

## RESUMO

### PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DE LESÕES PROVENIENTES DE PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE

**TEGUMENTAR.** Introdução: A Leishmaniose Tegumentar (LT) está entre as seis doenças negligenciadas prioritárias conforme a Organização Mundial de Saúde, acometendo cerca de 1 a 1,5 milhões de casos de indivíduos em todo o mundo, principalmente aqueles residentes em áreas tropicais e subtropicais do planeta. No Brasil, a LT apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país. A LT na região Sudeste da Bahia registra o maior número de casos, incluindo a região Vale de Jiquiriçá. Muitos estudos têm buscado esclarecer os mecanismos que controlam o desenvolvimento das lesões e a resposta imune envolvida. Técnicas de alto rendimento têm revelado alvos importantes na progressão da doença, entretanto, alguns mecanismos imunológicos ainda não foram totalmente elucidados. É importante identificar os principais fatores que impulsionam o sucesso do estabelecimento da infecção por *Leishmania* influenciando diretamente no desenvolvimento de diferentes formas clínicas. Dessa forma, durante a infecção, o hospedeiro pode induzir vias de resposta imune que contribuem para a resolução ou favorecimento da doença. Mais recentemente, o papel da via do Liver X Receptor (LXR) tem sido estudado em diferentes doenças infecciosas, incluindo a Leishmaniose. Objetivo: Nossa hipótese é que diferenças no perfil de expressão gênica em lesões de LT humana informam sobre os mecanismos imunopatológicos da LT. O objetivo geral foi o de comparar o perfil de expressão genica de moléculas envolvidas em vias metabólicas críticas das formas cutânea localizada (LCL), disseminada (LD) e mucosa (LM). Materiais e métodos: Trata-se de um estudo de corte transversal para caracterizar os aspectos imunopatológicos das lesões de pacientes com LCL (n=15), LD (n=7) e LM (n=8) usando o nCounter (nanosttring) e RNA-seq, abordagens modernas e de alto desempenho para caracterizar o transcriptoma das lesões. Para avaliar a expressão do LXR nas lesões, foi feita uma análise por microscopia óptica das amostras dos tecidos de LM, LD e mucosa sadia marcados por imuno-histoquímica (IHQ). Resultados: Entre os genes avaliados, 25 estavam regulados positivamente em relação à amostra de doadores normais tanto na LCL quanto na LM, como os do ICAM-1, Caspase 1, CXCL-10 e Granzimas A e B. Entretanto, cerca de 100 genes foram identificados isoladamente na LCL quando comparados com pele de doadores saudáveis ou na LM quando comparados com mucosa nasal saudável. A análise das vias canônicas mostrou regulação positiva da via do TREM-1 e NF-κB. Por outro lado, há uma modulação negativa das vias relacionadas à ativação do LXR/RXR. A análise por RNA-seq de amostras de 7 pacientes com LD e 4 doadores saudáveis mostrou 1.765 genes sobre expressos e 384 reprimidos na comparação doador normal. Na IHQ, as amostras de LCL e LM apresentaram redução ou ausência de células positivas para LXR enquanto na LD houve marcação moderada de LXR. Conclusão: Dessa forma podemos concluir que na LCL e na LM há ativação de varias vias pró-inflamatórias enquanto na LD há uma modulação negativa na resposta imune humoral e celular, conforme verificado tanto a nível transcripcional quanto de expressão da proteína LXR. Por outro lado, genes capazes de modular negativamente a resposta imune e contribuir para o processo de cicatrização, como o LTF e o EDNRB, estão regulados na LC e na LD, sugerindo mecanismos comuns de controle da inflamação.

