



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



## TRABALHO DE TESE

**O polimorfismo genético intraespecífico e o comportamento biológico da infecção por *Leishmania braziliensis*.**

**Rosana Santos Sousa**

Salvador - Bahia  
2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**Rosana Santos Sousa**

**O polimorfismo genético intraespecífico e o comportamento  
biológico da infecção por *Leishmania braziliensis*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia, do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Nicolaus Albert B. Schriefer

Salvador - Bahia

2012

Ficha Catalográfica elaborada pela BUS – Biblioteca Universitária de Saúde da UFBA

S725 Sousa, Rosana Santos

O polimorfismo genético intraespecífico e o comportamento biológico da infecção por *Leishmania braziliensis* / Rosana Santos Sousa, 2012.

111 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Albert Schriefer.

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2012.

1. Leishmaniose tegumentar americana. 2. Polimorfismo genético. 3. *Leishmania braziliensis*. 4. Microarranjo de DNA.  
I. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde.  
II. Schriefer, Albert. III. Título.

CDU 616.993.161



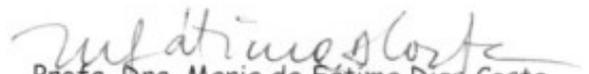
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



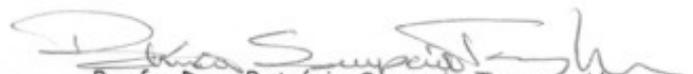
ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DO TRABALHO DE TESE DO DOUTORANDO  
ROSANA SANTOS SOUSA

Aos dois dias do mês de outubro do ano de dois mil e doze, às 08:00 horas no auditório Ophélia Gaudenzi no 3º andar do Instituto de Ciências da Saúde, se reúne em sessão pública, a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dr. Nicolaus Albert Borges Schriefer orientador, Dra. Maria de Fátima Dias Costa, Dra. Maria Olívia Amado Ramos Bacellar, Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras Dr. Ricardo Riccio Oliveira, com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Tese intitulado "O polimorfismo genético intraespecífico e o comportamento biológico da infecção por *Leishmania braziliensis*" da doutoranda Rosana Santos Sousa. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que a Doutoranda teve a sua defesa de Tese APROVADA emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, é encerrada a sessão, e lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca examinadora, pela Doutoranda e pelo Coordenador do Programa de Pós-Graduação. Salvador, dois de outubro do ano de dois mil e doze.

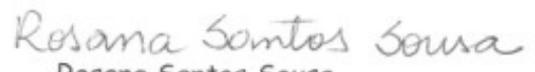
  
Prof. Dr. Nicolaus Albert Borges Schriefer  
Orientador

  
Profa. Dra. Maria de Fátima Dias Costa  
Banca Examinadora

  
Profa Dra. Maria Olívia Amado Ramos  
Bacellar  
Banca Examinadora

  
Profa. Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras  
Banca Examinadora

  
Prof. Dr. Ricardo Riccio Oliveira  
Banca Examinadora

  
Rosana Santos Sousa  
Doutoranda

  
Profa. Dra. Silvia Lima Costa  
Coordenadora do PPGIm/ICS/UFBA

Dedico a Deus por me conceder mais essa importante vitória e por me dar a oportunidade de viver essa trajetória, de ter desafios e poder crescer nessa vida cheia de obstáculos.

A minha mãe, Dalva, minha razão de viver, meu pai, José, minha irmã Simone.  
Minha família que tanto amo.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Nicolaus Albert B. Schriefer, pela aceitação no seu grupo de pesquisa, pela valiosa orientação e competência particular frente a este trabalho. Obrigada pela troca de idéias e de conhecimento, despertando em mim a vontade de trabalhar com pesquisa e fazer ciência. Minha admiração e respeito eternos.

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

Aos médicos do Serviço de Imunologia que trabalham na área endêmica de Corte de Pedra, pela geração de matéria-prima para os experimentos.

A Dra. Mary Wilson, por disponibilizar o seu Laboratório para a realização dos experimentos de Microarranjos de DNA e pela estimada discussão dos resultados obtidos.

Aos voluntários que participaram do estudo pelo sangue doado, fornecendo as células utilizadas nos experimentos.

Aos meus colegas do SIM, que me ajudaram de alguma maneira na construção deste trabalho, em especial a Kátia Salgado e Angela Giudice, pela *expertise* no manejo com os parasitos e macrófagos. Obrigada pelo apoio, incentivo e agradável convivência.

Aos amigos Angela Giudice, Anselmo Souza e Thaís Delavechia, pela ajuda, pelo carinho e pela amizade construída a partir da convivência iniciada no laboratório, pela parceria na vida e pelos bons momentos de risadas compartilhados.

As alunas de Mestrado Viviane Magalhães, pela valiosa ajuda na reta final dos experimentos, Juliana Almeida, Lilian Medina e Silvana Silva pela alegria trazida ao convívio no Laboratório.

A minha turma de Doutorado pelos momentos de construção do conhecimento.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Imunologia – PPGIm, pela preciosa contribuição para o crescimento do conhecimento.

As secretárias do PPGIm, Dilcéa Reis, Sonia Costa e Juciara Nascimento pelo auxílio em nossos interesses acadêmicos.

Aos meus colegas de profissão e amigos de trabalho pela colaboração durante o desenvolvimento deste projeto.

## **APOIO FINANCEIRO**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Parasitologia molecular do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos – HUPES / Universidade Federal da Bahia

Apoio Financeiro

NIH R03AI067663-02

NIH P50-AI30639-16

(...) Todo recomeço  
Toda boa intenção  
Toda idéia nova  
Todas as noites que eu não dormi  
Toda nova informação  
Tantas saudades do que ainda não vivi  
Vencer os contratempos  
Passar mais tempo juntos  
Consciência e paciência  
Intensas modificações  
E a mais completa certeza  
De que tudo vai dar certo!  
(Rogério Flausino, Jota Quest)

## RESUMO

Diferentes espécies do gênero *Leishmania* podem ser associadas com as diferentes formas de doença, evidenciando a contribuição do conteúdo genético do parasito sobre as manifestações clínicas e o prognóstico das infecções. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é caracterizada por um amplo espectro de manifestações clínicas e imunológicas, que envolve a pele e mucosas. Três formas diferentes de LTA resultantes da infecção humana por *Leishmania braziliensis* - Leishmaniose Tegumentar Localizada (LC), Leishmaniose Cutâneo-Mucosa (LM) e Leishmaniose Disseminada (LD) - podem ser encontradas simultaneamente em Corte de Pedra, área endêmica de *L. braziliensis* no estado da Bahia. Estudos prévios indicaram que subpopulações (clados) de *L. braziliensis* geneticamente distintas foram associadas com diferentes tipos clínicos de infecção, sugerindo um alto grau de polimorfismo fenotípico e genético intraespecífico. *Leishmania* reside preferencialmente em macrófagos nos hospedeiros mamíferos. Nossa hipótese é que *L. braziliensis* de diferentes clados induzem perfis de expressão gênica distintos nos macrófagos infectados do hospedeiro, que favorecem a sua sobrevivência e que levariam aos vários desfechos clínicos de LTA. Este estudo visa avaliar se cepas pertencentes a subtipos diferentes de *L. braziliensis* de Corte de Pedra causam padrões distintos na expressão gênica de macrófagos após infecção. A infecção *in vitro* de macrófagos derivados de monócitos (MDM) humanos de doadores sadios foi realizada em paralelo por quatro horas com *L. braziliensis* de cada um dos diferentes clados - A, B e C, os quais estão associados com LD, LC e LM respectivamente. Utilizando a técnica de microarranjo de DNA, comparamos os padrões globais de expressão gênica entre os macrófagos infectados pelas diferentes cepas e os não infectados. Foram avaliados os níveis de expressão de 47.000 transcritos de sequências funcionalmente caracterizadas de 6.500 genes do genoma humano e os nossos resultados indicam que a maioria dos transcritos permaneceu inalterada e entre os transcritos significativamente alterados (cerca de 500), houve uma repressão causada por todos os isolados de *L. braziliensis* no estágio precoce da infecção. Dentre os transcritos para genes dramaticamente reprimidos temos os que codificam proteínas associadas com funções celulares importantes, como propagação de estímulos, apoptose e metabolismo oxidativo mitocondrial. Poucos transcritos de genes que codificam proteínas envolvidas na resposta ao estresse tiveram a sua expressão induzida. As diferenças entre os três isolados de *L. braziliensis* foram observadas na magnitude da alteração do que no tipo de transcrito envolvido e de uma maneira geral os isolados derivados das formas metastáticas da doença (LD e LM) induziram uma maior magnitude de repressão do que o isolado proveniente da forma LC. Os achados sugerem que a *L. braziliensis* estimula a sua sobrevivência através de modulação negativa de genes importantes das MDM do hospedeiro durante o processo de infecção, e que as cepas destinadas à disseminação exercem uma mais profunda repressão do que cepas que permanecem próximas ao sítio cutâneo de inoculação, reforçando a distinção genética entre as formas clínicas de doença.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Tegumentar Americana, polimorfismo genético, *Leishmania braziliensis*, expressão gênica, Microarranjo de DNA.

## ABSTRACT

Different species from the genus *Leishmania* have been found to be associated with different forms of leishmaniasis – an observation which highlights how variations in genetic content among these parasites can inform expected clinical outcome of infections. American cutaneous leishmaniasis (ACL) is characterized by a broad spectrum of clinical and immunological manifestations, including involvement of the skin and mucous membranes. Three different forms of ACL result from human infection with *Leishmania braziliensis* - localized cutaneous leishmaniasis (CL), mucocutaneous leishmaniasis (ML) and disseminated leishmaniasis (DL) - have been found simultaneously in Corte de Pedra, an endemic area of *L. braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. Previous studies indicated that subpopulations (clades) of *L. braziliensis* were genetically distinct and associated with different types of clinical infection and it suggests that, within the species, there exists a high degree of phenotypic and genetic polymorphisms. Intracellular parasites such as *Leishmania* selectively reside into macrophages in mammalian hosts. Our hypothesis is that *L. braziliensis* from different clades induce distinct gene expression profiles in macrophages of the infected host, promoting their survival and ultimately leading to the various clinical outcomes of ACL. This study aims to evaluate whether strains belonging to different subtypes of *L. braziliensis* from Corte de Pedra cause distinct patterns of gene expression in macrophages after infection. An *in vitro* infection of monocyte-derived macrophages (MDM) from healthy, human donors was performed in parallel for four hours with *L. braziliensis* from each of the different clades - A, B and C, which are associated with DL, CL and ML, respectively. Using the technique of DNA microarray, we compared global patterns of gene expression between macrophages infected by different strains to uninfected macrophages. We assessed the expression levels of 47,000 transcripts sequenced from 6,500 functionally characterized genes of the human genome and our results indicate that the majority of transcripts remained unchanged. Of the transcripts significantly altered (500), there was a suppression caused by all cells infected with *L. braziliensis* during the early stage of infection. Among the transcripts for genes that were strongly suppressed were those encoding proteins associated with important cellular functions, such as propagation of stimuli, apoptosis and mitochondrial oxidative metabolism. A few transcripts of genes encoding proteins involved in the response to stress were noted to have expression induced. Differences between the three strains of *L. braziliensis* were observed more in the magnitude of change than in type of transcript involved. In general, isolates derived from metastatic forms of the disease (ML and DL) induced a suppression of greater magnitude than those isolated from the CL form. The findings suggest that *L. braziliensis* stimulates its survival through down regulation of important genes in host MDM during infection. Likewise, strains with metastatic qualities exert a more profound suppression than strains which remain close to the site of skin inoculation, further emphasizing the genetic distinction among different clinical forms of disease.

**Keywords:** American Tegumentary Leishmaniasis, genetic polymorphism, *Leishmania braziliensis*, gene expression, DNA microarray.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Carga parasitária em MDM infectados por quatro horas, na razão de 2 parasitos para cada macrófago. 48
- Figura 2. Mudanças globais na expressão gênica em macrófagos infectados com *L. braziliensis* de diferentes clados. 54
- Figura 3. Avaliação por RT-qPCR das expressões de alguns genes que se mostraram reprimidos ao microarranjo de DNA. 60
- Figura 4. Avaliação por RT-qPCR das expressões de alguns genes que se mostraram induzidos ao microarranjo de DNA 61
- Figura 5. Perfis de expressão gênica dos MDM infectados com *L. braziliensis* representantes dos clados A, B e C de Corte de Pedra/Ba obtidos por avaliação da expressão gênica global com microarranjo de DNA 62
- Figura 6. Análise de agregação mostrando que macrófagos infectados com isolados de *L. braziliensis* dos clados A e C apresentam comportamentos semelhantes nas suas expressões gênicas. 63
- Figura 7. Expressão dos genes LRRK2, TLR8, MT1M e HSPA1A avaliada por RT-qPCR em MDM infectados em paralelo com três isolados de *L. braziliensis* representativos de cada um dos clados A, B ou C. 64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns genes de macrófagos derivados de monócitos humanos cuja expressão foi significativamente alterada pela infecção com *L. braziliensis* dos clados A, B e C de Corte de Pedra – Ba. 50

Tabela 2. Mudanças na expressão de 10 transcritos em MDM infectados por isolados de *L. braziliensis* pertencentes a cada clado (A, B ou C). Comparação dos resultados entre os microarranjos de DNA e o RT-qPCR. 59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina 5'-trifosfato
CD4	Marcador de diferenciação 4
CD8	Marcador de diferenciação 8
cDNA	DNA complementar
Células Th1	Linfócitos T auxiliares do tipo 1
Células Th17	Linfócitos T auxiliares do tipo 17
Células Th2	Linfócitos T auxiliares do tipo 2
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
CR1	Receptor de Complemento 1
CR3	Receptor de Complemento 3
CSF	Fator Estimulador de Colônia
CTP	Nucleosídeo Trifosfato de citidina
DALY	Anos de Vida Perdidos Ajustados por Incapacidade ( <i>Disability Adjusted Life of Years</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase I	Desoxirribonuclease I
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Monócitos
gp63	Glicoproteína 63 de superfície da Leishmania
HBSS	Solução salina balanceada de Hank
HEPES	4 - (2-hidroxi-etil)-1-piperazinoetanossulfônico
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 fração beta
IL-23	Interleucina 23
IL-4	Interleucina 4
iNOS	Óxido nítrico sintase, isoforma indutível
Jak	Janus quinase
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
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
MDM	Macrófago derivado de monócito
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

mL	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro
μg	Micrograma
μL	Microlitro
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-κB	Fator nuclear <i>kappa</i> B
ng	Nanograma
NK	Liinfócito T <i>Natural killer</i>
NNN	Meio de cultura de Nicolle, Novy e McNeal
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Dióxido de nitrogênio – Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas do oxigênio
RPMI	Meio de cultura de células
RT-qPCR	Reação de transcriptase reversa seguida de PCR em tempo real
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TGFβ	Fator transformador de crescimento beta
TLR	<i>Toll like</i> receptor
TNF	Fator de necrose tumoral
UTP	Nucleosídeo Trifosfato de uridina

## SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	
1.1 – Leishmaniose	18
1.2 – O Agente etiológico	19
1.3 – Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar	21
1.4 – Transmissão e Ciclo biológico	23
1.5 – Aspectos Clínicos e Imunológicos da Leishmaniose Tegumentar	25
1.6 – O hospedeiro.	28
1.7 – Microarranjo de DNA	33
1.8 – Microarranjo de DNA e Leishmania	35
2 – HIPÓTESE	37
3 – OBJETIVOS	
Geral	38
Específicos	38
4 – JUSTIFICATIVA	39
5 – DESENHO DE ESTUDO E MÉTODOS	40
Aquisição dos isolados parasitários	40
Recrutamento de voluntários e critério de inclusão e exclusão	40
Infecção de macrófagos humanos derivados de monócitos do sangue periférico (MDM)	41
Avaliação dos perfis globais de expressão / repressão gênica nas células infectadas com diferentes cepas de <i>L. braziliensis</i> por microarranjo de DNA	42
Validação dos resultados dos microarranjos por qPCR de alvos selecionados dentre os transcritos significativamente afetados pelas infecções	44
Análise estatística	46
6 – RESULTADOS	48
7 – DISCUSSÃO	65
8 – CONCLUSÕES	72
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXOS	
Artigo - Effects of <i>Leishmania braziliensis</i> on macrophage gene expression: differences between strains associated with distinct clinical outcomes	

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Leishmaniose

Leishmaniose e suas variantes constituem um grupo de enfermidades que acometem o homem, causadas por várias espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. Dependendo da espécie infectante envolvida e de outros fatores associados, como a imunidade do hospedeiro, pode se manifestar com eventos clínicos bastante heterogêneos, que variam desde lesões brandas que se curam espontaneamente até lesões destrutivas ou desfigurantes em pele, caracterizando a forma cutânea da doença, ou mesmo disseminar de modo sistêmico pelos órgãos como o fígado, o baço e a medula óssea, consistindo na forma visceral, assumindo assim uma maior gravidade (GRIMALDI JR e *col.*, 1993; CHANG e *col.*, 1999).

Estima-se que aproximadamente 2 milhões de novos casos, entre eles 1,6 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500.000 de leishmaniose visceral, ocorram anualmente no mundo inteiro, resultando em mais de 70.000 mortes, predominantemente pela forma mais grave (visceral), com cerca de 12 milhões de pessoas infectadas (MURRAY e *col.*, 2005; OMS, 2012). Do total de casos de leishmaniose cutânea, 90% ocorrem em apenas oito países: Afeganistão, Argélia, República Islâmica do Irã, Arábia Saudita, Sudão e República Árabe Síria no Velho Mundo, Brasil e Peru no Novo Mundo (SCHALLIG e *col.*, 2002; DESJEUX, 2004; OMS, 2012).

A forma de doença cutânea, ou leishmaniose tegumentar, é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância em saúde pública, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades, acometendo as regiões tropicais e subtropicais do planeta. Durante os últimos 10 anos, as regiões endêmicas foram se expandindo, proporcionando um aumento acentuado no número de casos registrados da doença. No entanto, historicamente, o impacto deste agravo vem sendo subestimado, e um número substancial de casos é perdido devido à ausência do registro da informação nos sistemas e órgãos

públicos de saúde ou mesmo pelo fato da notificação da doença ser obrigatória em apenas 32 dos 88 países afetados (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Tal como acontece com muitas doenças endêmicas, que causam alta morbidade, mas baixa mortalidade, a verdadeira importância da leishmaniose permanece em grande parte despercebida, sobretudo porque as pessoas mais afetadas vivem em áreas remotas e o estigma social associado às deformidades e cicatrizes desfigurantes causadas pela doença mantém os pacientes recolhidos. As deficiências e danos relacionados com a doença contribuem para a morbidade associada com a leishmaniose, que através da OMS é dada por um indicador o DALY (*Disability Adjusted Life of Years – Anos de Vida Perdidos Ajustados por Incapacidade*), cujo índice atualmente se situa em 2,4 milhões. As leishmanioses, portanto, são doenças negligenciadas, que levam 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, e estratégias de prevenção adequadas para o melhor controle da doença diminuindo, assim, os prejuízos gerados e o impacto em saúde pública (DESJEUX, 2004; REITHINGER e col., 2007; OMS, 2012).

