UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

CHRISTIANE YUMI OZAKI

Perfil de expressão gênica de célula monocítica humana infectada por *Leishmania (Leishmania) infantum*

SÃO PAULO
2018

CHRISTIANE YUMI OZAKI

Perfil de expressão gênica de célula monocítica humana infectada por *Leishmania (Leishmania) infantum*

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientadora: Profa. Dra. Hiro Goto

SÃO PAULO
2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

Ozaki, Christiane Yumi
Perfil de expressão gênica de célula monocítica humana infectada por Leishmania (Leishmania) infantum / Christiane Yumi Ozaki. – São Paulo, 2018.
Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientadora: Hiro Goto

Descritores: 1. LEISHMANIA INFANTUM. 2. MACRÓFAGOS. 3. RNA. 4. SEQUENCIAMENTO GENÉTICO. 5. EXPRESSÃO GÊNICA. 6. LIPÍDEOS - METABOLISMO.

USP/IMTSP/BIB-24/2018.

À minha família Cleide, Massaru e Luciane.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Hiro Goto pela confiança, paciência, compreensão e apoio em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Paulo Eduardo Martins Ribolla, do Departamento de Parasitologia da UNESP de Botucatu, pelo projeto, acolhimento em seu laboratório e pela ajuda financeira sem a qual esse trabalho não teria sido concluído.

Ao Dr. Diego Perez Alonso pela disponibilidade e apoio em todas as vezes que estive em Botucatu e também pela ajuda essencial na obtenção e sequenciamento das bibliotecas.

À Dra. Silvia Yumi Bando, do Laboratório de Genômica Funcional do Departamento de Pediatria da FMUSP, pela paciência, análises e discussões sobre o *WGCNA*.

Ao Prof. Audun Nerland e o doutorando Karl Erik Muller pelo acolhimento na Universidade de Bergen durante meu doutorado sanduíche.

Às funcionárias Beatriz, Kelly, Carmem, Edite, Mussya e Lúcia pela colaboração nestes últimos meses, que permitiu a redação deste trabalho, pelas palavras de incentivo e pelo carinho sempre.

Aos pós-doutorandos Eduardo, Marina, Lídia e, principalmente, Luiza pela convivência, discussões científicas, apoio e momentos de descontração ao longo destes anos.

Às alunas Fernanda, Mahyumi, Berna, Mariane, Malu, Larissa, Emily e Ruth e aos alunos Wilson, Luiz, Joedh, Vinícius e Lucas pela companhia, colaboração, momentos de descontração, convivência e apoio.

À Flaviane e Alline por me ensinarem grande parte do que sei hoje no cultivo de *Leishmania* e no manejo de animais.

Aos Professores Paulo Cotrim e Thelma Okay pelos incentivos e aconselhamentos.

Ao Dr. Ângelo Lindoso pelo apoio, incentivo e otimismo.

À secretária da Pós gradução Eliane Araújo pela paciência e disponibilidade.

Aos meus amigos e familiares que sempre me apoiaram e incentivaram.

Aos membros da Colônia: Kelinha, Keyde, Dani e Eliza pelas palavras de incentivo, momentos de descontração e apoio sempre.

À família Yamashiro Kanashiro que me adotou! Obrigada Álvaro, Aninha, Tia Kimie e Edite pelas comidinhas e pelo carinho!

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento pessoal.

Ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo.

Ao Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo.

Aos funcionários do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Ao Instituto Biotecnológico, da UNESP de Botucatu.

Ao LIM-38.

Ao apoio financeiro da FAPESP (Processos Nº 12/18347-4 e Nº 17/14278-1).

A CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche (Processo N º 10295/14-3).

Muito obrigada!

Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.

Leonardo da Vinci

RESUMO

Ozaki CY. Perfil de expressão gênica de célula monocítica humana infectada por *Leishmania (Leishmania) infantum* (Tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2018.