**Palavras-chave:** 1. Leishmaniose Tegumentar; 2. Perfil transcriptômico; 3. Nanosttring; 4. RNA-seq.

## SUMMARY

### TRANSCRIPTOMIC PROFILE OF LESIONS FROM PATIENTS WITH DIFFERENT CLINICAL FORMS OF TEGUMENTARY LEISHMANIASIS.

**Introduction:** Cutaneous Leishmaniasis (LT) is among the six most important neglected diseases according to the World Health Organization, affecting approximately 1 to 1.5 million cases worldwide, occurring mainly in tropical and subtropical areas of the planet. In Brazil, LT has a wide distribution with case records in all regions, occurring mainly in the North and Northeast regions of the country. Vale de Jiquiriçá region, southeast region of Bahia, has the highest number of LT cases. Many studies have sought to clarify the mechanisms that control the development of the lesions and the immune response involved. High-throughput techniques have been shown to reveal important targets for disease progression, however, some immunological mechanisms have not yet been fully elucidated. It is important to identify the main factors that drive the successful establishment of Leishmania infection by directly influencing the development of different clinical forms. Thus, during infection, the host can induce immune response pathways that contribute to the resolution or favoring of the disease. More recently, the role of the Liver X Receptor pathway (LXR) has been studied in different infectious diseases, including Leishmaniasis. **Objective:** Our hypothesis is that differences in the gene expression profile in human LT lesions could reveal immunopathological mechanisms of LT. The general objective was to compare the genetic expression profile of molecules involved in the metabolic pathways of the localized cutaneous (LCL), disseminated (LD) and mucosal (LM) forms. **Materials and methods:** This is a cross-sectional study to characterize the immunopathological aspects of the lesions of patients with LCL (n = 15), LD (n = 7) and LM (n = 8) using nCounter and RNA-seq, modern and high-performance approaches to characterize the transcriptome of lesions. To evaluate the expression of LXR in the lesions, an optical microscopy analysis of immunohistochemical (IHC) -labeled tissue samples of LM, LD and healthy mucosa were performed. **Results:** Among the evaluated genes, 25 were positively regulated in relation to the sample of normal donors in both LCL and LM, such as ICAM-1, Caspase 1, CXCL-10 and Granzimas A and B. However, about 100 genes were only identified in LCL when compared to healthy donor skin or in LM when compared with healthy nasal mucosa. The analysis of the canonical pathways showed a positive regulation of the TREM-1 and NF-kB pathways. On the other hand, there is a negative modulation of the pathways related to LXR/RXR activation. Sequence RNA analysis of samples from 7 patients with LD and 4 healthy donors showed 1,765 genes over expressed and 384 repressed in the normal donor comparison. In IHC, LCL and LM samples showed reduction or absence of LXR positive cells while in LD there was moderate LXR labeling. **Conclusion:** In this way we could conclude that in LCL and LM there is activation of several proinflammatory pathways whereas in LD there is a negative modulation in the humoral and cellular immune response, as verified both at the transcriptional level and in expression of the LXR protein. On the other hand, genes capable of negatively modulating the immune response and contributing to the healing process, such as LTF and EDNRB, are regulated in LC and LD, suggesting common mechanisms of inflammation control.