## 1.2 O agente etiológico

O gênero *Leishmania* pertence à família *Trypanosomatidae* da qual fazem parte outros membros com semelhante importância médica no que se refere à ocorrência de doença em humanos, como o *Trypanosoma cruzi*. A primeira observação deste agente etiológico foi feita por Cunningham em 1885 na Índia. Em 1903, Ross criou o gênero e chamou o parasito de *Leishmania donovani* (OUMEISH, 1999; AWASTHI e col., 2004; BASANO e col., 2004). Na América do Sul, os primeiros relatos de doença cutânea foram feitos em 1909 por Lindenberg, que encontrou o parasito em lesões de indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamentos na construção de rodovias em São Paulo (OUMEISH, 1999; BASANO e col., 2004). No Brasil, Gaspar Vianna em

1911 considerou o parasito diferente da espécie identificada no Velho Mundo e a nomeou *Leishmania braziliensis* de forma que até a década de setenta todos os casos de leishmaniose eram atribuídos a esta espécie. Com o desenvolvimento das técnicas de análise observou-se a descrição de outras espécies e associação com a doença (OUMEISH, 1999; BASANO e col, 2004).

Considerando a sua morfologia, as espécies do gênero *Leishmania* apresentam um único flagelo responsável pela locomoção e uma única mitocôndria, que contém uma significativa quantidade de DNA e forma uma estrutura chamada cinetoplasto. Por essa razão, esses parasitas pertencem à ordem *Kinetoplastida* (GRIMALDI e col, 1993; BRINGAUD e col, 1998). A *leishmania* é um parasito digênico, ou seja, as espécies apresentam duas formas evolutivas principais: a promastigota, forma flagelada, móvel, extracelular e mais frequentemente encontrada no hospedeiro invertebrado, e a amastigota, forma intracelular aflagelada, que pode ser vista nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (homem e outros mamíferos suscetíveis) (GRIMALDI e col, 1993; DE ALMEIDA e col, 2003). É um parasito diplóide e assexuado, tendo basicamente como forma de reprodução a clonal, onde seu genótipo se propaga de forma total entre os descendentes (BANULS e col, 1999). Isto fortalece a existência de uma grande diversidade específica e intraespecífica, embora não se exclua totalmente a possibilidade de eventos de recombinação sexual (CUPOLILLO e col, 1998; BANULS e col, 1999; ISHIKAWA e col, 2002, SCHRIEFER e col, 2004; IVES e col, 2011).

Uma das características mais marcantes apresentadas pelo gênero *Leishmania*, em comparação com os outros gêneros que fazem parte da família *Tripanosomatidae*, é a grande diversidade de espécies. Desde a descrição desses parasitos, o número de espécies identificadas vem crescendo continuamente e, desde então, vários esquemas de classificação taxonômica vêm sendo propostos (CUPOLILLO e col, 1998). As espécies até então reconhecidas e associadas com doença em humanos no Velho Mundo pertencem aos complexos *L. donovani* (*L. donovani* e *L. infantum*), responsáveis pela leishmaniose visceral e *L. aethiopica*, *L. major* e *L. tropica*, responsáveis pela leishmaniose tegumentar. Já no Novo Mundo, estas 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*. A *L. infantum chagasi* embora anteriormente considerada como membro desse subgênero se destaca como responsável pela leishmaniose visceral, seguida pela *L. (L) amazonensis*, que é responsável pela leishmaniose cutânea (SILVEIRA e col, 2004; DANTAS-TORRES, 2006). As espécies que pertencem ao subgênero *Viannia* são: *L. (V) braziliensis*, *L. (V) peruviana*, *L. (V) guyanensis*, *L. (V) panamensis*, *L. (V) lainsoni*, *L. (V) naiffi*, *L. (V) colombiensis* e *L. (V) shawi* (SILVEIRA e col, 2004). Dentre as espécies do subgênero *Viannia*, a *L. (V) braziliensis* tem uma grande importância em nosso meio pelo seu alto grau de polimorfismo genético e fenotípico e pelo seu espectro de manifestações clínicas observadas na leishmaniose tegumentar (SARAVIA e col, 1998; CUPOLILLO e col, 2003; SCHRIEFER e col, 2004). A necessidade de se diferenciar e caracterizar as populações desses parasitos, com o objetivo de melhorar o diagnóstico e de determinar o prognóstico das infecções, tem estimulado o desenvolvimento de estudos voltados para esta finalidade (SINGH, 1997; BANUS e col, 1999).

### **1.3 Epidemiologia da leishmaniose tegumentar**

A leishmaniose do Novo Mundo, ou leishmaniose tegumentar americana (LTA), distribuiu-se 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, onde o número de casos tem crescido progressivamente durante os últimos 20 anos em praticamente todos os Estados. Surtos epidêmicos têm ocorrido nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na região Amazônica, estando associados ao processo predatório de colonização. Nos últimos anos, o Ministério da Saúde registrou média anual de 35 mil novos casos de LTA em nosso país (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). A incidência anual aumentou de 10,45 casos por 100.000 indivíduos em 1985 para 18,63 casos por 100.000 indivíduos em

2000 (OLIVEIRA e col, 2004). Cerca de 39% dos casos de LTA estão na região Nordeste, sendo a maioria deles pertencentes aos estados do Maranhão, Bahia e Ceará.

A distribuição da leishmaniose em nosso país sofreu mudanças no decorrer dos anos, pois durante muito tempo era considerada uma doença ocupacional de caráter rural que acometia apenas as pessoas que viviam ou trabalhavam no campo e, atualmente, vem aumentando progressivamente o relato de casos que surgem em áreas urbanas e periurbanas, estes atribuídos possivelmente a uma adaptação do inseto vetor a novos ambientes (OLIVEIRA e col, 2004). Deste modo, as mudanças dos hábitos humanos associados a alterações do meio ambiente têm contribuído para grandes impactos na prevalência e nos padrões de transmissão, já que os dados disponíveis até então sugerem que alguns dos parasitos e seus vetores possam adaptar-se às mudanças ecológicas como o desmatamento e a urbanização (CUPOLILLO e col, 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 tropical e subtropical do planeta; (2) apresentarem ciclos zoonóticos envolvendo animais selvagens e domésticos; (3) em sua maioria, infectam pessoas residentes em áreas rurais ou que tenham contato com áreas silvestres (CUPOLILLO e col, 1998; OLIVEIRA e col, 2004).

Há pelo menos 20 espécies distintas de *Leishmania* patogênicas para o homem. Nas Américas, são reconhecidas, até o momento, 11 espécies com importância médica causando a doença em humanos e oito espécies descritas somente em animais. No Brasil foram identificadas sete espécies que se encontram inseridas nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, dentre as quais se destacam: *L. (V) braziliensis*, *L. (L) amazonensis* e *L. (V) guyanensis*. As espécies *L. (V) lainsoni*, a *L. (V) naiffi*, *L. (V) shawi* e *L. (V) lindenberg* foram encontradas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A *L. (L) amazonensis* é encontrada em áreas de florestas primárias e secundárias da Amazônia Legal, nos estados do Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão, e também nos estados das regiões Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-Oeste (Goiás) e Sul (Paraná) (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; SILVEIRA e col, 2004).

A *L. (V) guyanensis* é encontrada principalmente em florestas de terra firme, em áreas que não se alagam no período de chuvas, aparentemente limitada à região Norte (Amapá, Amazonas, Pará, Roraima e Acre) e estendendo-se a outros países como as Guianas, Equador, Peru e Venezuela (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000 e 2007; BASANO e col, 2004).

A *L. (V) braziliensis* é a mais importante e prevalente espécie causadora de LTA no homem. É encontrada em praticamente todas as regiões endêmicas do Brasil, aparecendo desde o Norte até o Sul, em locais onde o ambiente encontra-se intensamente modificado, com áreas de colonização recente e presença de animais domésticos, bem como naqueles locais que ainda apresentem resquícios da Mata Atlântica (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000 e 2007).

#### **1.4 Transmissão e ciclo biológico**

A leishmaniose é uma doença zoonótica, cujo ciclo de vida do parasito acomete hospedeiros vertebrados e invertebrados. Entre os vertebrados, temos os reservatórios silvestres (marsupiais, tatu, tamanduá, dentre outros) e o cão como o reservatório do meio periurbano. O homem pode vir a adquirir a infecção quando se insere em um desses ambientes, e a transmissão acontece em decorrência da propagação do inseto vetor contendo o parasito em ambientes domiciliares e em áreas de peridomicílio. Os vetores da leishmaniose tegumentar são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes ao gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo, e *Phlebotomus*, no Velho Mundo, sendo tais insetos conhecidos popularmente como “mosquito palha”, “tatuquira”, “birigui”, entre outros, a depender de sua localização geográfica. No

Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei* e *L. migonei* (ASHFORD, 2000; DE ALMEIDA e col, 2003; BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

O ciclo biológico de *Leishmania* se inicia quando as fêmeas dos flebotomíneos parasitadas inoculam formas promastigotas metacíclicas infectantes em um hospedeiro vertebrado suscetível durante seus repastos sanguíneos (AWASTHI e col, 2004). A saliva também inoculada parece exercer papel importante na infecção, através de diversos mecanismos dentre eles a quimiotaxia de macrófagos e monócitos ao local da picada (ROGERS e col, 2002). As formas metacíclicas que são inoculadas pelos flebotomíneos nos hospedeiros vertebrados ativam a via clássica do sistema Complemento sem sofrerem lise, explorando este mecanismo na facilitação da sua interiorização pelos macrófagos (BOGDAN e col, 1998; CHANG e col, 1999; SACKS, 2002). Os parasitos internalizados são capazes de resistir ao ataque de produtos derivados do oxigênio e radicais do nitrogênio, como o óxido nítrico, com o auxílio de moléculas próprias, como o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína gp63, que se encontram presentes na superfície de suas membranas (BOGDAN e col, 1998; DE ALMEIDA e col, 2003). À medida que o fagolisossomo é formado, os parasitos se transformam em amastigotas e passam a ser capazes de resistir ao ambiente ácido presente nesta organela. As formas amastigotas recém-transformadas passam a se multiplicar através de um processo de fissão binária e suas sucessivas divisões favorecem o rompimento da célula hospedeira, o que contribui para a liberação dos parasitos e para que macrófagos adicionais se tornem infectados, perpetuando assim a infecção do organismo hospedeiro (AWASTHI e col, 2004).

Por outro lado, a infecção do hospedeiro invertebrado ocorre quando o flebótomo ingere o sangue contendo as células infectadas com formas amastigotas ao realizar o seu repasto sanguíneo em um indivíduo infectado ou animal reservatório. No aparelho digestivo do inseto, as amastigotas se transformam em promastigotas, que se multiplicam intensamente e passam a colonizar o epitélio digestivo sob a forma de promastigota procíclica, e a faringe

sob a forma infectante metacíclica. Estas são extremamente móveis e se alojam em parte no aparelho bucal do inseto, a partir do qual serão inoculadas em animais vertebrados durante novos repastos sanguíneos (AWASTHI e col, 2004).

### 1.5 Aspectos clínicos e imunológicos da leishmaniose tegumentar

A doença em nosso meio apresenta-se como uma enfermidade bastante polimórfica, que acomete primariamente a pele e mucosas. O espectro de quadros clínicos pode ser associado a fatores relacionados à resposta imune do hospedeiro, à variabilidade das espécies de parasitos envolvidas e também a fatores ambientais. As três formas resultantes da infecção com *L. (V) braziliensis* são: leishmaniose cutânea localizada (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada (LD) (CARVALHO e col, 1994; CARVALHO e col, 1995).

A leishmaniose cutânea localizada (LC) é a mais comum das formas de manifestação da LTA, podendo também ser causada por parasitos pertencentes ao subgênero *Leishmania*, além do *Viannia*. É caracterizada pela presença de uma ou poucas lesões em pele, que se iniciam no sítio de entrada das promastigotas infectantes após a picada do inseto vetor, sendo encontradas principalmente em áreas expostas do corpo como face, braços e pernas. Tais lesões podem ser acompanhadas de intensa adenopatia regional, apresentando-se ulceradas, com bordas elevadas e endurecidas. (SILVEIRA e col, 2004, SCHRIEFER e col, 2004). Os pacientes com LC geralmente apresentam uma resposta imune do tipo Th1 frente aos antígenos de *Leishmania*, o que se verifica pela produção de perfil característico de citocinas e pela positividade ao teste cutâneo de resposta tardia, a intradermorreação de Montenegro. Esses pacientes apresentam níveis elevados de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), citocina que induz a ativação de macrófagos, e outros fagócitos com elevada atividade antimicrobica para as formas amastigotas do protozoário (BACELLAR e col, 2002). O estudo histológico das lesões revela riqueza de linfócitos e plasmócitos, e escassez ou mesmo ausência de macrófagos e

parasitos. Quando a infecção não é controlada pelos mecanismos adaptativos da resposta imune celular, a doença pode evoluir para uma forma mais grave e em cerca de 4% dos casos ocorre associação com a leishmaniose mucosa (LM) (MARSDEN e col., 1983).

Na LC, sabe-se que a incapacidade de montar uma resposta imune celular eficaz está associada à evolução clínica e respostas terapêuticas menos favoráveis. Em pacientes imunocomprometidos, como na síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), a LC pode apresentar quadros clínicos atípicos, tendência à disseminação e má resposta aos esquemas medicamentosos usuais (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A LM é uma doença desfigurante caracterizada por envolvimento da mucosa nasal, oral ou faríngea, concomitante à doença cutânea ativa ou iniciada meses a anos após a resolução da lesão primária em pele. Os indivíduos acometidos 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 e IFN- $\gamma$ . 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 (CARVALHO e col, 1995; BACELLAR e col, 2002). 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 até lesões desfigurantes e destrutivas da cartilagem nasal, lábios e face, algumas vezes chegando a ser fatal (CHOI e col, 2001). A forma mucocutânea ocorre predominantemente na América do Sul e muitas vezes mostra-se de difícil tratamento (CARVALHO e col, 1994).

A leishmaniose disseminada (LD) é uma forma clínica da LTA causada por *L. (V) braziliensis* e que vem sendo identificada no estado da Bahia (CARVALHO e col, 1994; TURETZ e col, 2002). Clinicamente distinta da leishmaniose cutânea difusa, a qual geralmente é causada pela *L. amazonensis*, a LD acomete predominantemente homens adultos com

atividade rural, caracterizando-se pelo aparecimento de uma única lesão inicial ulcerada em uma extremidade corpórea, seguida, após um período de poucos dias, 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. As células da resposta imune dos indivíduos acometidos produzem níveis menores de TNF e IFN- $\gamma$ , 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).

Para o tratamento da LTA, a droga de primeira escolha ainda é o antimonial pentavalente, que é encontrado sob duas formas: o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime) e o stibogluconato de sódio (Pentostam), sendo que este último não é comercializado no Brasil. 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 e recidivas. 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 *et al*, 1993).

As drogas de segunda linha na LTA são Anfotericina B e Pentamidina, que também requerem cuidados para a sua administração além da toxicidade associada. A Anfotericina B 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 responsiva à terapia convencional (CHOI *et al*, 2001; GRIMALDI *et al*, 1993). Outros medicamentos vêm sendo utilizados quando ocorre a refratariedade na terapêutica da LTA, que estão baseados na imunoterapia, ou seja, no conhecimento de que a patogênese da LTA está fortemente associada com a resposta imune do hospedeiro. Assim, há relatos do uso de GM-CSF, de drogas inibidoras do TNF e de Miltefosina como tratamentos alternativos para os casos de difícil controle.

O diagnóstico precoce da leishmaniose é importante a fim de evitar danos mais graves ao hospedeiro. Ele é feito baseado em critérios clínicos e epidemiológicos, além do critério parasitológico, que busca a confirmação da infecção pela presença do parasito na lesão. Uma melhor compreensão dos fatores que influenciam o curso clínico da infecção por *L. (V) braziliensis* relacionados ao parasito ou mesmo aqueles desencadeados pela resposta imune do hospedeiro, poderá resultar em novas abordagens que contribuiriam para a prevenção e para o tratamento precoce da LTA.

A implicação de uma única espécie de parasito em mais de uma forma de leishmaniose sugere uma participação da variabilidade intra-específica sobre os desfechos clínicos dessa enfermidade, à semelhança da variabilidade que observamos ao nível de espécies. Gomes e colaboradores descreveram que cepas de *L. braziliensis* coletadas na região Sudeste do Brasil mostraram-se marcadamente diferentes daquelas coletadas na região Norte do país quando genotipadas (GOMES e col, 1995). Por outro lado, avaliando a estrutura populacional de isolados de *L. braziliensis* de casos de LTA na região endêmica de Corte de Pedra, no Sudeste do estado da Bahia, Schriefer e colaboradores encontraram uma estrutura multiclonal dos parasitos responsáveis pela doença naquela área geográfica (SCHRIEFER e col, 2004). Além disso, uma contribuição importante desse trabalho foi a detecção de uma associação significativa entre subpopulações de *L. braziliensis* e desfecho clínico de doença humana, onde esta espécie é a principal causa de LC clássica em nossa região e vem sendo o agente etiológico para a maioria dos casos emergentes de LD.

## 1.6 O hospedeiro

Ao penetrar no hospedeiro mamífero, *Leishmania* desencadeia uma série de eventos importantes para a ação do sistema imune. Por ser um parasito intracelular, as interações que acontecem nesse momento entre ele e os diferentes tipos celulares da primeira linha de defesa do hospedeiro exercem um papel crítico na composição da resposta imune inata. 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 (RAVASI e col, 2007). 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 (OLIVIER e col., 2005).

As células que compõem a primeira linha de defesa do hospedeiro mamífero incluem os macrófagos, os neutrófilos, os eosinófilos e as células dendríticas. Ao considerar que os macrófagos constituem o principal e o preferencial tipo celular que é infectado por *Leishmania*, a sua função é essencial para o desfecho da infecção no hospedeiro. Tanto no homem como em animais silvestres ou domésticos, e seja qual for a espécie de *Leishmania* envolvida, elas vivem e proliferam em macrófagos e monócitos de vários tecidos, no chamado sistema fagocítico mononuclear (SFM). Esse sistema é uma família de células que compreendem os progenitores da medula óssea, os monócitos do sangue circulante e os macrófagos teciduais, que são especializadas e eficientes na fagocitose e têm um importante papel na detecção e eliminação dos microorganismos patogênicos. A produção de macrófagos ocorre a partir de precursores mielóides na medula óssea, sendo controlada por fatores de crescimento chamados de fatores estimuladores de colônia (CSFs), que compõem o microambiente local (STOUT, 2004; MOSSER e col., 2008). Ao saírem para a circulação, as células passam a entrar em contato com diferentes moléculas, as quais têm influência nas características fenotípicas e funcionais que estas passam a assumir desde então.

