pacientes de três formas clínicas (LD, LC e LM), demonstrando que a maioria dos genes da célula hospedeira sofreram alteração (expressão reprimida), sendo identificados diversos alvos pertencentes a importantes processos celulares com alterações significativas. No estudo prévio foi salientado os primeiros passos na compreensão dos mecanismos biológicos responsáveis pelas associações epidemiológicas entre cepa parasitária e forma de LTA. Como o referido trabalho avaliou apenas um ponto no tempo (4 horas), o atual estudo se propôs a verificar os comportamentos cinéticos de alguns destes alvos gênicos nas células infectadas com uma cepa representante de cada uma das duas formas clínicas (LC e LD).

Diante deste fato, o estudo das alterações na expressão gênica em diferentes pontos durante a infecção auxiliará numa melhor compreensão sobre a dinâmica de expressão de cada alvo para assim poder estabelecer quais eventos são mais precoces ou mais tardios nas vias que define o sucesso da infecção pela *L. (V.) braziliensis*, permitindo um entendimento acerca dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da doença. Somado a isto, os ensaios de “*transwell*” tiveram importância por permitirem verificar se os eventos ocorridos após a infecção/exposição se mantêm constantes e se as células infectadas influenciam a expressão desses genes nas não infectadas. A detecção dos efeitos das infecções nos macrófagos é importante para ter

conhecimento se esses efeitos podem estar ligados à patogênese das diferentes formas de LTA, e, portanto, serem explorados em abordagens de diagnósticos com fins prognósticos sobre a infecção e na melhoria das abordagens terapêuticas.

VII. DESENHO DO ESTUDO E MÉTODOS

VII.1 Desenho do estudo

É um estudo experimental, de caso-controle onde o controle são as células não infectadas e o caso são as células infectadas.

VII.2 Recrutamento de doadores de macrófagos voluntários e critérios de inclusão e exclusão.

Voluntários sadios doaram o sangue que foi empregado como fonte de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e, conseqüentemente, como fontes de macrófagos. Cinco adultos sadios com idades entre 21 e 65 anos, que não tivessem sido expostos à infecção por *Leishmania*, foram recrutados da comunidade em Salvador/Bahia. Indivíduos com doenças agudas ou crônicas, ou que estivessem em uso de medicações não foram incluídos. A quantidade de sangue coletada de cada doador variou entre 120 e 180 mL. Foram recrutados, ao longo do tempo para este estudo, 8 voluntários, mas nem todos renderam células suficientes ou participaram de experimentos bem sucedidos.

VII.3 Caracterização dos doadores.

Gênero	Quantidade (n= 5)	Idade
Masculino	4	21- 30
Feminino	1	29

VII.4 Considerações Éticas

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética da Universidade Federal da Bahia (HUPES), e Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP-128/2008, 17.03.2008).

VII.5 Parasitas.

Os isolados de *L. (V.) braziliensis* foram obtidos de pacientes com LC e LD, diagnosticados no Posto médico de Corte de Pedra – Bahia, por meio de aspiração de lesões durante as consultas iniciais, sendo provenientes de formas clínicas distintas. Os aspirados foram então colocados em meio de cultura específico LIT/NNN, e em condições de aeração e temperatura adequadas (25°C) por 7 a 30 dias para cultivo dos parasitos. Após a observação da presença de formas promastigotas viáveis no LIT/NNN, o material era então transferido para o meio de cultura Líquido Schneider (SCHNEIDER Insect Extract Medium, SIGMA), suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (Gibco BRL, division of Invitrogen, GAITHERSBURG, USA), 2% de urina masculina humana e o antibiótico Gentamicina 50 µg/ mL (Gibco BRL, division of Invitrogen, GAITHERSBURG, USA), e incubado até que os parasitos atingissem fase logarítmica tardia de crescimento (uma suspensão de aproximadamente 1×10^8 células/mL). Então, os parasitos eram estocados e congelados em DMSO a -180°C . Para a obtenção das promastigotas utilizadas nas infecções dos Macrófagos derivados de Monócitos do sangue periférico (MDM), os estoques de isolados selecionados foram descongelados, cultivados em Schneider até atingirem 1×10^7 células / mL (fase estacionária) e tratados como previamente descrito. Os dois isolados de *L. (V.) braziliensis* utilizados

para o desenvolvimento do trabalho pertenceram aos clados associados à LD e LC (A, B, respectivamente).

VII.6 Isolamento de Monócitos do Sangue Periférico como fontes de macrófagos (macrófagos derivados de monócitos- MDM).

Para a infecção dos MDM, apenas um doador foi empregado por ensaio, para que as únicas diferenças entre os grupos experimentais fossem as cepas de *L. (V.) braziliensis* usadas nas infecções. As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas dos voluntários sadios de Salvador/Bahia que não residiam em regiões endêmicas para a infecção por *L. (V.) braziliensis*. As CMSP foram separadas a partir de 180 mL sangue total por gradiente de Ficoll-Hypaque. As células foram lavadas, ajustadas para 2 a 4×10^6 células / mL de meio RPMI suplementado com 2mM L-glutamina, 10 mM HEPES, 20% de soro autólogo humano (doador específico) e 50 U/mL de Penicilina / Estreptomicina [meio RP-10] (Gibco BRL, division of Invitrogen, GAITHERSBURG, USA). As células foram mantidas em placas de Teflon (Savillex Corporation) a 37°C e 5% de CO₂ por seis dias. Nessa fase, os monócitos presentes entre as CMSP se diferenciam em macrófagos, servindo como fonte de células para a infecção.

VII.7 Infecções de MDM com isolados de *L. (V.) braziliensis*.

Após os seis dias de incubação, as CMSP foram lavadas com solução HBSS 1x, contadas e ajustadas para 5×10^6 células/mL. Então, a suspensão foi distribuída em placas de cultura de 6 poços, que foram incubadas por um período de 4 horas para facilitar a aderência dos MDM. As células não aderentes foram removidas por lavagem, restando apenas as MDM em cultura,

que foram incubadas por 16 horas a 37°C e 5% de CO₂. Cada uma das duas cepas de *L. (V.) braziliensis* representantes das formas clínicas de LD e LC foram adicionadas a dois poços contendo os MDM em paralelo. Os parasitos foram adicionados às MDM na proporção de 2:1 e 10:1 (leishmania / MDM), a partir de suspensões que se encontravam em fase estacionária de crescimento, nas infecções *in vitro*. Células controle receberam meio de cultivo RP-10 sem parasitos e serviram como parâmetro basal de expressão / repressão gênica nos experimentos. As incubações foram sincronizadas por centrifugação a 500 rpm por 4 minutos, a 4°C, e depois transferidas para a estufa. Após 2 horas de infecção, as promastigotas livres foram removidas por lavagem, e após 30min, 4, 24 e 48 horas de incubação a 37°C e 5% CO₂, as células foram coletadas com solução trizol (TRI Reagent - Ambion, Applied Biosystems Inc., USA) para isolamento do RNA total, que foi extraído e estocado a -70°C até o momento do uso.

Para a determinação da porcentagem de infecção nos experimentos, CMSP foram plaqueadas em placas de 24 poços, tratadas e infectadas em paralelo como descrito acima. Após 30min, 4, 24 e 48 horas de infecção, as suspensões foram submetidas a Cytospin, fixadas, coradas ao Giemsa e avaliadas quanto aos níveis de infecção de cada isolado ao microscópio ótico. Apenas experimentos com taxas de infecção superiores a 80% foram empregados na avaliação da expressão gênica por qPCR.

VII.8 Ensaio em câmara do tipo “Transwell” para a avaliação da expressão gênica em macrófagos não infectados, co-cultivados com macrófagos infectados.

A técnica de infecção dos macrófagos por *transwell* tem como finalidade analisar se as células infectadas influenciam as não infectadas, quando co-cultivadas, mas separadas fisicamente das primeiras por uma membrana.

CMSPs obtidas de sangue total de voluntários sadios foram separadas por gradiente de Ficoll-Hypaque, lavadas com salina e submetidas à separação magnética com o Monocyte Isolation kit II human (Magnetic cell sorting). São adicionados tampão e reagentes para a separação, sendo estes: reagente de bloqueio FcR, anticorpo biotina e MicroBeads. Em seguida a suspensão foi aplicada na coluna LS do campo magnético separador do MACS, após adicionou-se 2 ml de tampão para a lavagem da coluna. Esta coluna permite a passagem das células não marcadas pelos reagentes, o que representa a fração enriquecida de monócitos. As células da fração enriquecidas em monócitos foram ajustadas para 2×10^6 a 4×10^6 células/mL em RPMI suplementado com 2 mM L-glutamina, 10 mM HEPES, 10% de soro fetal bovino inativado (GIBCO) e 10.000 U/mL de penicilina / estreptomicina (GIBCO) [meio RP-10] (Gibco BRL, division of Invitrogen, GAITHERSBURG, USA). As células foram cultivadas em placa de teflon por seis dias, a 37°C e 5% CO₂, para os monócitos se diferenciarem em macrófagos (MDM).

Os MDM foram adicionados nas placas de 24 poços do *transwell*, diâmetro da membrana de 6,5 mm e poro da membrana de 0,4µm. Nos poços eram colocadas 2×10^6 células e 1×10^6 células na membrana do poço do *transwell*. Então, as suspensões foram incubadas por um período de 4 horas para facilitar a aderência dos MDM. As células não aderentes foram removidas por lavagem, restando apenas as MDM em cultura, que foram incubadas por 16 horas a 37°C e 5% de CO₂. Cada uma das duas cepas de *L. (V.) braziliensis*

representantes dos clados A (LD) e B (LC) foram adicionadas a dois poços contendo os MDM em paralelo. Os parasitos foram adicionados às MDM na proporção de 2:1 e 10:1(leishmania/ MDM), a partir de suspensões que se encontravam em fase estacionária de crescimento. Células controle receberam meio de cultivo RP-10 sem parasitos e serviram como parâmetro basal de expressão / repressão gênica nos experimentos. As incubações foram sincronizadas por centrifugação a 500 rpm por 4 minutos a 4°C, e depois transferidas para a estufa. Após 2 horas de infecção, as promastigotas livres foram removidas por lavagem, e após 4 horas e 16h de incubação a 37°C e 5% CO₂, as células foram coletadas com solução trizol (TRI Reagent - Ambion, Applied Biosystems Inc., USA) para isolamento do RNA total, que foi extraído e estocado a -70°C até o momento do uso.

VII. 9 Avaliação da expressão gênica de alvos selecionados nas células infectadas com promastigotas de *L. (V.) braziliensis* por qPCR.

Os genes explorados foram selecionados de forma a refletir o espectro de expressões observado, variando de muito induzido a muito reprimido. Os transcritos validados também foram escolhidos de forma a representar os principais processos celulares afetados pelas infecções no estudo de Sousa et al (submetido, anexo). Os níveis relativos de expressão dos genes avaliados ao qPCR foram determinados segundo o método do Ct comparativo ou DDCT. Nesse método, para cada amostra realizada foi obtido o Ct (*Threshold cycle*, ou ciclo limiar) que é definido como o ciclo onde a fluorescência se encontra acima do baseline (linha de base) e atinge o threshold (limite). Uma vez que a expressão do gene é analisada em relação ao controle interno (*housekeeping*

gene), foi então calculado o DCt, ou seja a diferença entre as médias do Ct de cada amostra e a media do Ct do controle interno (β -actina). Posteriormente é calculado o DDCt que consiste na diferença do DCt de cada amostra em relação ao DCt da amostra referência (MDM não infectado). Para calcular a razão relativa da abundância dos transcritos de cada gene em relação à abundância de transcritos na amostra de referência foi aplicada a fórmula 2^{-DDCt} , que parte do princípio de que a cada ciclo da PCR a quantidade de produto dobra, sendo então necessário contemplar que o ganho de cada ciclo (2 vezes) seja elevado à potência do inverso de DDCt (PFAFFL, 2001).

Para a execução dos qPCR, a síntese do cDNA foi realizada a partir do RNA total extraído das amostras dos MDM usando o High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems Inc., USA), convertendo 1 μ g de RNA total em cDNA segundo a recomendação do fabricante (). A segunda etapa consistiu na amplificação dos alvos, usando o cDNA como *template* (molde) através do uso dos reagentes específicos e de acordo com as recomendações do fabricante (). Foram usados primers e sondas específicos para os transcritos a serem avaliados, desenvolvidos sob encomenda à um fornecedor através do Custom TaqMan Gene Expression Assay® (Applied Biosystems Inc., USA). Resumidamente, a reação foi realizada em um volume final de 10 μ L, consistindo no preparo do Master Mix (mistura dos reagentes que contém a enzima DNA polimerase), a sequência de primers específicos marcados com a sonda e com o fluorocromo, e acrescentamos a amostra que contém o cDNA sintetizado. Os transcritos foram então amplificados com o termociclador StepOne Plus® (Applied Biosystems Inc., USA).

VII.10 Análise Estatística.

Foram realizadas múltiplas comparações entre os grupos por ANOVA, e as mudanças na expressão dos transcritos individualmente foram comparadas por teste t – pareado. Todas as comparações foram consideradas significantes com um $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com o software Graph Pad Prism.

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Cinética da Infecção de Macrófagos por *L. (V.) braziliensis*

No estudo prévio realizado pelo nosso grupo (Sousa et al, submetido, Anexo1), o grau de infecção foi documentado por avaliação microscópica das MDM expostas por 4 horas aos parasitas de *L. (V.) braziliensis* (associados às leishmanioses disseminada, cutânea e mucosa). Observou-se uma média de cinco amastigotas por macrófago. Na avaliação da cinética da infecção de MDM com isolados de *L. (V.) braziliensis* (associados às leishmanioses disseminada e cutânea), a quantidade média de amastigotas por MDM foi semelhante à observada no estudo anterior até o ponto de 4h. Contudo, após este ponto, o número médio de parasitas por MDM cresceu continuamente até cerca de 25 amastigotas por célula hospedeira, após 48h (Figura 1). Além do mais, a partir de 24h de infecção, houve diferença estatística (" $p < 0.001$ ") entre os graus de infecção dos MDM pelos dois isolados analisados.

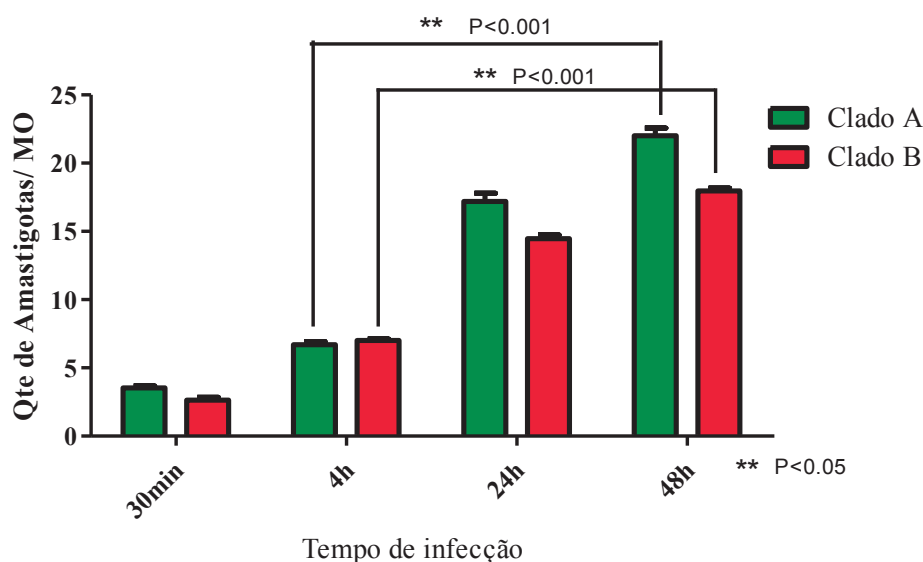


Figura 1. Número médio de formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* por macrófago infectado. Os dados mostram a média \pm SE após a quantificação de 400 a 500 macrófagos, por condição, em lâminas de cada doador (n=5).

Número médio de formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* por macrófago após 30min, 4h, 24h e 48h de infecção.

Método estatístico: Anova, $p < 0,05$.

No estudo de Sousa et al, aproximadamente 80% dos MDM se mostraram infectados pelas cepas de *L. (V.) braziliensis* após 4h de infecção (clado A 83 ± 5 , clado B 81 ± 8 , clado C 81 ± 7). No presente trabalho, após 30 minutos de infecção, cerca de 40% dos MDM se mostraram infectados. Contudo, após 4h, e até 48h, os percentuais de macrófagos infectados se estabilizaram em níveis compatíveis aos observados em Sousa et al (Figura 2) sem diferença entre os isolados avaliados. O percentual de MDM infectados, e o número de amastigotas por célula diferiu estatisticamente entre doadores, considerando-se cada isolado estudado.

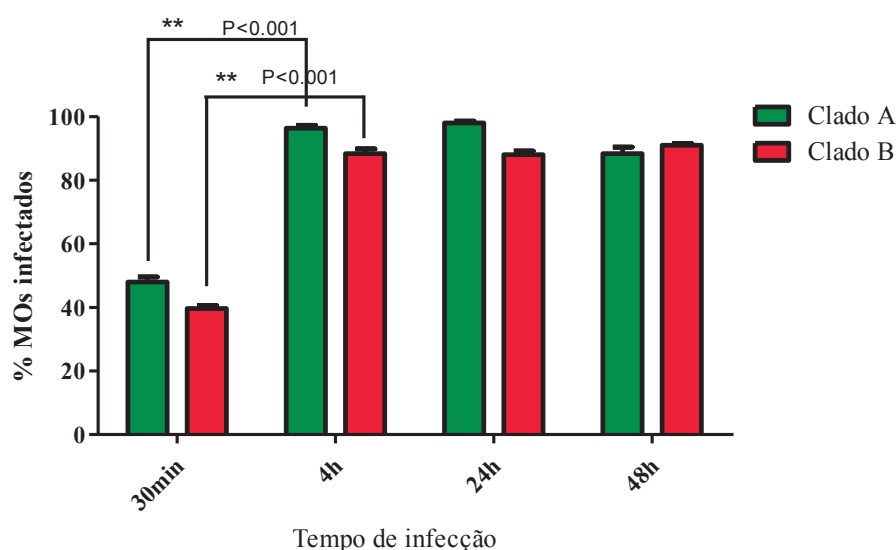


Figura 2. Percentual de MDM infectados, após incubação com *L. (V.) braziliensis* na razão de dois parasitos para cada macrófago.

Percentual médio de macrófagos, de cinco doadores saudáveis, infectados com isolados de *L. (V.) braziliensis*, representantes dos clados A (LD) e B (LC)

Método estatístico: Anova, $p < 0,05$.

VIII.2 Expressão Gênica

Em Sousa et al, os processos do hospedeiro que foram afetados pela fagocitose de *L. (V.) braziliensis* puderam ser agrupados em quatro principais

categorias: propagação de sinal, função metabólica mitocondrial, apoptose e resposta aos estímulos externos.

Tabela 1: Grupos funcionais e descrições dos 21 genes de macrófagos derivados de monócitos humanos cujas cinéticas de expressão foram avaliadas no presente estudo.