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por parasitos de diferentes espécies do gênero *Leishmania*, sendo a leishmaniose visceral a causa de grande morbidade e mortalidade, principalmente, em países em desenvolvimento como o Brasil. Apesar dos inúmeros estudos focados na participação dos sistemas imunes inato e adaptativo na proteção ou desenvolvimento da doença, pouco se conhece das alterações que ocorrem na célula hospedeira no início da infecção. Ao mesmo tempo em que as células suscitam respostas que levam à eliminação do parasito, esse pode induzir alterações nos processos celulares para sua evasão, sobrevivência e proliferação. Para o entendimento desses processos propomos identificar as vias biológicas moduladas na infecção de células THP-1 por *Leishmania infantum*. Para isso, células monocíticas humanas THP-1 foram infectadas ou não por *Leishmania infantum* por 6, 10, 24, 48 e 72 h. A partir do RNA total dessas células, bibliotecas de cDNA foram obtidas e submetidas ao sequenciamento pela técnica de *RNA-seq*. Posteriormente, o número total de sequências por gene foi obtido por meio do alinhamento das sequências de DNA ao genoma humano de referência GRCh37 (hg19) empregando o programa *CLC Genomics Workbench 7.1*. Esses dados foram então utilizados na composição da matriz de dados de expressão gênica global das amostras, que serviu como base para obtenção de duas redes de co-expressão gênica utilizando o programa *Weighted Gene Co-expression Network Analysis* (*WGCNA*). As redes foram compostas pelos dados de expressão gênica global das amostras controle e infectadas dos períodos 6 h e 10 h (Rede 1) e 24 h, 48 h e 72 h (Rede 2). A partir da análise dessas redes foi possível selecionar módulos altamente correlacionados às amostras controle e infectadas nos diferentes períodos, realizar o enriquecimento funcional dos genes contidos nos módulos, como também identificar genes *HGS-hub* (genes *hub* diferencialmente expressos). O enriquecimento funcional dos genes contidos nos módulos altamente correlacionados com as amostras mostrou que as maiores mudanças no perfil de expressão gênica das células infectadas, em relação às células não infectadas, ocorreram nas primeiras 10 h de infecção e que muitos dos genes relacionados com a resposta imune são expressos nas primeiras 6 h de infecção. Já a partir de 24 h de infecção, pequenas alterações no perfil de expressão entre as células não infectadas e infectadas foram observadas. A determinação dos genes *HGS-hub* mostrou que dentre os processos biológicos alterados por *Leishmania infantum* nas células THP-1, o metabolismo de lipídios foi o que mais apresentou genes diferencialmente expressos, além da resposta imune. Esses resultados sugerem que além do sistema imune, a *Leishmania infantum* também é capaz de modular o metabolismo de lipídios das células THP-1 infectadas.

Descritores: *Leishmania infantum*. Macrófagos. RNA. Sequenciamento genético. Expressão gênica. Lipídeos – metabolismo.

ABSTRACT

Ozaki CY. Gene expression profile of human monocytic cell infected by *Leishmania (Leishmania) infantum* (Thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2018.

Leishmaniasis is a group of diseases caused by parasites of different species of the genus *Leishmania*, with visceral leishmaniasis being the cause of great morbidity and mortality, especially in developing countries such as Brazil. Despite the numerous studies focused on the participation of innate and adaptive immune systems in the protection or development of the disease, little is known about the changes that occur in the host cell at the beginning of the infection. At the same time as the cells elicit responses that lead to the elimination of the parasite, it can induce changes in the cellular processes for their evasion, survival and proliferation. To understanding these processes, we aim to identify the biological pathways modulated in THP-1 cell infected by *Leishmania infantum*. For this, THP-1 human monocytic cells were infected or not by *Leishmania infantum* for 6, 10, 24, 48 and 72 h. Using total RNA extracted from these cells, cDNA libraries were obtained and submitted to RNA sequencing. Subsequently, the total number of sequences per gene was obtained by aligning the DNA sequences to the reference human genome GRCh37 (hg19) using CLC Genomics Workbench 7.1 software. These data were then used to compose the samples' global gene expression data matrix, which was employed to obtain two gene co-expression networks using the Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA) program. The networks were composed by the global gene expression data from the control and infected samples at 6 h and 10 h (Network 1) and at 24 h, 48 h and 72 h (Network 2). Analysis of these networks allowed the selection of modules highly correlated to the control and infected samples in different periods, as well as the identification of HGS-hub genes (differentially expressed hub genes). The functional enrichment of the genes showed that the major changes in the infected cells gene expression profile compared to uninfected cells occurred within 10 h of infection and the genes of the biological pathway related to the immune response are expressed in the first 6 h of infection. Starting at 24 h of infection, small changes in the gene expression profile between uninfected and infected cells were observed. The HGS-hub genes analysis showed that among the biological processes altered by *Leishmania infantum* in THP-1 cells, lipid metabolism was the one that presented a great number of differentially expressed genes, besides the immune response. These results suggest that in addition to the immune system, *Leishmania infantum* is also able to modulate THP-1 macrophages' lipid metabolism.

Descriptors: *Leishmania infantum*. Macrophages. RNA. Genetic sequencing. Gene expression. Lipid – metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida da *Leishmania*. 16
Figura 2 - Exemplo da análise de dados por redes de co-expressão gênica..... 36
Figura 3 - Resumo das etapas envolvidas no ensaio biológico entre macrófagos e *Leishmania infantum* e a obtenção dos dados de expressão gênica global. 40
Figura 4 - Etapas envolvidas na obtenção das redes de co-expressão gênica, na identificação e na análise dos módulos trasncricionais. 53
Figura 5 - Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania infantum*. 54
Figura 6 - Padronização da infecção de células THP1 com promastigotas de *Leishmania infantum* – 24 h 55
Figura 7 - Padronização da infecção de células THP1 com promastigotas de *Leishmania infantum* – 48 h 56
Figura 8 - Parasitismo de células THP-1 infectadas com formas promastigotas de *Leishmania infantum* na proporção 10:1... 57
Figura 9 - Quantificação das bibliotecas de cDNA por qPCR..... 58
Figura 10 - Valores de expressão gênica global das amostras Controle e Infectado de células THP-1 infectadas com *Leishmania infantum*..... 62
Figura 11 - Agrupamento hierárquico das amostras Controle e Infectado para detecção de valores de expressão gênica discrepantes. 63
Figura 12 - Escolha do valor de β baseado no critério de rede *scale free* para a construção da rede de co-expressão das amostras dos grupos 6 h e 10 h. 64
Figura 13 - Dendrograma dos genes e módulos relacionados à rede de co-expressão das amostras dos grupos 6 h e 10 h. 65
Figura 14 - Gráfico *Heatmap* das correlaçãoes entre os módulos e as amostras pertencentes aos grupos 6 h e 10 h. 68
Figura 15 - Enriquecimento funcional dos genes contidos nos módulos *Brown* e *Salmon* associados à amostra C06. 69
Figura 16 - Enriquecimento funcional dos genes contidos nos módulo *Black* e *Blue* associados à amostra I06. 70
Figura 17 - Enriquecimento funcional dos genes contidos nos módulos *Lightyellow* e *Tan* associados à amostra C10..... 71
Figura 18 - Enriquecimento funcional dos genes contidos no módulo *Magenta* associado à amostra I10. 71
Figura 19 – Genes *hub* diferencialmente expressos nos módulos correlacionados com a amostra C06. 73
Figura 20 - Genes *hub* diferencialmente expressos nos módulos correlacionados com a amostra I06. 75
Figura 21 - Genes *hub* diferencialmente expressos nos módulos correlacionados às amostras C10 e I10.. 78
Figura 22 - Escolha do valor de β baseado no critério de rede *scale free* para a construção da rede de co-expressão das amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.. 80
Figura 23 - Dendrograma dos genes e módulos relacionados à rede de co-expressão das amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h. 81