Estas células mostram heterogeneidade fenotípica, possuindo a capacidade de englobar e matar potenciais patógenos (fagocitose), a capacidade de processamento e apresentação de antígenos, e funções efetoras que são ativadas em resposta a produtos provenientes da imunidade adquirida. Além desse papel na imunidade, os macrófagos contribuem também na homeostase, na vascularização, na progressão de tumores, no reconhecimento e remoção de células sob apoptose, entre outros (VEGA e col.,

2006; KZHYSKOWSKA e col., 2008; McCONVILLE e col., 2011). A depender de sua localização no microambiente ou do tipo de estímulo ao qual foram expostos, ou seja, da via de ativação, os macrófagos podem ser classificados em macrófagos classicamente ativados ou inflamatórios (M1), que medeiam a defesa do hospedeiro e a imunidade antitumoral, macrófagos alternativamente ativados (M2), que são supressores e regulam a cicatrização de feridas e macrófagos regulatórios, que secretam IL-10 apresentando atividade anti-inflamatória (STOUT, 2004; KZHYSKOWSKA e col., 2008; GALLI, 2011).

Quando o inseto vetor inocula na pele do hospedeiro suscetível as formas promastigotas infectantes de *Leishmania*, estas são capazes de escapar do primeiro mecanismo inato de defesa que é a lise mediada pelo sistema complemento até se aderirem e serem englobadas pelo macrófago. Uma vez internalizados, por um processo de fagocitose, os parasitos desencadeiam uma série de alterações morfológicas e bioquímicas no interior da célula e permanecem dentro de um vacúolo parasitóforo chamado de fagolisossoma, que os separa do citoplasma celular (BOGDAN, 2008).

Embora os macrófagos sejam células fagocitárias especializadas no combate a agentes infecciosos, 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 a infecção (CUNNINGHAM, 2002; BOGDAN, e col., 1998).

Tal característica se deve em parte à contribuição das moléculas de superfície do parasito, que representam um importante papel no direcionamento da infecção, e a interação dessas moléculas com os receptores celulares específicos. Entre as moléculas de superfície presentes no parasito a mais predominante é a LPG seguida pela gp63. Outras moléculas presas à superfície celular são proteofosfoglicanos, fosfatase ácida, nucleotidase e cisteína proteinases que em conjunto conferem virulência a *Leishmania*. Os receptores celulares envolvidos nessa interação são o CR1, o CR3, o receptor

para manose-fucose, os receptores para a porção Fc de imunoglobulinas (FcγRI, FcγRII), receptor Toll like (TLR2) e o receptor para fibronectina. Estes receptores representam importante papel na ativação da resposta imune inata (BASU e col., 2005; KZHYSHKOWSKA e col., 2008).

Outro evento muito importante que ocorre na superfície de macrófagos durante a internalização dos parasitos é o desencadeamento de uma combinação de mecanismos oxidativos e não oxidativos visando à sua atividade microbicida. As alterações causadas pelo parasito na membrana de macrófagos ativam uma enzima ligada à membrana, a NADPH oxidase, a qual catalisa a redução do O<sub>2</sub> molecular para O<sub>2</sub><sup>-</sup>, constituindo a explosão respiratória (burst oxidativo) e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A ativação do macrófago demanda um aumento do consumo do oxigênio que, por sua vez, aumenta a resposta oxidativa. Outra via requerida envolve a geração de óxidos de nitrogênio como mediadores da morte intracelular dos parasitas, onde ocorre a síntese de NO, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a partir do substrato L-arginina, pela ação da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), constituindo o segundo principal mecanismo de defesa de macrófagos classicamente ativados (BASU e col., 2005; PLUDDMANN e col., 2011). O óxido Nítrico (NO) é uma importante molécula biológica produzida por diferentes tipos celulares, tendo um papel importante em vários processos fisiológicos essenciais, como na sinalização celular, podendo participar na fisiopatologia de várias doenças. Esta molécula é importante atuando na regulação da resposta imune durante a infecção por *Leishmania*, sendo considerado o principal mediador citotóxico e citostático contra patógenos intracelulares (QUEIROZ e col., 1999; DUSSE e col., 2003). Entre os mecanismos independentes de oxigênio (não oxidativos), temos as atividades funcionais proteolíticas e catabólicas inerentes à sua ação de célula fagocítica, com liberação de enzimas armazenadas no interior dos seus grânulos e lisossomas. Estas enzimas lisossomais são peptidases, nucleases, fosfatases, esterases e lipases e levam à destruição dos organismos fagocitados pelos macrófagos (BASU e col., 2005; PLUDDMANN e col., 2011).

Em contrapartida, *Leishmania* manipula a célula hospedeira visando à sua sobrevivência. A LPG pode inibir a explosão respiratória, eliminar os radicais de oxigênio e inibir as  $\beta$  galactosidases lisossomais, sendo um determinante molecular essencial do parasito dirigido contra a função efetora antiparasitária da célula hospedeira (BASU e col., 2005). A LPG representa muitos papéis importantes na sobrevivência do parasito e na modulação da resposta imune, e diferenças na sua estrutura e distribuição são importantes para as diferentes propriedades de diferentes estágios de desenvolvimento da *Leishmania*, já que varia entre as diferentes espécies e quantitativamente entre as formas evolutivas (MCCONVILLE e col., 1995; DESCOTEAUX e col., 1999). A glicoproteína gp63 inativa enzimas proteolíticas do hospedeiro e, assim, protege as proteínas do parasita da degradação fagolisossomal. *Leishmania spp.* é também capaz de manter um pH intracelular neutro, apesar de ambiente ácido existente no interior do fagolisossomo aumentando a sobrevivência no interior destas células (BOGDAN e col., 1990).

A localização das amastigotas no interior de macrófagos faz com que o controle da infecção seja dependente da resposta imune mediada por células. As células Natural killer (NK) fornecem inicialmente o IFN- $\gamma$  que orienta os macrófagos ao desenvolvimento de um fenótipo de ativação clássico (M1). Estes macrófagos inflamatórios inatos ativados produzem grandes quantidades de citocinas como TNF, IL-1 $\beta$ , IL-12 e IL-23, o que as tornam importantes no direcionamento das respostas antígeno-específicas de células T auxiliares tipo 1 (Th1) e de células Th17. Por sua vez, o IFN- $\gamma$  agora produzido pelas células T proporciona uma cascata de amplificação positiva que favorece a expansão da população de células ativadas enquanto também aumenta as suas atividades microbicida e tumoricida (GALLI e col., 2011).

A modulação da resposta imune é uma fase importante para evitar a patologia mediada por célula que observamos na leishmaniose tegumentar causada por *L. (V.) braziliensis*. 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,

o que acontece inicialmente pela produção de citocinas imunossupressivas como IL-10 e TGF- $\beta$ . Durante a fase mais precoce da leishmaniose cutânea localizada causada por *L. braziliensis*, baixos níveis de IFN- $\gamma$  são observados ao passo que os níveis de IL-10 se encontram superiores (KANE e col., 2000; CUNNINGHAM, 2002). A IL-10 desempenha um papel crítico na persistência do parasito *in vivo*. À medida que a infecção progride, todas as formas clínicas da infecção por *L. braziliensis* evidenciam uma produção de IFN- $\gamma$  antígeno específica predominante sobre os níveis de IL-10 (BOGDAN e col., 1991; MOORE e col., 2001). Há relatos de que a IL-10 não só controla a produção de IFN- $\gamma$ , mas também inibe fortemente a produção de TNF- $\alpha$ , de intermediários reativos de oxigênio ( $O_2^-$  e metabólitos), de IL-12 e em menor extensão de intermediários reativos de nitrogênio (NO e derivados) pelos macrófagos e células dendríticas prejudicando, assim, a atividade antimicrobicida desses tipos celulares (KANE e col., 2000; BOGDAN, 2008).

A persistência das formas amastigotas nas células hospedeiras também leva à alteração da função de processamento e apresentação de antígenos para a célula T principalmente pela inibição da expressão de moléculas MHC classe II (FRUTH e col., 1993; COURRET e col., 2001). 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. 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 (OLIVIER e col., 2005).

## 1.7 Microarranjo de DNA

Na busca do entendimento de como uma célula envolvida na resposta imune, por exemplo, responde e se comporta no desempenho de sua função, se torna evidente a necessidade do conhecimento mais detalhado sobre a

atividade de um grande número de genes contidos em seu genoma, assim como do panorama de expressão deste genoma frente a diversas situações biológicas. Após os recentes trabalhos que culminaram no sequenciamento completo de genomas de vários microrganismos, houve a geração de uma quantidade imensa de informações úteis para o desenvolvimento de abordagens globais, possibilitando vasto uso para a obtenção deste conhecimento (BUTTE, 2002).

O estudo da função dos genes, através da medição paralela da expressão de genomas, utiliza muito comumente a metodologia de microarranjos de DNA (*microarray*, do inglês). As análises de microarranjo se tornaram amplamente utilizadas em biologia molecular, sendo uma técnica que busca medir a expressão de transcritos em larga escala, medindo muitos simultaneamente. Também permite a exploração do genoma e de outros dados funcionais fornecendo informações importantes sobre as funções dos genes e interações dentro e entre as vias metabólicas celulares (BRAZMA *e col.*, 2001).

Um microarranjo de DNA, ou DNA-chip, consiste num arranjo pré-definido de moléculas de DNA (fragmentos de DNA genômico, cDNAs ou oligonucleotídeos) quimicamente ligadas à uma superfície sólida, revestidas com compostos que conferem carga positiva. Os microarranjos são utilizados na detecção e quantificação de ácidos nucleicos (mRNA na forma de cDNA ou DNA genômico) provenientes de amostras biológicas, as quais são postas para hibridizar com o DNA fixado no arranjo (hibridização por complementariedade de bases). O uso mais frequente dos microarranjos é na determinação da expressão gênica (perfil do transcriptoma). A alta performance desta técnica permite determinar a expressão diferencial de milhares de genes num único experimento. Para a preparação dos microarranjos, utilizam-se robôs altamente precisos que aplicam as diferentes amostras de DNA em diminutos pontos (spots) no centro de uma lâmina de microscópio com a superfície quimicamente preparada (densidade aproximada de 10.000 pontos/cm<sup>2</sup>). Cada ponto representa um segmento gênico em particular. Quanto mais pontos no microarranjo, mais abrangente ele será na análise do transcriptoma (WEERARATNA *e col.*, 2004).

A tecnologia dos microarranjos tem impulsionado de maneira importante a pesquisa de genômica funcional dos diferentes organismos, desde bactérias até o homem, incluindo situações normais e patológicas (câncer, doenças autoimunes, doenças degenerativas entre outras). Esta técnica apresenta várias vantagens sobre outros sistemas empregados para esta finalidade, pois permite medir simultaneamente a presença em larga escala de genes específicos e seus padrões de expressão em uma varredura do genoma. Porém, este tipo de metodologia é relativamente cara e perde em precisão, pois gera uma grande quantidade de dados que terminam necessitando da execução de outras técnicas mais refinadas para validação desses resultados (KATO-MAEDA *et al.*, 2001).

### **1.8 Microarranjo de DNA e *Leishmania***

Vários estudos vêm demonstrando que a sobrevivência de *Leishmania spp.* está associada com modificações na expressão gênica de células do hospedeiro, como os macrófagos (RODRIGUEZ *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2010). Alguns deles buscavam a análise do perfil transcricional da expressão gênica, mas sempre avaliaram de maneira isolada, não permitindo uma comparação entre os diferentes estágios de ativação celular e, portanto, o comportamento global da célula frente a um único estímulo, como, por exemplo, a infecção por parasitas intracelulares (ZHANG *et al.*, 2010; PROBST *et al.*, 2012). A análise do perfil transcricional da expressão gênica de maneira global através da tecnologia do microarranjo de DNA é uma ferramenta frequentemente utilizada em tempos atuais para estudar as interações entre hospedeiro e patógeno, principalmente através da identificação de genes que podem estar envolvidos na patogenicidade, ou mesmo do ponto de vista da resposta do hospedeiro à infecção. (KATO-MAEDA *et al.*, 2001).

Em um estudo Blader e colaboradores analisaram as mudanças globais que ocorrem quando um protozoário parasita intracelular infecta uma célula hospedeira de mamífero, utilizando o modelo de infecção por *Toxoplasma gondii*. Ao observar o perfil transcricional de fibroblastos humanos após a

infecção, verificou-se que vários genes que estão envolvidos em diversos processos celulares, incluindo o metabolismo, a transcrição de proteínas alvo e a apoptose foram modulados, o que acontece de maneira semelhante com *Leishmania spp.* (BLADER e col., 2001). Já Ettinger e colaboradores utilizaram a análise da expressão gênica usando o microarranjo de DNA para investigar um modelo de infecção precoce com macrófagos humanos desafiados por parasitos da espécie *L. chagasi*, e observaram também uma modulação negativa para muitos transcritos que levava a uma inibição do fenótipo clássico de ativação celular. Em contraste, quando eles analisaram estas mesmas células após a adição de células T autólogas à cultura observaram a expressão de genes relacionados com a ativação da resposta imune do tipo Th1 e uma indução de elementos com atividade modulatória (IL-10, TGF- $\beta$ ), caracterizando uma resposta adaptativa (ETTINGER e col., 2008).

Assim, para determinar se haveria diferenças na expressão gênica de células do hospedeiro quando infectados com distintos isolados de uma mesma espécie de parasito (*L. braziliensis*) foi utilizado o microarranjo de DNA. Esse estudo tem como objetivo identificar possíveis padrões distintos de expressão gênica entre células infectadas com parasitos isolados de pacientes com diferentes apresentações de LTA.

## 2. HIPÓTESE

A hipótese desse trabalho é que isolados de *L. braziliensis* pertencentes a diferentes clados, isto é, apresentam conteúdos genéticos diferentes, induzem a expressão de diferentes perfis de genes em células da resposta imune, como os macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico, e estes padrões distintos teriam um papel nos desfechos clínicos em hospedeiros humanos infectados.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

Distinguir cepas pertencentes às diferentes subpopulações de *L. braziliensis* associadas com forma clínica de doença (LC, LM e LD), através de diferenças em seus comportamentos biológicos pela avaliação da indução dos padrões de resposta específicos em células imunes infectadas, os quais devem ser em parte responsáveis pelos vários desfechos da LTA.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

Comparar os perfis globais de expressão gênica em macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico humanos, provenientes de doadores saudáveis, infectados em paralelo com isolados dos diferentes clados de *L. braziliensis* (LC, LM e LD) de Corte de Pedra/Ba.

Detectar diferenças no padrão de expressão (indução / repressão) de genes em macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico humanos dos doadores saudáveis infectados com os isolados representantes dos diferentes clados e as células não infectadas.

Avaliar os alvos que deverão apresentar comportamentos diversos entre os clados através de técnicas moleculares tais como qPCR.

#### 4. JUSTIFICATIVA

Em estudo anterior realizado por Schriefer e colaboradores, foi descrita uma população multiclonal entre isolados de *L. braziliensis* provenientes da área endêmica para LTA de Corte de Pedra/Bahia. Nesse estudo, foi também encontrada uma associação estatisticamente significativa entre desfecho clínico da LTA e genótipo parasitário (SCHRIEFER *e col.*, 2004). Essas observações indicam que a variabilidade intraespecífica desses microorganismos exerce um papel importante na determinação da forma de doença, semelhante ao que ocorre na forte relação entre espécie de *Leishmania* e forma de leishmaniose (MARSDEN *e col.*, 1985; AZULAY *e col.*, 1995; SARAVIA *e col.*, 1998 - 2002; SCHRIEFER *e col.*, 2004). Reforçando, esse raciocínio, estudos experimentais indicam que *L. braziliensis* isoladas de pacientes de diferentes formas de leishmaniose se comportam diferentemente em modelos animais (e.g. KAHL *e col.*, 1991; INDIANI DE OLIVEIRA *e col.*, 2004).

Com o estudo proposto estamos dando os primeiros passos na compreensão dos mecanismos biológicos responsáveis pelas associações epidemiológicas entre cepa parasitária e forma de LTA. Os dados que são reportados nesta tese também nos permitem uma melhor compreensão da interação entre a célula hospedeira humana e a *L. braziliensis*, nos permitindo um entendimento acerca dos mecanismos envolvidos no estabelecimento de uma infecção. Os macrófagos uma vez sendo infectados com diferentes cepas de *L. braziliensis* sofreriam eventos precoces distintos, e estes, influenciariam as respostas inatas e posteriormente adaptativas que condicionariam a imunidade ao parasito, a imunopatogênese e ao desfecho clínico da LTA.

O fato de avaliarmos, paralelamente, os padrões globais de expressão gênica que foram significativamente alterados pela infecção por isolados distintos de *L. braziliensis* em macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico (MDM) de um mesmo doador humano sadio nos permitirá detectar os efeitos diferenciais causados pelas cepas parasitárias nas células infectadas, sem o confundimento introduzido pela variabilidade genética dos hospedeiros.

## 5. DESENHO DE ESTUDO E METODOS

### Obtenção dos isolados parasitários.

Os isolados de *L. braziliensis* foram obtidos de pacientes com LC, LM e LD, diagnosticados no Posto médico de Corte de Pedra – Bahia, por meio de aspiração de lesões durante as consultas iniciais, sendo provenientes de casos humanos distintos. 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  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  células/mL). Então, os parasitos eram estocados e congelados em DMSO a  $-180^\circ\text{C}$ . Para a obtenção das promastigotas utilizadas nas infecções dos MDM, os estoques de isolados selecionados foram descongelados, cultivados em Schneider até atingirem  $10^7$  células / mL (fase estacionária) e tratados como descrito anteriormente. Foram selecionados para o desenvolvimento do trabalho até três isolados de *L. braziliensis* de cada clado associado à LC, LM ou LD (B, C e A, respectivamente), correspondendo ao total de nove amostras.

### Recrutamento de Voluntários e Critério 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. 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 foram excluídos. A

quantidade de sangue coletada de cada doador variou entre 120 e 180 mL. Foram recrutados, ao longo do tempo para este estudo, em torno de 20 voluntários, já que houve dificuldades para a obtenção de células suficientes, bem como de condições experimentais apropriadas para responder os nossos objetivos ao longo da fase experimental deste trabalho.

### **Infecção de Macrófagos humanos derivados de monócitos do sangue periférico (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. 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. braziliensis*. As CMSP foram separadas a partir de 120 a 180 mL sangue total por gradiente de Ficoll-Hypaque. As células foram lavadas, ajustadas para 2 a  $4 \times 10^6$  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). Então as células foram mantidas em placas de Teflon (Savillex Corporation) a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por seis dias. Nessa fase, os monócitos presentes entre as CMSP se diferenciam em macrófagos, servindo como fonte de células para a infecção. Após os seis dias de incubação, as CMSP foram lavadas com solução HBSS 1x, contadas e ajustadas para  $5 \times 10^6$  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 CO<sub>2</sub>. Cada uma das três cepas de *L. braziliensis* representantes dos clados A, B e C foi adicionada a dois poços contendo os MDM em paralelo. Os parasitos foram adicionados às MDM na proporção de 2:1 (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 4 horas de incubação a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, 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.

A determinação da porcentagem de infecção nos experimentos foi realizada concomitantemente, onde CMSP foram plaqueadas em placas de 24 poços, tratadas, incubadas para a obtenção de MDM e infectadas em paralelo semelhante ao descrito acima. Após 4 horas de infecção, as suspensões foram submetidas a Citospin, fixadas, coradas pelo Giemsa e avaliadas quanto a taxa de infecção de cada isolado ao microscópio ótico. Apenas experimentos com taxas de infecção superiores a 80% foram empregados nos ensaios de microarranjos e suas validações, os demais foram descartados.