**Key words:** 1. Cutaneous Leishmaniasis; 2. Transcriptomic profile; 3. Nanostring; 4. RNA-seq.

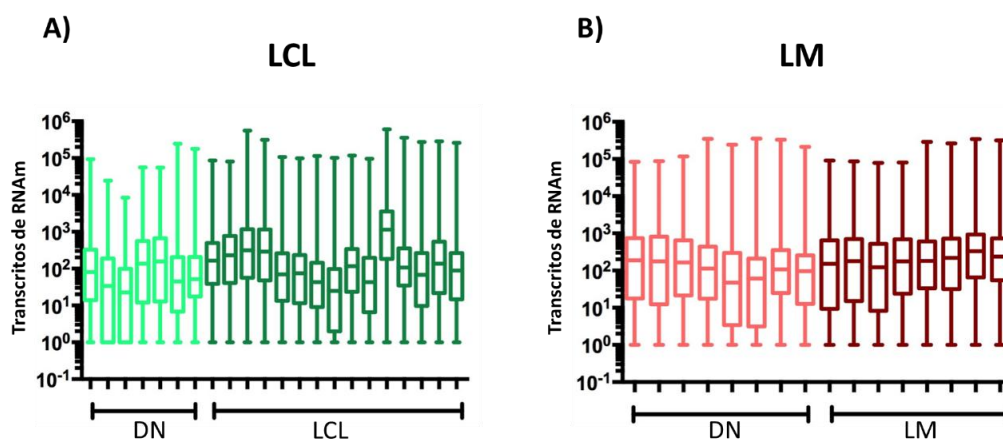
## Metadados

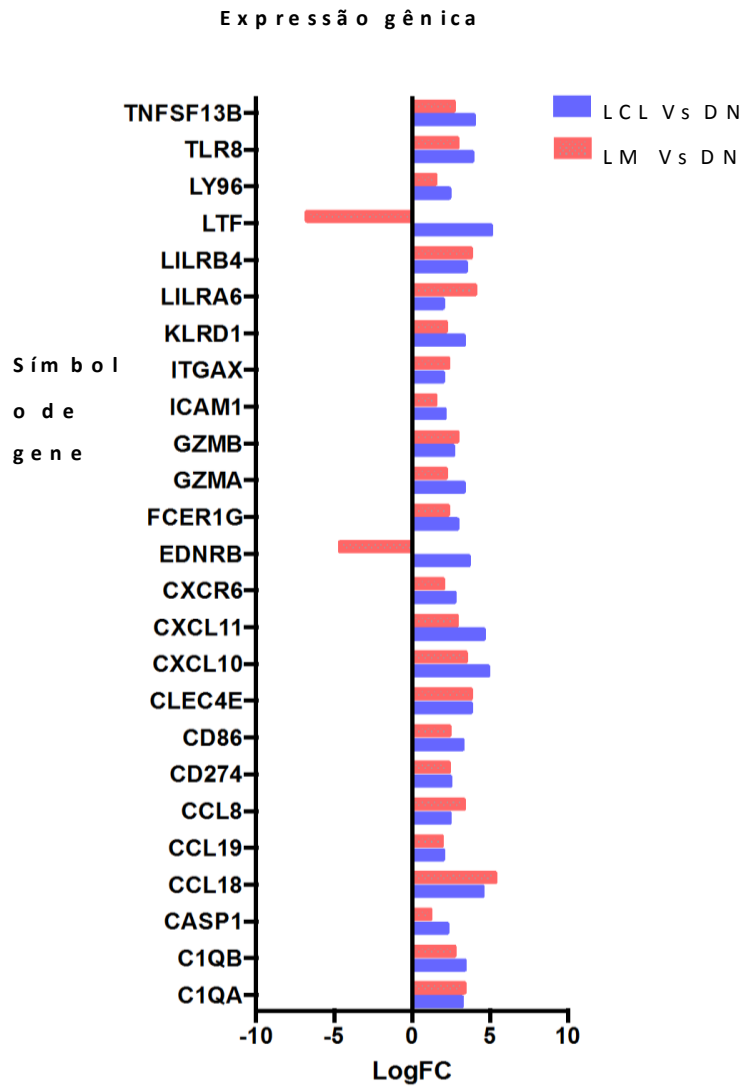
**Tabela 2:** Caracterização demográfica e clínica de 30 pacientes com leishmaniose tegumentar, de acordo com a forma clínica.

	LCL = 15	LD = 7	LM = 8
<b>Idade (anos)</b>	37 (10-65) n = 15	37,6 (18-56) n = 7	61,2 (50-76) n = 8
<b>Sexo % (proporção de masculino)</b>	46,6 (7/15)	100 (7/7)	62,5 (5/8)
<b>IDRM (% positivo)</b>	91,6 (11/12)	100 (6/6)	100 (8/8)
<b>Número de lesões</b>	1 (1-3) n = 14	78 (10-300) n = 7	1 n = 2
<b>Envolvimento da mucosa (%)</b>	0 (0/11)	40 (2/5)	100 (8/8)
<b>Presença de parasita (%)</b>	60 (6/10)	33,3 (2/6)	0 (0/5)

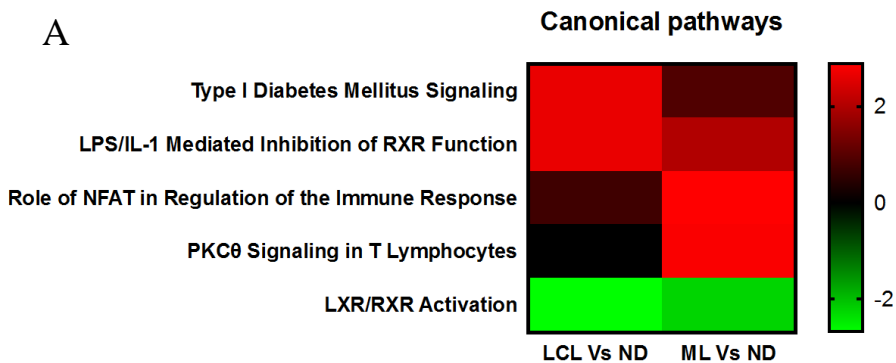
### V.2.1. Normalização de dados de expressão gênica

