

TITULO:

Perfil transcriptômico de células sanguíneas estimuladas com saliva de flebotomíneos: estudo dos eventos iniciais da interação vetor-parasito-hospedeiro.

TITLE:

Transcriptomic profile of blood cells stimulated with phlebotomine saliva: study of the initial events of the vector-parasite-host interaction.

PALAVRAS-CHAVE: Saliva, Transcriptoma, Resposta imune, *Lutzomyia intermedia* e *Lutzomyia longipalpis*.

KEYWORDS: Saliva, Transcriptome, Immune response, *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia longipalpis*

RESUMO:

A saliva dos flebotomíneos transmissores do parasita leishmania possui uma variedade de agentes farmacológicos, como anticoagulantes, vasodilatadores além de moléculas imunomoduladoras e anti-inflamatórias. A saliva de *Lu. intermedia* e de *Lu. longipalpis* provocam o aumento da infecção por diferentes espécies de Leishmania, em modelos experimentais. Entretanto a pré-exposição à saliva de *Lu. longipalpis* confere proteção a infecção, enquanto a pré-exposição à saliva de *Lu. intermedia* causa exacerbação da doença. Neste trabalho estimulamos as células do sangue total de voluntários sadios com a saliva de *Lu. intermedia* ou *Lu. intermedia* + *L. braziliensis* ou de *Lu. longipalpis* e, posteriormente, o RNA foi extraído e utilizado no sequenciamento em larga escala (RNAseq). O estudo demonstrou que a saliva dos dois vetores promove a modulação da expressão de diversos genes envolvidos em processos biológicos semelhantes. Foram identificados quatro processos biológicos comuns às salivas dos dois flebotomíneos: quimiotaxia; regulação da produção de citocinas; regulação da ativação celular e resposta inflamatória. Os genes envolvidos nesses processos comuns foram avaliados quanto a sua expressão, os resultados indicam que a saliva de *Lu. intermedia* promove uma modulação mais robusta do que a saliva de *Lu. longipalpis*. Definimos um conjunto de genes encontrados exclusivamente na amostra estimulada com a saliva de *Lu. intermedia*, tais como MMP1, CCL3, CCL3L1 e TIMP. Da mesma forma, encontramos um outro

conjunto de genes expresso exclusivamente em células estimuladas com a saliva de *Lu. longipalpis*, tais como ENPP2 e IDO. Juntos esses achados nos informam sobre os efeitos imunomoduladores da saliva de flebotomíneos, o que pode ser relevante na resposta imunológica de indivíduos continuamente expostos à saliva desses vetores. Além disso as hipóteses geradas por esse estudo podem determinar pontos chave e possíveis alvos de interferência exógena para impedir o sucesso da infecção.

ABSTRACT:

The saliva of Leishmania parasite-transmitting sand flies has a variety of pharmacological agents, such as anticoagulants, vasodilators and immunomodulatory and anti-inflammatory molecules. *Lu. intermedia* and *Lu. longipalpis* saliva cause the increase of infection by different species of Leishmania in experimental models. However, pre-exposure to *Lu. longipalpis* saliva protects the infection while pre-exposure to *Lu. intermedia* saliva causes exacerbation of the disease. In this paper we stimulate whole blood cells of healthy volunteers with *Lu. intermedia* saliva or *Lu. intermedia* + *L. braziliensis* or *Lu. longipalpis* and subsequently RNA was extracted and used for large-scale sequencing (RNAseq). The study showed that the saliva of both vectors promotes the modulation of several genes involved in similar biological processes. Four biological processes common to the saliva of the two sandflies were identified: chemotaxis; regulation of cytokine production; regulation of cell activation and inflammatory response. The genes involved in these common processes were evaluated for their expression, it seems that the saliva of *Lu. intermedia* promotes more robust modulation than *Lu. longipalpis* saliva. We defined a set of genes found exclusively in the sample stimulated with *Lu. intermedia* saliva (MMP1, CCL3, CCL3L1 and TIMP). Similarly, we find another set of genes expressed exclusively in cells stimulated with *Lu. longipalpis* saliva (ENPP2 and IDO). Together these findings may provide further guidance on the pathogenesis of Leshmaniasis and the immune response of individuals continuously exposed to saliva from these vectors. In addition, the hypotheses generated by this study may determine key points and possible targets for exogenous interference to prevent infection success.

PRINCIPAIS RESULTADOS

-Observamos que, com o tempo inicial de 2 horas, o padrão de expressão gênica é mais semelhante ao obtido com a amostra controle, como podemos observar analisando o padrão de cores da amostra identificada como CTR (controle) e 2h (Figura 2A). Além disso é possível visualizar na porção inferior da figura que os colchetes agrupam a amostra controle e estimulada 2 horas, ratificando a maior similaridade.

-Avaliamos o número absoluto de DEGs após estimulação com SGS de *Lu. intermedia*. Após o período de 2 horas, observamos um total de 132 genes regulados positivamente e 46 genes regulados negativamente, enquanto que com 6 horas, 244 genes foram modulados positivamente e 113 genes foram modulados negativamente (Figura 3A).

-Análises foram conduzidas para células estimuladas com a saliva de *Lu. longipalpis*: no ponto de 2 horas de incubação, 198 genes foram regulados positivamente e 48 genes foram regulados negativamente, enquanto que com 6 horas de estimulação, um grande número de genes foi regulado positivamente (181), enquanto observamos um aumento de 4 vezes no número de genes regulados negativamente (208) (Figura 4A).

-Com base na determinação dos processos biológicos mais relevantes, observamos que quatro processos foram comumente regulados após a estimulação com a saliva de ambos vetores, são eles: quimiotaxia; regulação da produção de citocinas; regulação da ativação celular e resposta inflamatória.

-Foram encontrados um conjunto de genes modulado somente na presença da saliva de um ou de outro vetor. Na presença de *Lu. intermedia*, ressaltamos a modulação na expressão dos genes *MMP1*, *SPINK1* e *IL24*. Com relação à saliva de *Lu. longipalpis*, os genes cuja modulação foi mais elevada são: NR4A3, GJB2, FAP e WNT5A.

-Foram avaliados os genes diferencialmente expressos na presença de SGS de *Lu. intermedia* mais *L. braziliensis* após duas e/ou seis horas de estimulação, em comparação com o sangue estimulado apenas com SGS de *Lu. intermedia*. Neste caso, houve 164 genes estimulados e 49 genes suprimidos, após duas horas. Encontramos também 40 genes estimulados e 120 genes suprimidos após seis horas (Figura 7A e B).