### **Avaliação dos perfis globais de expressão / repressão gênica nas células infectadas com diferentes cepas de *L. braziliensis* por microarranjo de DNA.**

A avaliação global da expressão gênica nos MDM foi realizada por microarranjos de DNA, que foi realizada na planta de microarranjos de DNA da Universidade de Iowa (EUA), juntamente com a avaliação bioinformática dos resultados globais. Foram empregadas máquinas e *chips* da Affymetrix onde o DNA foi removido das amostras de RNA total dos MDM infectados por *L. braziliensis* e dos não infectados usando-se 1 unidade de DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por µg de RNA. Então o RNA foi purificado com o kit comercial RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, USA) e a quantidade de RNA total usada para as análises de microarranjo foi de 10 µg. Em resumo, o cDNA foi sintetizado a partir do RNA total [BRL Superscript, T7-(dT)24 primer], seguido de transcrição *in vitro* com UTP/CTP biotinilado (ENZO kit, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). O cRNA biotinilado produzido foi fragmentado em

oligonucleotídeos com 50 a 100 bases usando-se alta salinidade e calor (94°C). Inicialmente, as amostras de cRNA foram hibridizadas a um *chip* de pré-avaliação (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) contendo seqüências alvo de diversos genes, dentre eles GAPDH e  $\beta$ -actina, para avaliar a sua qualidade. Uma vez confirmada a integridade dos produtos a serem testados com o *chip* de pré-avaliação, o resto do cRNA foi usado para hibridizar ao Genechip de microarranjo Human Genome U133 Plus 2.0 Array® (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) *overnight*, o qual contém cerca de 47.000 transcritos de seqüências funcionalmente caracterizadas de 6.500 genes do genoma humano. Os *chips* de DNA foram hibridizados com 15  $\mu$ g de cRNA fragmentado numa mistura incluindo o oligonucleotídeo controle B2 da Affymetrix, 0.1 mg / mL de DNA de esperma de salmão, 0.5 mg/mL de albumina sérica bovina acetilada, e tampão de hibridização 1x [50mM MES (Ácido 2-Morfolinoetanesulfônico monoidratado), 0.5 M [Na<sup>+</sup>], 10mM EDTA, e 0.005% Tween 20]. O oligonucleotídeo de controle B2 foi usado para hibridizar com segmentos estruturais do *chip* e assim permitir sua varredura e alinhamento adequados. Os coquetéis de hibridização foram aquecidos a 95°C e incubados com os *chips* por 18 horas a 45°C. Após as hibridizações, os *chips* foram lavados e corados com estreptoavidina-ficoeritina. Monitorando-se a fluorescência associada a cada ponto de DNA na matriz do microarranjo foi possível inferir-se a abundância de cada mRNA na amostra avaliada. Os *chips* foram varridos duas vezes usando o Affymetrix® GeneChip Scanner Model 3000 7G e inicialmente analisados para a presença ou ausência de transcritos. As imagens escaneadas dos *chips* incubados com as amostras referentes às células submetidas às condições de infecção foram obtidas e analisadas usando o GeneChip operating software (GCOS) v1.4. Estas imagens foram comparadas com as imagens obtidas a partir do chip controle incubado com as amostras referentes aos MDM não infectados para determinar se um transcrito em particular foi induzido, reprimido ou manteve-se de acordo com o grau basal de transcrição. As análises foram realizadas empregando-se o software da Affymetrix e os resultados exportados para planilhas Excel. Para as análises dos dados, a integridade das amostras e performances de hibridização foram avaliadas através de hibridizações de grupos de controles exógenos e

endógenos (bioB, bioC, bioD, cre; poly A-dap, lys, phe, thr, e trp; e os genes de controle Actina, GAPDH e hexocinase). A intensidade de fluorescência dos controles e cDNAs foram monitoradas usando-se o software Affymetrix Microarray Suite 5 (MAS), o qual avalia o sinal de fluorescência emitido por cada sonda para determinar se um transcrito está presente ou ausente. O algoritmo identifica e remove a contribuição de sinais inespecíficos, além de estimar a abundância relativa de cada transcrito. Os dados então foram analisados através da comparação entre dois arranjos, gerando uma saída qualitativa, associada a um valor de significância e uma medida quantitativa seguida de intervalo de confiança. A saída qualitativa indica se um transcrito está aumentado, diminuído ou inalterado em relação ao estado basal da sua expressão (célula não infectada). A medida quantitativa fornece uma estimativa da diferença relativa da abundância do transcrito entre os dois arranjos. A ferramenta de exploração de dados AffyQCReport foi usada para filtrar e ranquear grupos de dados obtidos de amostras replicadas e múltiplos arranjos. O ponto de corte para se determinar se um gene teve a sua expressão aumentada ou diminuída consistiu numa mudança duas vezes maior ou menor entre as intensidades de fluorescência obtidas para os MDM controles (não infectados) *versus* infectados. Cada uma das três condições (i.e. MDM infectados em paralelo com os três isolados diferentes de *L. braziliensis*) foi testada pelo menos duas vezes. As diferenças relevantes detectadas foram então validadas por qPCR.

### **Validação dos resultados dos Microarranjos por qPCR de alvos selecionados dentre os transcritos significativamente afetados pelas infecções.**

Para a validação dos resultados da avaliação da expressão gênica global, os níveis de expressão de 21 genes significativamente afetados pela infecção dos MDM com os representantes de *L. braziliensis* foram reavaliados através de qPCR, usando-se as mesmas amostras de RNA empregadas nos microarranjos. Os genes explorados na validação foram selecionados de forma

a refletir o espectro de expressões observado ao microarranjo, selecionando aqueles dentre os que foram mais intensamente induzidos e reprimidos. Os transcritos validados também foram escolhidos de forma a representar os principais processos celulares afetados pelas infecções.

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 1µg de RNA total em cDNA segundo a recomendação do fabricante. A segunda etapa consistiu na amplificação dos alvos, usando o cDNA como *template* através do uso dos reagentes específicos e de acordo com as recomendações do fabricante, caracterizando uma reação de RT-qPCR. Foram usados primers e sondas específicos para os transcritos a serem avaliados, desenvolvidos sob encomenda a um fornecedor através do Custom TaqMan Gene Expression Assay® (Applied Biosystems Inc., USA). Resumidamente, a reação foi realizada em um volume final de 10 µL, 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 candidatos foram então amplificados com o termociclador StepOne Plus® (Applied Biosystems Inc., USA). 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. 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 média do Ct do controle interno ( $\beta$ -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 avaliarmos se haveria mudanças similares na expressão gênica global em MDM se novos isolados de *L. braziliensis* pertencentes aos clados A, B e C, como também se novos doadores humanos fossem adicionados, os níveis de expressão de 21 genes significativamente afetados pela infecção foram reavaliados por qPCR, usando-se as amostras de RNA de oito novos doadores, que por sua vez tiveram as suas MDM infectadas em paralelo com três representantes de cada clado estudado.

### **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. Para as comparações dos perfis de expressão gênica entre os clados foram empregados os testes de Wilcoxon e Friedman. Todas as comparações foram consideradas significantes com um  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas com o software Graph Pad Prism.

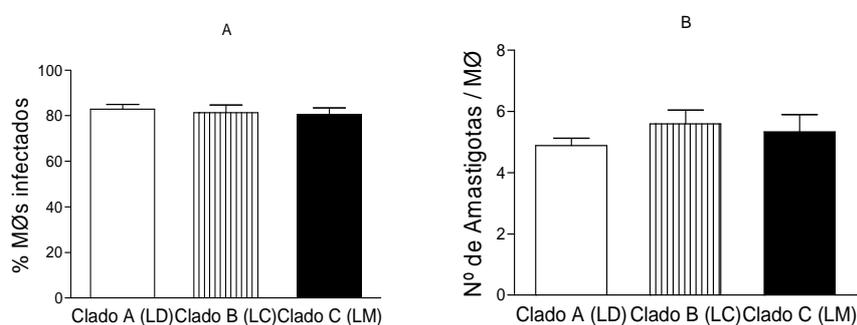
Primers e sondas empregadas para a validação dos transcritos através de RTqPCR:

Alvo	Sequência Forward	Sequencia Reverse	Sequência Reporter
LRRK2	TGAGGTCATTTCTGCTTTAGGAAAA GT	GTTGTCCTATCACAGGGAATTATCT GAA	FAMCAGGGCCAAAGAATTTA
IL-10RB	CAAGGGCCAAGACCATCTGA	GTAGCTCTCTGGTGGCTAAGTC	FAMCCAGCCCCACATCTAG
IL-15RA	TGCCTGGAATACATGTGGAATGAA	GGTATGTCACCTTTCTCTGTGAAC TATCATATATCTATGGCT	FAMCTGCCCCGAATCTT
MYD88	GCCATGGTCTTAGGTGTCTGT	TGGAGCAAAGATATGCATTTTCTAT TGGAA	FAMCCCCAGGACAGACCC
TLR8	CCTAATATTAAGCTGTTGTTTATATT TATCATATATCTATGGCT	GGCATCTAAACCTTAGAAGTCAAAT GTTAC	FAMACCGAACGCAACCACA
PARK7	GCAATTGTTGAAGCCCTGAATGG	CAGTTCGCTGCTCTAGTCTTTAAGA	FAMTTGAGCCGCCACCTCC
TRERF1	GTTGGGAGGTGTCATGGAAGAG	CACCCTGAAGCAAGACTGAATCT	FAMTCGGTGTCCACAACCTT
XPO6	CTGGACGGTGTCCCA	TCCTAGTACCTGGCCACACA	FAMCTGTCCAACGCC
FRP1	ACAATGAGGCTGATGCGTGAT	CTCCATTCCACAAGAGGATCATGT	FAMAAGACTCATTAAAGGCTCTC
MAPK14	CCCCTTTCAAGGAAAGTGAACCTTT	GCTGATAAAATTCATCTTGCTGTGG AT	FAMTTGCAGTTCAAATCCTC
NUB1	CTCCTGAACAGTACCCTTAACTTAC C	CCTGCTAATTTTTTCAGTGGATGCT	FAMCCCTAACAAAACCTCAATAATT
NDUFA11	GGCCTCCCTGGTCAAGATG	GGGCTCACACCTTGGGTT	FAMTTGCAAACACCTCCCAGCCC
NUP93	CCCCAGCGAGTCATCGA	AGAGTGCGGGCTTGACTTC	FAMACCGGACTCTCAACTC
NUP214	GCGGATTCTCTGGTTTTGGATCA	CCCTGGACAGACGAGTTATTTGAC	FAMCCAAAGCTGAACCCTCC
NUP62	GTGCCTCGTCTCGCTGTT	GGAACGACAGTGGTCTCT	FAMCATGGGAACTCACAATCT
TP53	TCAGCCTCCGGAGTAGCT	CCCCATCTCTACAAAACATGCAAAA	FAMATGGTGGCATGAACCTG
HSPA1A	TCAGGCCCCACCATTGAG	GCAAAGTCTTGAAGCTCCAAAACAA	FAMAAGGCCCTAATCTAC
TXNRD1	GGCTGTGTAAGAAATGGGAAAAG G	TGGTGGACTTGGAGAAAAAACAAA TTAAA	FAMCAACTGCCTCAATTGC
UBC	GGGAAACAGCTGGAAGATGGA	GATTTGCATCCCACCTCTGAGA	FAMCAGGGTGGACTCTTTC
MT1M	TGCACCTCCTGCAAGAAGAG	GCCGTGGGCACACTTG	FAMCTGCTCCTGCTGCCCC
MT1X	GCTCCTGCTCGCCTGTT	AGCAGCAGCTCTTCTTGCA	FAMCCGGCTCCTGCAAAT

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Infecção de macrófagos derivados de monócitos (MDM) humanos.

Os MDM dos doadores humanos recrutados para o estudo foram incubados *in vitro* em meio de cultura sendo expostos a cada uma das três cepas de *L. braziliensis* representativas de cada clado. O grau de infecção foi documentado por avaliação microscópica das MDM expostas por 4 horas aos parasitos. A avaliação em quatro doadores, representada abaixo, exhibe que aproximadamente 80% dos MDM se mostraram infectados pelas cepas de *L. braziliensis* (clado A  $83 \pm 5$ , clado B  $81 \pm 8$ , clado C  $81 \pm 7$ ), com uma média de cinco parasitos por célula (clado A  $5 \pm 1$ , clado B  $6 \pm 1$ , clado C  $5 \pm 1$ ) após quatro horas de infecção (Figura 1). Tanto o percentual de MDM infectados quanto o número de amastigotas por célula não diferiram estatisticamente entre os doadores ou entre os clados infectantes para cada doador.



**Figura 1. Carga parasitária em MDM infectados por quatro horas, na razão de 2 parasitos para cada macrófago.**

**(A)** Percentual médio de macrófagos de quatro doadores saudáveis infectados com cada isolado de *L. braziliensis* representante dos clados A, B ou C.

**(B)** O número médio de formas amastigotas de *L. braziliensis* por macrófago infectado. Os dados mostram a média  $\pm$  SE após a quantificação de pelo menos 400 macrófagos por condição em lâminas de cada doador.

## 6.2. Expressão gênica global.

Os MDM foram infectados, em paralelo, com um representante de cada uma das três subpopulações ou clados de *L. braziliensis* (isto é, A, B ou C, associados a LD, LC ou LM, respectivamente). A análise dos perfis de expressão gênica global foi realizada em um único ponto de infecção (4 horas), com a finalidade de detectar as alterações mais precoces induzidas quando da interação parasito–hospedeiro. Foram detectados 560 genes cujas expressões foram significativamente alteradas após a infecção com qualquer dos isolados de *L. braziliensis* quando comparados com os controles não infectados. Os dados foram primeiramente analisados dentro de cada doador para as mudanças na expressão gênica entre MDM infectados *versus* não infectados para cada clado. As mudanças na expressão gênica induzidas pelos três diferentes clados foram então comparadas entre os doadores. A maioria das mudanças dos transcritos revelou uma diminuição nas suas expressões quando comparadas aos MDM não infectados, independente do clado da *L. braziliensis* empregada no experimento. A figura 2 mostra as intensidades de mudança em 89 transcritos que foram significativamente induzidos, e 471 transcritos que foram significativamente reprimidos após a infecção com cada um dos três isolados de *L. braziliensis*, em comparação com as intensidades de suas expressões em MDM não infectados.

Os transcritos significativamente alterados foram classificados de acordo com suas vias funcionais. Os processos do hospedeiro que foram afetados pela fagocitose de *L. braziliensis* puderam ser agrupados em quatro principais categorias: propagação de sinal, função metabólica mitocondrial, apoptose e resposta aos estímulos externos. As vias predominantes e genes cuja expressão foram alteradas pela infecção por *L. braziliensis*, bem como as mudanças na expressão para cada clado, estão listados na Tabela 1.

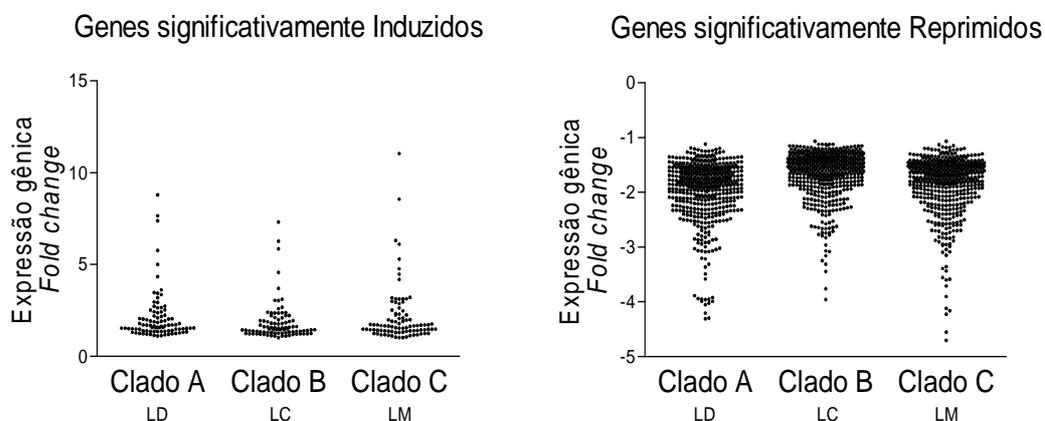
TABELA 1: Alguns genes de macrófagos derivados de monócitos humanos cuja expressão foi significativamente alterada pela infecção com *L. braziliensis* dos clados A, B e C de Corte de Pedra – Ba.