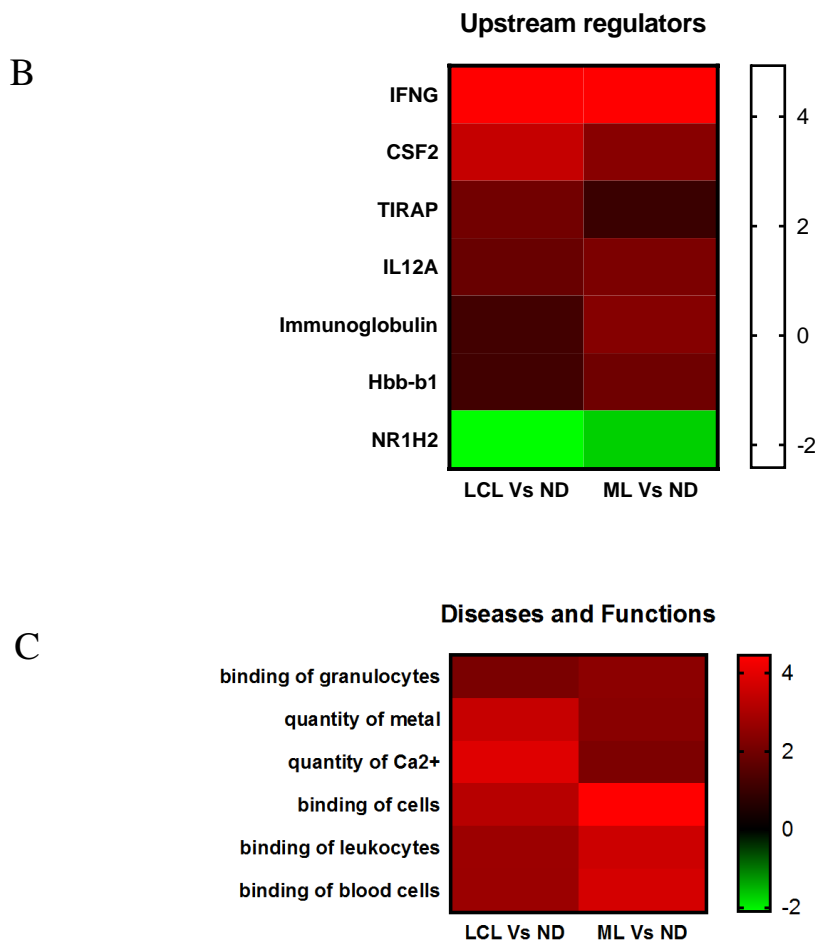
A figura 4A apresenta o resultado das distribuições dos valores de expressão entre amostras de LCL (n=15) e DN (n=7) e na figura 4B entre as amostras de LM (n=8) e DN (n=8).



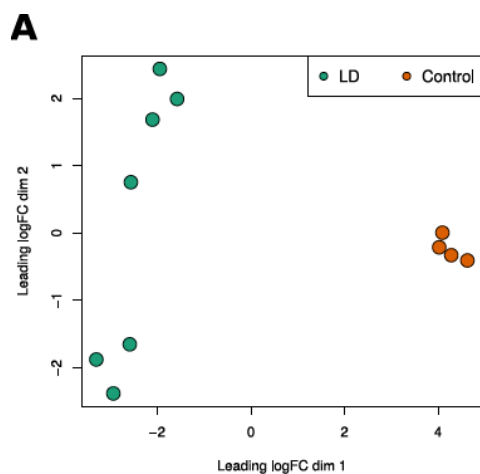


**Figura 6.** Lista dos 25 genes expressos nas biópsias de LCL e LM. Vias de enriquecimento da expressão gênica da LCL e LM: LogFC de genes regulados. A expressão gênica foi considerada significativa se  $\text{LogFC} > 1$  e valor  $p < 0,05$  ajustado. Para a análise de enriquecimento, utilizamos o software Ingenuity Pathway Analysis.





**Figura 7.** Vias de enriquecimento da expressão gênica da LCL e ML pelo software IPA: A) Enriquecimento da via canônica. B) Enriquecimento upstream. C) Enriquecimento de doenças e funções.



**Figura 10.** Agrupamento das amostras por metodologias não supervisionadas. A) Agrupamento através de escalonamento multidimensional. A distância entre cada par de amostras representa diferenças em termos de expressão gênica ( $\log_2$ -fold-change) nos indivíduos para os 500 genes que exibem maior variabilidade entre eles. LD, leishmaniose cutânea disseminada.