Figura 24 - Gráfico *Heatmap* das correlações entre os módulos e as amostras pertencentes aos grupos 24 h, 48 h e 72 h. 83
Figura 25 - Enriquecimento funcional dos genes contidos no módulo *Red* associado à amostra C24. 84
Figura 26 - Enriquecimento funcional dos genes contidos nos módulos *Brown* e *Magenta* associados à amostra I24. 85
Figura 27 - Enriquecimento funcional dos genes contidos no módulo *Tan* associado à amostra C48. 85
Figura 28 - Enriquecimento funcional dos genes contidos no módulo *Green* associados à amostra I48. 86
Figura 29 - Enriquecimento funcional dos genes contidos no módulo *Turquoise* associado à amostra C72. 87
Figura 30 - Enriquecimento funcional dos genes contidos nos módulos *Black* e *Blue* associados à amostra I72. 88
Figura 31 - Genes *hub* diferencialmente expressos no módulo *Red,* correlacionado com a amostra C24. 89
Figura 32 - Genes *hub* diferencialmente expressos nos módulos correlacionados à amostra I24. 90
Figura 33 - Genes *hub* diferencialmente expressos no módulo *Blue* correlacionado com a amostra I72. 92
Figura 34 - Agrupamento dos genes diferencialmente expressos das amostras controle dos grupos 6 h, 10 h e 24 h de acordo com os processos biológicos associados a eles. 94
Figura 35 - Agrupamento dos genes diferencialmente expressos das amostras infectadas dos grupos 6 h, 10 h, 24 h e 72 h de acordo com os processos biológicos associados a eles. 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nomenclatura dos grupos obtidos, de acordo com os tempos de incubação..... 44

Tabela 2 - Condições da PCR para amplificação das bibliotecas de cDNA..... 48

Tabela 3 - Concentração das bibliotecas de cDNA..... 59

Tabela 4 - Número de sequências geradas no Sequenciamento das bibliotecas de cDNA..... 61

Tabela 5 - Módulos da rede de co-expressão das amostras dos grupos 6 h e 10 h e seus respectivos números de genes..... 66

Tabela 6 - Descrição dos genes *HGS-hub* pertencentes aos módulos *Brown* e *Salmon* correlacionados à amostra C06 e seus respectivos processos biológicos..... 73

Tabela 7 - Descrição dos genes *HGS-hub* pertencentes aos módulos *Black* e *Blue* correlacionados à amostra I06 e seus respectivos processos biológicos..... 76

Tabela 8 - Descrição dos genes *HGS-hub* pertencentes aos módulos *Black* e *Blue* correlacionados às amostras C10 e I10 e seus respectivos processos biológicos..... 79

Tabela 9 - Módulos da rede de co-expressão das amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h e seus respectivos números de genes..... 81

Tabela 10 - Descrição dos genes *HGS-hub* pertencentes ao módulo *Red* correlacionados à amostra C24 e seus respectivos processos biológicos..... 89

Tabela 11 - Descrição dos genes *HGS-hub* pertencentes aos módulos *Brown* e *Magenta* correlacionados à amostra I24 e seus respectivos processos biológicos..... 90

Tabela 12 - Descrição dos *HGS-hub* pertencentes ao módulo *Blue* correlacionado à amostra I72 e seus respectivos processos biológicos..... 93