Grupo Funcional	Gene	Alteração em Log <sub>2</sub> na expressão relativa em MDMs não infectados, por clado infectado			Descrição do Gene
		Clado			
EXPRESSÃO DIMINUÍDA		A	B	C	
<b>Propagação de Sinal</b>					
Receptores de Superfície	TLR8	-2.5	-1.9	-2.5	Receptor Toll-like 8
	IL-10RA	-1.2	-0.9	-1.1	Receptor de Interleucina 10, subunidade alfa
	IL-10RB	-0.8	-0.5	-0.7	Receptor de Interleucina 10, subunidade beta
	IL-12RB1	-1.8	-1.5	-1.5	Receptor de Interleucina 12, subunidade beta 1
	IL-15RA	-2.2	-1.7	-1.9	Receptor de Interleucina 15, subunidade alfa
<b>Transdução de Sinal</b>					
	MYD88	-1.7	-1.5	-1.6	Gene de resposta primária de diferenciação mielóide (88); Ativa NF-Kb
	PELI1	-1.9	-1.9	-2.1	Molécula de sinalização intracelular Pellino-relacionada; Ativa NF-kB
	ECT2	-2.6	-2.0	-2.3	Oncogene transformador de célula epitelial sequência 2; Ativa NF-kB
	VISA	-1.7	-2.0	-1.8	Gene adaptador de sinalização Vírus-induzido; Ativa NF-kB
	NOD2	-2.4	-2.7	-2.5	Gene 2 contendo domínio de oligomerização ligado a nucleotídeo; Ativa NF-kB
	STAT1	-1.4	-1.2	-1.4	Transdutor de Sinal & ativador da transcrição 1 via JAK-STAT

	STAT5A	-1.6	-1.4	-1.4	Transdutor de Sinal & ativador da transcrição 5 via JAK-STAT
	TYK2	-1.8	-1.6	-1.7	Membro não receptor da família JAK; via JAK-STAT
	JAK2	-2.2	-2.1	-2.4	Janus kinase 2; via JAK-STAT
	MAP2K5	-1.2	-1.5	-1.7	Proteína kinase kinase 5 Mitogeno-ativada; via MAPK
	MAP2K3	1.9	1.8	1.9	Proteína kinase kinase 3 Mitogeno-ativada; via MAPK
	ICK	-2.3	-1.9	-2.5	Kinase celular Intestinal (MAK "like"); Possivelmente via MAPK
	TRAF7	-1.4	-1.3	-1.3	Fator 7 TNF receptor-associado; via MKKK da MAPK
	PLCB2	-1.7	-1.6	-1.9	Fosfolipase C, cadeia beta 2; Ativa Fosfolipase C
	CAMKK2	-1.9	-1.6	-1.8	Proteína kinase kinase 2 cálcio/calmodulina-dependente
	MFNG	-1.9	-1.5	-1.8	<i>Manic fringe</i> ; via de sinalização Notch
<b>Reguladores Transcrpcionais</b>	TRERF1	-1.9	-1.6	-1.5	Regulador Transcricional
<b>Função de Poro Nuclear</b>	XPO6	-1.5	-1.5	-1.6	Exportina 6; proteína transportadora de poro nuclear
	RANBP10	-2.0	-1.7	-1.8	Proteína 10 ligadora RAN; transporte poro nuclear
	NUP62	-1.4	-1.3	-1.4	Nucleoporina 62kDa
	NUP93	-1.6	-1.4	-1.5	Nucleoporina 93kDa
	NUP214	-1.8	-1.3	-1.6	Nucleoporina 214kDa
<b>Função Mitocondrial</b>					
Transporte de Elétrons	ISCU	-1.5	-1.4	-1.5	Homólogo <i>Iron-sulfur cluster scaffold</i>
	ISCA2	-2.4	-1.8	-2.3	Homólogo <i>Iron-sulfur cluster assembly 2</i>
	NDUFA11	-1.4	-1.3	-1.4	Subunidade NADH dehydrogenase, mitocondrial codificada
	NDUFC1	-1.4	-1.3	-1.4	Subunidade NADH dehydrogenase, mitocondrial codificada
	NDUFB10	-1.5	-1.3	-1.4	Subunidade NADH dehydrogenase, mitocondrial codificada
	NDUFV3	-1.8	-1.5	-1.7	Subunidade NADH dehydrogenase, mitocondrial codificada
	NDUFS3	-1.6	-1.4	-1.5	Subunidade NADH dehydrogenase, mitocondrial codificada

	NDUFS2	-1.7	-1.4	-1.5	Subunidade NADH dehydrogenase, mitocondrial codificada
	NDUFB8	-1.3	-1.2	-1.2	Subunidade NADH dehydrogenase, mitocondrial codificada
	TFAM	-1.5	-1.3	-1.5	Fator de Transcrição A, mitocondrial; codificada no núcleo
Proteína Mitocondrial	MRPS14	-2.3	-2.2	-2.0	Proteína S14 mitocondrial ribossomal; codificada no núcleo
Síntese	MRPS35	-1.5	-1.4	-1.5	Proteína S35 mitocondrial ribossomal; codificada no núcleo
	MRPL16	-2.0	-1.7	-1.8	Proteína L16 mitocondrial ribossomal; codificada no núcleo
	MRPL19	-1.8	-1.5	-1.9	Proteína L19 mitocondrial ribossomal; codificada no núcleo
	MRPL41	-1.7	-1.4	-1.5	Proteína L41 mitocondrial ribossomal; codificada no núcleo
	MRPL52	-1.5	-1.3	-1.5	Proteína L52 mitocondrial ribossomal; codificada no núcleo
	MRP63	-1.6	-1.4	-1.5	Proteína 63 mitocondrial ribossomal; codificada no núcleo
	PDHB	-1.8	-1.5	-1.7	Pyruvate dehydrogenase (lipoamida) beta
<b>Apoptose</b>					
	TP53	-1.5	-1.5	-1.8	Proteína Tumoral p53; Tumor supressora
	MAPK14	-1.7	-1.5	-1.6	Fosforila e ativa TP53
	FRAP1	-2.2	-1.8	-2.0	Fosforila e ativa TP53
	YPEL3	-2.9	-2.2	-2.7	Tumor suppressora diretamente induzida por TP53
	MRPL41	-1.7	-1.4	-1.5	TP53 translocação a mitocôndria
<b>Doença de Parkinson</b>					
	LRRK2	-3.9	-3.1	-4.1	PARK8; Induz apoptose; Interage com PARKIN e DJ-1
	DJ-1	-1.3	-1.2	-1.2	PARK7; Chaperona redox-sensível e sensor do estresse oxidativo
	NUB1	-1.7	-1.6	-1.7	Regulador negativo de proteínas ubiquitina-like 1; Parte de corpos de Lewy
<b>EXPRESSÃO AUMENTADA</b>					
			<b>Clado</b>		
		<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	
<b>Regulador Transcricional</b>	HIC1	3.6	2.7	2.9	Repressor de transcrição Hipermetilado no Cancer 1

<b>Apoptose</b>	ETS2	2.4	1.9	2.1	Provável ativador transcricional de TP53
<b>Resposta ao Ambiente</b>					
Ligante de Metal	MT1M	7.6	6.3	11.0	Metalotionina 1M
	MT1X	2.7	2.4	3.2	Metalotionina 1X
	MT1F	2.6	2.4	3.2	Metalotionina 1F
	MT1E	3.4	3.0	4.2	Metalotionina 1E
	MT1G	2.7	2.4	3.1	Metalotionina 1G
	MT1H	2.7	2.4	3.1	Metalotionina 1H
Resposta Antioxidante	TXNRD1	1.3	1.3	1.4	Tioredoxina redutase 1
Resposta ao Estresse	HSPA1A	5.8	4.6	6.1	Proteína 1A do choque térmico 70kDa
<b>Degradação de Proteasoma</b>					
	UBC	1.2	1.1	1.2	Ubiquitina C; proteassoma
	UBAP1	1.5	1.4	1.4	Ubiquitina proteína 1 associada alvo ubiquitinação
	SPSB1	2.4	2.1	2.2	Substrato reconhecimento – complexo E3 ubiquitina-proteína ligase
	KLHL21	1.7	1.6	1.7	Kelch-like 21; Adaptador de uma E3 ubiquitina-proteína ligase
	USP12	1.6	1.4	1.5	Ubiquitin specific peptidase 12; Deubiquitinating enzyme



**Figura 2.** Mudanças globais na expressão gênica em macrófagos infectados com *L. braziliensis* de diferentes clados. MDM de quatro doadores humanos saudáveis infectados numa razão 2:1 (parasito: MDM) com cada um dos três isolados de *L. braziliensis*, representativos de cada um dos três clados descritos: clado A (associado a LD); clado B (associado a LC); e clado C (associado a LM). As intensidades de mudanças nas expressões dos genes (*Fold change*) foram calculadas através da comparação de dados de fluorescência que representam a abundância de cada transcrito em MDM infectados em relação à abundância dos mesmos transcritos entre os MDM não infectados do mesmo doador. Cada ponto na figura representa a média da intensidade de mudança (*Fold change*) em abundância de cada transcrito entre os quatro doadores.

### 6.3. Genes Reprimidos

Do total de 560 genes que foram significativamente alterados pela infecção, com qualquer um dos isolados de *L. braziliensis* selecionados, aproximadamente 85% (471) dos transcritos, sofreram repressão na sua expressão, representando portanto a maioria dos genes influenciados (Figura 2). Os genes pertencentes a três das quatro categorias mencionadas anteriormente foram predominantemente reprimidos, e o grupo cujo maior número de genes sofreu alteração foi o de sinalização celular, tendo entre os transcritos de RNAs mensageiros aqueles codificando para receptores celulares de superfície, proteínas de transdução de sinal e um regulador da transcrição.

### **Propagação do sinal celular**

O transcrito mais altamente reprimido codificando para um receptor de superfície foi o *Toll-like 8* (TLR8), receptor que reconhece componentes sintéticos pequenos e RNA de fita simples dentro de vacúolos na célula hospedeira. Também sofreu alteração o transcrito para a proteína adaptadora MyD88, uma molécula envolvida na sinalização celular induzida por TLRs que auxilia na ativação de vários fatores de transcrição.

Os transcritos que codificam para receptores de citocinas ou intermediários na sinalização em cascatas iniciadas pelas citocinas, que foram regulados negativamente, incluem subunidades para o receptor de IL-12 (IL-12R $\beta$ 1), IL-15 (IL-15R $\alpha$ ) e IL-10 (IL-10R $\beta$ ). Proteínas transdutoras de sinal, a partir de receptores de citocinas, também foram reprimidas entre as quais a Jak2, STAT1, STAT5A, TYK2 e duas MAP kinases (MAP2K5 e MAP2K3).

De maneira geral, os transcritos que codificam peptídeos intermediários do processo de sinalização ou proteínas reguladoras da transcrição foram significativamente afetados. Destes, 35 (87,5%) foram modulados negativamente.

### **Papel na permeabilidade nuclear**

Os transcritos que codificam para fatores de permeabilidade nuclear foram também modulados negativamente pela infecção por *L. braziliensis*, dentre eles os transcritos que codificam componentes de poros nucleares, incluindo dois transcritos que codificam para proteínas ligadoras Ran (nuclear exportina 6 – XPO6, e RBP10) e três nucleoporinas (NUP62, NUP93 e NUP214).

### **Função Mitocondrial**

Vários transcritos que codificam proteínas com funções na mitocôndria, como na fosforilação oxidativa se mostraram reprimidos. Dentre eles temos os transcritos que

codificam para proteínas envolvidas no transporte de elétrons (NADH desidrogenases), transporte do íon Ferro (ISCA2 e ISCU) e isoformas de proteínas ribossomais mitocondriais –MPLs.

## **Apoptose**

Alguns transcritos que codificam para fatores envolvidos no mecanismo celular de apoptose foram modulados negativamente pela infecção por *L. braziliensis*, dentre eles os transcritos que codificam componentes para a proteína p53 e a LRRK2

## **6.4. Genes induzidos**

Do total de 560 genes que foram significativamente influenciados pela infecção, com qualquer um dos isolados de *L. braziliensis* selecionados, apenas aproximadamente 15% (89) dos transcritos se mostraram positivamente expressos (Figura 2).

Alguns transcritos que codificam para proteínas envolvidas na regulação da transcrição (HIC1) e na apoptose (ETS2) tiveram a sua expressão induzida, embora a maioria dos transcritos contidos nestes grupos tivessem sido reprimidos.

## **Resposta ao estímulo externo**

Os transcritos que foram induzidos neste grupo foram aqueles que codificam genes envolvidos na resposta às condições ambientais, muitas vezes envolvidos na resposta celular ao estresse. Entre eles, temos os que codificam para as proteínas Metalotioninas (MT1M, MT1X, MT1F, MT1G, MT1E e MT1H), que são importantes para a quelação de metais e na regulação celular dependente do íon zinco. Por causa do

seu conteúdo rico em cisteína, as metalotioninas não apenas quelam íons metais, mas em algumas situações assumem um papel protetor contra a toxicidade oxidante. O transcrito para a tioredoxina redutase (TXRND1) também foi modulado positivamente como também um membro da família HSP70 (HSPA1A).

### **Degradação de proteassoma**

Vários transcritos que codificam para proteínas associadas com a Ubiquitina foram induzidos, sugerindo um aumento dos seus níveis de expressão quando a célula sofre diferentes tipos de estresse, como é o caso da infecção por *L. braziliensis*. Dentre eles figuraram a Ubiquitina C (UBC), a proteína 1 associada a ubiquitina (UBAP1), proteínas do complexo ligase (SPSB1, KLHL21) e a peptidase específica USP12.

### **6.5. Validação dos Microarranjos de DNA**

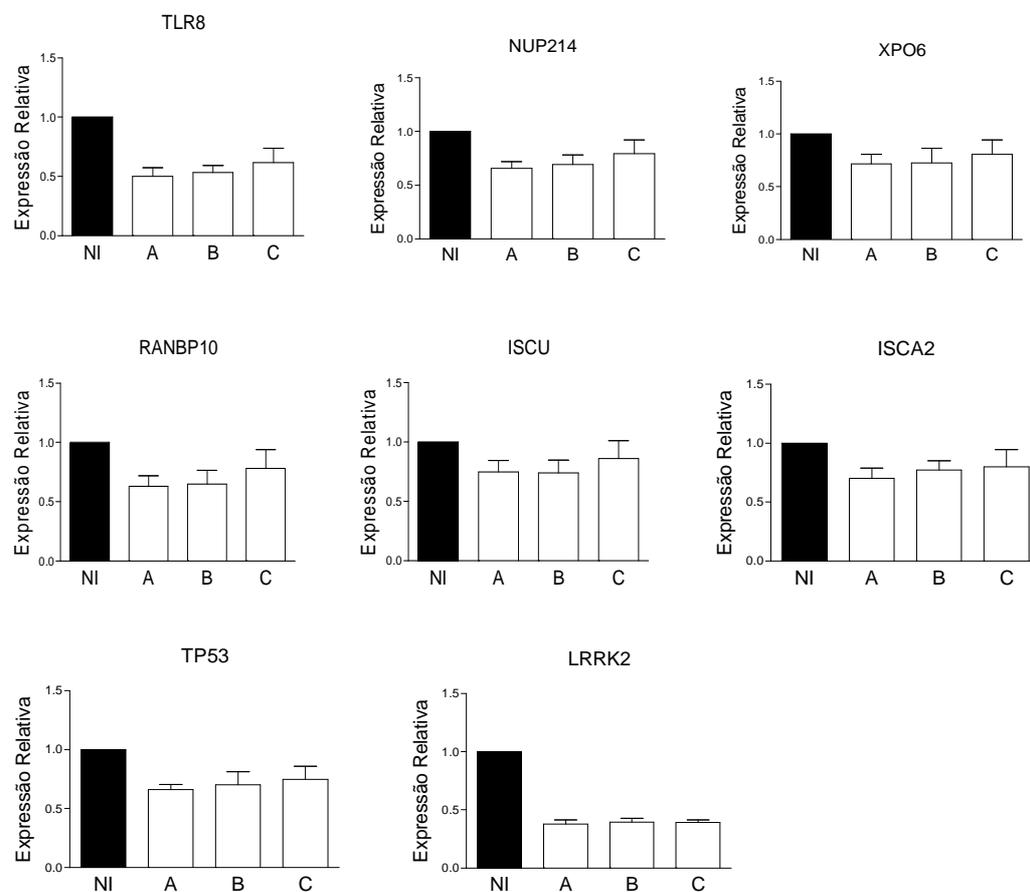
Na validação das observações obtidas por Microarranjo de DNA nós reavaliamos os níveis de expressão de 10 transcritos representativos dos que foram significativamente alterados pela infecção por *L. braziliensis* por RT-qPCR, empregando-se a mesma amostra originalmente usada para os microarranjos. Os dados são mostrados na Tabela 2, onde observamos as intensidades de expressão (*fold change*, do inglês) observadas empregando-se cada uma das duas técnicas para os genes (MT1M, HSPA1A, MT1X, TXNRD1, UBC, DJ-1, TRERF1, IL-15RA, TLR8 e LRRK2), que foram escolhidos com a finalidade de refletir o espectro geral de expressão observada nas células infectadas aos ensaios de microarranjo. Ou seja, variando desde os transcritos mais induzidos aos mais reprimidos. Como mostra a Tabela 2, em todas as condições avaliadas observamos que a intensidade relativa dos transcritos detectadas por RT-qPCR variou na mesma direção verificada no microarranjo, mas como era de se esperar com diferenças na magnitude entre os

métodos. Reforçando a precisão dos achados ao microarranjo, com exceção do transcrito para o IL-15RA, o ranqueamento geral dos transcritos de acordo com seus graus relativos de expressão foi coincidente entre os dois métodos.

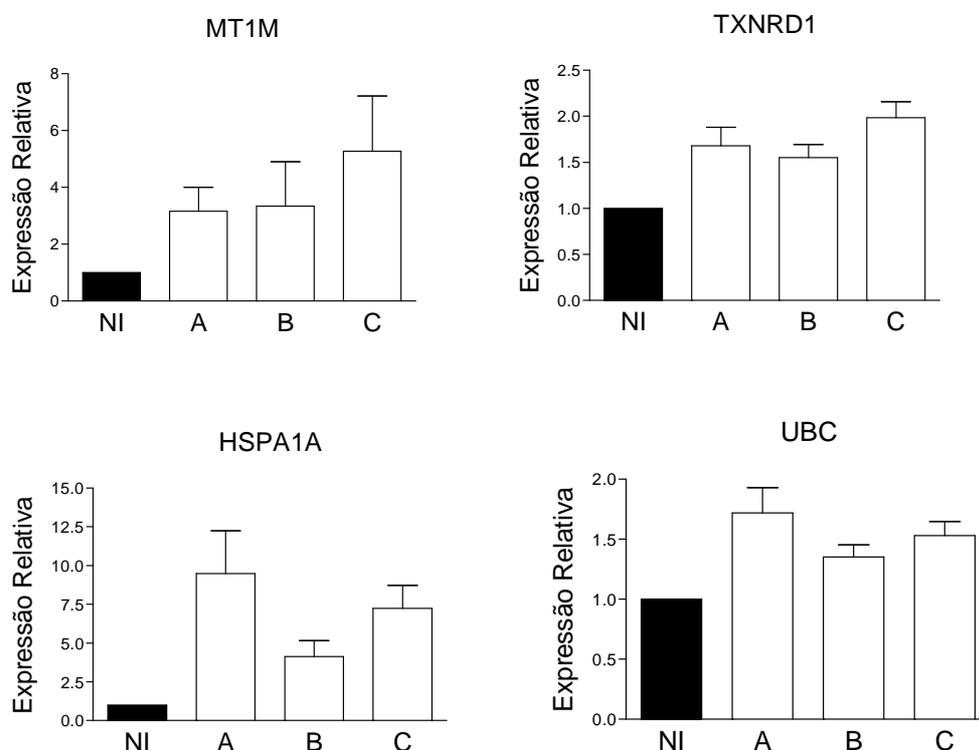
As figuras 3 e 4 mostram mais alguns transcritos que foram selecionados para a validação e que sofreram alteração na expressão gênica, tanto para uma modulação negativa (figura 3), quanto para uma modulação positiva (figura 4). Em todos os casos, a direção da alteração foi semelhante entre os dados obtidos pelo Microarranjo e pelo RT-qPCR.