Grupo Funcional	Gene	Descrição do Gene
Propagação de Sinal		
Receptores de Superfície	TLR8	Receptor Toll-like 8
	IL-10RB	Receptor de Interleucina 10, subunidade beta
	IL-15RA	Receptor de Interleucina 15, subunidade alfa
Transdução de Sinal		
	MYD88	Resposta de diferenciação mielóide primária (88)-ativa NF-Kb
Reguladores Transcricionais		
	TRERF1	Regulador Transcricional
Função de Poro Nuclear		
	XPO6	Exportina 6; transportador de protein do poro nuclear
	NUP62	Nucleoporina 62kDa
	NUP93	Nucleoporina 93kDa
	NUP214	Nucleoporina 214kDa
Função Mitocondrial		
Transporte de Elétrons		
	NDUFA11	Subunidade NADH desidrogenase, codificado mitocondrial
Apoptose		
	TP53	Proteína p53; Supressor tumoral
	MAPK14	Fosforila e ativa TP53
	FRP1_ATR	Fosforila e ativa TP53

Doença de Parkinson		
	LRRK2	PARK8; Induz apoptose; Interage com Parkin e DJ-1
	NUB1	Regulador negativo da ubiquitina
	PARK7	DJ-1, sensor de estresse oxidativo
Resposta ao Ambiente		
Ligante de Metal	MT1M	Metalotioneína 1M
	MT1X	Metalotioneína 1X
Resposta Antioxidante	TXNRD1	Tioredoxina redutase 1
Resposta ao Estresse	HSPA1A	Proteína do choque térmico 70kDa
Degradação de Proteasoma		
	UBC	Ubiquitina C; proteassoma

Vinte e um dos transcritos descritos por Sousa et al como significativamente afetados pelas infecções dos MDM por cepas de *L. (V.) braziliensis* foram escolhidos para sofrerem uma avaliação mais pormenorizada de suas cinéticas de expressão no presente estudo. Esses alvos foram escolhidos porque refletem todo o espectro de expressão gênica observado nos MDM infectados, de muito reprimidos a muito induzidos, e porque são genes que exemplificam bem os processos que foram afetados na célula hospedeira pelas infecções (Tabela 1).

Os resultados das expressões dos 21 genes avaliados neste estudo corroboram os achados em Sousa et al, após 4h de infecção. Os genes dos grupos de função de poro nuclear, receptores de superfície e transporte de elétrons se mostraram reprimidos, ao passo que aqueles relativos à resposta do hospedeiro ao estresse se mostraram induzidos (Tabela 2).

Tabela 2: Expressão de 21 genes significativamente afetados após a infecção dos MDM com *L. (V.) braziliensis* dos clados A (LD) e B (LC) de Corte de Pedra – Ba. Dados refletem as variações (RQ) nos níveis dos transcritos em relação a células não infectadas, após 4h de infecção em Sousa et al e no corrente estudo.

GENES	SOUSA et al		Estudo Atual	
	Clado A	Clado B	Clado A	Clado B
LRRK2	0,376	0,394	0,309	0,569
HSPA1A	9,495	4,141	3,061	5,831
IL10-RB	0,656	0,716	0,673	0,544
IL15-RA	0,663	0,539	0,947	0,867
MYD88H	0,718	0,822	0,907	0,784
TLR8	0,500	0,532	0,520	0,819
MT1X	4,184	5,273	3,142	2,180
PARK7	0,997	1,053	0,738	0,724
TRERF1	0,401	0,428	0,587	0,515
TXNRD1	1,680	1,550	1,856	1,849
UBC	1,719	1,355	1,391	1,391
MT1M	3,162	3,335	3,681	2,707
XPO6	0,716	0,727	0,768	0,724

FRP1_ATR	0,480	0,561	0,743	0,698
MAPK14	0,554	0,678	0,779	0,463
NUB1	0,519	0,479	0,654	0,524
NDUFA11	0,909	0,977	0,755	0,642
NUP93	0,801	0,799	0,843	0,800
NUP214	0,658	0,693	0,616	0,476
NUP62	0,756	0,831	0,776	0,714
TP53	0,662	0,701	0,463	0,728

Para cada transcrito avaliado, seus níveis de expressão ao longo dos quatro pontos de cinética (30 min, 4, 24 e 48h) foram comparados por ANOVA (Tabela 3). Onze dos alvos avaliados apresentaram diferenças significantes em suas expressões ao longo da avaliação cinética. Foram eles: LRRK2, IL10-RB, MYD88H, PARK7, TXRND1, UBC, MT1M, XPO6, NUB1, NDUFA11, NUP214, NUP62.

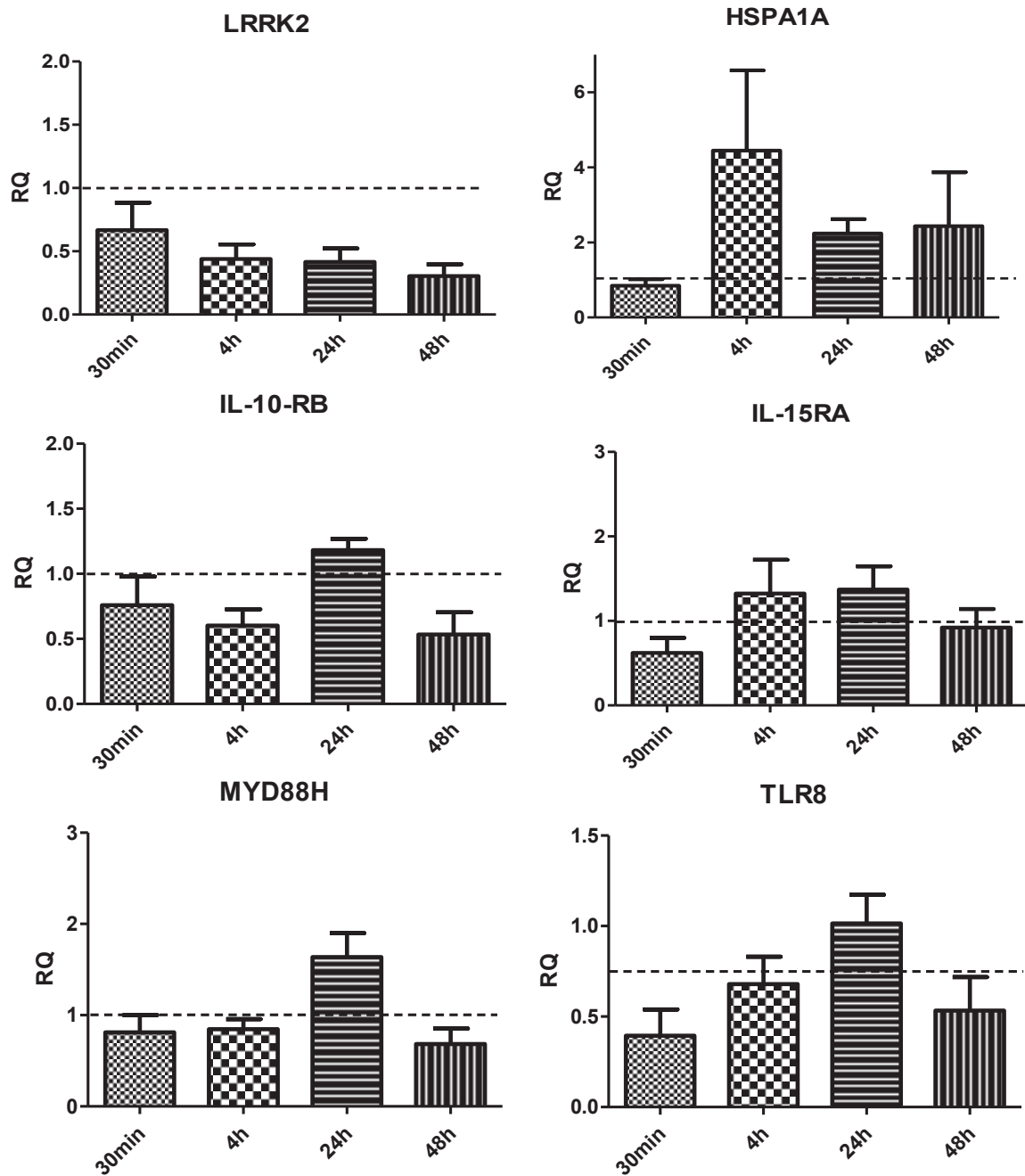
Tabela 3: A significância, valor de p – analisado por Anova dos 21 genes, calculado entre os quatro pontos da infecção dos MDM pela *L. (V.) braziliensis*, e seus períodos de ocorrência.

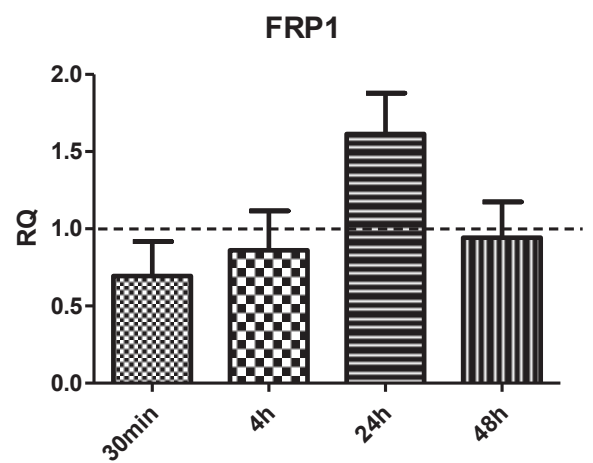
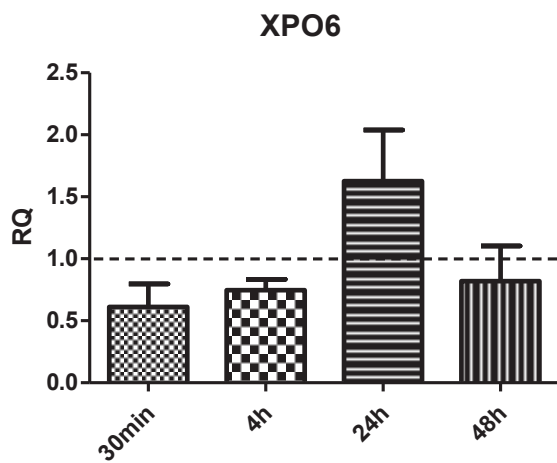
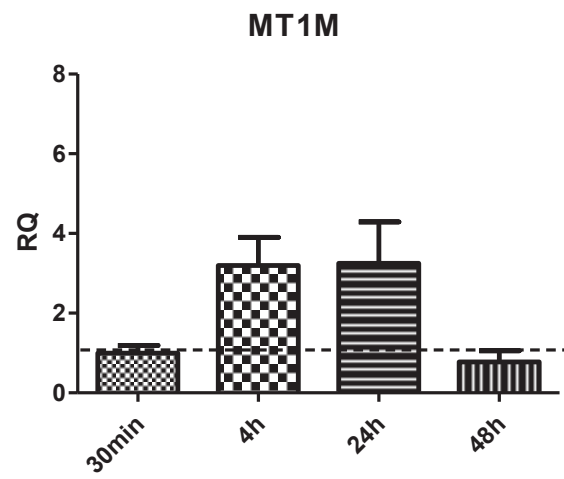
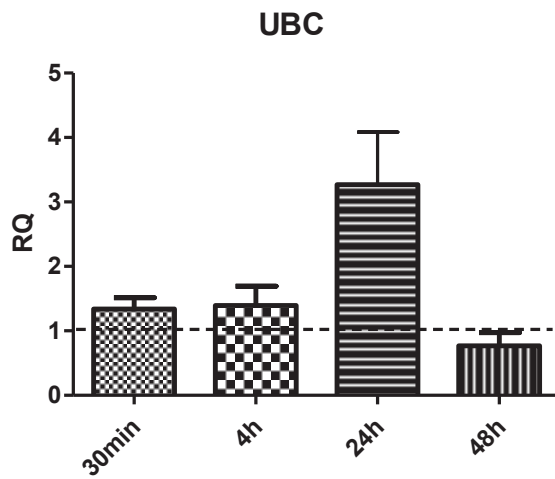
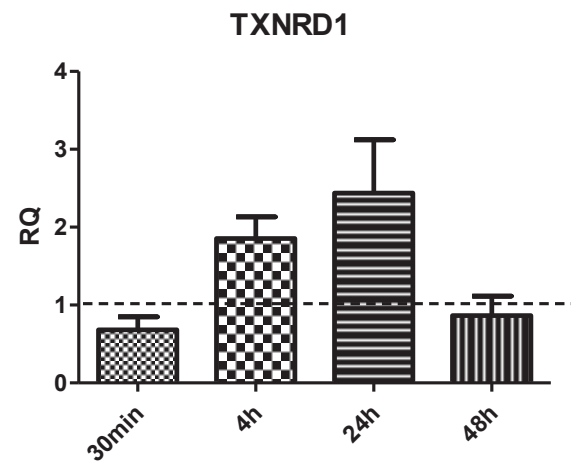
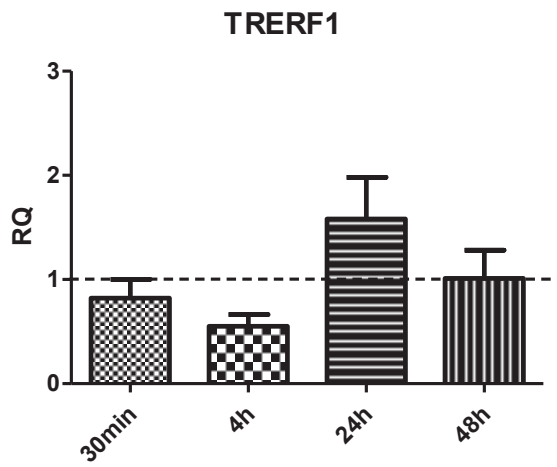
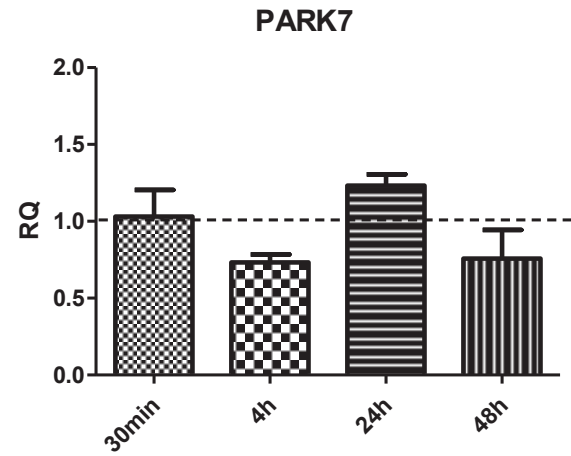
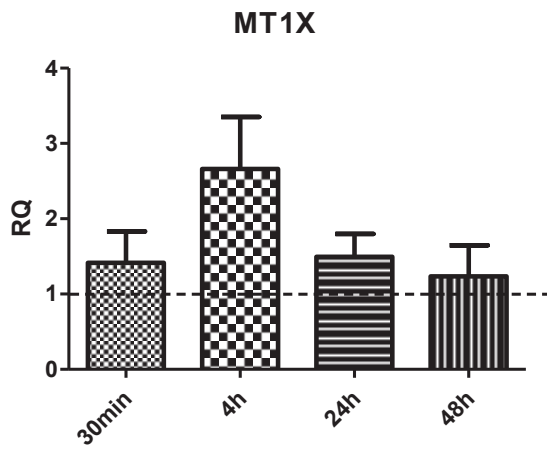
GENES	" valor P "	Períodos de significância
LRRK2	0,3518	-

HSPA1A	0,3380	-
IL10-RB	0,0328	24h-48h
IL15-RA	0,2159	-
MYD88H	0,0059	30min- 24h/ 4h- 24h/ 24h- 48h
TLR8	0,0332	30min- 24h
MT1X	0,1619	-
PARK7	0,0417	4h-48h
TRERF1	0,0629	-
TXNRD1	0,0121	30min- 24h
UBC	0,0036	30min- 24h/ 4h- 24h/ 24h- 48h
MT1M	0,0129	4h-24h
XPO6	0,0583	-
FRP1	0,0625	-
MAPK14	0,5927	-
NUB1	0,0120	30min- 24h
NDUFA11	0,0031	30min- 24h/ 4h- 24h/ 24h- 48h
NUP93	0,3254	-
NUP214	0,0149	30min- 24h/ 4h- 24h

NUP62	0,0421	30min- 24h
TP53	0,5894	-

Para alguns dos alvos as expressões após a infecção dos MDM com as diferentes cepas de *Leishmania (V.) braziliensis* foram semelhantes ao observado às 4h de infecção. Porém alguns alvos mostraram aumento e outros alvos mostraram diminuição significativa em suas expressões em relação ao ponto de 4h (Figura 3).





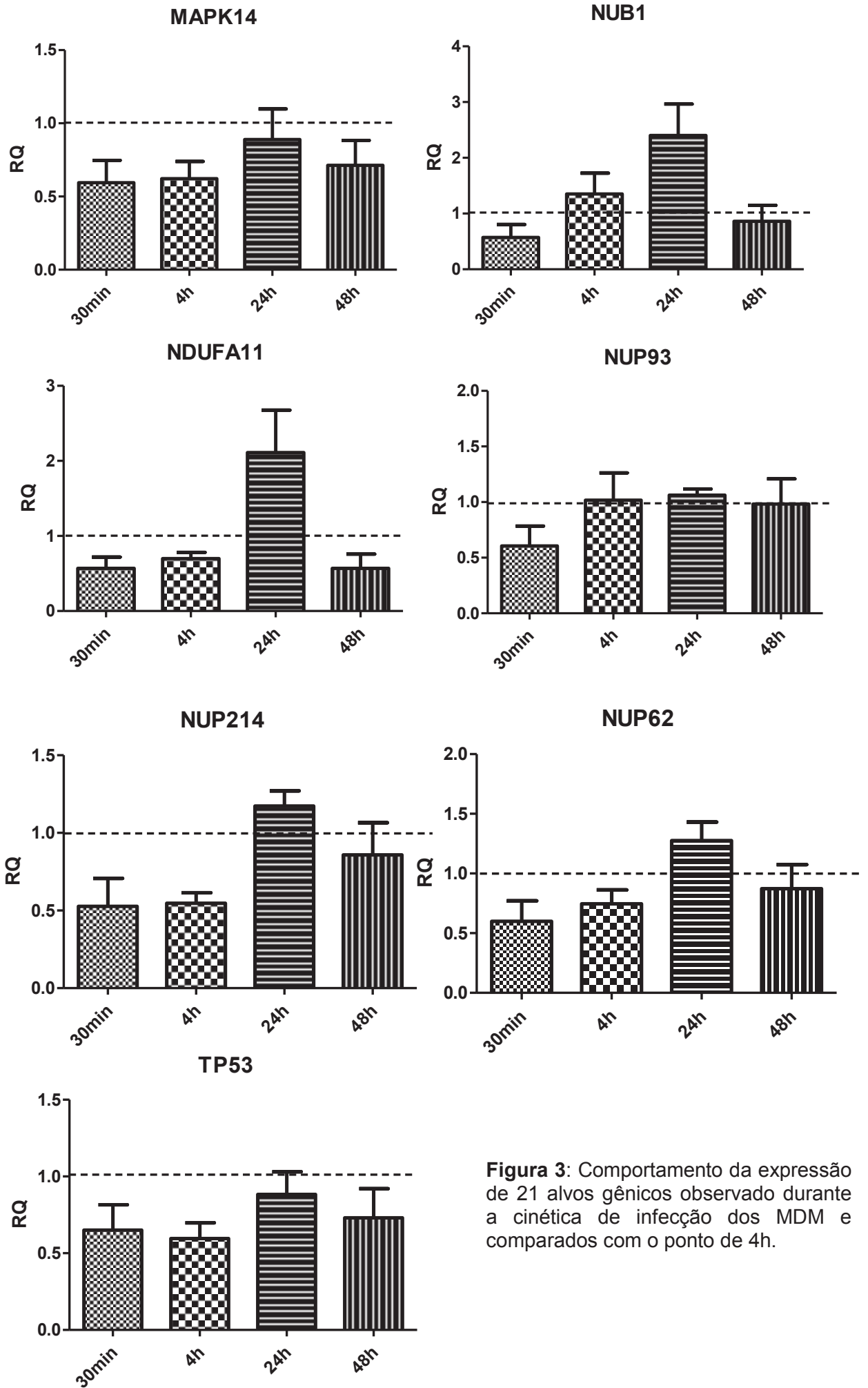


Figura 3: Comportamento da expressão de 21 alvos gênicos observado durante a cinética de infecção dos MDM e comparados com o ponto de 4h.