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
1.1 Aspectos gerais das lesihmanioses..... 15
1.2 Leishmaniose visceral (LV) 17
1.3 Resposta imune e mecanismos de evasão 18
1.3.1 Sistema complemento..... 18
1.3.2 Neutrófilos..... 20
1.3.3 Macrófagos..... 21
1.3.4 Receptores Toll-like..... 22
1.3.5 O papel das citocinas na Leishmaniose..... 23
1.4 Nutrição e metabolismo nas amastigotas..... 26
1.5 Importância do metabolismo de lipídios e do colesterol na Leishmaniose Visceral..... 28
1.6 Metabolismo de lipídios em macrófagos..... 30
1.7 Técnicas para determinação do perfil de expressão gênica..... 33
1.8 Abordagens para análise de dados de expressão gênica..... 35
2 JUSTIFICATIVA 38
3 OBJETIVOS 39
3.1 Objetivo geral 39
3.2 Objetivos específicos 39
4 MATERIAIS E MÉTODOS 40
4.1 Células THP-1..... 41
4.2 Parasito e manutenção de amastigotas de *Leishmania infantum*..... 41
4.3 Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania infantum*..... 42
4.4 Infecção de células THP-1 com promastigotas de *Leishmania infantum* 42
4.4.1 Diferenciação das células THP-1 com *phorbol 12-myristate 13 acetate* (PMA) em macrófagos..... 42
4.4.2 Padronização da infecção de células THP-1 com *Leishmania infantum* 43
4.4.3 Infecção das células THP-1 com *Leishmania infantum* para extração de RNA total..... 43
4.5 Extração de RNA total..... 45
4.6 Sequenciamento de Nova Geração (NGS) em Plataforma *Illumina*..... 45
4.6.1 Preparo das bibliotecas de cDNA para sequenciamento de nova geração..... 46
4.6.2 Quantificação das bibliotecas de cDNA por PCR quantitativa..... 49
4.6.3 Sequenciamento das bibliotecas de cDNA na plataforma *Illumina*.... 49
4.6.4 Alinhamento das sequências obtidas..... 50
4.6.5 Obtenção da matriz de dados de expressão gênica global..... 50
4.7 *Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA)*..... 50
4.7.1 Construção das redes de co-expressão gênica 51

4.7.2 Associação dos módulos de co-expressão gênica às amostras dos grupos analisados..... 52
4.7.3 Identificação de genes *hub*..... 52
4.7.4 Análise de enriquecimento funcional dos módulos e *HGS-hub*..... 53
5 RESULTADOS 54
5.1 Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania infantum*..... 54
5.2 Infecção de células THP-1 por *Leishmania infantum*..... 54
5.3 Sequenciamento das bibliotecas de cDNA..... 57
5.3.1 Concentração das bibliotecas de cDNA..... 57
5.4 Análise dos dados gerados no sequenciamento..... 60
5.5 Análise das redes de co-expressão gênica geradas pelo software *WGCNA*..... 63
5.5.1 Rede de co-expressão gênica das amostras dos grupos 6 h e 10 h..... 64
5.5.1.1 Módulos correlacionados às amostras dos grupos 6 h e 10 h..... 66
5.5.1.2 Enriquecimento funcional dos módulos selecionados..... 69
5.5.1.3 Análise dos genes *hub* de alto valor GS *(HGS-hub)*..... 72
5.5.2 Rede de co-expressão gênica das amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h..... 79
5.5.2.1 Módulos correlacionados com as amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h..... 82
5.5.2.2 Enriquecimento funcional dos módulos selecionados..... 84
5.5.2.3 Análise dos genes hub..... 88
5.6 Análise global dos processos biológicos associados aos genes hub diferencialmente expressos..... 93
6 DISCUSSÃO 96
7 CONCLUSÃO 115
REFERÊNCIAS 117
ANEXOS..... 144

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* que estão presentes em 98 países ao redor do mundo atingindo, principalmente, países da América Latina, África e Ásia [1]. Em humanos, a doença é causada por mais de 20 espécies de leishmânias, que apresentam duas formas distintas dependendo do hospedeiro que as abrigam durante seu ciclo de vida. As promastigotas apresentam morfologia alongada, com flagelo evidente e são encontradas no intestino dos vetores transmissores, os flebotomíneos. Já as amastigotas são as formas intracelulares, que apresentam morfologia arredondada e flagelo rudimentar abrigado no bolso flagelar. Essa é a forma obrigatória nos hospedeiros vertebrados, que podem variar de pequenos roedores ao ser humano [2, 3].

A infecção do vetor ocorre quando flebotomíneos fêmeas ingerem macrófagos parasitados por amastigotas de *Leishmania* durante o repasto sanguíneo em mamíferos infectados. No trato digestivo posterior do vetor ocorre o rompimento dos macrófagos liberando as amastigotas, que se diferenciam rapidamente em promastigotas e se mantêm aderidas ao epitélio intestinal até a diferenciação nas formas infectantes, as promastigotas metacíclicas. Após esse período, as fêmeas infectantes, ao realizarem novo repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, liberam as promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva do inseto. Na epiderme do hospedeiro, essas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear e no interior dos macrófagos se transformam em amastigotas. A propagação das amastigotas se dá por meio da lise de macrófagos infectados, após diversos ciclos de divisão e ruptura das células, ocasionando a reinfecção de outros fagócitos. O ciclo de vida do parasito se completa com a diferenciação das amastigotas em promastigotas no intestino de um novo flebótomo, após a ingestão das células

infectadas durante o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado [4, 5]. O ciclo de vida da *Leishmania* pode ser observado na Figura 1.