**TABELA 2. Mudanças na expressão de 10 transcritos em MDM infectados por isolados de *L. braziliensis* pertencentes a cada clado (A, B ou C). Comparação dos resultados entre os Microarranjos de DNA e o qRT-PCR**

Transcrito	Clado	Microarranjo	qPCR	Razão A, C/B	
		Fold change	RQ	Microarranjo	qPCR
MT1M	A	7,6533	2,66	1,22	1,11
MT1M	B	6,2687	2,405		
MT1M	C	11,048	4,945	1,76	2,06
HSPA1A	A	5,7629	4,869	1,26	1,5
HSPA1A	B	4,5629	3,249		
HSPA1A	C	6,1013	4,414	1,34	1,36
MT1X	A	2,6616	3,88	1,12	1,34
MT1X	B	2,3838	2,898		
MT1X	C	3,2027	5,642	1,34	1,95
TXNRD1	A	1,3368	1,524	1,00	0,98
TXNRD1	B	1,33406	1,56		
TXNRD1	C	1,3765	1,855	1,03	1,19
UBC	A	1,1787	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	0,453	1,18	0,93
TRERF1	B	-1,61773	0,486		
TRERF1	C	-1,48509	0,5736	0,92	1,18
IL-15RA	A	-2,18693	0,6243	1,29	1,15
IL-15RA	B	-1,6893	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	-3,8873	0,5367	1,26	0,97
LRRK2	B	-3,08211	0,5532		
LRRK2	C	-4,12024	0,4819	1,34	0,87



**Figura 3. Avaliação por RT-qPCR das expressões de alguns genes que se mostraram reprimidos ao Microarranjo de DNA. Foram usadas as mesmas amostras de RNA empregadas nos Microarranjos nessas validações. As barras correspondem às expressões médias e erros padrão dos genes avaliados nos RNAs dos MDM dos quatro doadores saudáveis infectados com cada um dos três isolados de *L. braziliensis* em relação a MDM não infectados do mesmo doador. (NI) não infectado; (A) Clado A (associado a LD); (B) Clado B (associado a LC); (C) Clado C (associado a LM).**



**Figura 4.** Avaliação por RT-qPCR das expressões de alguns genes que se mostraram induzidos ao Microarranjo de DNA. Foram usadas as mesmas amostras de RNA empregadas nos Microarranjos nessas validações. As barras correspondem às expressões médias e erros padrão dos genes avaliados nos RNAs dos MDM dos quatro doadores saudáveis infectados com cada um dos três isolados de *L. braziliensis* em relação a MDM não infectados do mesmo doador. (NI) não infectado; (A) Clado A (associado a LD); (B) Clado B (associado a LC); (C) Clado C (associado a LM).

### 6.6. Regulação diferencial durante a infecção com diferentes clados de *L. braziliensis*

Os transcritos de MDM infectados com isolados de *L. braziliensis* pertencentes a cada um dos três diferentes clados foram regulados na mesma direção geral (indução / repressão). Contudo, a magnitude da mudança para muitos transcritos diferiu entre os clados (figura 5). Como é mostrado na Figura 5A, observa-se um número bem maior de transcritos significativamente alterados pela infecção com os clados A e C do que entre os clados C e B ou clados A e B. A magnitude pela qual cada um dos isolados de

parasitos reprimiu os 471 transcritos está plotado de acordo com o clado na Figura 5B. Apesar das expressões de todos os transcritos terem apresentado a mesma direção, o gráfico ilustra que a magnitude dos efeitos exercidos pelos isolados pertencentes aos clados A e C foi mais intensa que aquela exercida pelo isolado do clado B. Esses efeitos diferenciais dos isolados na expressão gênica dos MDM foram estatisticamente significantes (teste de Friedman,  $p < 0,01$ ). Por outro lado, a análise de agregação acerca da similaridade das expressões gênicas nos MDM infectados com os diferentes isolados de *L. braziliensis*, representada pelo dendrograma no topo da figura 6, indica que as células infectadas com parasitos de clados associados com doença mais grave (A e C) têm comportamentos mais parecidos entre si.

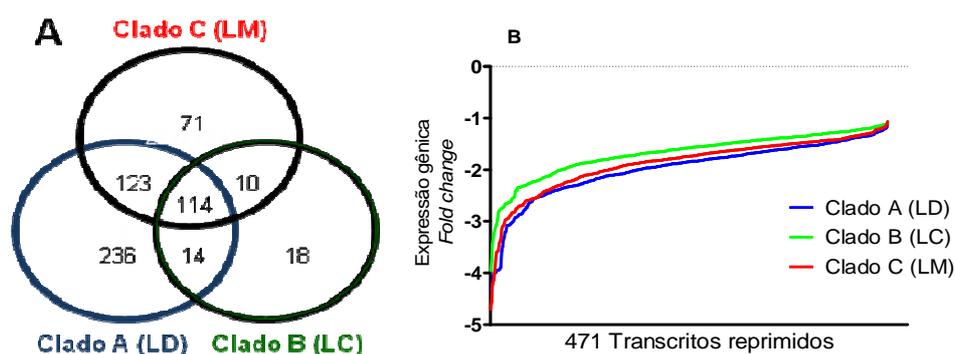


Figura 5. Perfis de expressão gênica dos MDM infectados com *L. braziliensis* representantes dos clados A, B e C de Corte de Pedra/Ba obtidos por avaliação da expressão gênica global com microarranjos de DNA. (A) Diagrama de Venn cujos setores resumem os comportamentos dos genes significativamente afetados pelas infecções de acordo com o isolado de *L. braziliensis* infectante. (B) Magnitude da repressão exercida sobre 471 genes nos MDM infectados com os isolados de *L. braziliensis* dos diferentes clados: (Vermelho) clado A; (Verde) clado B; (Azul) clado C. Cada posição sobre o eixo x corresponde a um único gene, registrada em função do seu grau de repressão (*fold change*) sobre o eixo y.

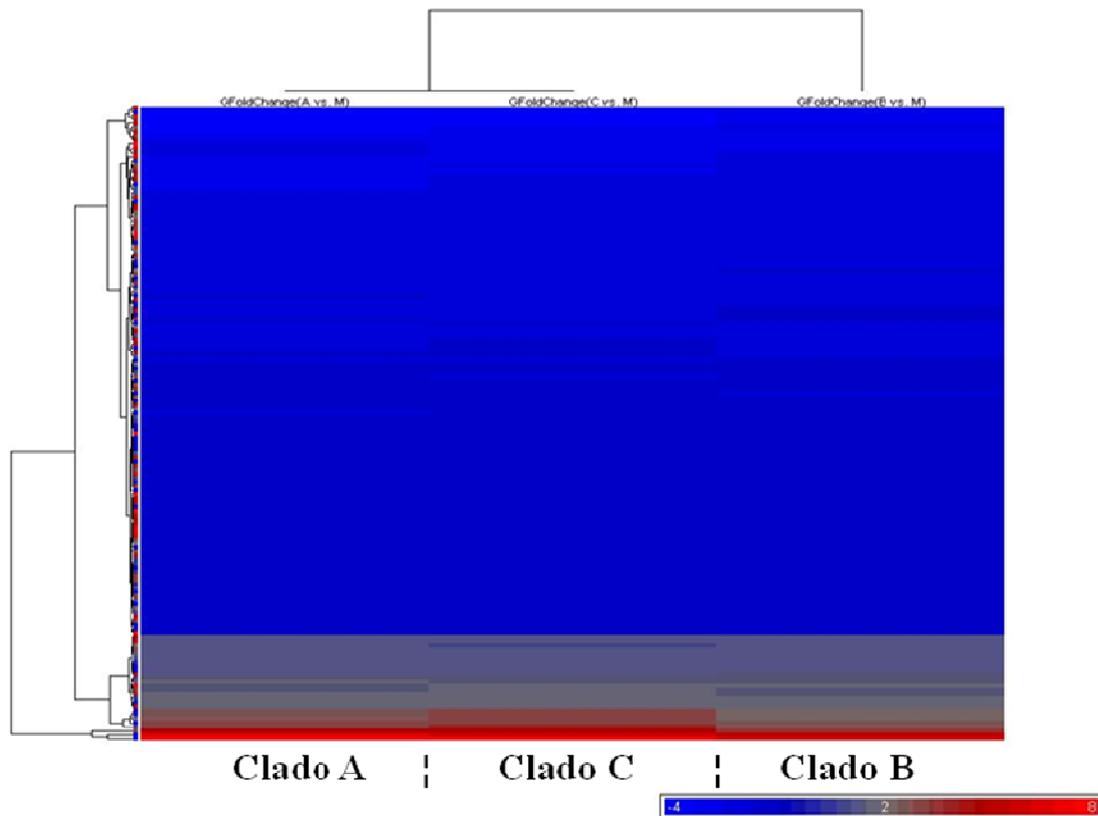
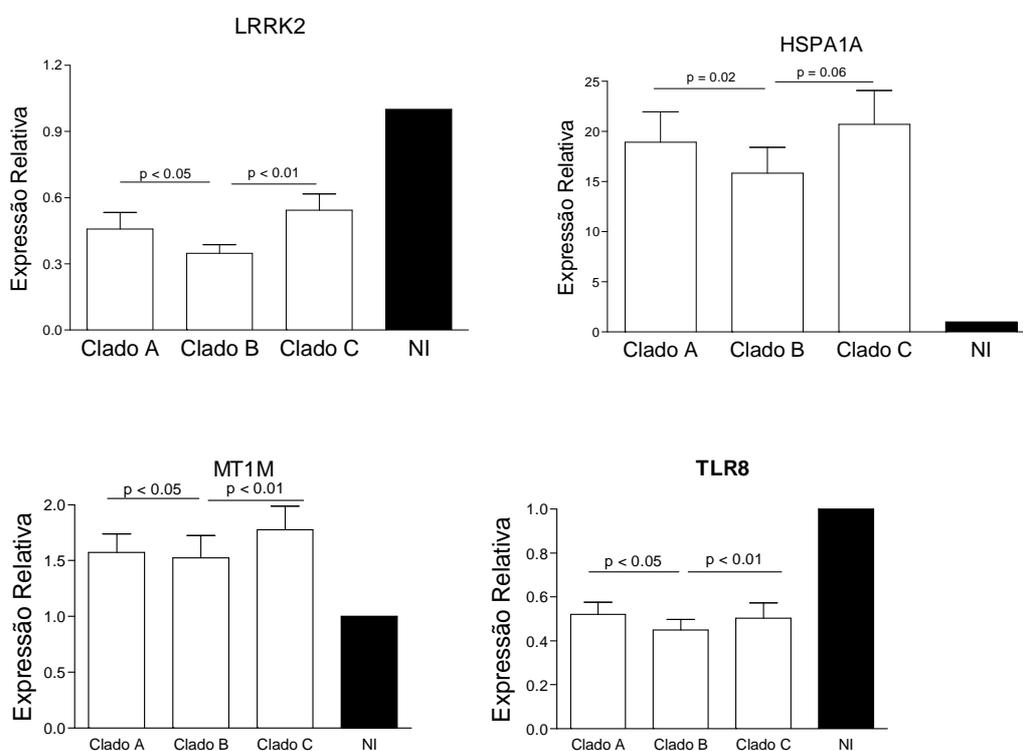


Figura 6. Análise de agregação mostrando que Macrófagos infectados com isolados de *L. braziliensis* dos clados A e C apresentam comportamentos semelhantes nas suas expressões gênicas. (Azul) transcritos reprimidos nas células infectadas em relação às não infectadas. (Vermelho) transcritos induzidos nas células infectadas em relação às não infectadas. Dendrograma no topo da figura agrega os macrófagos de acordo com a semelhança dos seus perfis de expressão gênica.

Para verificar se os efeitos sobre a expressão gênica dos MDM causados pelos três isolados de *L. braziliensis* (um de cada clado) inicialmente empregados poderiam ser extrapolados para outros membros do mesmo clado, MDM de oito novos doadores saudáveis foram infectados em paralelo com nove isolados de *L. braziliensis*, sendo três de cada clado (A, B e C). Os transcritos explorados nessa avaliação foram aqueles que sofreram as maiores intensidades de repressão e indução nos experimentos originais. Os dados dispostos na figura 7 sugerem que a maior similaridade entre os resultados das infecções dos MDM com isolados dos clados A e C, associados às formas metastáticas e graves de LTA, são razoavelmente extrapoláveis a outros integrantes dos clados.



**Figura 7.** Expressão dos genes LRRK2, TLR8, MT1M e HSPA1A avaliada por RT-qPCR em MDM infectados em paralelo com três isolados de *L. braziliensis* representativos de cada um dos clados A, B ou C. Os MDM foram isolados a partir de oito doadores saudáveis distintos daqueles usados para os experimentos representados nas figuras 1, 5, 6, 7 e 8. Os dados foram obtidos a partir de RNA total extraído após quatro horas de infecção paralela de lotes de MDM provenientes de mesmos doadores com os nove isolados de *L. braziliensis* (três de cada clado) a uma MOI de 2 parasitos por macrófagos (2:1). Os valores de p correspondem a comparações de pares pelo teste de Wilcoxon pareado monocaudal.

## 7. DISCUSSÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças com um espectro de manifestações clínicas que variam de úlceras cutâneas auto-resolutivas à doença visceral grave podendo levar até a morte. A resposta imune do hospedeiro à infecção por *Leishmania* é altamente complexa, e envolve interações importantes entre os mecanismos imunes inatos e adaptativos. Nos mamíferos, o macrófago está entre os principais tipos celulares da imunidade inata, que primeiro encontram o parasito após a sua entrada no hospedeiro, e também é a célula imune efetora que, após a ativação, é capaz de matar os organismos intracelulares. Portanto, 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 contribuindo ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas através de medicamentos e vacinas (HANDMAN e col., 2002).

Um modelo de compreensão para as complexas interações entre patógeno e hospedeiro e das vias de sinalização celulares que estão envolvidas na resposta imune do hospedeiro à infecção por *Leishmania* pode ser realizado através da verificação de alterações no transcriptoma dos macrófagos promovidas após exposição *in vitro* destas células às formas infectantes do parasito. Estudos prévios têm direta ou indiretamente destacado as influências de parasito e hospedeiro nos fenótipos clínicos de doenças provocadas por *L. braziliensis* (SCHRIEFER e col., 2004-2009; KAHL e col., 1999; SARAVIA e col., 1998; CABRERA e col., 1995; CASTELLUCCI e col., 2005-2006; SALHI e col., 2008). No presente estudo, nós testamos se o contato inicial entre macrófagos humanos e cepas geneticamente distintas de *L. braziliensis*, provenientes de indivíduos com diferentes formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar, pode levar a diferentes padrões de expressão gênica nestas células do hospedeiro. Os isolados de *L. braziliensis* utilizados nos experimentos foram escolhidos para representar os indivíduos com formas de doença metastáticas (disseminada ou mucosa) ou localizadas (cutânea), onde cada um deles tinha sido previamente genotipado como

pertencentes aos três clados geneticamente distintos, que correspondem a essas formas de doença (A, C ou B, respectivamente) (SCHRIEFER e *col.*, 2004).

Para analisar o padrão de expressão gênica, foi utilizada como ferramenta molecular a técnica de microarranjo de DNA. Vários autores empregaram esta ferramenta no estudo da Leishmaniose em diversas possibilidades. *Ashutosh e colaboradores*, utilizando o protocolo de expressão gênica por esta metodologia, identificaram um gene que codifica para a molécula MAPK1 no cinetoplasto de *L. donovani*, que foi modulado negativamente em isolados resistentes ao tratamento com antimonial, correlacionando o papel desta molécula na resistência ao tratamento em isolados responsáveis pela Leishmaniose visceral na Índia (ASHUTOSH e *col.*, 2012). Em nosso estudo, entre os transcritos dos macrófagos que foram significativamente alterados pela infecção por *L. braziliensis*, ocorreu a repressão da expressão da maioria deles influenciada pelo parasito. Muitos 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, 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. Isto sugere que pode haver uma supressão geral de vias de transdução de sinais a partir do ambiente extracelular. Um trabalho de *Moore e colaboradores* relata uma das primeiras descrições, indicando que a infecção de macrófagos por *Leishmania.spp* prejudica a transmissão de informações a partir da superfície do macrófago para o núcleo (MOORE e *col.*, 1993).

Posteriormente, vários relatos mais detalhados neste sentido, mostraram que, embora o contato inicial de parasitas com a célula hospedeira conduza a uma ativação transitória de mecanismos de sinalização, uma vez que a infecção do macrófago é estabelecida, muitas vias de sinalização são suprimidas (ENGWERDA e *col.*, 2004). Tanto os TLRs como as vias Jak-STAT levam a ativação do fator de transcrição NF-κB,

que por sua vez está envolvido na ativação de genes ligados à resposta inflamatória, e desta forma a infecção por *L. braziliensis* levaria a uma diminuição destas respostas pró-inflamatórias no macrófago. A sinalização através das vias Jak / STAT e MAPK, com efeitos resultantes sobre a ativação de NF- $\kappa$ B, são algumas das mais dramaticamente afetadas (JUNGHAE e col., 2002; BHARDWAJ e col., 2005; BENOTHMAN e col., 2008; CALEGARI-SILVA e col., 2009; MATTE e col., 2010). Isto vem favorecer 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 R e col., 2007). Por sua vez, os citados mecanismos de regulação prejudicados implicam em vários efeitos sobre proteínas nestas cascatas, incluindo o seu estado de fosforilação (BHARDWAJ e col., 2005), e direcionamento ao proteassomo para a degradação (FORGET e col., 2005). Os dados que apresentamos no presente trabalho documenta 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 nas vias de sinalização, embora as nossas observações sugiram que as alterações na expressão gênica ocorrem de maneira precoce após a infecção do macrófago, mesmo que os efeitos fenotípicos sejam supostamente detectados mais tardiamente.

Uma observação inesperada foi a modulação negativa dos transcritos relacionados à permeabilidade nuclear após a infecção de macrófagos por *L. braziliensis*. Os transcritos 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. Alguns vírus de RNA têm sido mostrados a manipular componentes da maquinaria de poro nuclear, estimulando a sua própria infecção e sobrevivência, como resultado da permeabilidade alterada da membrana nuclear (GUSTIN e col., 2003). O único efeito relatado de *Leishmania* influenciando o transporte nuclear é um trabalho recente que indica que amastigotas de

*L. donovani* prejudicam a translocação nuclear da STAT1 $\alpha$  pelo bloqueio de sua interação com a importina-Alpha5 (MATTE e col., 2010). Nossas observações sugerem que podem haver efeitos adicionais de *Leishmania spp.* em vias de transporte nuclear.

Observações no presente estudo levantaram a hipótese de que a infecção com *L. braziliensis* pode suprimir ou modificar a biogênese de grupamentos ferro-enxofre e/ou a respiração mitocondrial. Permanece a ser visto se uma diminuição sutil dos transcritos que codificam os componentes do Complexo I é capaz de afetar a geração do potencial de elétrons na membrana mitocondrial interna. No entanto, as evidências sugerem que o complexo I está envolvido na apoptose celular, e é tentador especular que estas alterações podem resultar numa diminuição dos sinais mitocondriais, levando a apoptose na célula infectada. Na verdade, 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 e col., 1994). Embora vários trabalhos documentem este fenômeno (MOORE e col., 1994; LISI e col., 2005; RUHLAND e col., 2007), o mecanismo se manteve praticamente indescritível. Dois estudos de macrófagos de linhagem celular de murinos de BALB/c ou do RAW 264,7 sugerem que a infecção por *L. major* provoca uma diminuição da permeabilidade e consequente repressão do Citocromo c liberado a partir da mitocôndria, em parte mediada pelo Bcl-xL, impedindo a ativação das caspases e apoptose (AKARID e col., 2004; DONOVAN e col., 2009). As células de um modo geral diferem na sua resposta a determinadas alterações no DNA em decorrência de diferentes fatores, como físicos, tóxicos, imunológicos ou infecciosos, e que frequentemente induzem a apoptose. Isso é dependente do tipo de célula, da etapa do ciclo celular e do grau de diferenciação que a mesma se encontra. Um dos fatores importantes é a proteína p53, um fator de transcrição que é fosforilado por diferentes kinases em resposta aos fatores lesivos do DNA. Os transcritos envolvidos na via de apoptose, que observamos repressão por *L. 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 presente estudo de macrófagos humanos infectados com *L. braziliensis* não revelou uma mudança significativa na expressão de membros da família Bcl-2. No entanto, os transcritos que codificaram proteínas envolvidas em dois principais ativadores da via intrínseca de apoptose foram reprimidos. Estes foram (1) TP53 e moléculas proteicas que controlam a sua ativação, estabilização e translocação dentro da mitocôndria; e (2) LRRK2, o qual se liga à mitocôndria e medeia a apoptose por um mecanismo ainda pouco compreendido. Esta última proteína é central para a patogênese de uma grande proporção de casos de doença de Parkinson familiar.