VIII.3 Comparação dos graus de infecção dos MDM e expressão dos 21 genes estudados entre os MDM infectados com *L. (V.) braziliensis* nas proporções de 2:1 e 10:1

A fim de mimetizar uma condição de alta carga parasitária, os MDM foram infectados com os dois isolados de *L. (V.) braziliensis* na proporção de 10:1 e os resultados relativos ao grau de infecção das células hospedeiras e de expressão dos 21 alvos foram comparados aos obtidos por infecções em multiplicidade 2:1 realizadas em paralelo.

Em relação ao grau de infecção, o percentual de MDM infectados nos ensaios em MOI de 10:1 foi de 97% (Figura 4A), ao passo que cada MDM apresentou em média 30 amastigotas de *leishmania* em seu interior após 4h de infecção (Figura 4B). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as condições comparadas.

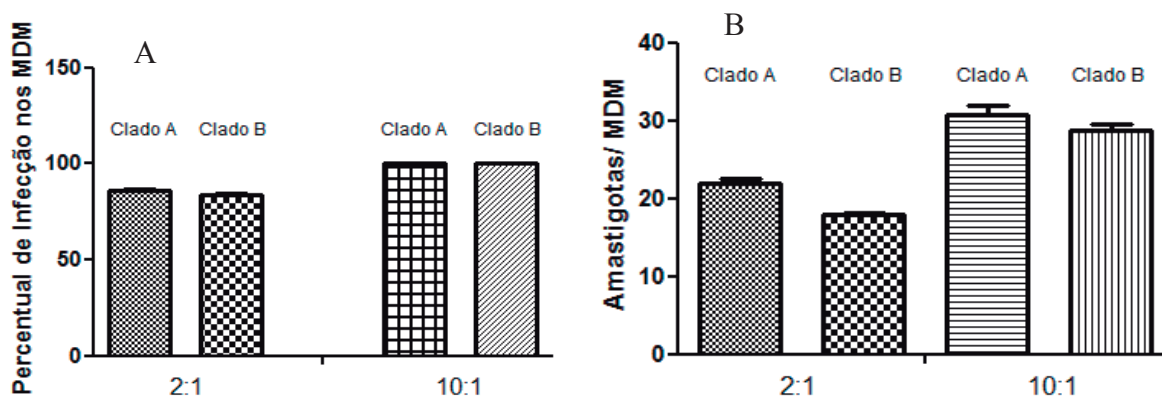


Figura 4: (A) Percentual de MDM infectados, após incubação com *L. (V.) braziliensis* em MOI de 2:1 e 10:1.

(B) Número médio de formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* por MDM infectados em MOI de 2:1 e 10:1.

Em relação à expressão dos 21 genes avaliados, a direção geral das expressões não foi afetada. Isto é, os transcritos reprimidos em infecções com

MOI 2:1, também se mostraram reprimidos nas infecções com MOI 10:1 (Figura 5A), o mesmo valendo para os transcritos induzidos (Figura 5B). Nos casos dos genes LRRK2 e TLR8 as diferenças nos graus de repressão entre MDM infectados em MOI 10:1 e MOI 2:1 foram significantes. O mesmo se observou entre os graus de indução dos genes MT1M e TXNRD1.

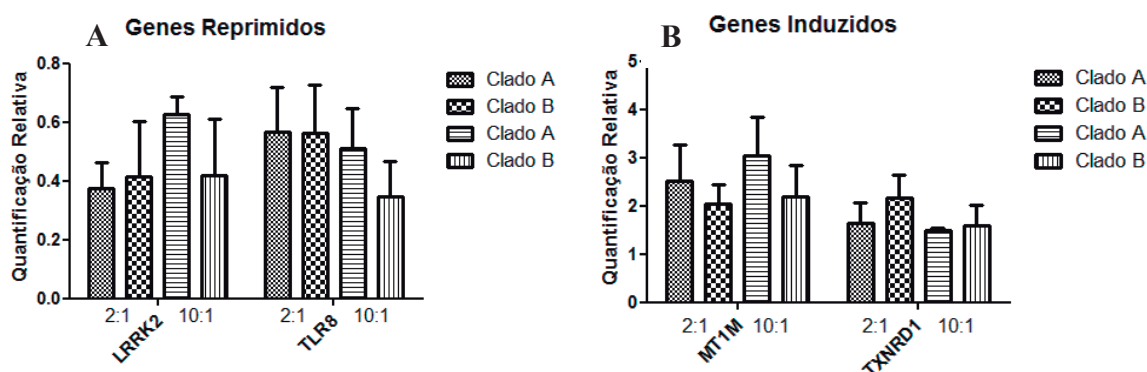


Figura 5: (A) Genes reprimidos durante a infecção de MDM com *L. (V.) braziliensis*. (B) Genes induzidos durante a infecção de MDM com *L. (V.) braziliensis*.

VIII.4 Efeito de macrófagos infectados com *L. (V.) braziliensis* sobre a expressão gênica de macrófagos não infectados

A técnica de infecção dos macrófagos por *transwell* tem como finalidade analisar se as células infectadas influenciam as não infectadas, quando co-cultivadas, mas separadas fisicamente das primeiras por uma membrana. Quatro dos 21 genes avaliados mostraram-se influenciados nas células não infectadas. O HSPA1A e MT1M são genes de resposta a estímulos do ambiente e do estresse celular (resposta ao estresse e ligante de metal, respectivamente), que tiveram suas expressões em células não infectadas influenciadas pelas células infectadas no ponto de 4h. Para ambos os genes, observou-se uma indução significativa nos MDM não infectados (Figura 6, A e

B). Já os genes TLR8 e LRRK2 (receptor de superfície e mediadores de apoptose celular associado à doença de Parkinson, respectivamente) apresentaram uma significativa repressão nas células não infectadas, após 16h de co-cultivo com MDM infectadas no ponto de 16h (Figura 6, C e D).

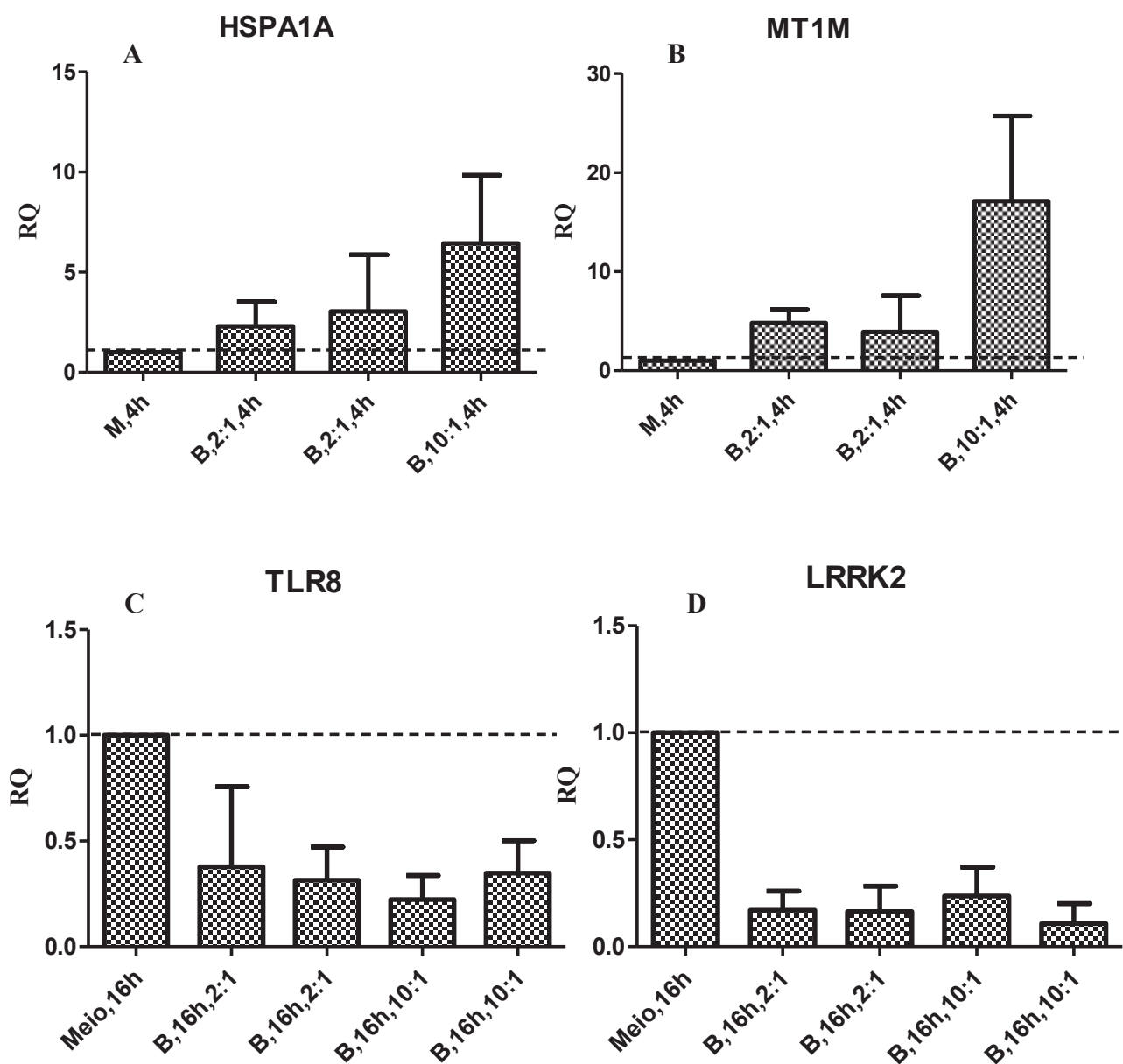


Figura 6: Expressão dos genes HSPA1A (4h), MT1M (4h), TLR8 (16h) e LRRK2 (16h) em MDM não infectados com *L. (V.) braziliensis*, co-cultivados em ensaios de *transwell* com MDM infectados com *L. (V.) braziliensis* em MOI de 2:1 e 10:1. Tendo (A) e (B) primeira barra o Meio (Meio, células MDM sem infecção), B (*L. (V.) braziliensis* do Clado B de Corte de Pedra), segunda barra representa S/M (MDM infectado com *L. (V.) braziliensis* sem a membrana do *transwell*), terceira barra C/M (MDM infectado com *L. (V.) braziliensis* com a membrana do *transwell*) em MOI de 2:1 e quarta barra S/M (MDM infectado com *L. (V.) braziliensis* sem a membrana do *transwell*) em 10:1. E (C) e (D) mesma representação com a quinta barra que representa C/M (MDM infectado com *L. (V.) braziliensis* com a membrana do *transwell*) em MOI de 10:1.

IX. DISCUSSÃO

As interações entre patógeno e hospedeiro e as vias metabólicas celulares que estão envolvidas no desenvolvimento da resposta imune à infecção por *Leishmania* podem ser observadas através da verificação de alterações no perfil do transcriptoma de células envolvidas nessa resposta, que são promovidas após uma exposição *in vitro* destas à formas infectantes do parasito. Estudos prévios têm destacado as influências de parasitos e hospedeiros nos fenótipos clínicos de doenças provocadas por *L. (V.) braziliensis* (Kahl et al,1991; Saravia et al,1998; Schriefer et al, 2004; Castellucci et al, 2005-2006).

Em um estudo prévio realizado pelo nosso grupo para a validação dos resultados encontrados em uma avaliação da expressão gênica global em macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico realizada após 4 horas de infecção pela *L. (V.) braziliensis* pela técnica de microarranjos de DNA foram selecionados 21 genes identificados como significativamente afetados pela infecção, variando dos mais induzidos aos mais reprimidos, de forma a representar os principais processos celulares influenciados pela exposição ao parasito a fim de que fossem reavaliados através do qPCR. Foi também analisado se o contato inicial entre macrófagos humanos e cepas geneticamente distintas de *L. (V.) braziliensis*, provenientes de indivíduos com diferentes formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar (cutânea, disseminada ou mucosa) e pertencentes aos três clados (B, A e C, respectivamente) poderiam levar a diferentes padrões de expressão gênica nestas células do hospedeiro (Sousa et al, submetido). No presente estudo, uma avaliação

cinética da infecção ao longo do tempo (30 min, 4, 24 e 48h) foi realizada e o perfil de expressão gênica dos mesmos 21 genes analisada nestes quatro pontos de tempo. Quando comparamos a expressão dos genes nos pontos de 4h *versus* 24h, oito deles (IL-10RB, MyD88H, PARK7, TRERF1, UBC, NDUFA11, NUP214, NUP62) apresentaram uma mudança significativa em seus níveis de expressão, indicando alterações relevantes nos níveis de seus transcritos ao longo do tempo de infecção.

Em um estudo realizado por Ramírez et al, que também faz uma avaliação cinética utilizando três pontos de tempo, os macrófagos derivados de monócitos infectados com *L. (V.) panamensis* mostraram mudanças significativas na expressão de 30min até 24h; os níveis de expressão foi significativamente alterado nos pontos iniciais (30min e 4h), e as transcrições induzidas durante as primeiras 24 horas pertenciam a vias envolvendo o estresse oxidativo e o mecanismo de regulação gênica (Ramírez et al, 2012) . No presente estudo as alterações na expressão gênica foram encontradas para os genes relacionados com a sinalização celular que favorecem a formação de um ambiente de anergia celular com diminuição das funções celulares após a infecção, ou seja, as várias funções que estão direcionadas para a proteção do hospedeiro passam a ser exploradas pelo parasito para sua sobrevivência (Dey et al, 2007), levando a uma sobrevivida prolongada dos macrófagos. Tal observação nos leva a hipótese de que este mecanismo pode ser devido a uma diminuição da apoptose (repressão dos genes TP53, MAPK14 e FRP1), bem como a uma maior supressão das respostas celulares a estímulos externos, podendo corresponder em parte ao mecanismo que favorece a manutenção da infecção.

Uma avaliação cinética estendida até 48h pós-infecção reforçou as observações anteriormente referidas e mostrou mudanças significativas em algum momento em oito dos 21 genes analisados. Desses genes, seis fazem parte dos oito genes referidos no parágrafo anterior, ou seja, da comparação entre os pontos de 4h *versus* 24h (IL-10RB, MyD88H, PARK7, UBC, NDUFA11, NUP214), enquanto que dois apresentaram suas mudanças após o ponto de 24h (MT1M, NUB1), demonstrando que tais eventos que ocorrem na interação parasito-hospedeiro favorecem a sobrevivência do parasito tanto quanto proteção a célula do hospedeiro (macrófagos), essa significância tem genes relacionados à resposta ao ambiente, à degradação no proteossoma e na transdução de sinal.

Gregory et al, comparou os perfis de expressão dos genes de macrófagos derivados da medula óssea infectados com *Leishmania donovani* ou promastigota de *L. major* e constataram que as duas espécies tiveram os efeitos muito semelhantes, ambas causaram uma pequena mas estatisticamente significativa repressão gênica, e apenas 26 genes foram regulados de forma diferente por *L. major* em oposição a *L. donovani*.

O macrófago é uma das principais células que abrigam a *Leishmania* e, portanto a sobrevivência ou a morte desse parasito depende de sua ativação. Há evidência de que o metabolismo da célula hospedeira pode ser modulado pela presença de agentes patogênicos intracelulares e / ou a indução de respostas imunitárias específicas de forma a promover ou retardar o seu crescimento (Turetz et al,2002). Um trabalho de Moore et. al. relata que a *L. donovani* prejudica a transmissão de informação a partir da superfície da célula para o núcleo e que este efeito é induzido em muito pouco tempo depois do

contato do macrófago com o parasito, indicando que a infecção de macrófagos por *Leishmania.spp* prejudica a transmissão de informações intracelulares (Moore et al, 1993). Os macrófagos participam na apresentação de antígeno e na ativação da resposta imune adaptativa. É provavelmente neste momento que características como intensidade e qualidade da resposta imune são definidas, influenciando, assim, a evolução da doença para cura espontânea, para formas autolimitadas ou para formas progressivas (Rodriguez et al, 2004).

Para analisar o padrão de expressão gênica neste presente estudo, foi utilizada como ferramenta molecular a técnica de RT-PCR quantitativo, sendo esta metodologia amplamente empregada em estudos em leishmaniose. Trabalhos como o de Sousa et al, que obteve achados de expressão gênica de MDM infectados com *L. (V.) braziliensis* após um período de 4 horas ao microarranjo, o de Ramírez et al, que avaliou a expressão gênica diferencial em macrófagos humanos após exposição a *L. (V.) panamensis*, e o de Xin et al, que trabalharam com células dendríticas infectadas com promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* utilizaram esta técnica para as validações de seus resultados.

Em nosso estudo, entre os transcritos dos macrófagos cuja expressão foi significativamente afetada pela infecção por *L. (V.) braziliensis* observou-se a repressão da maioria deles influenciada pela presença do parasito. Muitos genes, cuja expressão foi reprimida em maior intensidade, codificam para as proteínas envolvidas na propagação do sinal, na função mitocondrial e vias de apoptose. Entre os genes cuja expressão foi induzida, encontramos os que codificam proteínas envolvidas na proteção ao estresse. Alguns dos transcritos que foram significativamente modulados negativamente codificam para

receptores de superfície, para proteínas envolvidas na sinalização intracelular, para reguladores de transcrição ou proteínas envolvidas na permeabilidade nuclear.

Os transcritos envolvidos na via de apoptose dos quais observamos uma repressão por *L. (V.) braziliensis*, foram a TP53 e a LRRK2, sugerindo que o parasito leva a um efeito anti-apoptótico nos macrófagos contribuindo mais uma vez para a manutenção da infecção. O LRRK2 se liga à mitocôndria e medeia a apoptose por um mecanismo ainda pouco compreendido, sendo central para a patogênese de uma grande proporção de casos de doença de Parkinson familiar. O gene LRRK2 em comparação com outros genes causadores da doença de Parkinson mostra duas características importantes: que as mutações deste gene foram observadas em casos esporádicos da doença e a outra é que, entre os genes que causam esta doença, características patológicas observadas em pacientes portando mutações em LRRK2 são as mais semelhantes a pacientes com doença de Parkinson esporádica. (SEOL W., 2010)

A capacidade da infecção por *Leishmania spp.* em inibir a apoptose da célula hospedeira tem sido reconhecida como uma estratégia de promoção da persistência do parasito e sobrevivência (Moore et al, 1993). A *leishmania* consegue se esquivar dos eventos microbicidas do hospedeiro, utilizando mecanismos de escape, como a inativação do sistema complemento, diminuindo assim a resposta imunológica, também pela modulação da produção de citocinas e quimiocinas, ou mesmo agindo na repressão ou na indução de genes celulares para assim interferir nos processos celulares de

migração e apoptose, levando a uma modificação do micro-ambiente intracelular.