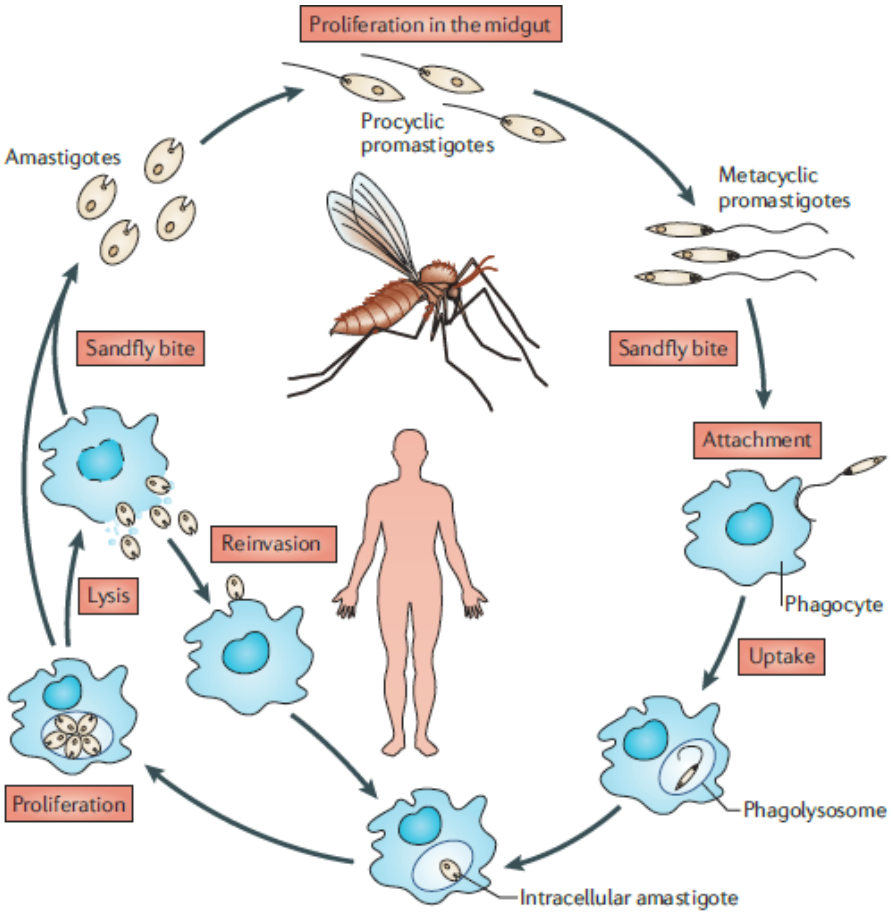

Figura 1 - Ciclo de vida da *Leishmania*. Reproduzido de Kaye e Scott [5].

A conjunção de diferentes fatores como a espécie da *Leishmania* e do vetor, como também a constituição genética e a resposta imune do hospedeiro podem influenciar no desenvolvimento da doença, ocasionando manifestações clínicas diversas. Em humanos, a infecção pode se manter assintomática, causar lesões de pele e de mucosa ou ainda acometer órgãos internos. As lesões de pele e de mucosa são conhecidas como leishmanioses cutânea e mucocutânea, enquanto o acometimento dos órgãos internos é conhecido como leishmaniose visceral [3, 6].

1.2 Leishmaniose Visceral (LV)

Dentre as diferentes formas clínicas causadas pelas leishmânias, a leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar é a mais severa, com a infecção progressiva de órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear como baço, fígado, medula óssea e linfonodos. Acomete, principalmente, crianças menores de 5 anos e adultos maiores de 20 anos. Ela é caracterizada por febre intermitente, hepatoesplenomegalia, anemia e debilidade progressiva, levando frequentemente a óbito se não tratada. A doença pode apresentar diferentes formas clínicas, sendo classificada de acordo com os sintomas apresentados em: assintomática, oligossintomática, moderada e severa. Fatores genéticos, desnutrição e a co-infecção com outras doenças infecciosas, principalmente o HIV, podem contribuir na progressão da doença [7, 8].

Das duas espécies que causam a doença no homem, a *Leishmania (L.) donovani* é encontrada no continente indiano e na África, enquanto a infecção por *Leishmania (L.) infantum* ocorre no Mediterrâneo e nas Américas do Sul e Central. No Brasil, a doença é considerada uma zoonose, sendo o homem um hospedeiro acidental. A transmissão de *Leishmania infantum* ocorre do reservatório animal, principalmente, o cão doméstico para o inseto vetor e desse para o homem. Já na Índia, a doença é considerada uma antroponose, ocorrendo a transmissão de *Leishmania donovani* do homem para o inseto vetor e desse novamente para o homem [3, 9].

No mundo, cerca de 200 a 400 mil casos de leishmaniose visceral ocorrem a cada ano, dos quais 90% são registrados em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. Entre as doenças tropicais negligenciadas, a LV é a segunda em mortalidade e a quarta em morbidade [1].

No Brasil, a doença que era considerada de área rural começou a atingir a população das capitais dos estados do Nordeste como Teresina, São Luís e Natal. A partir de 1980 e até a década de 1990, a grande maioria dos casos da doença ocorria nessa região. No período dos anos 2000 a 2012, notificações dos casos de LV começaram a ocorrer em outras cidades brasileiras, como Belo Horizonte (MG),

Araguaína (TO), Campo Grande (MS), Bauru (SP), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Rondonópolis (MT), Cametá (PA), Montes Claros (MG) e Três Lagoas (MS), totalizando 15% dos casos registrados no país, no período avaliado [10].