O decréscimo significativo nos transcritos codificando LRRK2 em MDMs infectados com *L. braziliensis* é de particular interesse, considerando recentes relatos que SNPs no gene LRRK2 estão associados com a forma multibacilar de infecção humana pelo *Mycobacterium leprae* (ZHANG e col., 2009). Tanto *M. leprae* como *L. braziliensis* são patógenos intracelulares, causando manifestações de doença crônica na pele, levando à especulação de que os efeitos sobre a apoptose podem ser um mecanismo comum de suas sobrevivências a nível intracelular. Embora muito diferente na patogênese, deve ser mencionado também que as mutações nas regiões promotoras para dois outros genes associados à doença de Parkinson, ambos os quais codificam participantes nos processos de ubiquitinação da célula, PARK2 e PACRG, também têm sido associados com a hanseníase (SCHURR e col., 2006). Isto pode indicar vias comuns envolvidas na patogênese destas desordens infecciosas e neurológicas.

Nos macrófagos humanos, a degradação de proteínas citoplasmáticas ocorre de maneira seletiva, e o controle do nível de determinadas proteínas no interior destas células durante certos processos celulares, bem como a eliminação de proteínas com erros de síntese, proteínas não funcionais e polipeptídeos desnaturados, cuja acumulação poderia tornar-se tóxica, se faz necessário através da proteólise. Em condições fisiológicas normais e em particular condição de estresse, ocorre o enrolamento incorreto de proteínas, que ou são recuperadas por ação de chaperonas

moleculares, ou destruídas pela via dependente de Ubiquitina para degradação no proteassoma.

A *L. braziliensis* pode levar a diversas manifestações em humanos infectados. A leishmaniose cutânea pode ser disseminada, se não diagnosticada e tratada por um período prolongado de tempo, ou quando ocorre em indivíduos desnutridos. Formas disseminadas da Leishmaniose tegumentar também são mais comuns em indivíduos que abrigam alelos polimórficos risco-associados particulares compartilhados a outros genótipos (TURETZ *et al.*, 2002; CABRERA *et al.*, 1995; CASTELLUCCI *et al.*, 2005-2006; SALHI *et al.*, 2008; LLANOS-CUENTAS *et al.*, 1984; ALCAIS *et al.*, 1997; MACHADO-COELHO *et al.*, 2005). Nossos trabalhos prévios sugerem que o polimorfismo genético do parasita em si também está associado com a diversidade de *L. braziliensis* (SCHRIEFER *et al.*, 2004). O presente trabalho amplia a nossa compreensão, mostrando que as cepas de *L. braziliensis* pertencentes a subpopulações distintas levam a comportamentos sutis, mas consistentemente distintos, logo após a interação com MDM humanos.

Foi notável que os parasitas associados com duas diferentes formas metastáticas de leishmaniose, leishmaniose mucosa ou disseminada, provocaram mudanças na expressão gênica de macrófagos hospedeiros que foram mais semelhantes entre si do que o isolado de um indivíduo com leishmaniose cutânea. A diferença foi principalmente na magnitude da indução ou repressão dos transcritos alterados causados pelas cepas de *L. braziliensis* provenientes de pacientes com LM ou LD que a cepa de um indivíduo com LC. Por conta de a diferença ser principalmente de magnitude, nós examinamos o padrão das alterações na expressão gênica pelos diferentes clados, raciocinando que estes podem representar pelo menos em parte as barreiras para a metástase na doença. O estudo levou à estruturação da hipótese de que a sobrevivência prolongada de macrófagos devido a uma diminuição na apoptose, e uma maior supressão das respostas a estímulos externos, podem corresponder a parte do mecanismo que favorece a disseminação.

O diagnóstico e o manejo clínico da Leishmaniose tegumentar americana podem ser difíceis. As observações acima enfatizam a importância de estudos em epidemiologia molecular, associados com cuidadosas observações clínicas. Tais estudos definem o estágio para a busca futura de marcas genéticas para cepas de *L. braziliensis* para usá-las como preditores de prognóstico da doença.

## 8. CONCLUSÕES

- As cepas associadas com diferentes formas de doença estimulam comportamentos distintos nas células hospedeiras.
- A *Leishmania braziliensis* causou a repressão da maioria dos genes que apresentaram alterações significativas em seus níveis de expressão nos macrófagos infectados, quando comparados ao não infectados.
- Os genes mais extensamente reprimidos codificam para as proteínas envolvidas na função mitocondrial, vias de apoptose, receptores de superfície, na sinalização intracelular e para reguladores de transcrição ou proteínas envolvidas na permeabilidade nuclear, sugerindo uma supressão geral de vias importantes que estão envolvidas na função efetora dos macrófagos.
- Os isolados associados às formas LD (clado A) e LM (clado C) reprimem mais intensamente quando comparados com a forma LC (clado B), e isso sugere que estes parasitos devem aumentar a sua chance de sobrevivência por modulação negativa dos genes das células hospedeiras durante o processo de infecção.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcais A, Abel L, David C, Torrez ME, Flandre P, Dedet JP. Risk factors for onset of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg.* 1997 Jul;57(1):79-84.

Akarid K, Arnoult D, Micic-Polianski J, Sif J, Estaquier J, Ameisen JC. Leishmania major-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. *J Leukoc Biol.* 2004 Jul;76(1):95-103.

Ashford, R.W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 2000 Nov; 30(12-13):1269-81.

Ashutosh, Garg M, Sundar S, Duncan R, Nakhasi HL, Goyal N. Downregulation of mitogen-activated protein kinase 1 of *Leishmania donovani* field isolates is associated with antimony resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jan;56(1):518-25.

Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res.* 2004 Jun; 119(6):238-58.

Azulay RD, Azulay Junior DR. Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis. *Int J Dermatol.* 1995 May;34(5):303-7.

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.

Banuls AL, Hide M, Tibayrenc M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. *Int J Parasitol.* 1999 Aug;29(8):1137-47.

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.

Ben-Othman R, Guizani-Tabbane L, Dellagi K. *Leishmania* initially activates but subsequently down-regulates intracellular mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB signaling in macrophages. *Mol Immunol.* 2008 Jun;45(11):3222-9.

Bhardwaj N, Rosas LE, Lafuse WP, Satoskar AR. *Leishmania* inhibits STAT1-mediated IFN-gamma signaling in macrophages: increased tyrosine phosphorylation of dominant negative STAT1beta by *Leishmania mexicana*. *Int J Parasitol.* 2005 Jan;35(1):75-82.

Bhardwaj S, Srivastava N, Sudan R, Saha B. Leishmania interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010:109189.

Blader IJ, Manger ID, Boothroyd JC. Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. *J Biol Chem.* 2001 Jun 29;276(26):24223-31.

Bogdan C, Rollinghoff M, Solbach W. Evasion strategies of *Leishmania* parasites. *Parasitol Today.* 1990 Jun;6(6):183-7.

Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by IL-10. *J Exp Med.* 1991 Dec 1;174(6):1549-55.

Bogdan C, Rollinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol.* 1998 Jan;28(1):121-34.

Bogdan C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. *Cell Microbiol.* 2008 Jun;10(6):1221-34.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª Ed. 2007. Brasília.

Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet.* 2001 Dec;29(4):365-71.

Bringaud F, Vedrenne C, Cuvillier A, Parzy D, Baltz D, Tetaud E, et al. Conserved organization of genes in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 1998 Aug 1; 94(2):249-64.

Butte A. The use and analysis of microarray data. *Nat Rev Drug Discov.* 2002 Dec;1(12):951-60.

Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, et al. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.* 1995 Nov 1;182(5):1259-64.

Calegari-Silva TC, Pereira RM, De-Melo LD, Saraiva EM, Soares DC, Bellio M, et al. NF-kappaB-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. *Immunol Lett.* 2009 Dec 2;127(1):19-26.

Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JL, Reed S, et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol.* 1985 Dec;135(6):4144-8.

Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 1994 Apr;56(4):315-25.

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.

Chaussabel D, Semnani RT, McDowell MA, Sacks D, Sher A, Nutman TB. Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. *Blood.* 2003 Jul 15;102(2):672-81.

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

Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg.* 1986 Dec;89(6):319-23.

Courret N, Frehel C, Prina E, Lang T, Antoine C. Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. *Parasitology.* 2001 Mar;122(Pt 3):263-79.

Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Exp. Mol. Pathol.* 2002 Apr;72(2):132-41.

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, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito ME, Falqueto A, et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2003 Jul;41(7):3126-32.

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 Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003 Oct;98(7):861-70.

Descoteaux A, Turco SJ. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim. Biophys. Acta*. 1999 Oct 8;1455(2-3):341-52.

Desjeux P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Stat Q*. 1992;45(2-3):267-75.

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.

Donovan MJ, Maciuba BZ, Mahan CE, McDowell MA. *Leishmania* infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner. *Exp Parasitol*. 2009 Sep;123(1):58-64.

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.

Engwerda CR, Ato M, Kaye PM. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol*. 2004 Nov;20(11):524-30.

Forget G, Gregory DJ, Olivier M. Proteasome-mediated degradation of STAT1 $\alpha$  following infection of macrophages with *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*. 2005 Aug 26;280(34):30542-9.

Fruth U, Solioz N, Louis JA. *Leishmania major* interferes with antigen presentation by infected macrophages. *J. Immunol*. 1993 Mar 1;150(5):1857-64.

Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol*. 2011 Nov;12(11):1035-44.

Gomes RF, Macedo AM, Pena SD, Melo MN. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*: genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. *Exp Parasitol*. 1995 Jun;80(4):681-7.

Grimaldi G, Jr., Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*. 1993 Jul;6(3):230-50.

Gustin KE. Inhibition of nucleo-cytoplasmic trafficking by RNA viruses: targeting the nuclear pore complex. *Virus Res*. 2003 Sep;95(1-2):35-44.

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

Indiani de Oliveira C, Teixeira MJ, Teixeira CR, Ramos de Jesus J, Bomura Rosato A, Santa da Silva J, et al. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes Infect*. 2004 Sep;6(11):977-84.

Ishikawa EA, Silveira FT, Magalhaes AL, Guerra junior RB, Melo MN, Gomes R, et al. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002 Apr;96 Suppl 1:S111-21.

Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, et al. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science*. 2011 Feb 11;331(6018):775-8.

Junghae M, Raynes JG. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates *Leishmania donovani* infection in macrophages. *Infect Immun*. 2002 Sep;70(9):5026-35.

Kahl LP, Byram JE, David JR, Comerford SA, Von Lichtenberg F. *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*. 1991 Feb;44(2):218-32.

Kane MM, Mosser DM. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin Hematol*. 2000 Jan;7(1):26-31.

Kato-Maeda M, Gao Q, Small PM. Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. *Cell Microbiol*. 2001 Nov;3(11):713-9.

Kzhyshkowska J, Marciniak-Czochra A, Gratchev A. Perspectives of mathematical modeling for understanding of intracellular signaling and vesicular trafficking in macrophages. *Immunobiology*. 2007;212(9-10):813-25. Epub 2007 Nov 9.

Llanos-Cuentas EA, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC, Campos M. Possible risk factors in development of mucosal lesions in leishmaniasis. *Lancet*. 1984 Aug 4;2(8397):295.

Lisi S, Sisto M, Acquafredda A, Spinelli R, Schiavone M, Mitolo V, et al. Infection with *Leishmania infantum* Inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. *J Eukaryot Microbiol*. 2005 May-Jun;52(3):211-7.

Machado-Coelho GL, Caiaffa WT, Genaro O, Magalhaes PA, Mayrink W. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2005 Jan;99(1):55-61.

Matte C, Descoteaux A. *Leishmania donovani* amastigotes impair gamma interferon-induced STAT1alpha nuclear translocation by blocking the interaction between STAT1alpha and importin-alpha5. *Infect Immun*. 2010 Sep;78(9):3736-43.

McConville MJ, Schnur LF, Jaffe C, Schneider P. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem. J*. 1995 Sep 15;310 (Pt 3):807-18.

McConville MJ, Naderer T. Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol*. 2011;65:543-61.

Marsden PD, Jones TC. Clinical manifestations, diagnosis and treatment of leishmaniasis. Coordinating ed., E. Chang and R.S. Bary. Elsevier Science Publisher, Amsterdam, 1985.

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.

Moore KJ, Matlashewski G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol*. 1994 Mar 15;152(6):2930-7.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19: 683–765

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. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005 Oct 29-Nov 4;366(9496):1561-77.

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 : fev 2012]. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.

Oumeish OY. Cutaneous leishmaniasis: a historical perspective. *Clin Dermatol*. 1999 May-Jun;17(3):249-54.

Pluddemann A, Mukhopadhyay S, Gordon S. Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. *Immunol Rev*. 2011 Mar;240(1):11-24.

Probst CM, Silva RA, Menezes JP, Almeida TF, Gomes IN, Dallabona AC, et al. A comparison of two distinct murine macrophage gene expression profiles in response to *Leishmania amazonensis* infection. *BMC Microbiol*. 2012;12:22.

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

Ravasi T, Wells CA, Hume DA. Systems biology of transcription control in macrophages. *Bioessays*. 2007 Dec;29(12):1215-26.

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

Rogers KA, DeKrey GK, Mbow ML, Gillespie RD, Brodskyn CI, Titus RG. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002 Mar 19;209(1):1-7.

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.

Ruhland A, Leal N, Kima PE. *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cell Microbiol*. 2007 Jan;9(1):84-96.

Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):1041-7.

Salhi A, Rodrigues V, Jr., Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, et al. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol*. 2008 May 1;180(9):6139-48.

Saravia NG, Segura I, Holguin AF, Santrich C, Valderrama L, Ocampo C. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania* (*Viannia*) in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Jul;59(1):86-94.

Saravia NG, Weigle K, Navas C, Segura I, Valderrama L, Valencia AZ, et al. Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of *Leishmania viannia* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2002 Jun;66(6):738-44.

Schallig HD, Oskam L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop Med Int Health*. 2002 Aug;7(8):641-51.

Schriefer A, Schriefer AL, Goes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, et al. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect Immun*. 2004 Jan;72(1):508-14.

Schriefer A, Guimaraes LH, Machado PR, Lessa M, Lessa HA, Lago E, et al. Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009 Jun;15(6):871-6.

Schurr E, Alcais A, de Leseleuc L, Abel L. Genetic predisposition to leprosy: A major gene reveals novel pathways of immunity to *Mycobacterium leprae*. *Semin Immunol*. 2006 Dec;18(6):404-10.

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.

Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *Int J Parasitol*. 1997 Oct;27(10):1135-45.

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

Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis*. 2002 Dec 15;186(12):1829-34.

Weeraratna WAT, Nagel JE, Mello-Coelho V, Taub DD. Gene expression profiling: from microarrays to medicine. *J Clin Immunol* 2004; 24(3):213-24.

Zhang FR, Huang W, Chen SM, Sun LD, Liu H, Li Y, et al. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med*. 2009 Dec 31;361(27):2609-18.

Zhang S, Kim CC, Batra S, McKerrow JH, Loke P. Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(3):e648.

## **ANEXOS**

TITLE: Effects of *Leishmania braziliensis* on macrophage gene expression: differences between strains associated with distinct clinical outcomes

Running title: *Leishmania braziliensis* strains suppress macrophage gene expression

AUTHORS: Rosana Sousa<sup>1</sup>, Thomas Bair<sup>2</sup>, Nicholas Ettinger<sup>3</sup>, Luana Guimarães<sup>1</sup>, Laura Andrade<sup>1</sup>, Luiz Henrique Guimarães<sup>1</sup>, Paulo Roberto Lima Machado<sup>1</sup>, Edgar M. Carvalho<sup>1</sup>, Mary E. Wilson<sup>4</sup>, Albert Schriefer<sup>1,5,6</sup>

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

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

## ABSTRACT

The protozoan parasite *Leishmania braziliensis* has a high degree of intra-species genetic and phenotypic polymorphism. Accordingly, *L. braziliensis* causes a spectrum of clinical presentations in humans, including localized cutaneous leishmaniasis (CL), mucosal leishmaniasis (ML) and the recently described disseminated leishmaniasis (DL). Our prior studies indicated that genetically distinct *L. braziliensis* clades associate with different clinical infection types. Most *Leishmania* exist as intracellular parasites of macrophages in the mammalian host. We hypothesized that parasites would induce a program of macrophage gene expression beneficial for their intracellular survival, and that strains of *L. braziliensis* from patients with CL, ML or DL would cause different gene expression profiles that might predict the differences in pathogenesis. Human monocyte derived macrophages (MDMs) were infected in parallel with strains of different *L. braziliensis* clades collected from subjects with CL, ML or DL, living in an endemic region of northeast Brazil. Patterns of gene expression were compared using DNA microarrays. A majority of MDM transcripts were unchanged. Amongst the significantly altered transcripts, most were decreased by all *L. braziliensis* isolates. The most dramatically decreased transcripts encoded proteins associated with stimulus propagation, apoptosis and mitochondrial oxidative phosphorylation. A few transcripts encoding proteins involved in the stress response were up-regulated. Differences between the three *L. braziliensis* isolates were observed in the magnitude of change, rather than differences in the identity of transcripts that were up- or down-modulated. Generally, isolates derived from subjects with metastatic disease (i.e. ML and DL) induced a greater magnitude of decrease than the isolate from a subject with CL. The findings suggest that *L. braziliensis* may enhance their survival by down regulating host cell genes during the infection process, and that strains destined for dissemination exert a more profound suppression than strains remaining near the cutaneous site of inoculation.

## 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]. *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) [1-5]. 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 [6].

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 [7]. 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 [8, 9]. 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 [7].

## 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. A diagnosis of tegumentary leishmaniasis was made by isolation of parasites in culture from an aspirate or biopsy of a cutaneous lesion. 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). In addition to these clinical criteria, cases had 2-3 of the following: positive delayed type hypersensitivity skin response to leishmania antigen (Montenegro test), positive serology, and/or parasites identified in tissue biopsies by histopathology.

*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 [10, 11] and recently confirmed by real time PCR [12]. 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% CO<sub>2</sub>, 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% CO<sub>2</sub>. Non-adherent cells were removed by rinsing, and adherent MDMs were cultivated in RP-10, and incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 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% CO<sub>2</sub>. 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% CO<sub>2</sub> 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 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* [13]. Data from samples were imported into Partek [PartekGS St. Louis, MO] and normalized using gcRMA [14]. 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  $\Delta\Delta$ 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 [7]. Figure one shows that, on average, more than 80% of the MDMs contained intracellular parasites (clade A  $83 \pm 5$ , clade B  $81 \pm 8$ , clade C  $81 \pm 7$ , mean  $\pm$  SD), with a mean of 5 parasites in each cell (clade A  $5 \pm 1$ , clade B  $6 \pm 1$ , clade C  $5 \pm 1$ , 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 $\alpha$  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. braziliensis* 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 [15]. Transcripts encoding cytokine receptors or signaling intermediates in cytokine-initiated cascades that were down-modulated included subunits of receptors for IL-12 (IL12R $\beta$ 1), IL15 (IL15R $\alpha$ ) and IL-10 (IL10R $\beta$ ). 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- $\kappa$ B [16]; 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 [17]. 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 [18]. 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 [19]. 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 [20] 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 [21, 22]]. 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 [23]. 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 [24]. 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 [22, 25, 26]. 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 [27].