Foi observada uma modulação negativa global na expressão de genes envolvidos na transdução de sinais a partir de receptores TLRs ou de citocinas. Isto é consistente com os efeitos relatados para as vias de sinalização, embora observações avaliadas na cinética da infecção sugiram que as alterações na expressão gênica ocorrem de maneira precoce após a infecção do macrófago (Sousa et al, submetido). Afinal o receptor *Toll-like* (TLR) e a via de sinalização fazem parte de um dos primeiros sistemas de defesa contra *leishmania spp.* Após o reconhecimento de antígenos específicos, as informações são passadas para o núcleo que promove a transcrição e a síntese de mais citocinas pró-inflamatórias (Tuon et al, 2012). Makela et al, demonstrou que monócitos humanos derivados de células dendríticas tiveram a expressão de genes de citocinas de maneira sinérgica quando o ligante TLR8 foi combinado com ligantes TLR3 ou TLR4, e nenhuma sinergia entre TLR2. As citocinas modulatórias, que caracterizam a resposta imune do tipo Th2, induzidas por *Leishmania* geralmente estão em baixas concentrações tanto na leishmaniose cutânea, como na leishmaniose mucosa, embora provavelmente previna a extensiva destruição tecidual, mas promova a infecção intracelular (Reithinger et al, 2007).

Num estudo de avaliação da expressão gênica global em células infectadas, Buates & Matlashewski empregaram um arranjo limitado de cDNA murino para comparar os conteúdos de RNAm em macrófagos derivados de medula óssea infectados ou não com *L. donovani*. Os resultados mostraram uma supressão generalizada dos genes. Em contraste, os transcritos de alguns

genes importantes mostraram-se induzidos. Esses efeitos foram interpretados pelos autores como benéficos para o microorganismo infectante, uma vez que a supressão gênica global inibiria fatores microbicidas e melhoraria a sobrevivência intracelular desses parasitos (Buates, S, & G Matlashewski. 2001).

O estudo prévio realizado pelo nosso grupo e a avaliação cinética do estudo atual concordam em seus resultados; no ponto de quatro horas os genes induziram / reprimiram de forma semelhante. Como no estudo prévio, a infecção foi apenas em um único ponto (4h), estes achados mostram que este é um ponto ideal para avaliação da infecção não sendo, portanto, um ponto precoce para estimar a expressão gênica, mesmo que os efeitos fenotípicos sejam supostamente detectados mais tardiamente. Este mesmo achado de significância aos eventos precoces foi encontrado por Moore et al, que realizou uma infecção dos macrófagos por até 18h e em apenas 1h estes apresentaram um aumento da deficiência na proteína quinase C (PKC), e por Ramírez et al, em um estudo onde avaliou uma cinética de infecção constatou que os RNAm variaram ao longo do tempo, mas o maior nível de ativação ocorreu nos momentos iniciais (30min e 4h), demonstrando que as alterações gênicas ao longo do tempo de infecção ilustram a dinâmica destas interações e respostas biológicas desde o início da infecção dentro de sua célula hospedeira primária.

Trez et al, relata que o desenvolvimento da resposta imune protetora Th1 frente a *L. major* requer a função da proteína MyD88H nas vias de transdução. As vias de ativação parecem ser dependentes desta molécula, mas independentes da internalização do parasito e de interações com as células T (Tuon et al, 2012). Os macrófagos detectam os sinais de perigo

endógenos que estão presentes em fragmentos de células necróticas através de receptores *Toll-like* e receptores intracelulares, a maioria dos quais conduzidos principalmente pela molécula MyD88H. (Mosser et al, 2008)

Outros transcritos que se mostraram reprimidos codificam componentes do complexo de poro nuclear e proteínas que facilitam o transporte de moléculas entre os microambientes. Ambos, proteína e ácido nucleico, devem fluir em ambas as direções através de todo o envelope nuclear e, assim, as proteínas que formam o poro nuclear representam componentes essenciais da expressão gênica. Neste presente estudo, os transcritos para algumas nucleoporinas (NUP214, NUP93 e NUP62) foram reprimidas, sugerindo que a *L. (V.) braziliensis* modula negativamente genes importantes na permeabilidade nuclear das células do hospedeiro durante o processo de infecção, preparando um ambiente propício para permanecer. Vimos também que as cepas de *L. (V.) braziliensis* direcionadas à disseminação exercem uma repressão mais intensa do que as cepas que permanecem próximas ao sítio cutâneo de inoculação, reforçando a distinção genética entre as formas clínicas de doença.

Na análise feita para verificar se as células infectadas influenciam na resposta de células não infectadas, pode-se observar que apenas quatro dos genes avaliados mostraram-se afetados nas células que não foram expostas ao parasito, demonstrando que houve a passagem de partículas solúveis produzidas e liberadas pelas células infectadas através da membrana da câmara *do transwell* havendo conseqüentemente uma influência do microambiente extracelular. Este achado revela, portanto, a existência de mecanismos de interação e cooperação entre células infectadas e não

infectadas, influenciando modificações na sua expressão gênica mesmo sem a ocorrência da interação célula-parasito.

Assim sendo, o entendimento dos mecanismos do parasito que permitem o estabelecimento da infecção bem como dos mecanismos imunes do hospedeiro desencadeados que são responsáveis pelo reconhecimento e morte do parasito é decisivo para que ocorra o controle da infecção, e consequentemente proporcionem uma contribuição ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas através de medicamentos e vacinas que tragam uma melhoria no prognóstico da doença (Handman E & Bullen DV , 2002).

X. CONCLUSÃO

A capacidade da infecção por *Leishmania* spp. com o efeito de inibir a apoptose da célula hospedeira tem sido uma estratégia para a persistente sobrevivência do parasita.

O isolado associado à forma LD (clado A) reprime mais intensamente quando comparado com a forma LC (clado B), devido a este evento os parasitos devem aumentar a sua chance de sobrevivência por modulação negativa dos genes das células hospedeiras durante o processo de infecção.

Observou-se que no tempo de 4h de infecção a maioria dos alvos teve seus níveis de expressão (indução/repressão) máximos, demonstrando que os eventos precoces são de importância crucial para o estabelecimento da infecção na célula hospedeira.

A passagem de partículas solúveis na membrana da câmara do *transwell* e conseqüentemente a influência do microambiente, implicou em um mecanismo de interação de moléculas das células infectadas sobre as células não infectadas, resultando em modificações na sua expressão gênica.

XI. REFERÊNCIAS

- Azulay, RD, DR Azulay Jr. 1995. *Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis*. Int. J. Dermatol. 34: 303-307.
- Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, et al. *Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients*. Infect Immun. 2002 Dec;70(12):6734-40.
- Basano SA, Camargo LMA. *Leishmaniose tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle*. Rev Bras Epidemiol. 2004; 7(3):328-37.
- Basu MK, Ray M. *Macrophage and Leishmania: an unacceptable coexistence*. Crit Rev Microbiol. 2005; 31(3):145-54.
- Bittencourt, A. L.; Barral, A. *Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz RJ, 1991. 86: 51-56.
- Brasil. Ministério da Saúde. *Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2ª Ed. 2007. Brasília.
- Bogdan C. *Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example*. Cell Microbiol. 2008 Jun;10(6):1221-34.
- Buates, S, G Matlashewski. 2001. *General suppression of macrophage gene expression during Leishmania donovani infection*. J. Immunol. 166: 3416-3422.
- Carvalho, E. M, A Barral, J.M Costa, A Bittencourt, P Marsden. 1994. *Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis*. Acta. Trop. 56: 315-325.
- Carvalho EM, Correia Filho D, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, Rocha H. *Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis*. Am J Trop Med Hyg. 1995 Sep;53(3):273-7.

Castellucci L, Cheng LH, Araujo C, Guimaraes LH, Lessa H, Machado P, et al. *Familial aggregation of mucosal leishmaniasis in northeast Brazil*. Am J Trop Med Hyg. 2005 Jul;73(1):69-73.

Castellucci L, Menezes E, Oliveira J, Magalhaes A, Guimaraes LH, Lessa M, et al. *IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil*. J Infect Dis. 2006 Aug 15; 194(4):519-27.

Chang KP, Akman L, Nielsen JS. *Leishmania virulence and genetic heterogeneity*. Clin Dermatol. 1999 May-Jun; 17(3):269-73.

Choi CM, Lerner EA. *Leishmaniasis as an emerging infection*. J Investig Dermatol Symp Proc. 2001 Dec;6(3):175-82.

Costa, J.M, P.D Marsden, EA Llanos-Cuentas, EM Netto, EM Carvalho, A Barral, AC Rosa, CC Cuba, AV Magalhães, AC Barreto. 1986. *Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases*. J. Trop. Med. Hyg. 89: 319-323.

Coutinho, S. G., M. P. Oliveira, et al. (1996). *"T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified Leishmania pifanoi amastigote antigens and Leishmania braziliensis promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure."* Exp Parasitol **84**(2): 144-55.

Cupolillo E, Momen H, Grimaldi G, Jr. *Genetic diversity in natural populations of New World Leishmania*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998 Sep-Oct;93(5):663-8.

Cupolillo, E, LR Brahim, CB Toaldo, MP de Oliveira-Neto, ME de Brito, A Falqueto, M de Farias Naiff, G Grimaldi Jr. 2003. *Genetic polymorphism and molecular epidemiology of Leishmania (Viannia) braziliensis from different hosts and geographic areas in Brazil*. J. Clin. Microbiol. 41: 3126-3132.

Dantas-Torres F. *Leishmania infantum versus Leishmania chagasi: do not forget the law of priority*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006 Feb;101(1):117-8; discussion 8.

de Oliveira, CI, MJ Teixeira, CR Teixeira, JR de Jesus, AB Rosato, J Santa da Silva, C Brodskyn, M Barral-Netto, A Barral. 2004. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes and Infection* 6: 977-984.

Desjeux, P. 1992. *Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects*. *World Health Stat. Q.* 45: 267-275.

Desjeux P. *Leishmaniasis: current situation and new perspectives*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004 Sep; 27(5):305-18.

Dey R, Khan S, Pahari S, Srivastava N, Jadhav M, Saha B. *Functional paradox in host-pathogen interaction dictates the fate of parasites*. *Future Microbiol.* 2007 Aug;2(4):425-37.

Dusse LM, Vieira LM, Carvalho MG. *Revisão sobre óxido nítrico/Nitric oxide revision*. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2003 vol.39 nº.4:343-350.

Gomes R.F., A.M. Macedo, S.D. Pena and M.N. Melo. 1995. *Leishmania (Viannia) braziliensis: genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD*. *Exp. Parasitol.* 80: 681-687.

Gontijo B.; Carvalho M.L.R. *Leishmaniose tegumentar Americana*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(1): 71-80, jan-fev, 2003.

Gregory D J, Sladek R, Olivier M, Matlashewshi G. *Comparison of the Effects of Leishmania major or Leishmania donovani Infection on Macrophage Gene Expression*. *Infection and Immunity*, Março 2008, p.1186-1192.

Grimaldi G, Jr., Tesh RB. *Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research*. *Clin Microbiol Rev.* 1993 Jul;6(3):230

Handman E, Bullen DV. *Interaction of Leishmania with the host macrophage*. *Trends Parasitol.* 2002 Aug;18(8):332-4.

Ishikawa E.A., F.T. Silveira, A.L. Magalhaes, R.B. Guerra junior, M.N. Melo, R. Gomes, T.G. Silveira and J.J. Shaw. 2002. *Genetic variation in populations of*

Leishmania species in Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 96 Suppl 1: S111-121.

Lainson, R. S., J.J. (1987). *Evolution, classification and geographical distribution*. The leishmanioses in biology and medicine. K.-K. Peters W., K. London, Academic Press. **1**: 1-118.

Lessa, M. M.; Lessa H. A.; Castro T.W.N.; Oliveira A.; Schriefer A; Machado P. R.; Carvalho E.M. *Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos*. Rev. Bras. Otorrinolaringol. [online]. 2007, vol.73, n.6, pp. 843-847. ISSN 0034-7299. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-72992007000600016>.

Kahl, LP, JE Byram, JR David, SA Comerford, F Von Lichtenberg. 1991. *Leishmania (Viannia) braziliensis: comparative pathology of golden hamsters infected with isolates from cutaneous and mucosal lesions of patients residing in Tres Bracos, Bahia, Brazil*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 44: 218-232.

Kraemer D.M., Tony H.P. *Nuclear Pore Protein p62 Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus*. Rheumatology Journal, 2010, 4, 24-27.

Machado P.R., Rosa ME, Costa D, Mignac M, Silva JS, et al. (2011) Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 105: 438-444.

Machado P.R., Penna G. Miltefosina and cutaneous leishmaniasis. National Library of Medicine, 2012 Apr; 25(2):141-4. doi: 10.1097/QCO, PMID: 22248979.

Makela S.M, Strengell M., Pietila T.E., Osterlund P., Juljunen I. *Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells*. Journal of Leukocyte Biology Volume 85, April 2009 0741-5400/09/0085-664.

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

Marzochi, M. C. A., Schuback, A.O., Marzochi, K.B.F. (2002). *Leishmaniose Tegumentar Americana. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais*. B. C. Cinerman, S. São Paulo, Editora Atheneu: 39-64

Mathers, C.D., M. Ezzati, and A.D. Lopez, *Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework*. PLoS neglected tropical diseases, 2007. **1**(2): p. e114.

Moore KJ, Labrecque S, Matlashewski G. *Alteration of Leishmania donovani infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction*. J Immunol. 1993 May 15;150(10):4457-65.

Mosser DM, Edwards JP. *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol. 2008 Dec; 8(12):958-69.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005). *Advances in leishmaniasis*. Lancet 366: 1561-1577.

Oliveira CC, Lacerda HG, Martins DR, Barbosa JD, Monteiro GR, Queiroz JW, et al. *Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface*. Acta Trop. 2004 Apr;90(2):155-62.

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

Organização Mundial da Saúde. *Leishmaniasis: background information. A brief history of the diseases*. 2009. [acesso em: Nov. 2012]. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.

Queiroz SL, Batista AA. *Biological functions of nitric oxide*. Quim Nova. 1999 Jul-Aug;22(4):584-90.

Ramírez C, Díaz-Toro Y, Tellez J, Castilho T M, Rojas R, Ettinger N A, Tikhonova I, Alexander N D, Valderrama L, Hager J, Wilson ME, Lin A, Zhao H, Saravia N G, McMahon-Pratt D. *Human Macrophage Response to L. (Viannia) panamensis: Microarray Evidence for an Early Inflammatory Response*. 2012 Outubro; PLoS Negl Trop Dis 6(10): e1866

Reithinger R, Dujardin JC. *Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications*. J Clin Microbiol. 2007 Jan; 45(1):21-5.

Rodriguez NE, Chang HK, Wilson ME. *Novel program of macrophage gene expression induced by phagocytosis of Leishmania chagasi*. Infect Immun. 2004 Apr;72(4):2111-22.

Seol W. *Biochemical and molecular features of LRRK2 and its pathophysiological roles in Parkinson's disease*. Março 2010;43(4): 233-244.

Saravia, N. G., I. Segura, A. F. Holguin, C. Santrich, L. Valderrama, and C. Ocampo. 1998. *Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of Leishmania (Viannia) in Colombia*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59: 86-94.

Saravia, N. G., K. Weigle, C. Navas, I. Segura, L. Valderrama, A. Z. Valencia, B. Escorcia, and D. McMahon-Pratt. 2002. *Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of Leishmania viannia in Colombia*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 66: 738-744.

Schriefer, A, ALF Schriefer, A Góes-Neto, LH Guimarães, LP Carvalho, RP Almeida, PR Machado, HA Lessa, A Ribeiro de Jesus, LW Riley, EM Carvalho. 2004. *Multiclonal Leishmania braziliensis Population Structure and Its Clinical Implication in a Region of Endemic American Tegumentary Leishmaniasis (ATL)*. Infect. Immun. 72: 508-514.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. *Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004 May;99(3):239-51.

Sousa, R., Bair, T., Ettinger, N.A, Guimarães L., Andrade L., LH Guimarães, PR Machado, EM Carvalho, Wilson, M.E., A. Schriefer. *Suppression of Macrophage Gene Expression by Leishmania braziliensis Clades Associated with Different Clinical Syndromes*. **Submetido, Anexo 1**.

Stout RD, Suttles J. *Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments*. J Leukoc Biol. 2004 Sep;76(3):509-13.

Thomaz-Soccol, V., G. Lanotte, J. A. Rioux, F. Pratlong, A. Martini-Dumas, and E. Serres. 1993. *Phylogenetic Taxonomy of New World Leishmania*. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 68: 104-106.

Thomaz-Soccol, V., G. Lanotte, J. A. Rioux, F. Pratlong, A. Martini-Dumas, and E. Serres. 1993. *Monophyletic origin of the genus Leishmania* Ross, 1903. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 68: 107-108.

Trez C.D, Brait M., Leo O., Aebischer T., Torrentela F. A., Calier Y., Muraille E. *Myd88-Dependent In Vivo Maturation of Splenic Dendritic Cells Induced by Leishmania donovani and Other Leishmania Species*. Infection And Immunity, Feb. 2004, p. 824–832.

Tuon F.F, Fernades E.R., Duarte M.I.S., Amato V.S. *Expression of TLR2 and TLR4 in lesions of patients with Tegumentary American leishmaniasis*. Rev. Inst. Medicina Tropical ,São Paulo, 2012 May-June 54(3):159-163.

Turetz, ML, PR Machado, Al Ko, F Alves, A Bittencourt, RP Almeida, N Mobashery, WD Johnson Jr, EM Carvalho. 2002. *Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil*. J. Infect. Dis. 186: 1829-1834.

Xin L, Li K, Soong L. *Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by Leishmania amazonensis amastigotes*. Mol Immunol. 2008 July ; 45(12): 3371–3382.

XII. ANEXOS

Title: Suppression of Macrophage Gene Expression by *Leishmania braziliensis* Clades
Associated with Different Clinical Syndromes

Short title: *Leishmania braziliensis* clades and macrophages

Authors: Rosana Sousa¹, Viviane Andrade¹, Thomas Bair², Nicholas A. Ettinger³, Luana Guimarães¹, Laura Andrade¹, Luiz Henrique Guimarães¹, Paulo Roberto Lima Machado¹, Edgar M. Carvalho¹, Mary E. Wilson^{4*}, Albert Schriefer^{1,5,6}

Affiliations: ¹Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Brazil; ²DNA facility, University of Iowa, Iowa City, IA, USA; ³Dept. of Pediatrics, Vanderbilt University, Nashville, TN, USA; ⁴Departments of Internal Medicine and Microbiology, University of Iowa and the VA Medical Center, Iowa City, IA, USA, ⁵Departamento de Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Brazil; ⁶Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Doenças Tropicais (INCT-DT), Brazil.