Nos últimos 5 anos (2012 a 2017), o número de casos confirmados de LV nas cinco regiões brasileiras aumentou de 2953 para 4103. Dos casos confirmados em 2017, a região Nordeste apresentou o maior número (1824), com destaques para os estados do Maranhão (714) e Ceará (323). Já na região Sudeste, 908 casos foram confirmados, dos quais 750 foram registrados no estado de Minas Gerais e 124 em São Paulo. Os estados do Pará e do Tocantins apresentaram 512 e 220 casos, respectivamente, dos 765 registrados na região Norte. As regiões Centro-Oeste e Sul apresentaram 182 e 15 casos, respectivamente, com destaques para os estados de Mato Grosso do Sul (120), Goiás (40), Rio Grande do Sul (8) e Santa Catarina (4). Houve ainda 409 casos, dos quais não se conhece o local da infecção [11].

Esses dados demonstram o alastramento da doença em todas as regiões brasileiras, evidenciando a necessidade de intervenções para o controle do vetor, como também de estudos dos diferentes fatores envolvendo o hospedeiro, que podem contribuir no desenvolvimento da LV.

1.3 Resposta imune e mecanismos de evasão

1.3.1 Sistema complemento

Após inoculação das promastigotas pelos flebotomíneos no hospedeiro vertebrado, o sistema complemento e os fagócitos são os primeiros componentes do sistema imune inato a reconhecerem os parasitos e a participação de ambos acaba por viabilizar o estabelecimento da infecção [12].

O sistema complemento está presente no soro do hospedeiro, podendo causar diferentes efeitos biológicos ao se ligar ao microrganismo com o intuito de eliminá-lo. Dentre esses efeitos podemos citar a lise mediada pelo complexo de ataque à

membrana, a opsonização do parasito com consequente internalização pelos fagócitos e a indução da inflamação [13]. No entanto, fatores de virulência da *Leishmania* são capazes de promover o escape da ação desse sistema.

O lipofosfoglicano (LPG) é um glicoconjugado sintetizado pela *Leishmania*, que pode ser encontrado em todas as espécies recobrindo a membrana externa do parasito até o flagelo. A modificação na estrutura do LPG durante a metaciclogênese dos parasitos é que confere a resistência ao sistema complemento, já que essas moléculas podem apresentar o dobro de tamanho nas promastigotas metacíclicas, impedindo a inserção do complexo de ataque à membrana e consequente lise [14]. Além de evitar a lise pelo sistema complemento, a molécula do LPG também serve de sítio de ligação para o componente C3 do sistema complemento, sendo esse essencial nas etapas posteriores da cascata de ativação. Após a fixação do componente C3 no LPG, esse é clivado gerando os fragmentos C3a e C3b. O fragmento C3b se mantém fixado covalentemente ao LPG do parasito, sendo inativado pela atividade da metaloproteinase GP63, dando origem ao fragmento C3bi. A deposição dos fragmentos C3b e C3bi na superfície do parasito facilita a fagocitose dos mesmos, já que os macrófagos possuem receptores para tais moléculas, como o receptor de complemento do tipo 1 (CR1) e receptor de complemento do tipo 3 (CR3). O fragmento C3b também se liga a outras proteínas do complemento formando a C5 convertase, que cliva a proteína C5, gerando os fragmentos C5a e C5b. O fragmento C5a, juntamente com o fragmento C3a, atraem neutrófilos para a região da infecção, enquanto o fragmento C5b inicia a formação do complexo de ataque à membrana [12, 14, 15].

A entrada nos macrófagos via receptores CR1 e CR3 constitui outro mecanismo de evasão da *Leishmania*, já que a internalização por meio desses receptores evitam a ativação dos mecanismos microbicidas do fagócito. A internalização via CR3 evita: a ativação da sinalização pró-inflamatória mediada por Interferon Gama (IFN-γ); a produção de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2); e a produção da Interleucina-12 (IL-12). Além disso, o acúmulo de proteínas importantes para a formação do fagolisossomo, como a catepsina D e a proteína de membrana associada ao lisossomo (LAMP-1), é prejudicado, assim como a maturação do fagolisossomo é atrasada. Apesar do

receptor CR3 ter papel fundamental na internalização do parasito, o receptor CR1 também participa na ligação e na internalização das promastigotas metacíclicas, agindo coordenadamente com o receptor CR3 [16, 17].

Verma e colaboradores [18] demonstraram que um inibidor de serina peptidase de *Leishmania donovani* (LdISP2) é capaz de inibir a ativação da via das lectinas do sistema complemento por meio da interação com a serina protease associada (MASP-2) a lectina de ligação à manose (MBL). Essa inibição levaria a uma menor produção de C3 e C5 convertase, fatores essenciais para a formação do complexo de ataque a membrana, inibindo assim a lise do parasito. LdISP2 também atuaria inibindo a atividade da elastase de neutrófilos, aumentando a expressão do receptor de C5a e consequente ativação da via de sinalização fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/AKT), resultando na inibição da produção de IL-12 e garantindo a sobrevivência do parasito dentro do macrófago.