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 [28]. 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 [8]. 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 [29]. 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 [30].

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 LRKK2 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* [7, 31-38]. 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) [7].

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 [39]. 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 [40]. Signaling through Jak/STAT and MAPK, with resultant effects on NF- $\kappa$ B activation, are some of the most dramatically affected pathways [41-46]. Impaired regulatory mechanisms cited implicate several effects on proteins in these cascades, including their phosphorylation status [42], and targeting to the proteasome for degradation [43]. 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 [47]. 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 [47]. The only reported effect of *Leishmania* influencing nuclear transport is recent work indicating that *L. donovani* amastigotes impair STAT1 $\alpha$  nuclear translocation by blocking its interaction with importin- $\alpha$ 5 [46]. 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 [48]. Although several reports document this phenomenon [48-50], 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 [51, 52]. 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* [53]. 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 [54]. 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. Cutaneous leishmaniasis 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 [5, 35-38, 55-57]. Our prior report suggested that genetic polymorphism of the parasite itself is also associated with the diversity of *Leishmania braziliensis* [7]. 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, mucosal or disseminated leishmaniasis, 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.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Parasite loads in infected MDMs used in for microarrays. (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 [7]. 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.

**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.

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 <sub>2</sub> change in expression relative to uninfected MDMs, per infecting clade			Gene description
		Clade A	Clade B	Clade C	
<b>DECREASED EXPRESSION</b>					
<b>Signal propagation</b>					
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-kB
	PELI1	-1.9	-1.9	-2.1	Pellino-related intracellular-signaling molecule; Activates NF-kB
	ECT2	-2.6	-2.0	-2.3	Epithelial cell transf. sequence 2 oncogene; Activates NF-kB
	VISA	-1.7	-2.0	-1.8	Virus-induced signaling adapter; Activates NF-kB
	NOD2	-2.4	-2.7	-2.5	Nucl.-bind. oligomerization domain cont. 2; Activates NF-kB
	STAT1	-1.4	-1.2	-1.4	Signal transduction & activation of transcription 1 JAK-STAT pathway
	STAT5A	-1.6	-1.4	-1.4	Signal transduction & activation of transcription 5 JAK-STAT pathway
	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
<b>Transcriptional regulators</b>					
	TRERF1	-1.9	-1.6	-1.5	Transcriptional regulator
<b>Nuclear pore function</b>	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
<b>Mitochondrial function</b>					
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
	NDUFV3	-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
<b>Apoptosis</b>					

	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
<b>Parkinson's disease</b>					
	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
<b>INCREASED EXPRESSION</b>					
<b>Transcriptional regulation</b>	HIC1	3.6	2.7	2.9	Transcription repressor Hypermethylated in Cancer 1
<b>Apoptosis</b>	ETS2	2.4	1.9	2.1	<b>Probable transcriptional activator of TP53</b>
<b>Environmental response</b>					
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
<b>Proteasomal degradation</b>					
	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 microarray	Fold change qPCR	Ratio A,C/B micro-array	Ratio A,C/B 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

## REFERENCES

1. Azulay, R.D. and D.R. Azulay Junior, *Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis*. International journal of dermatology, 1995. **34**(5): p. 303-7.
2. Bacellar, O., et al., *Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients*. Infection and immunity, 2002. **70**(12): p. 6734-40.
3. Carvalho, E.M., et al., *Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis*. Acta tropica, 1994. **56**(4): p. 315-25.
4. Costa, J.M., et al., *Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases*. The Journal of tropical medicine and hygiene, 1986. **89**(6): p. 319-23.
5. Turetz, M.L., et al., *Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil*. The Journal of infectious diseases, 2002. **186**(12): p. 1829-34.
6. Machado, P.R., et al., *Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2011. **105**(8): p. 438-44.
7. Schriefer, A., et al., *Multiclonal Leishmania braziliensis population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis*. Infection and immunity, 2004. **72**(1): p. 508-14.
8. Ettinger, N.A. and M.E. Wilson, *Macrophage and T-cell gene expression in a model of early infection with the protozoan Leishmania chagasi*. PLoS neglected tropical diseases, 2008. **2**(6): p. e252.
9. Chaussabel, D., et al., *Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites*. Blood, 2003. **102**(2): p. 672-81.
10. Garcia, L., et al., *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, 2004. **42**(5): p. 2294-7.
11. Montalvo, A.M., et al., *Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for Leishmania species discrimination in the New and Old World*. Parasitology, 2010. **137**(8): p. 1159-68.
12. Weirather, J.L., et al., *Serial quantitative PCR assay for detection, species-discrimination and quantification of Leishmania spp. in human samples*. Journal of clinical microbiology, 2011.
13. Gautier, L., et al., *affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level*. Bioinformatics, 2004. **20**(3): p. 307-15.
14. Irizarry, R.A., et al., *Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data*. Biostatistics, 2003. **4**(2): p. 249-64.
15. Kenny, E.F. and L.A. O'Neill, *Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update*. Cytokine, 2008. **43**(3): p. 342-9.
16. Oeckinghaus, A., M.S. Hayden, and S. Ghosh, *Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways*. Nature immunology, 2011. **12**(8): p. 695-708.
17. Rouault, T.A. and W.H. Tong, *Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2005. **6**(4): p. 345-51.
18. Andreyev, A.Y., Y.E. Kushnareva, and A.A. Starkov, *Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species*. Biochemistry. Biokhimiia, 2005. **70**(2): p. 200-14.

19. Chomova, M. and P. Racay, *Mitochondrial complex I in the network of known and unknown facts*. General physiology and biophysics, 2010. **29**(1): p. 3-11.
20. Jin, Z. and W.S. El-Deiry, *Overview of cell death signaling pathways*. Cancer biology & therapy, 2005. **4**(2): p. 139-63.
21. Paisan-Ruiz, C., et al., *Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease*. Neuron, 2004. **44**(4): p. 595-600.
22. Zimprich, A., et al., *Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology*. Neuron, 2004. **44**(4): p. 601-7.
23. Moll, U.M., N. Marchenko, and X.K. Zhang, *p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction*. Oncogene, 2006. **25**(34): p. 4725-43.
24. Kelley, K.D., et al., *YPEL3, a p53-regulated gene that induces cellular senescence*. Cancer research, 2010. **70**(9): p. 3566-75.
25. Lin, T.K., et al., *Mitochondrial dysfunction and biogenesis in the pathogenesis of Parkinson's disease*. Chang Gung medical journal, 2009. **32**(6): p. 589-99.
26. Healy, D.G., et al., *Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study*. Lancet neurology, 2008. **7**(7): p. 583-90.
27. Bonifati, V., *Genetics of parkinsonism*. Parkinsonism & related disorders, 2007. **13 Suppl 3**: p. S233-41.
28. Venanzoni, M.C., et al., *ETS1 and ETS2 in p53 regulation: spatial separation of ETS binding sites (EBS) modulate protein: DNA interaction*. Oncogene, 1996. **12**(6): p. 1199-1204.
29. Namdarghanbari, M., et al., *Mammalian metallothionein in toxicology, cancer, and cancer chemotherapy*. Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry, 2011. **16**(7): p. 1087-101.
30. Wong, E. and A.M. Cuervo, *Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2010. **2**(12): p. a006734.
31. Kahl, L.P., et al., *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, 1991. **44**(2): p. 218-32.
32. Saravia, N.G., et al., *Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of Leishmania (Viannia) in Colombia*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 1998. **59**(1): p. 86-94.
33. Saravia, N.G., et al., *Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of Leishmania viannia in Colombia*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 2002. **66**(6): p. 738-44.
34. Schriefer, A., et al., *Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil*. Emerging infectious diseases, 2009. **15**(6): p. 871-6.
35. Cabrera, M., et al., *Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis*. The Journal of experimental medicine, 1995. **182**(5): p. 1259-64.
36. Castellucci, L., et al., *Familial aggregation of mucosal leishmaniasis in northeast Brazil*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 2005. **73**(1): p. 69-73.

37. Castellucci, L., et al., *IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil*. The Journal of infectious diseases, 2006. **194**(4): p. 519-27.
38. Salhi, A., et al., *Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with Leishmania braziliensis*. Journal of immunology, 2008. **180**(9): p. 6139-48.
39. Moore, K.J., S. Labrecque, and G. Matlashewski, *Alteration of Leishmania donovani infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction*. Journal of immunology, 1993. **150**(10): p. 4457-65.
40. Engwerda, C.R., M. Ato, and P.M. Kaye, *Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis*. Trends in parasitology, 2004. **20**(11): p. 524-30.
41. Junghee, M. and J.G. Raynes, *Activation of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates Leishmania donovani infection in macrophages*. Infection and immunity, 2002. **70**(9): p. 5026-35.
42. Bhardwaj, N., et al., *Leishmania inhibits STAT1-mediated IFN-gamma signaling in macrophages: increased tyrosine phosphorylation of dominant negative STAT1beta by Leishmania mexicana*. International journal for parasitology, 2005. **35**(1): p. 75-82.
43. Forget, G., D.J. Gregory, and M. Olivier, *Proteasome-mediated degradation of STAT1alpha following infection of macrophages with Leishmania donovani*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(34): p. 30542-9.
44. Ben-Othman, R., L. Guizani-Tabbane, and K. Dellagi, *Leishmania initially activates but subsequently down-regulates intracellular mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB signaling in macrophages*. Molecular immunology, 2008. **45**(11): p. 3222-9.
45. Calegari-Silva, T.C., et al., *NF-kappaB-mediated repression of iNOS expression in Leishmania amazonensis macrophage infection*. Immunology letters, 2009. **127**(1): p. 19-26.
46. Matte, C. and A. Descoteaux, *Leishmania donovani amastigotes impair gamma interferon-induced STAT1alpha nuclear translocation by blocking the interaction between STAT1alpha and importin-alpha5*. Infection and immunity, 2010. **78**(9): p. 3736-43.
47. Gustin, K.E., *Inhibition of nucleo-cytoplasmic trafficking by RNA viruses: targeting the nuclear pore complex*. Virus research, 2003. **95**(1-2): p. 35-44.
48. Moore, K.J. and G. Matlashewski, *Intracellular infection by Leishmania donovani inhibits macrophage apoptosis*. Journal of immunology, 1994. **152**(6): p. 2930-7.
49. Lisi, S., et al., *Infection with Leishmania infantum Inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937*. The Journal of eukaryotic microbiology, 2005. **52**(3): p. 211-7.
50. Ruhland, A., N. Leal, and P.E. Kima, *Leishmania promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis*. Cellular microbiology, 2007. **9**(1): p. 84-96.
51. Akarid, K., et al., *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, 2004. **76**(1): p. 95-103.

52. Donovan, M.J., et al., *Leishmania infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner*. *Experimental parasitology*, 2009. **123**(1): p. 58-64.
53. Zhang, F.R., et al., *Genomewide association study of leprosy*. *The New England journal of medicine*, 2009. **361**(27): p. 2609-18.
54. Schurr, E., et al., *Genetic predisposition to leprosy: A major gene reveals novel pathways of immunity to Mycobacterium leprae*. *Seminars in immunology*, 2006. **18**(6): p. 404-10.
55. Llanos-Cuentas, E.A., et al., *Possible risk factors in development of mucosal lesions in leishmaniasis*. *Lancet*, 1984. **2**(8397): p. 295.
56. Alcasis, A., et al., *Risk factors for onset of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1997. **57**(1): p. 79-84.
57. Machado-Coelho, G.L., et al., *Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2005. **99**(1): p. 55-61.

Figure 1

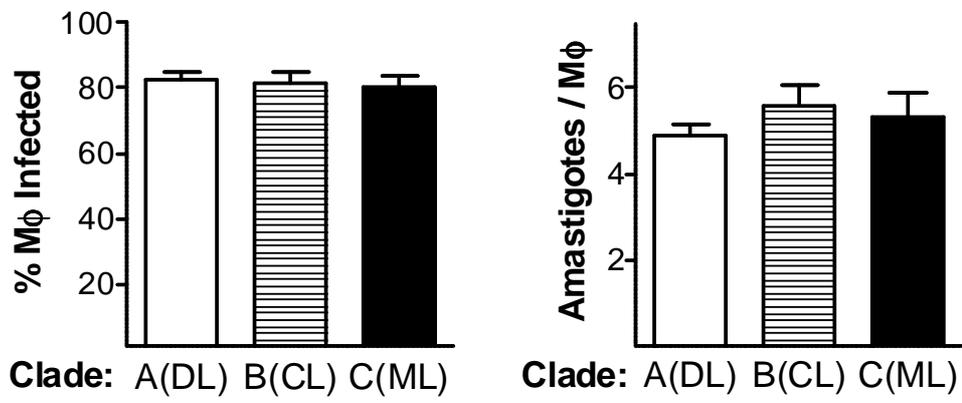


Figure 2

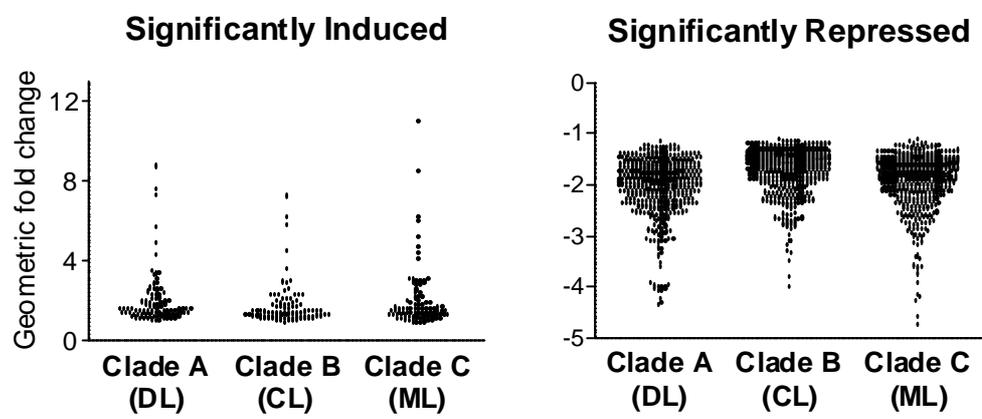


Figure 3

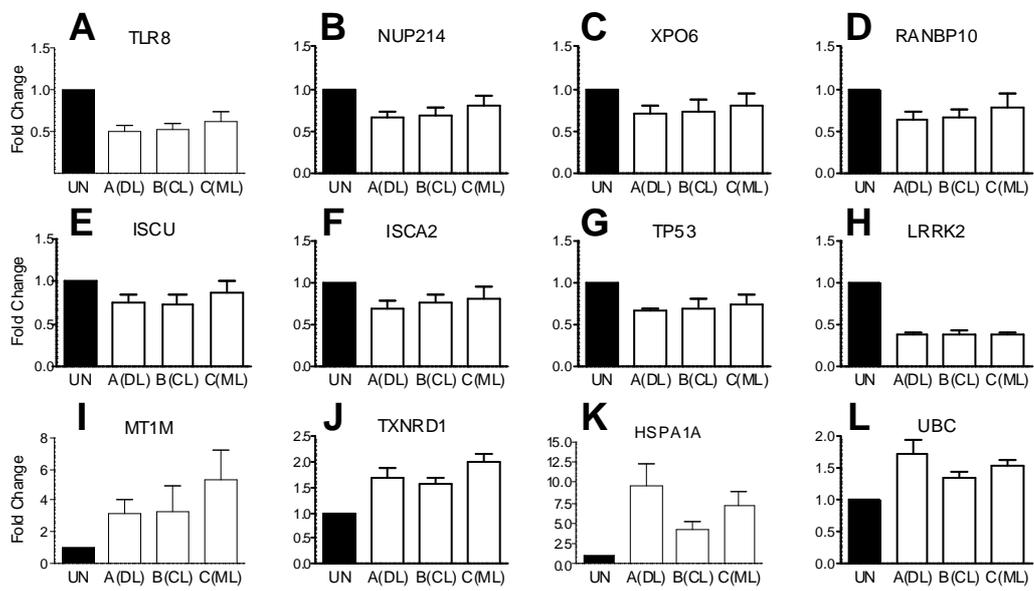


Figure 4

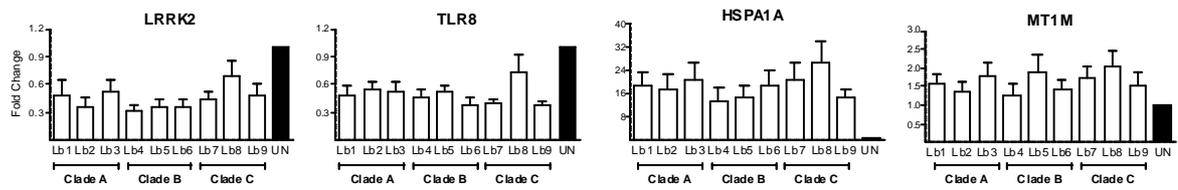


Figure 5

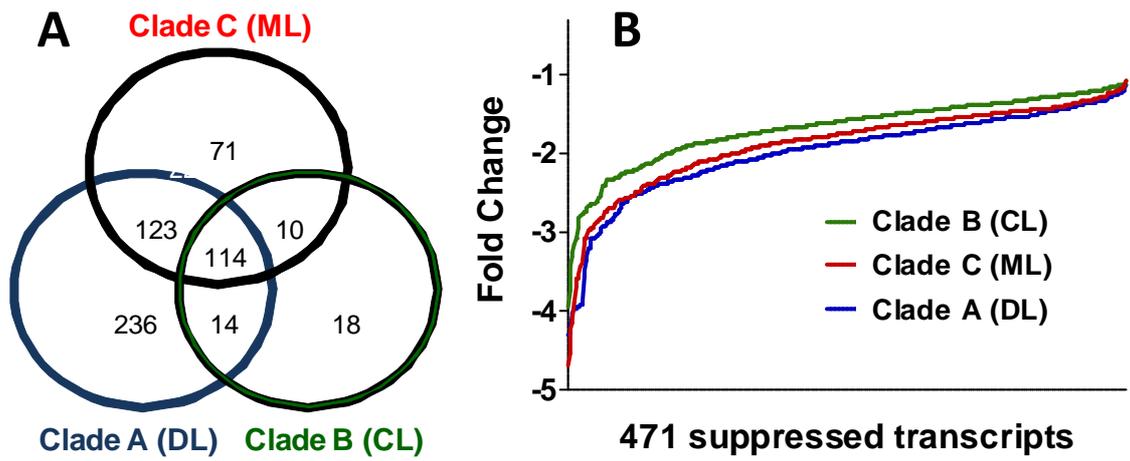


Figure 6