* Corresponding author

Abbreviations used: CL – cutaneous leishmaniasis; DL – disseminated leishmaniasis;
MDMs - monocyte-derived macrophages; ML – mucosal leishmaniasis; RP-10:
macrophage growth medium

ABSTRACT

Background: The protozoan parasite *Leishmania braziliensis* has a high degree of intra-species genetic and phenotypic polymorphism. Similarly, *L. braziliensis* causes a spectrum of clinical syndromes, including localized cutaneous leishmaniasis (CL), mucosal leishmaniasis (ML) and the recently described disseminated leishmaniasis (DL). Our prior studies showed that genetically distinct *L. braziliensis* clades associate with different clinical infection types. *Leishmania* are obligate intracellular parasites in mammalian hosts, most residing in macrophages. We hypothesized that *L. braziliensis* strains associated with CL (clade B), ML (clade C) or DL clade A) will induce macrophage gene expression profiles that correspond to their different pathogenic mechanisms, and also enhance intracellular survival.

Methodology: Human monocyte derived macrophages (MDMs) were infected in parallel with *L. braziliensis* isolates from clades associated with CL, ML or DL. Patterns of gene expression were compared using Affymetrix DNA microarrays.

Principal Findings: Most transcripts were unchanged. Amongst the significantly altered transcripts, most were decreased by all isolates. The most dramatically decreased transcripts encoded proteins associated with stimulus propagation, apoptosis and mitochondrial oxidative phosphorylation. A few transcripts encoding stress response proteins were up-regulated. Differences between *L. braziliensis* clades were observed in the magnitude of change, rather than the identity of transcripts that were modified. Isolates from subjects with metastatic disease (ML, DL) induced a greater magnitude of change than isolates from subjects with CL.

Conclusions: *L. braziliensis* enhances its intracellular survival by inhibiting macrophage pathways leading to microbicidal activity. Parasite strains destined for dissemination may exert a more profound suppression than strains remaining near the cutaneous site of inoculation.

AUTHOR SUMMARY

Leishmania braziliensis is a protozoan parasite of humans causing diseases of the skin and mucosal surfaces. Clinical forms of *L. braziliensis* disease are extremely variable for unknown reasons. Leishmania become intracellular in order to survive in a mammalian host, and most parasites reside in macrophages. We previously observed genetic markers that distinguish different parasite strains associated with the three major forms of *L. braziliensis* disease in northeast Brazil. Infection of human macrophages with these different strains showed that all profoundly suppressed the expression of genes associated with macrophage functions. Pathways communicating signals leading to inflammation or oxidative activity were especially affected. Notably, parasite strains that cause widely disseminated forms of human disease had a more profound effect on macrophage gene expression than parasites causing localized cutaneous ulcers. We conclude that parasite strains destined to cause different forms of infection have different functional effects on the host macrophage that they inhabit.

INTRODUCTION

Leishmaniasis refers to a spectrum of human diseases caused by protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania*, subgenus either *Leishmania* or *Viannia*. All forms of leishmaniasis are initiated when the promastigote form of the parasite is introduced into the skin of a mammalian host during a sand fly bite, followed by entry into local phagocytic cells. Thereafter, parasites convert to their intracellular amastigote form, and reside intracellularly primarily in host macrophages. Amastigotes multiply and spread to new phagocytes, disseminating through host tissues in a pattern dictated primarily by the particular species of the organism. Productive infections may be either asymptomatic or lead to different clinical syndromes involving internal organs, skin and/or mucosal surfaces [1,2]. *Leishmania braziliensis*, a member of the *Leishmania Viannia* sub-genus, is prevalent in Latin America. *L. braziliensis* causes at least three clinical types of tegumentary disease: localized cutaneous (CL), mucosal (ML) and disseminated leishmaniasis (DL) [1,2,3,4,5,6]. The most striking feature differentiating CL from either ML or DL is the degree of metastasis of the microorganism, with consequent disease manifestations limited to or distant from the original inoculation site. Localized cutaneous leishmaniasis lesions are restricted to the entry site of the parasites, whereas ML is defined by parasite spread to mucosal surfaces of upper digestive and airways tracts. DL is characterized by parasite dissemination throughout skin sites of the infected patient [7].

Individuals living in the region of Corte de Pedra in the state of Bahia, Northeast Brazil, can be afflicted with all three phenotypes of *L. braziliensis* disease. We previously reported that isolates derived from these individuals can be distinguished according to polymorphic genetic markers, and that these markers distinguish separate clades of *L. braziliensis* isolates in the region. Furthermore, three clades correspond to a predominant forms of clinical disease caused by *L. braziliensis*. Specifically, Clade A contains

primarily isolates from individuals with DL, Clade B contains isolates from CL subjects, and isolates from individuals with ML are concentrated in Clade C [8]. We reasoned that the biological responses of the host would exhibit correspondingly distinct characteristics.

Successful infection and ultimate dissemination of microorganisms throughout the host likely depends in part on the very early parasite-host cell interactions. Other studies have documented different patterns of gene expression change in host macrophages after phagocytosis of different *Leishmania* species [9,10]. Due to the severity and the diverse clinical forms of disease caused by infection with *L. braziliensis*, we hypothesized that macrophage responses to the *Leishmania Viannia* subspecies *L. braziliensis* might be unique, and that these responses may differ upon invasion by different clades of *L. braziliensis* that correspond to different clinical forms of disease. The purpose of the current study, therefore, was to characterize and compare the changes in macrophage gene expression caused by phagocytosis of three *L. braziliensis* isolates from the three different clades. We hypothesize that these patterns may provide a key to the pathogenic changes induced during each of the clinical forms of leishmaniasis [8].

METHODS

Parasites. *L. braziliensis* isolates were originally derived from individuals with CL, ML or DL diagnosed in the medical clinic in Corte de Pedra, Bahia. The three types of leishmaniasis were defined as follows. Localized cutaneous leishmaniasis (CL) consisted of an ulcerated skin lesion at a single body site with no more than 2 secondary or satellite lesions, without clinical evidence of mucosal involvement. Mucosal leishmaniasis (ML) was defined as the presence of an inflamed or ulcerated mucosal lesion with a biopsy, smear or culture positive for leishmania at a site that was non-contiguous with any cutaneous lesion. ML most frequently involved the nasal septum, oropharyngeal cavity and/or larynx. Disseminated leishmaniasis (DL) was defined as 10 or more skin lesions of mixed type (acneiform, papular, nodular, and/or ulcerated) located in 2 or more body parts (head, trunk, arms and legs). A diagnosis of tegumentary leishmaniasis was made by isolation of parasites in culture from an aspirate or biopsy of a cutaneous or mucosal lesion. Additionally all patients had a positive delayed hypersensitivity skin response to leishmania antigen (Montenegro Test).

L. braziliensis isolates used in the present study were cultured from aspirates of lesion borders suspended in Schneider's medium with 10% heat inactivated fetal calf serum and 2 mM L-glutamine. Species determination was based upon HSP-70 PCR-RFLP [11,12] and recently confirmed by real time PCR [13]. Parasites were frozen in 10% DMSO, 90% growth medium in liquid nitrogen and thawed prior to testing for genotype and macrophage infection studies. All studies were conducted with parasites in stationary phase of growth.

Human Studies Approvals. Studies were approved by Institutional Review Boards of the Federal University of Bahia and the University of Iowa. Protocols were approved by

the NIH in the USA, and by CONEP in Brazil. The Brazilian IRB is registered with the US NIH. All subjects were healthy adults over age 18, and written consent was obtained.

Macrophages and macrophage infections. Peripheral blood mononuclear cells were isolated from normal healthy male volunteers from Salvador, Brazil, who resided outside of regions endemic for *L. braziliensis* infection. Mononuclear cells were separated from peripheral blood by Ficoll hypaque density sedimentation, and monocytes were separated by adherence to plastic. Cells were maintained in Teflon vials in 20% autologous serum, 2 mM L-glutamine in RPMI 1640 with 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (RP-10 medium; reagents from GIBCO). After five days culture at 37°C, 5% CO₂, differentiated monocyte-derived macrophages (MDMs) were suspended in 10% heat-inactivated fetal calf serum (Sigma), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco) [RP-10] and allowed to adhere to glass coverslips for 4 hours at 37°C, 5% CO₂. Non-adherent cells were removed by rinsing, and adherent MDMs were cultivated in RP-10, and incubated at 37°C, 5% CO₂ overnight.

MDMs from each of four donors were incubated in RP-10 with stationary phase *L. braziliensis* promastigotes from one of the three clades at a 2:1 parasite:MDM ratio. Incubations were synchronized by centrifugation at 60xg for 4 minutes at 4°C, and transferred to 37°C, 5% CO₂. Control MDMs were treated in parallel but parasites were not added. After 1 hour, free parasites were removed by rinsing the cultures and returned to 37°C, 5% CO₂ for an additional 3 hours.

Duplicate coverslips from MDM-parasite co-cultures were removed, fixed in methanol and stained with Wright Giemsa (Diff Quik Hema 3, Fisher Scientific) to document the parasite loads. From the remaining samples, total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen). RNA was treated with DNaseI and purified with Qiagen RNeasy mini-kit (Qiagen, Hilden, Germany). The RNA quality was checked with the Agilent

Model 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). The numbers of MDM-associated parasites were quantified microscopically in stained coverslips generated from each sample. Samples in which at least 80% of the macrophages contained intracellular parasites, and which generated highly pure RNA, were chosen for microarrays.

Microarrays. Fifty nanograms of total RNA were converted to SPIA amplified cDNA (a small sample PCR-based isothermal amplification method) using the Ovation Pico RNA Amplification System, v2 (NuGEN Technologies, Cat. #3100) according to the manufacturer's recommended protocol. The amplified SPIA cDNA product was purified through a QIAGEN QIAquick PCR Purification column (QIAGEN Cat #28104) according to modifications from NuGEN. 3.75ug of this product were fragmented (average fragment size = 85 bases) and biotin labeled using the NuGEN FL-Ovation cDNA Biotin Module, v2 (NuGEN Technologies, Cat. #4200) per the manufacturer's recommended protocol. The resulting biotin-labeled cDNA was mixed with Affymetrix prokaryotic hybridization buffer, placed onto Human U133+2.0 arrays (Cat #900470), and incubated at 45° C for 18 h with 60 rpms rotation in an Affymetrix Model 640 Genechip Hybridization Oven. Following hybridization, the arrays were washed, stained with streptavidin (Thermo Scientific, Rockford,IL), signal amplified with antistreptavidin antibody (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) , followed by streptavidin-phycoerythrin (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), using the Affymetrix Model 450Fluidics Station (Affymetrix, Inc.). Arrays were scanned with the Affymetrix Model 3000 scanner with 7G upgrade and data were collected using the using the GeneChip operating software (GCOS) v1.4. Arrays and associated procedures were performed at the University of Iowa DNA Core facility.

Microarray data were first analyzed internally for quality of hybridization, using *affyQCReport* [14]. Data from samples were imported into Partek [PartekGS St. Louis, MO] and normalized using gcRMA [15]. The arrays were then compared using both

ANOVA and paired t-test models. The ANOVA comparison was enhanced by using the Partek batch correction feature to correct for the two hybridization sets that were used. Significance was assessed based on p-value with step-up FDR multiple testing correction and fold change cutoffs.

Validation of selected changes in gene expression. All transcripts selected for validation were significantly expressed in all samples, and changes in gene expression were statistically significant considering all four replicate samples in microarrays by ANOVA. Transcripts for validation were chosen from among this “significantly expressed, significantly changed” subset according to their likelihood, or the likelihood that pathways including these transcripts, to influence the anti-leishmanial immune response. Changes in expression observed on microarrays were validated by reverse transcriptase followed by qPCR to document expression in RNA samples from replicate PBMC samples incubated without or with the above *L. braziliensis* clades. cDNA was generated using the Superscript III First Strand Synthesis System kit (Invitrogen) and random hexamers, followed by RNase H treatment according to the manufacturer’s instructions. Taqman and primer pairs for qPCR were purchased from Applied Biosciences Inc. (ABI). Data were analyzed using the $\Delta\Delta\text{CT}$ method.

Statistical analyses other than microarrays. Differences in percent macrophage infection and amounts of amastigotes per infected macrophage among clades were compared using one-way ANOVA. RT-qPCR expression data were analyzed for significant changes in gene expression between donors using ANOVA. Changes in expression of individual transcripts were tested for significance by paired t-test. Comparisons of gene expression profiles between clades employed Friedman’s and paired one-tailed Wilcoxon tests. All comparisons were considered significant at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed with Prism Graph Pad software.

RESULTS

MDM infections. Peripheral blood monocyte derived macrophages (MDM) from four human donors were incubated in vitro with buffer alone, or with each of three strains of *L. braziliensis* representative of clades A, B or C under conditions promoting parasite phagocytosis. The degree of phagocytosis was documented by microscopic examination of MDMs from in each of the infected conditions. After four hours, total RNA was collected from all conditions. Samples with high quality RNA, and a high proportion of macrophages infected were chosen for analysis of gene expression on Affymetrix microarrays. Global gene expression profiles were compared between uninfected and infected macrophages from the same donor, yielding fold changes after phagocytosis of each of the three clades. The average changes caused by each of the parasite strains across all four donors were then compared. The three parasite strains included one derived from an individual with CL, one from an individual with ML and one from a subject with DL, belonging to clades B, C and A, respectively. All subjects were from the endemic region of Corte de Pedra [8]. Figure one shows that, on average, more than 80% of the MDMs contained intracellular parasites (clade A 83 ± 5 , clade B 81 ± 8 , clade C 81 ± 7 , mean \pm SD), with a mean of 5 parasites in each cell (clade A 5 ± 1 , clade B 6 ± 1 , clade C 5 ± 1 , mean \pm SD). Neither the percent of MDMs infected nor the number of intracellular parasites per macrophage differed statistically between donors or between parasite clades within each donor.

Global changes in gene expression. Gene expression in infected macrophages was evaluated at a single time point in order to allow for parallel infection of batches of host-cells from each donor with parasites of all three clades. Pilot experiments documented abundance of IL-10 or TNF α transcripts between 30 minutes and 72 hours after infection of MDMs with *L. braziliensis*. These data indicated that the maximal changes in these two

transcripts occurred between 4 and 16 hours after parasite addition (data not shown). In order to detect the very earliest changes induced by *L. brazileinsis* on host cells, we chose four hours post-infection as a time to screen for changes in gene expression.

Biotinylated cDNAs from infected or control macrophages were hybridized to the Affymetrix Human Genome U133 Set plus 2.0 chips. Data were first analyzed within each donor for the change in expression between the infected versus the uninfected MDM conditions for each clade. Changes in gene expression induced by the 3 different clades were then compared between donors. According to one-way ANOVA, more than five hundred expressed transcripts were significantly changed upon infection with any of the three strains of *L. braziliensis*. Amongst the transcripts whose abundance changed significantly, 471 transcripts were down-regulated whereas 89 were up-regulated.

Significantly altered transcripts were classified according to functional pathways. The host processes affected by *L. braziliensis* phagocytosis distributed into four main categories: signal propagation, mitochondrial function, apoptosis and response to external environment. The predominant pathways and genes whose expression was altered by *L. braziliensis* infection, and the changes in expression for each clade, are listed in Table 1.

Down-regulated transcripts. The overwhelming majority (approximately 85%) of transcripts that were significantly altered by infection with any of the 3 *L. braziliensis* clades were repressed (Figure 2A). Selected noteworthy transcripts are listed in Table 1. Genes belonging to three of the four categories mentioned above were predominantly down-regulated. The category with the largest number of down-regulated transcripts encoded components of cellular signaling. These down-regulated transcripts included mRNAs encoding cell surface receptors, signal transduction proteins and one transcriptional regulator. Transcripts encoding nuclear permeability factors were also diminished.

The most highly repressed transcript encoding a cell surface receptor was Toll-like receptor 8, the receptor that senses CpG-rich oligonucleotides within vacuoles of the host cell. Also affected was the transcript for MyD88, a binding protein necessary for function of many TLRs including TLR8 [16]. Transcripts encoding cytokine receptors or signaling intermediates in cytokine-initiated cascades that were down-modulated included subunits of receptors for IL-12 (IL12R β 1), IL15 (IL15R α) and IL-10 (IL10R β). Proteins transducing signals from cytokine receptors were also down-regulated, most notably Jak2, STAT1, STAT5A, TYK2, and two MAP kinase kinases (MAP2K5, MAP2K3). Both the TLR and Jak-STAT pathways can converge on the transcription factor NF- κ B [17]; thus these modifications could result in diminished pro-inflammatory responses. Overall, forty transcripts encoding signaling intermediates or transcriptional regulators were significantly affected, and 35 of these (87.5%) were down-regulated. Surprisingly, transcripts encoding components of nuclear pores were also down-modulated by *L. braziliensis* infection, including two transcripts encoding Ran binding proteins (nuclear exportin 6, XPO6; and RBP10) and three nucleoporins (NUP62, NUP93 and NUP214).

It is tempting to speculate that the changes in outside-inside signaling transcripts were primarily in a downward direction, possibly creating an environment of anergy and paralyzing cellular functions just after host-cell invasion by the parasite.

Several transcripts encoding proteins that function in the mitochondrion were significantly decreased. These included proteins important for mitochondrial oxidative phosphorylation. The nuclear-encoded proteins ISCU and ISCA2 are two of the three peptides that are translocated into the mitochondrion to serve as scaffold proteins for the biogenesis of iron-sulphur clusters [18]. These clusters are involved in electron transfer chains of both Complex I and Complex II during oxidative phosphorylation. In addition to the above, expression of all seven mitochondrially-encoded subunits of the NADH

dehydrogenase constituting Complex I were suppressed, thus decreasing essential components of the mitochondrial electron transport chain [19]. Additional proteins responsible for mitochondrial protein synthesis were suppressed, including one of two subunits of the major mitochondrial transcription factor TFAM and seven mitochondrial ribosomal proteins (MPRS 14,35; MPRL 16,19, 41, 52; MRP 63). Complex I and other mitochondrial proteins are essential for translocating protons across the mitochondrial inner membrane and generating the electrochemical potential gradient necessary for ATP production, generation of reactive oxygen species, and promoting apoptosis [20]. Thus the above observations could have implications for macrophage programmed cell death, as well as cellular metabolic activity.

Other transcripts involved in the intrinsic apoptosis pathway [21] that were suppressed by *L. braziliensis* exposure included TP53, which encodes tumor protein 53 or p53, and LRRK2, the major late-onset familial Parkinson's disease associated gene [also called PARK 8 [22,23]]. p53 is a tumor suppressor that can either arrest the cell cycle and activate DNA repair in the setting of DNA damage, or promote apoptosis mediated by the mitochondrion [24]. Expression of both p53 and proteins that participate in p53 function were decreased. The latter included MAPK14 and FRAP1, kinases that phosphorylate and activate p53, the p53-induced protein YPEL3 which promotes apoptosis, and MRPL41, a component of the mitochondrial ribosomal large subunit that stabilizes p53 and enhances its translocation into the mitochondrion [25]. LRRK2 (PARK 8) is hypothesized to play a role upstream of the MAPK pathway and to mediate both familial and sporadic Parkinson's disease by inducing intrinsic neuronal apoptosis [23,26,27]. Also decreased was the mRNA encoding NUB1, a Lewy body protein that accumulates in neurons during Alzheimer's or Parkinson's diseases, and DJ-1 (aka PARK7) whose product can bind

LRRK2. Polymorphic alleles of PARK 7 are associated with a recessive form of familial Parkinson's Disease [28].