1.3.2 Neutrófilos

No início da infecção, os neutrófilos são os primeiros fagócitos a chegarem ao sítio de inoculação dos parasitos, fagocitando grande parte das promastigotas presentes. Essas se mantêm viáveis, apesar da fagocitose, sugerindo um mecanismo de escape dos efeitos microbicidas dos neutrófilos [19]. Podemos citar como exemplos: a regulação da formação de fagolisossomos maduros e a fusão desses com os grânulos microbicidas presentes na célula; resistência aos derivados reativos de oxigênio (ROS); resistência à ação das NET (do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*) e ainda a inibição da formação dessas armadilhas. As leishmânias se mantêm em formas promastigotas dentro dos neutrófilos, mas algumas espécies, como a *Leishmania mexicana*, são capazes de se diferenciar em amastigotas e se multiplicar dentro dessas células [20].

Outra estratégia utilizada pelas leishmânias para o estabelecimento da infecção é a utilização dos neutrófilos como “cavalo de Tróia”. Essas células apresentam um ciclo de vida curto, de 6 a 12 h, e a infecção pelo parasito é capaz de prolongar a vida

dos neutrófilos, inibindo a apoptose dos mesmos por até 42 h. Esse tempo prolongado coincide com o número máximo de macrófagos atraídos para a região pela quimiocina MIP-1β (CCL4), secretada pelos neutrófilos infectados. Após esse período, ocorre a apoptose dos neutrófilos, que são fagocitados pelos macrófagos presentes na região. Como a eliminação de células apoptóticas é uma das funções do macrófago e esse processo ocorre sem a ativação da inflamação, os parasitos internalizados sobrevivem ao processo de fagocitose se mantendo viáveis e se multiplicando dentro do hospedeiro definitivo [21].

1.3.3 Macrófagos

Os macrófagos apresentam papel essencial na infecção por *Leishmania*, já que são as células definitivas para o estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado, além de participar de importantes processos da imunidade adaptativa que podem levar à eliminação do parasito.

A internalização do parasito pelo macrófago pode ocorrer via receptores, como o CR1, CR3, os de manose, *Fc gamma* e os de fibronectina. Imediatamente após esse processo, as leishmânias estão localizadas em compartimentos que são limitadas por uma membrana proveniente da membrana plasmática de macrófagos. Esse compartimento sofre remodelação por meio da maturação e fusão com organelas endocíticas, resultando na formação do vacúolo parasitóforo (VP) [16, 22].

Para que as promastigotas sobrevivam nesse vacúolo, alguns fatores de virulência de *Leishmania* estão envolvidos na subversão de vários processos intracelulares, evitando a ativação de mecanismos microbicidas dos macrófagos e sua consequente degradação. Podemos citar como exemplos, o glicoconjugado LPG e a metaloproteinase GP63 já apresentados anteriormente. O glicoconjugado LPG atua na eliminação dos produtos liberados pelo macrófago, após ativação da NADPH oxidase; na supressão da expressão do gene óxido nítrico sintase 2 (NOS2), como também na inibição da produção de óxido nítrico (NO); no bloqueio da atividade da proteína C quinase e na inibição da fusão fagossomo-endossomo. Já a GP63,

principal proteína de superfície da *Leishmania*, além de estar envolvida na adesão do parasito nas células hospedeiras, também está associada com a supressão do *burst* oxidativo e a sua atividade de protease degrada as enzimas do fagolisossomo, ajudando na proteção dos parasitos contra a lise lisossomal [23, 24].

Assim, com a proteção desses fatores de virulência, as promastigotas diferenciam-se em amastigotas, processo que pode levar de 2 a 5 dias para se completar, dependendo da espécie de *Leishmania*. O vacúolo parasitóforo, que no início era delimitado por membranas derivadas da membrana plasmática de macrófagos, adquire características de fagolisossomo com a fusão desse compartimento com lisossomos e endossomos, exibindo propriedades semelhantes às dos compartimentos endossomais tardios da célula hospedeira. O vacúolo parasitóforo passa a exibir um pH ácido, além de conter hidrolases ácidas ativas. A sobrevivência nesse meio ácido está garantida nas amastigotas, já que estas apresentam uma membrana de superfície adaptada para funcionar em pH baixo, enquanto o citoplasma do parasita está ativamente mantido a um pH neutro. A capacidade de expressar um número baixo de proteínas, evitando assim a degradação por proteases, além de possuir grandes quantidades de glicoinositolfosfolipídios (GIPL) de baixo peso molecular na sua membrana plasmática, faz com que as amastigotas sejam capazes de sobreviver ao ambiente ácido. Além disso, elas também apresentam altos níveis de glicoesfingolípidos em sua membrana, que parecem ser derivadas da célula hospedeira e podem representar 30-80% dos glicolipídios totais associados aos parasitas [22].

1.3.4 Receptores *Toll-like*

Os receptores *Toll-like* (TLR) apresentam papel importante na imunidade inata ao reconhecerem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Esse reconhecimento inicia uma cascata de sinalização que produz citocinas pró-inflamatórias voltadas para a eliminação do patógeno [25]. Atualmente, 13 receptores *Toll-like* estão descritos em mamíferos, dos quais 4 estão envolvidos na resposta

imune contra *Leishmania*: TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 [26, 27]. Dentre esses receptores, o TLR2 e o TLR4 estão mais bem caracterizados em relação à molécula ligante de *Leishmania* e aos mecanismos de evasão.