Up-regulated transcripts. Only approximately 15% of transcripts significantly influenced by MDM infections were up-regulated (Figure 2B). Noteworthy transcripts in this category are listed in Table 1. Some encoded proteins were involved in the above-mentioned processes, including the negative regulator of transcription HIC1, and ETS2, a transcription factor activating the apoptosis protein TP53 [29]. It is possible that the latter was induced in response to down-regulated expression of TP53 itself. Many of the other up-regulated transcripts encoded genes involved in response to environment conditions, sometimes involved in the cellular response to stress. Similar to our prior report, transcripts encoding several metallothionein proteins were highly up-regulated [9]. Metallothioneins are important for metal chelation and regulating cellular content of zinc. Because of their high cysteine content, metallothioneins not only chelate metal ions, but in some situations they can play a protective role against oxidant toxicity [30]. The transcript for thioredoxin reductase was also increased, as was the transcript HSP70 family member HSPA1A. Several transcripts encoding proteins associated with ubiquitin targeting were increased, suggesting an increase in proteins acting as chaperones for misfolded or damaged proteins targeted for degradation in the proteasome [31].

Validation. Microarray findings were validated in two manners. First, amongst the transcripts that were significantly changed by *L. braziliensis* infection, some were chosen for validation using the original mRNAs used for microarray hybridization. We employed reverse transcriptase-qPCR for validation of mRNA changes (Figure 3). Some of the validated transcripts were down-modulated (panels A through H) and some of them were up-regulated (panels I through L). In all cases, the direction of change was similar between the microarray and the transcript RT-qPCR.

In addition to validation of the observations made in the original microarray samples, we tested whether there would be similar changes in gene expression in MDMs from additional human blood donors. Table 2 shows a comparison of fold-changes measured by microarray of the original 4 donors, compared to reverse transcriptase qPCR measurements of gene expression in MDMs from eight new blood donors, for ten of the transcripts that were significantly altered by *L. braziliensis* infections. The transcripts were chosen to reflect a spectrum ranging from highly induced to highly repressed transcripts. Each transcript was evaluated in MDMs infected with each of the 3 clades of *L. braziliensis*. The mean fold-changes according to each method are shown in Table 2. In all 30 conditions evaluated by RT-qPCR, the relative abundance of transcripts changed in the same direction as the microarray. Not surprisingly, there were differences in the magnitude of fold-change between the two methods. Nonetheless nine of the ten genes fell into the same rank order from highest to lowest fold change in expression when aligned according to either microarray or to RT-qPCR fold changes. The only exception was IL-15RA, in which the rank order was changed.

In addition to study of the effects of the original three parasite isolates on gene expression in cells from a larger group of human donors shown in table 2, we questioned whether additional parasite isolates belonging to clades A, B or C would act differently. MDMs from the eight new subjects were infected in parallel with nine *L. braziliensis* isolates, including three isolates from each of the three clades A, B or C, respectively. The average fold changes in two down-regulated transcripts (LRRK2 and TLR8) and two up-regulated transcripts (HSPA1A and MT1M) were determined by RT-qPCR, and results are shown in Figure 4. In each case, the direction of fold-change in MDMs from the new donors was similar to that observed in the original four sets of MDM samples.

Differential regulation during infection with different *L. braziliensis* clades. Transcripts of MDMs infected with *L. braziliensis* isolates belonging to each of the 3 different clades were regulated in the same general direction (induction/repression). However, the magnitude of change for many transcripts differed between the clades (Table 2; Figure 5). Aggregate analysis of the MDM gene expression profiles, employing the built in clustering capability of the Partek Genomics Suite (Partek Inc. MO, USA), showed that the parasite strains associated with metastatic diseases [Clades A (DL) and C (ML)] were more similar in their effects on host gene expression than Clade B, which is associated with localized CL. This is illustrated in Figure 5A, showing a greater number of transcripts were significantly altered by infection with clades C and A than either clades C and B or clades A and B. The magnitude by which each of the parasite isolates suppressed the 471 down-modulated transcripts is plotted according to clade in Figure 5B. Although all changes were in the same direction, the plot illustrates that the magnitude of change was similar between isolates belonging to clades A and C, and both were lower than changes induced by the clade B isolate. The differential effects of parasite isolates on transcript expression were statistically significant (Friedman's test ($p < 0.01$)).

The *L. braziliensis* clade-specific effects on expression of ten genes in eight MDM donors, shown in Table 2, was used to further compare the changes induced by representatives of each of the three *L. braziliensis* clades (A, B or C). The last two columns of Table 2 illustrate a higher fold-change in expression of ten candidate genes induced by clade A or C isolates compared to clade B isolates in most of the instances shown. The one consistent exception in this list was LRKK2, in which both clades A and C induced lower magnitude changes in gene expression than the clade B member. The overall comparison of the averages for all determinations (Friedman's test) were statistically significant ($p = 0.002$). Figure 6 panels A and B depict the findings for LRRK2 and

HSPA1A, in which case the clade B isolate induced HSPA1A to a lower magnitude than either the clade A or C isolate, whereas the clade B isolate suppressed transcript expression to a greater extent than either of the other isolates shown. Nonetheless, in each case the changes induced by clade A and C isolates were similar to each other, but different from changes induced by clade B.

Overall, there were not many qualitative changes in the identity of transcripts that were altered between parasite isolates. However, the *Leishmania braziliensis* strains belonging to Clades A and C associated with disseminated forms of disease (ML and DL respectively) caused a higher magnitude effects on MDM gene expression than the Clade B strain associated with localized disease (CL).

DISCUSSION

Previous studies have directly or indirectly underscored the influences of both parasite and host in the clinical phenotypes of diseases caused by *L. braziliensis* [8,32,33,34,35,36,37,38,39]. In the present report, we tested whether the initial contact between human macrophages and genetically distinct *L. braziliensis* strains derived from individuals with different clinical forms of tegumentary leishmaniasis might lead to diverse gene expression patterns in the host macrophage. The *L. braziliensis* isolates to examine were chosen to represent individuals with either metastatic (disseminated or mucosal) forms of leishmaniasis, or localized (cutaneous) leishmaniasis. Each isolate had previously been typed as belonging to the three genetically distinct clades that correspond to these forms of disease (A, C or B, respectively) [8].

Amongst the transcripts that were significantly changed by *L. braziliensis* infection of MDMs, the parasite suppressed the expression of the majority of these transcripts. Many genes whose expression was suppressed to the greatest extent encoded proteins involved in signal propagation, mitochondrial function and apoptosis pathways. Interestingly, amongst the genes whose expression was up-regulated were genes encoding proteins involved in stress protection. Parasite isolates derived from individuals with metastatic forms of *L. braziliensis* disease (i.e. clade A corresponding to DL and clade C corresponding to ML) led to patterns of gene expression that were more similar to each other than to the isolate derived from a case of localized diseases (CL, clade B).

Some of the significantly down-modulated transcripts encoded surface receptors, proteins involved in intracellular signaling, transcriptional regulators, or proteins involved in nuclear permeability. This suggests there may be an overall suppression of pathways transducing signals from the extracellular environment. A report by More et al. was one of the earliest accounts indicating that *Leishmania* spp. infection of macrophages impairs the

transmission of information from the macrophage surface to the nucleus [40]. Several reports thereafter further detailed that effect, showing that even though the initial contact of leishmania parasites with the host cell led to a transient activation of signaling mechanisms, once macrophage infection is established many signaling pathways are suppressed [41]. Signaling through Jak/STAT and MAPK, with resultant effects on NF- κ B activation, are some of the most dramatically affected pathways [42,43,44,45,46,47]. Impaired regulatory mechanisms cited implicate several effects on proteins in these cascades, including their phosphorylation status [43], and targeting to the proteasome for degradation [44]. Data that we present in the current study document a general down-regulated expression of genes involved in transducing signals from TLRs or cytokines. This is consistent with the reported effects on signaling pathways, although our observations suggest that the changes in gene expression occur early after infection of the macrophage, even though the phenotypic effects are reportedly detected late.

An unanticipated observation was the down-regulation of transcripts related to nuclear permeability after *L. braziliensis* infection of macrophages. The suppressed transcripts encoded components of the nuclear pore complex and proteins facilitating transport. Both protein and nucleic acid must flow in both directions across the nuclear envelope, and thus proteins forming the nuclear pore represent essential components of gene expression [48]. Some RNA viruses have been shown to manipulate components of the nuclear pore machinery, enhancing their own infection and survival as a result of the altered permeability of the nuclear membrane [48]. The only reported effect of *Leishmania* influencing nuclear transport is recent work indicating that *L. donovani* amastigotes impair STAT1 α nuclear translocation by blocking its interaction with importin-alpha5 [47]. Our observations suggest that there may be additional effects of the *Leishmania* spp. on nuclear transport pathways.

Observations in the current study raise the hypothesis that infection with *L. braziliensis* may suppress or modify iron-sulphur clusters biogenesis and/or mitochondrial respiration. It remains to be seen whether subtle decreases in transcripts encoding components of Complex I is capable of affecting the generation of the electron potential at the mitochondrial inner membrane. Nonetheless evidence suggests that Complex I is involved in cellular apoptosis, and it is tempting to speculate that these changes might result in diminished mitochondrial signals leading to apoptosis in the infected cell. Indeed, the ability of *Leishmania* spp. infection to inhibit host cell apoptosis has long been recognized as a strategy promoting parasite persistence and survival [49]. Although several reports document this phenomenon [49,50,51], the mechanism has remained largely elusive. Two studies of BALB/c mouse macrophages or the RAW 264.7 murine macrophage cell line suggested that *L. major* infection causes a decrease in permeability and consequent repression of cytochrome c release from the mitochondrion, in part mediated by BCL-XL, preventing activation of caspases and apoptosis [52,53]. The current study of human macrophages infected with *L. braziliensis* did not reveal a significant change in expression of BCL-2 family members. However, transcripts encoding proteins involved in two major triggers of intrinsic pathway apoptosis were down-regulated. These were (1) TP53 and proteins molecules that control its activation, stabilization and translocation into the mitochondrion; and (2) LRRK2, which attaches to the mitochondrion and mediates apoptosis by a still poorly understood mechanism. The latter protein is central to the pathogenesis of a large proportion of Familial Parkinson's Disease cases.

The significant decrease in transcripts encoding LRRK2 in MDMs infected with *L. braziliensis* is of particular interest considering recent reports that SNPs in the LRRK2 gene are associated with the multibacillary form of human infection with *Mycobacterium leprae* [54]. Both *M. leprae* and *L. braziliensis* are intracellular pathogens causing chronic

disease manifestations in the skin, leading to speculation that effects on apoptosis may be a common mechanism of their intracellular survival. Although quite different in pathogenesis, it must be mentioned also that mutations in the promoter regions for two other genes associated with Parkinson's Disease, both of which encode participating in the cell's ubiquitination processes, PARK2 and PACRG, have also been associated associated with leprosy [55]. This may indicate common pathways involved in the pathogenesis of these infectious and neurologic disorders.

Leishmania braziliensis can lead to diverse manifestations in infected humans. CL can disseminate if left undiagnosed and untreated for an extended time period of time or when occurring in malnourished individuals. Disseminated forms of tegumentary leishmaniasis are also more common in individuals who harbor particular polymorphic risk-associated alleles compared to other genotypes [6,36,37,38,39,56,57,58]. Our prior report suggested that genetic polymorphism of the parasite itself is also associated with the diversity of *Leishmania braziliensis* [8]. The current report extends our understanding by showing that *L. braziliensis* strains belonging to distinct clades leading to subtle but consistently distinct behaviors upon interaction with human MDMs.

It was remarkable that the parasites associated with two different forms of metastatic leishmaniasis, ML or DL, elicited changes in host macrophage gene expression that were more similar to each other than the isolate from a subject with cutaneous leishmaniasis. The difference was primarily a difference in the magnitude of induction or repression of the affected transcripts caused by the *L. braziliensis* strains from subjects with ML or DL than the strain from a subject with CL. Because the difference was primarily one of magnitude, we examined the pattern of changes in gene expression by the different clades, reasoning that these may represent at least in part the barriers to disease metastasis. The study led to the hypothesis that prolonged macrophage survival due to a

decrease in apoptosis, and a greater suppression of the responses to external stimuli may correspond to part of the mechanism that favor dissemination.

The diagnosis and management of American tegumentary leishmaniasis can be difficult. The above observations emphasize the importance of molecular epidemiology studies coupled with careful clinical observations. Such studies set the stage for the future pursuit of genetic tags for *L. braziliensis* strains to use as predictors of disease outcome.

REFERENCES

1. Azulay RD, Azulay Junior DR (1995) Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis. *International journal of dermatology* 34: 303-307.
2. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561-1577.
3. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, et al. (2002) Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and immunity* 70: 6734-6740.
4. Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P (1994) Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta tropica* 56: 315-325.
5. Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, et al. (1986) Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *The Journal of tropical medicine and hygiene* 89: 319-323.
6. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, et al. (2002) Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *The Journal of infectious diseases* 186: 1829-1834.
7. Machado PR, Rosa ME, Costa D, Mignac M, Silva JS, et al. (2011) Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105: 438-444.
8. Schriefer A, Schriefer AL, Goes-Neto A, Guimaraes LH, Carvalho LP, et al. (2004) Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infection and immunity* 72: 508-514.
9. Ettinger NA, Wilson ME (2008) Macrophage and T-cell gene expression in a model of early infection with the protozoan *Leishmania chagasi*. *PLoS neglected tropical diseases* 2: e252.
10. Chaussabel D, Semnani RT, McDowell MA, Sacks D, Sher A, et al. (2003) Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. *Blood* 102: 672-681.
11. Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, et al. (2004) Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *Journal of clinical microbiology* 42: 2294-2297.
12. Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, De Doncker S, et al. (2010) Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology* 137: 1159-1168.
13. Weirather JL, Jeronimo SM, Gautam S, Sundar S, Kang M, et al. (2011) Serial quantitative PCR assay for detection, species-discrimination and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *Journal of clinical microbiology*.
14. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA (2004) affy-analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 20: 307-315.
15. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, et al. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4: 249-264.
16. Kenny EF, O'Neill LA (2008) Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. *Cytokine* 43: 342-349.

17. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S (2011) Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nature immunology* 12: 695-708.
18. Rouault TA, Tong WH (2005) Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology* 6: 345-351.
19. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry Biokhimiia* 70: 200-214.
20. Chomova M, Racay P (2010) Mitochondrial complex I in the network of known and unknown facts. *General physiology and biophysics* 29: 3-11.
21. Jin Z, El-Deiry WS (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer biology & therapy* 4: 139-163.
22. Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, et al. (2004) Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 44: 595-600.
23. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, et al. (2004) Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44: 601-607.
24. Moll UM, Marchenko N, Zhang XK (2006) p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene* 25: 4725-4743.
25. Kelley KD, Miller KR, Todd A, Kelley AR, Tuttle R, et al. (2010) YPEL3, a p53-regulated gene that induces cellular senescence. *Cancer research* 70: 3566-3575.
26. Lin TK, Liou CW, Chen SD, Chuang YC, Tiao MM, et al. (2009) Mitochondrial dysfunction and biogenesis in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Chang Gung medical journal* 32: 589-599.
27. Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, et al. (2008) Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet neurology* 7: 583-590.
28. Bonifati V (2007) Genetics of parkinsonism. *Parkinsonism & related disorders* 13 Suppl 3: S233-241.
29. Venanzoni MC, Robinson LR, Hodge DR, Kola I, Seth A (1996) ETS1 and ETS2 in p53 regulation: spatial separation of ETS binding sites (EBS) modulate protein: DNA interaction. *Oncogene* 12: 1199-1204.
30. Namdarghanbari M, Wobig W, Krezoski S, Tabatabai NM, Petering DH (2011) Mammalian metallothionein in toxicology, cancer, and cancer chemotherapy. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 16: 1087-1101.
31. Wong E, Cuervo AM (2010) Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2: a006734.
32. Kahl LP, Byram JE, David JR, Comerford SA, Von Lichtenberg F (1991) *Leishmania (Viannia) braziliensis*: comparative pathology of golden hamsters infected with isolates from cutaneous and mucosal lesions of patients residing in Tres Bracos, Bahia, Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 44: 218-232.
33. Saravia NG, Segura I, Holguin AF, Santrich C, Valderrama L, et al. (1998) Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania (Viannia)* in Colombia. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 59: 86-94.
34. Saravia NG, Weigle K, Navas C, Segura I, Valderrama L, et al. (2002) Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of *Leishmania viannia* in Colombia. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 66: 738-744.

35. Schriefer A, Guimaraes LH, Machado PR, Lessa M, Lessa HA, et al. (2009) Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil. *Emerging infectious diseases* 15: 871-876.
36. Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, et al. (1995) Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *The Journal of experimental medicine* 182: 1259-1264.
37. Castellucci L, Cheng LH, Araujo C, Guimaraes LH, Lessa H, et al. (2005) Familial aggregation of mucosal leishmaniasis in northeast Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 73: 69-73.
38. Castellucci L, Menezes E, Oliveira J, Magalhaes A, Guimaraes LH, et al. (2006) IL6 - 174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *The Journal of infectious diseases* 194: 519-527.
39. Salhi A, Rodrigues V, Jr., Santoro F, Dessein H, Romano A, et al. (2008) Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *Journal of immunology* 180: 6139-6148.
40. Moore KJ, Labrecque S, Matlashewski G (1993) Alteration of *Leishmania donovani* infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction. *Journal of immunology* 150: 4457-4465.
41. Engwerda CR, Ato M, Kaye PM (2004) Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends in parasitology* 20: 524-530.
42. Junghae M, Raynes JG (2002) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates *Leishmania donovani* infection in macrophages. *Infection and immunity* 70: 5026-5035.
43. Bhardwaj N, Rosas LE, Lafuse WP, Satoskar AR (2005) *Leishmania* inhibits STAT1-mediated IFN-gamma signaling in macrophages: increased tyrosine phosphorylation of dominant negative STAT1beta by *Leishmania mexicana*. *International journal for parasitology* 35: 75-82.
44. Forget G, Gregory DJ, Olivier M (2005) Proteasome-mediated degradation of STAT1alpha following infection of macrophages with *Leishmania donovani*. *The Journal of biological chemistry* 280: 30542-30549.
45. Ben-Othman R, Guizani-Tabbane L, Dellagi K (2008) *Leishmania* initially activates but subsequently down-regulates intracellular mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB signaling in macrophages. *Molecular immunology* 45: 3222-3229.
46. Calegari-Silva TC, Pereira RM, De-Melo LD, Saraiva EM, Soares DC, et al. (2009) NF-kappaB-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. *Immunology letters* 127: 19-26.
47. Matte C, Descoteaux A (2010) *Leishmania donovani* amastigotes impair gamma interferon-induced STAT1alpha nuclear translocation by blocking the interaction between STAT1alpha and importin-alpha5. *Infection and immunity* 78: 3736-3743.
48. Gustin KE (2003) Inhibition of nucleo-cytoplasmic trafficking by RNA viruses: targeting the nuclear pore complex. *Virus research* 95: 35-44.
49. Moore KJ, Matlashewski G (1994) Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *Journal of immunology* 152: 2930-2937.

50. Lisi S, Sisto M, Acquafredda A, Spinelli R, Schiavone M, et al. (2005) Infection with *Leishmania infantum* Inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. *The Journal of eukaryotic microbiology* 52: 211-217.
51. Ruhland A, Leal N, Kima PE (2007) *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cellular microbiology* 9: 84-96.
52. Akarid K, Arnoult D, Micic-Polianski J, Sif J, Estaquier J, et al. (2004) *Leishmania* major-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. *Journal of leukocyte biology* 76: 95-103.
53. Donovan MJ, Maciuba BZ, Mahan CE, McDowell MA (2009) *Leishmania* infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner. *Experimental parasitology* 123: 58-64.
54. Zhang FR, Huang W, Chen SM, Sun LD, Liu H, et al. (2009) Genomewide association study of leprosy. *The New England journal of medicine* 361: 2609-2618.
55. Schurr E, Alcais A, de Leseleuc L, Abel L (2006) Genetic predisposition to leprosy: A major gene reveals novel pathways of immunity to *Mycobacterium leprae*. *Seminars in immunology* 18: 404-410.
56. Llanos-Cuentas EA, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC, Campos M (1984) Possible risk factors in development of mucosal lesions in leishmaniasis. *Lancet* 2: 295.
57. Alcais A, Abel L, David C, Torrez ME, Flandre P, et al. (1997) Risk factors for onset of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 57: 79-84.
58. Machado-Coelho GL, Caiaffa WT, Genaro O, Magalhaes PA, Mayrink W (2005) Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 99: 55-61.

FIGURE LEGENDS

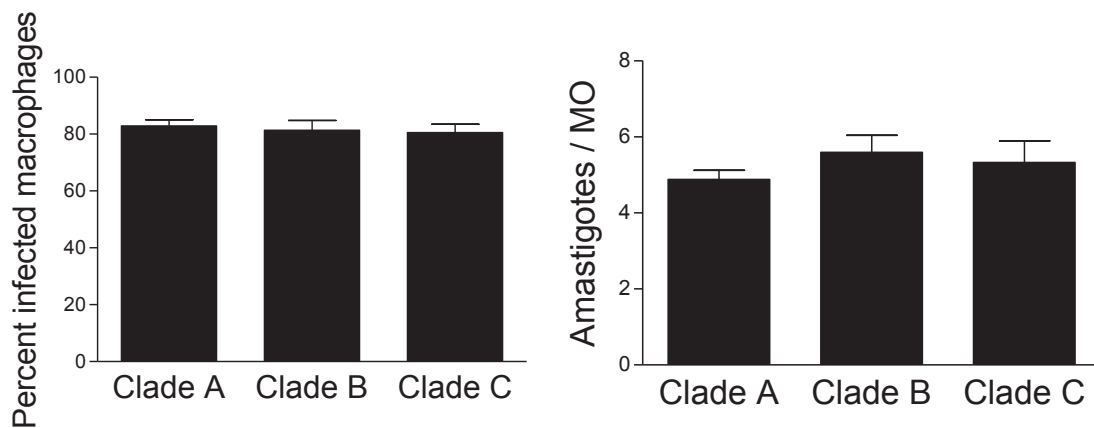


Figure 1. Parasite loads in infected MDMs used in for micrarrays. (A) The percentage of macrophages infected with each isolate of *L. braziliensis* of clades A, B or C in four replicated donors, at a 2:1 parasite:macrophage ratio for four hours, was quantified microscopically. (B) The mean number of intracellular *L. braziliensis* parasites per infected macrophage was quantified microscopically for each of the clades A, B or C representatives in MDMs from four replicate donors. Data show the mean \pm SE after quantifying at least 400 macrophages per condition in MDMs from each donor.

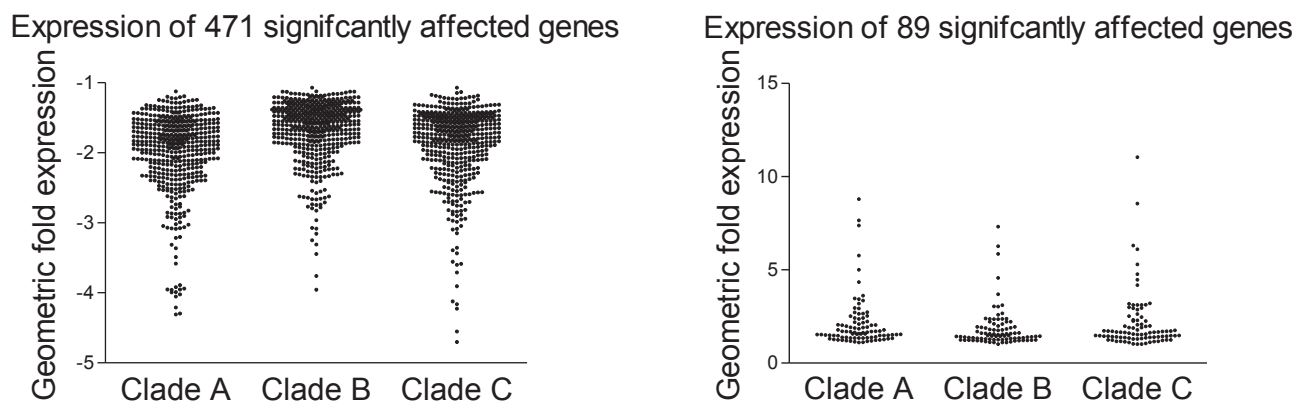
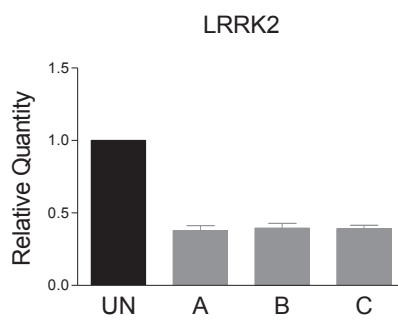
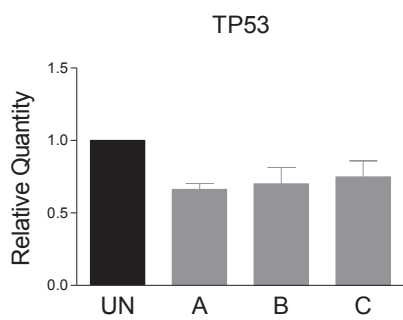
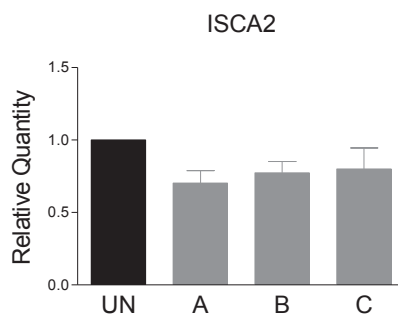
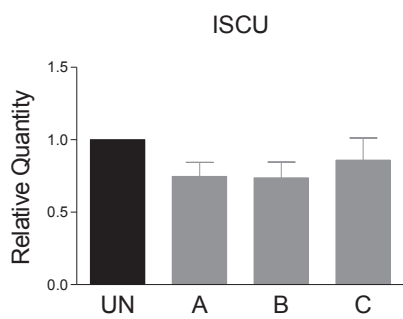
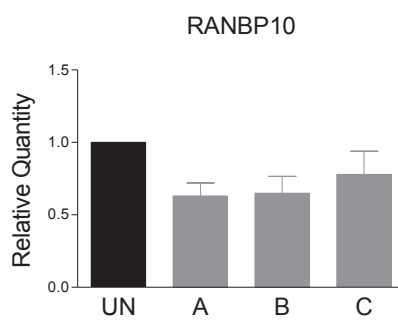
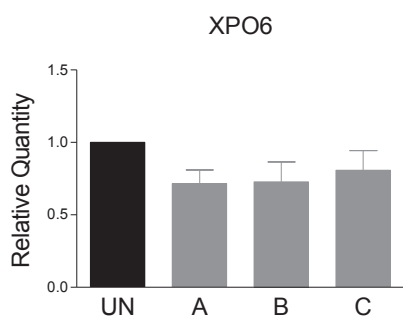
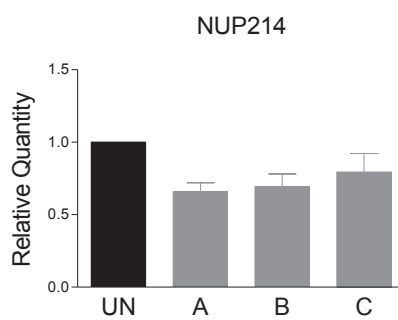
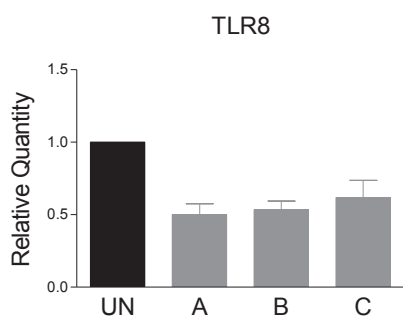


Figure 2. Global changes in gene expression. MDMs from four healthy human donors were infected at a 2:1 parasite:MDM ratio with each of three *L. braziliensis* isolates, representative of each of the three described clades [8]. The clade A isolate was from a patient with DL, the clade B isolate was from a patient with CL, and the clade C parasite was from a subject with ML. After 4 hours, total RNA was extracted and processed for hybridization to Affymetrix human transcript microarrays. Fold changes were calculated by comparing fluorescence data representing the abundance of each transcript in infected versus uninfected MDMs from the same donor. Each dot in the figure represents the average fold change in abundance of each transcript in all four donors. A majority of changes in transcript abundance revealed a decrease in expression upon infection of MDMs with any of the 3 clades. The figure shows fold changes in the 89 transcripts that were significantly increased, and 471 transcripts that were significantly decreased after infection with each of the three *L. braziliensis* isolates, shown as the fold decrease in expression relative to uninfected MDMs.



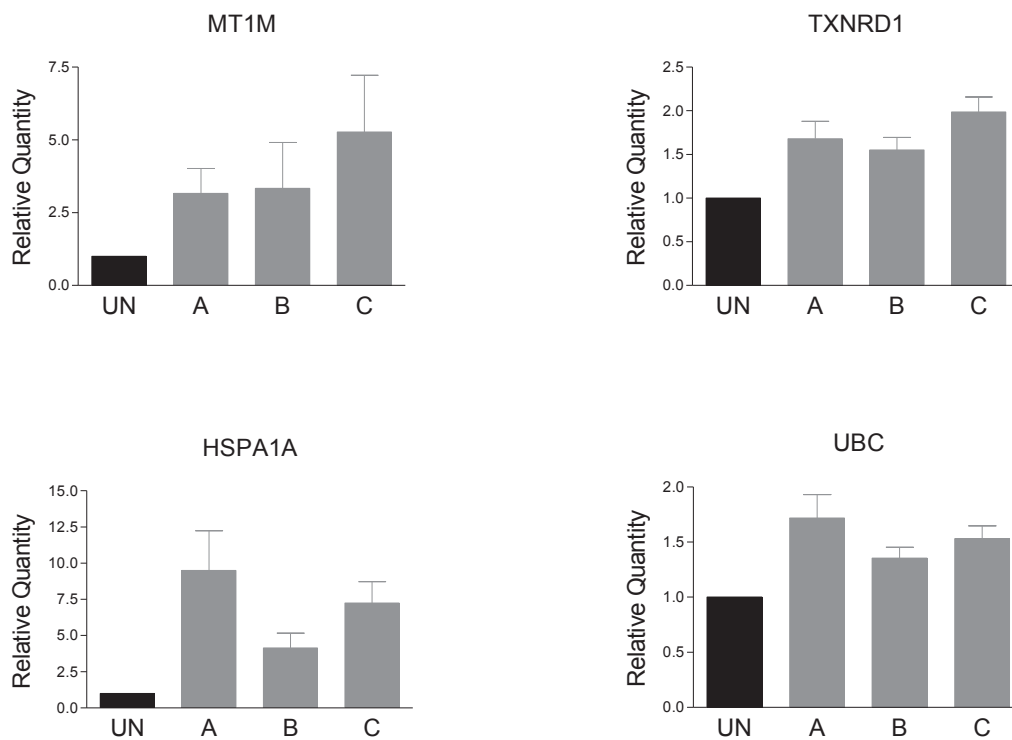


Figure 3. Validation of changes in gene expression observed on microarrays was performed using the original four RNA samples included in microarray analysis shown in Figure 2. Validation was performed by reverse transcriptase - qPCR. **Panels A to H:** Selected transcripts whose expression was down-regulated according to Affymetrix microarrays were chosen for validation. Data show the average fold changes in transcript abundance comparing uninfected MDMs with MDMs infected with each clade. **Panels I to L:** Selected transcripts whose expression was up-regulated in MDMs infected with each of the three *L. braziliensis* isolates were validated. Data are shown as the average fold-change induced by each parasite clade relative to uninfected MDMs from the same donor.

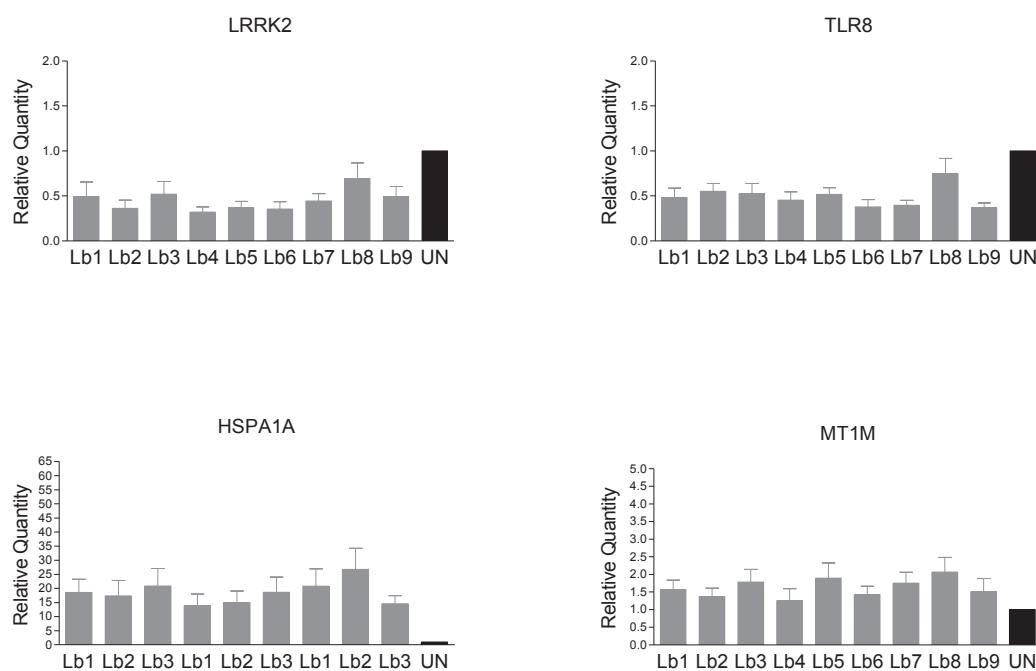
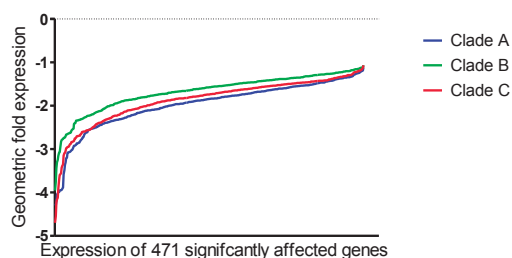


Figure 4. Validation in MDMs from additional human donors. Four significantly changed transcripts, LRRK2, TLR8, HSPA1A and MT1M expression levels in MDMs from eight healthy donors were infected with nine parasite isolates, three each belonging to *L. braziliensis* clades A (Lb1-3), B (Lb4-6) or C (Lb7-9). MDMs were infected at a parasite:macrophage ratio of 2:1. After 4 hours, MDMs were harvested and total RNA was extracted. The relative levels of LRRK2, TLR8, HSPA1A and MT1M expression were assessed by RT-qPCR. The MDMs were derived from human subjects, distinct from those contributing to the experiments depicted in figures 1, 2, 3 and 4.

Original figure 5B: Net repressing power: Genes ranked in each clade independently and graphed according to their positions in each clade after ranking (i.e. each position in the x axis is a particular gene that may be different between clades and at y their corresponding expressions)



Optional figure 5B: Net repressing power: Genes paired across clades and then ranked in each clade according to clade A gene position after ranking. (i.e. each position in the x axis is a particular gene and at y its expression)

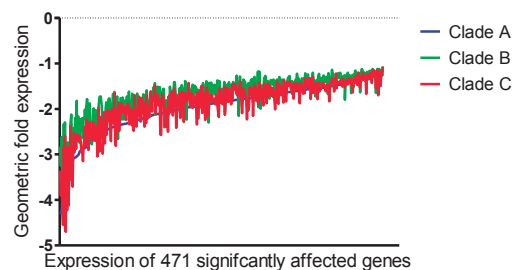


Figure 5. Gene expression profiles from the microarrays described and illustrated in Figure 2 were collated according to the number of significantly altered transcripts induced by MDM infection with isolates from each of the three *L. braziliensis* clades (A, B or C). Panel (A) shows a Venn diagram of the distribution of transcripts with changes in expression that reached statistical significance upon infection of MDMs with each infecting *L. braziliensis* parasite. Sectors indicate the numbers of transcripts that were uniquely changed due to infection with one parasite clade, or transcripts that were changed by infection with more than one parasite clade. (B) The magnitude of change in gene expression for each of 471 genes in each of the three *L. braziliensis* isolates is illustrated. Values represent the change in expression of the 471 genes for which transcript abundance was significantly decreased by infection with any of the three parasite isolates tested. The fold change in 471 repressed transcripts is plotted for *L. braziliensis* isolates belong to clade A (DL; red), clade B (CL; green) or clade C (ML; blue). Each position on the x axis corresponds to a single gene, plotted against its fold change in expression on the y-axis.

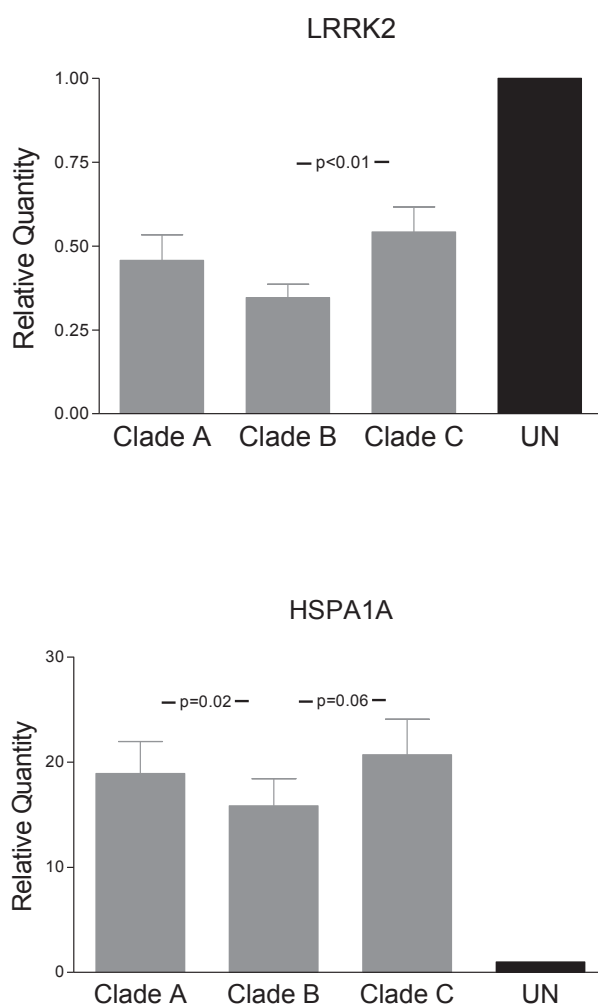


Figure 6. Changes in LRRK2 or HSPA1A expression was documented in MDMs infected with the same three representative *L. braziliensis* isolates of clades A, B or C used in microarray experiments. MDMs were isolated from eight healthy donors distinct from those used for experiments depicted in figures 1, 2, 3 and 4. Data were derived from total RNA extracted after four hours of MDM infection at an MOI of 2 parasites per macrophage (2:1). The relative abundance of TLR8 or LRRK2 expression was assessed by RT-qPCR. P values correspond to pair-wise comparisons by one tailed paired Wilcoxon test.

Supplemental Table 1. Examples of human monocyte derived macrophage genes whose expression was significantly changed by infection with *L. braziliensis* of clades A, B and C from Corte de Pedra.

Functional group	Gene	Log ₂ change in expression relative to uninfected MDMs, per infecting clade	Clade			Gene description
			A	B	C	
DECREASED EXPRESSION						
Signal propagation						
Surface receptors	TLR8	-2.5	-1.9	-2.5		Toll-like receptor 8
	IL-10RA	-1.2	-0.9	-1.1		Interleukin 10 receptor, alpha subunit
	IL-10RB	-0.8	-0.5	-0.7		Interleukin 10 receptor, beta subunit
	IL-12RB1	-1.8	-1.5	-1.5		Interleukin 12 receptor, beta one subunit
	IL-15RA	-2.2	-1.7	-1.9		Interleukin 15 receptor, alpha subunit
Signal transduction	MYD88	-1.7	-1.5	-1.6		Myeloid differentiation primary response (88); Activates NF-κB
	PELI1	-1.9	-1.9	-2.1		Pellino-related intracellular-signaling molecule; Activates NF-κB
	ECT2	-2.6	-2.0	-2.3		Epithelial cell transf. sequence 2 oncogene; Activates NF-κB
	VISA	-1.7	-2.0	-1.8		Virus-induced signaling adapter; Activates NF-κB
	NOD2	-2.4	-2.7	-2.5		Nucl.-bind. oligomerization domain cont. 2; Activates NF-κB
	STAT1	-1.4	-1.2	-1.4		Signal transduction & activation of transcription 1 JAK-STAT
	STAT5A	-1.6	-1.4	-1.4		Signal transduction & activation of transcription 5 JAK-STAT
	TYK2	-1.8	-1.6	-1.7		Non-receptor member of JAK family; JAK-STAT pathway
	JAK2	-2.2	-2.1	-2.4		Janus kinase 2; JAK-STAT pathway
	MAP2K5	-1.2	-1.5	-1.7		Mitogen-activated protein kinase kinase 5; MAPK pathway
	MAP2K3	1.9	1.8	1.9		Mitogen-activated protein kinase kinase 3; MAPK pathway
	ICK	-2.3	-1.9	-2.5		Intestinal cell (MAK-like) kinase; Possibly MAPK pathway
	TRAF7	-1.4	-1.3	-1.3		TNF receptor-associated factor 7; MKKK of MAPK pathway
	PLCB2	-1.7	-1.6	-1.9		Phospholipase C, beta 2 chain; Activates Phospholipase C
	CAMKK2	-1.9	-1.6	-1.8		Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2
	MFNG	-1.9	-1.5	-1.8		Manic fringe; Notch signaling pathway

Transcriptional regulators	TRERF1	-1.9	-1.6	-1.5	Transcriptional regulator	
Nuclear pore function	XPO6	-1.5	-1.5	-1.6	Exportin 6; nuclear pore protein transporter	
	RANBP10	-2.0	-1.7	-1.8	RAN binding prot 10; nuclear pore transport	
	NUP62	-1.4	-1.3	-1.4	Nucleoporin 62kDa	
	NUP93	-1.6	-1.4	-1.5	Nucleoporin 93kDa	
	NUP214	-1.8	-1.3	-1.6	Nucleoporin 214kDa	
Mitochondrial function						
Electron transport	ISCU	-1.5	-1.4	-1.5	Iron-sulfur cluster scaffold homolog	
	ISCA2	-2.4	-1.8	-2.3	Iron-sulfur cluster assembly 2 homolog	
	NDUFA11	-1.4	-1.3	-1.4	NADH dehydrogenase subunit, mitochondrial encoded	
	NDUFC1	-1.4	-1.3	-1.4	NADH dehydrogenase subunit, mitochondrial encoded	
	NDUFB10	-1.5	-1.3	-1.4	NADH dehydrogenase subunit, mitochondrial encoded	
	NDUFB3	-1.8	-1.5	-1.7	NADH dehydrogenase subunit, mitochondrial encoded	
	NDUFS3	-1.6	-1.4	-1.5	NADH dehydrogenase subunit, mitochondrial encoded	
	NDUFS2	-1.7	-1.4	-1.5	NADH dehydrogenase subunit, mitochondrial encoded	
	NDUFB8	-1.3	-1.2	-1.2	NADH dehydrogenase subunit, mitochondrial encoded	
	TFAM	-1.5	-1.3	-1.5	Transcription factor A, mitochondrial; encoded in the nucleus	
	Mitochondrial protein Synthesis	MRPS14	-2.3	-2.2	-2.0	Mitochondrial ribosomal protein S14; encoded in the nucleus
		MRPS35	-1.5	-1.4	-1.5	Mitochondrial ribosomal protein S35; encoded in the nucleus
		MRPL16	-2.0	-1.7	-1.8	Mitochondrial ribosomal protein L16; encoded in the nucleus
		MRPL19	-1.8	-1.5	-1.9	Mitochondrial ribosomal protein L19; encoded in the nucleus
MRPL41		-1.7	-1.4	-1.5	Mitochondrial ribosomal protein L41; encoded in the nucleus	
MRPL52		-1.5	-1.3	-1.5	Mitochondrial ribosomal protein L52; encoded in the nucleus	
MRP63	-1.6	-1.4	-1.5	Mitochondrial ribosomal protein 63; encoded in the nucleus		
PDHB	-1.8	-1.5	-1.7	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta		
Apoptosis						
	TP53	-1.5	-1.5	-1.8	Tumor protein p53; Tumor suppressor	
	MAPK14	-1.7	-1.5	-1.6	Phosphorylates and activates TP53	
	FRAP1	-2.2	-1.8	-2.0	Phosphorylates and activates TP53	
	YPEL3	-2.9	-2.2	-2.7	Tumor suppressor directly induced by TP53	

	MRPL41	-1.7	-1.4	-1.5	TP53 translocation to mitochondrion
Parkinson's disease					
	LRRK2	-3.9	-3.1	-4.1	PARK8; Induces apoptosis; Interacts with PARKIN and DJ-1
	DJ-1	-1.3	-1.2	-1.2	PARK7; Redox-sensitive chaperone and sensor of oxidative stress
	NUB1	-1.7	-1.6	-1.7	Negative regulator of ubiquitin-like proteins 1; Part of Lewy bodies
INCREASED EXPRESSION					
		Clade			
		A	B	C	
Transcriptional regulation	HIC1	3.6	2.7	2.9	Transcription repressor Hypermethylated in Cancer 1
Apoptosis	ETS2	2.4	1.9	2.1	Probably transcriptional activator of TP53
Environmental response					
Metal binding	MT1M	7.6	6.3	11.0	Metallothionein 1M
	MT1X	2.7	2.4	3.2	Metallothionein 1X
	MT1F	2.6	2.4	3.2	Metallothionein 1F
	MT1E	3.4	3.0	4.2	Metallothionein 1E
	MT1G	2.7	2.4	3.1	Metallothionein 1G
	MT1H	2.7	2.4	3.1	Metallothionein 1H
Antioxidant response	TXNRD1	1.3	1.3	1.4	Thioredoxin reductase 1
Stress response	HSPA1A	5.8	4.6	6.1	Heat shock 70kDa protein 1A
Proteasomal degradation					
	UBC	1.2	1.1	1.2	Ubiquitin C; proteasome
	UBAP1	1.5	1.4	1.4	Ubiquitin associated protein 1 target ubiquitination
	SPSB1	2.4	2.1	2.2	Substrate recognition-E3 ubiquitin-protein ligase complex
	KLHL21	1.7	1.6	1.7	Kelch-like 21; Adapter of an E3 ubiquitin-protein ligase complex
	USP12	1.6	1.4	1.5	Ubiquitin specific peptidase 12; Deubiquitinating enzyme

Table 2. Changes in expression of ten transcripts in MDMs infected with *L. braziliensis* isolates belonging to each clade (A, B or C). Data show the mean fold induction of transcripts in infected relative to uninfected MDMs 4 hours after parasite exposure. Results from both DNA microarrays and reverse transcriptase qPCR are shown.

Transcript	Clade	Fold change		Ratio A,C/B	
		microarray	qPCR	micro-array	qPCR
MT1M	A	7.65333	2.660	1.22	1.11
MT1M	B	6.26874	2.405	-	-
MT1M	C	11.0482	4.945	1.76	2.06
HSPA1A	A	5.76296	4.869	1.26	1.50
HSPA1A	B	4.56290	3.249	-	-
HSPA1A	C	6.10136	4.414	1.34	1.36
MT1X	A	2.66164	3.880	1.12	1.34
MT1X	B	2.38380	2.898	-	-
MT1X	C	3.20276	5.642	1.34	1.95
TXNRD1	A	1.33681	1.524	1.00	0.98
TXNRD1	B	1.33406	1.560	-	-
TXNRD1	C	1.37657	1.855	1.03	1.19
UBC	A	1.17872	1.444	1.06	1.13
UBC	B	1.11101	1.283	-	-
UBC	C	1.16969	1.351	1.05	1.05
DJ-1	A	-1.33309	0.8432	1.14	0.89
DJ-1	B	-1.16936	0.9488	-	-
DJ-1	C	-1.23954	0.9853	1.06	1.04
TRERF1	A	-1.91508	0.4530	1.18	0.93
TRERF1	B	-1.61773	0.4860	-	-
TRERF1	C	-1.48509	0.5736	0.92	1.18
IL-15RA	A	-2.18693	0.6243	1.29	1.15
IL-15RA	B	-1.68930	0.5412	-	-
IL-15RA	C	-1.87872	0.6933	1.11	1.28
TLR8	A	-2.51452	0.4346	1.33	0.95
TLR8	B	-1.88416	0.4581	-	-
TLR8	C	-2.54483	0.4817	1.35	1.05
LRRK2	A	-3.88733	0.5367	1.26	0.97
LRRK2	B	-3.08211	0.5532	-	-
LRRK2	C	-4.12024	0.4819	1.34	0.87

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do Projeto: O PAPEL DO POLIMORFISMO DA *Leishmania braziliensis* NO DESFECHO CLÍNICO E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS LEISHMANIOSES TEGUMENTARES POR ESTES PARASITOS.

Objetivo do Projeto: Comparar os efeitos que cepas pertencentes a clados de *L. braziliensis* de Corte de Pedra associados a LC, LM e LD exercem sobre a expressão gênica global das células de voluntários sadios (hospedeiros *in vitro*) infectadas com esses parasitos em paralelo.

Nome do paciente:

Investigador Principal: Albert Schriefer, médico, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brazil.

Comitê de Ética: Maternidade Climério de Oliveira/UFBA-Rua Padre Feijó 240, Ambulatório Magalhães Neto, 3^o andar, Canela-Salvador-Bahia.

Nº do Projeto:

QUAL O OBJETIVO DESTE ESTUDO?

Este é um estudo científico. O objetivo deste estudo é determinar a forma pela qual as células do sistema imune interagem com a *Leishmania braziliensis* e defendem os seres humanos nas infecções com esses agentes.

Nós estamos te convidando a participar deste estudo porque o seu sistema imune é normal e você está atualmente sadio. Nós usaremos células do sangue de indivíduos sadios como você a fim de testar as respostas dos macrófagos e outras células importantes do seu sistema imune contra a infecção com a leishmania.

QUANTAS PESSOAS PARTICIPARÃO DO ESTUDO?

Até 60 pessoas poderão participar deste estudo a ser conduzido pela Universidade Federal da Bahia, que contará com a colaboração da Universidade de Iowa / Estados Unidos em parte das avaliações laboratoriais.

QUANTO TEMPO EU PARTICIPAREI DESTE ESTUDO?

Se você aceitar participar, o seu envolvimento durará apenas uma visita, que deverá levar cerca de 30 a 45 minutos.

O QUE ACONTECERÁ DURANTE ESTE ESTUDO?

Os procedimentos explicados a seguir serão realizados neste estudo. Nós iremos aplicar um torniquete ao seu braço e limpar seu braço com álcool. Com

uma seringa e agulha estéreis, nós iremos tirar sangue de uma veia do seu braço. Então nós iremos pedi-lo para permanecer sentado na sala de coleta ou ante-sala até termos certeza de que qualquer sangramento resultante do procedimento tenha cessado e que você não apresente reações adversas. Nós iremos tirar 60 a 120 mL do seu sangue, o que é equivalente a uma xícara e meia aproximadamente. Essa quantidade é inferior àquela geralmente coletada pelos bancos de sangue brasileiros durante os procedimentos de doação de sangue.

O QUE SERÁ FEITO COM A AMOSTRA DE SANGUE QUE EU ESTOU DOANDO PARA O ESTUDO?

Dessa amostra de sangue total serão obtidas células do sistema imunológico chamadas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP). Estas CMSP serão cultivadas e infectadas com diferentes cepas de leishmania da espécie *Leishmania braziliensis*. Após algumas horas a um dia de infecção será avaliada a expressão de diferentes genes nessas CMSP infectadas, e comparados que genes foram ativados nas CMSP infectadas com cada uma das diferentes cepas. O método a ser usado na avaliação da expressão gênica é o micro-arranjo de DNA. Este método oferece a vantagem de avaliar até 30 mil genes diferentes de uma só vez, facilitando a comparação dos efeitos das diferentes cepas de leishmania sobre as CMSP infectadas. Como as CMSP têm um papel fundamental na patogênese das leishmanioses, ou seja, na geração de doença, essas avaliações permitirão inferir se as diferentes cepas de leishmania induzem comportamentos biológicos distintos nessas células, que possam justificar a variedade de quadros clínicos das leishmanioses causadas pela *Leishmania braziliensis*.

QUAIS SÃO OS RISCOS DESTE ESTUDO?

Os possíveis riscos associados à coleta dessa quantidade de sangue são: (1) Você poderá apresentar perda momentânea da consciência devido ao reflexo vago-vagal; (2) Você também poderá apresentar sangramento e / ou infecção no local da retirada do sangue.

COMO ESTES RISCOS SERÃO MINIMIZADOS?

Caso você apresente qualquer doença aguda ou crônica, esteja fazendo uso de quaisquer medicações, ou tiver doado sangue nos últimos dois meses então você não poderá participar deste estudo. Você não precisa revelar a natureza da sua condição médica caso apresente alguma doença aguda ou crônica. Para minimizar os riscos envolvidos com o procedimento a que você irá se submeter, você deverá fazer uma refeição antes da coleta de sangue (por exemplo, tomar o café da manhã), e esta coleta será realizada com você sentado para evitar tonturas ou perda transitória da consciência devido ao reflexo vago-vagal. Caso você esteja se sentindo muito ansioso, o procedimento não será realizado. Para evitar sangramento no local da picada da agulha, este local será pressionado com gaze ou algodão após o procedimento. Por outro lado, a infecção do local da picada ou mesmo sistêmica serão evitadas limpando-se esse local a ser puncionado com álcool e

usando-se materiais estéreis. Se em qualquer momento nós notarmos que você está parecendo ansioso ou apresentando sinais de reflexo vago-vagal, o procedimento será interrompido. Em caso de reflexo vago-vagal você ficará deitado enquanto se recupera. Um dos médicos da equipe estará presente durante o procedimento, e apenas indivíduos experientes na coleta de sangue realizarão o procedimento.

QUAIS OS BENEFÍCIOS DESTE ESTUDO?

Pode não haver qualquer benefício pessoal para você como consequência de sua participação neste estudo. Contudo, nós esperamos que, no futuro, a sociedade possa se beneficiar deste estudo por ele resultar numa melhor compreensão desta doença parasitária freqüente, que poderá, inclusive, ajudar no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento.

A PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO IRÁ ME OCASIONAR CUSTOS?

Você não terá quaisquer custos por participar neste projeto de pesquisa.

EU SEREI PAGO PARA PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Você não será compensado por participar deste projeto de pesquisa

QUEM ESTÁ PAGANDO ESTE ESTUDO?

O National Institutes of Health (NIH), agência semelhante ao Ministério da Saúde nos Estados Unidos, está custeando este estudo.

E SOBRE A CONFIDENCIALIDADE DOS MEUS DADOS PESSOAIS?

A confidencialidade dos arquivos de dados dos participantes deste projeto de pesquisa será mantida dentro dos limites permitidos pela lei. Contudo, as agências reguladoras dos governos brasileiro ou americano, bem como os comitês de ética da Universidade Federal da Bahia e da Universidade de Iowa (comitês que revisam e aprovam projetos de pesquisa de acordo com a sua adequação aos preceitos éticos de estudos envolvendo seres humanos) podem inspecionar ou copiar dados deste estudo. É possível que esses dados contenham informações que lhe identifiquem. No caso de serem publicados trabalhos com os dados deste estudo, em revistas de circulação nos meios científico ou leigo, a sua identidade não será revelada. Os resultados serão publicados de forma sumarizada não sendo possível identificá-lo como participante.

A PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO É VOLUNTÁRIA?

A participação neste estudo é voluntária. Você pode escolher não tomar parte deste projeto de pesquisa. Se você concordar em participar deste estudo, você poderá interromper sua participação a qualquer momento.

E SE EU TIVER DÚVIDAS?

Quaisquer questionamentos são encorajados. Se você tiver qualquer dúvida sobre este projeto de pesquisa, sinta-se à vontade para contactar o Dr. Albert Schriefer (Coordenador do projeto), (71) 3237-7353. Se você tiver dúvidas sobre os direitos dos participantes de pesquisas ou sobre injúrias secundárias à participação em projetos de pesquisa, favor contactar o Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira / Universidade Federal da Bahia, Salvador, (71) 3203-2740, e-mail cep_mco@yahoo.com.br.

DIREITOS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Eu li ou leram para mim as informações deste termo de consentimento livre e esclarecido acima. O Dr. Schriefer ou um representante dele explicou o estudo para mim e respondeu a todas as minhas dúvidas. Me foram listados também os riscos e incômodos a que serei submetido, bem como os possíveis benefícios gerados por este estudo.

Também me foi dito que eu não tenho que tomar parte deste estudo e que eu posso me recusar a participar a qualquer momento.

A equipe médica do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos estará disponível para quaisquer cuidados médicos que se mostrem necessários devido a injúrias resultantes da minha participação neste estudo. Além do mais, o Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, ou o patrocinador do estudo, cobrirá quaisquer despesas resultantes de cuidados médicos relativos à minha participação neste estudo.

Os meus direitos como participante da pesquisa me foram esclarecidos e eu, voluntariamente, consinto na minha participação no estudo. Me foram esclarecidos o estudo e as razões de sua realização. Eu receberei uma cópia assinada deste termo de consentimento livre e esclarecido para arquivar, como documentação da minha participação como voluntário neste estudo.

Assinatura do participante

Data

Assinatura do responsável do participante* / Data responsável*

Nome do

Assinatura da testemunha

/ Data

Nome da testemunha

* Requerido apenas se o participante não for competente para tomar decisões

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

Eu discuti os pontos acima com o participante do estudo ou seu representante legal. É da minha opinião que o participante entende os riscos, benefícios e obrigações envolvidos em sua participação neste projeto de pesquisa.

Assinatura do investigador