O receptor TLR2 reconhece as moléculas de LPG presentes na superfície das leishmânias, ativando a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina-12 (IL-12), NO e espécies reativas de oxigênio (ROS) [28]. No entanto, estudos demonstraram que diferentes espécies de *Leishmania* são capazes de suprimir os efeitos microbicidas das células ativadas via TLR2, utilizando diferentes estratégias. O LPG de *Leishmania major* é capaz de suprimir a produção de IL-12 por meio da indução da produção de membros da família de proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS): SOCS-1 e SOCS-3 [29]. Já *Leishmania donovani* interfere na fosforilação da p38 MAP-quinase, além de aumentar a fosforilação de quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2), diminuindo a produção de IL-12 e aumentando a produção de IL-10, respectivamente [30].

Glicoproteínas e glicoesfingolipídios de *Leishmania* são potenciais ligantes ao TLR4, que pode induzir a produção de ROS e IL-12. Os mecanismos utilizados pelas leishmânias para inibir a produção dos produtos de ativação do TLR4 e proporcionar a sobrevivência e multiplicação dos parasitos são: produção de fator de transformação de crescimento β (TGF-β); utilização de inibidores de serina peptidases para prevenir a ativação de TLR4 pela elastase de neutrófilos e utilização da via de sinalização TLR4 para inibição da produção de IL-12 [31, 32, 33, 34].

1.3.5 O papel das citocinas na Leishmaniose

Fagócitos ativados pelo reconhecimento de patógenos produzem uma série de moléculas que, além de agirem diretamente no microrganismo fagocitado, recrutam componentes do sistema imune adquirido para uma resposta mais efetiva. Dentre essas moléculas podemos citar as citocinas, que são proteínas secretadas por células dos sistemas imunes inato e adquirido em resposta a microrganismos e outros antígenos, estimulando diferentes respostas das células envolvidas [35].

Nas leishmanioses, a resposta imune mediada por células T apresenta papel fundamental no controle ou desenvolvimento da infecção, sendo dependentes das citocinas secretadas pelas células da imunidade inata no início da infecção. Dependendo do estímulo recebido, as células T $CD4^+$ *naive* podem se diferenciar em células do tipo T *helper* 1 (Th1) ou T *helper* 2 (Th2), caracterizadas pelo perfil de citocinas que produzem. O papel das resposta Th1 e Th2 está bem caracterizado na leishmaniose cutânea, causada por *Leishmania major*, em modelos animais susceptíveis e resistentes à doença [36].

As células do tipo Th1 são produtoras de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IFN-γ, capazes de aumentar a produção de NOS2 e, consequentemente, aumentar a produção de NO que pode levar à destruição do parasito. O estímulo para a diferenciação das células T em Th1 na infecção por *Leishmania* é a IL-12, produzida pelos macrófagos e células dendríticas, que aumentaria a expressão de outras citocinas, como IL-1α, IL-18, IL-23 e IL-27. Já as células do tipo Th2 produzem as citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que induzem a produção de imunoglobulinas e a inibição da inflamação, promovendo o desenvolvimento da infecção. A IL-4 secretada pelas células T Vβ4Vα8CD4+ parece ser a fonte para a indução da diferenciação das células Th2 em camundongos susceptíveis à *Leishmania major*. Ambos os perfis de citocinas apresentam propriedades inibidoras um sobre o outro, já que as citocinas secretadas pelas células Th1 inibem as funções das citocinas secretadas pelas células Th2 e vice-versa [37, 38, 39].

Essa dualidade na resposta Th1/Th2 está bem caracterizada para a infecção por *Leishmania major*, mas apresenta-se diferente na infecção por outras espécies [40]. A leishmaniose visceral em humanos é caracterizada pela imunossupressão das células T, que são incapazes de produzir INF-γ para a ativação dos macrófagos e destruição dos parasitos [41]. No entanto, as citocinas IL-4, IL-10, INF-γ e TNF-α foram detectados no plasma de pacientes com a doença ativa, apresentando altos níveis quando comparados com os grupos não infectados ou assintomáticos, indicando um perfil de resposta Th1/Th2 misto. Além disso, esses pacientes apresentaram maiores níveis plasmáticos de IL-12 do que os pacientes assintomáticos ou curados [42]. Outro estudo também encontrou um perfil misto de citocinas circulantes em pacientes com a doença ativa, sendo detectadas: IL-6, IL-8,

IL-10, INF-γ e TNF-α, que apresentaram maiores níveis nos pacientes com a doença ativa. Além das citocinas circulantes, os autores verificaram a produção aumentada das citocinas INF-γ e IL-10, além de baixa produção de TNF-α pelos leucócitos do sangue periférico desses pacientes [43]. A IL-27 também foi associada à severidade da leishmaniose visceral, que juntamente com os efeitos da IL-6 e IL-10, pode inibir os efeitos microbicidas dos macrófagos favorecendo a proliferação do parasito [44].

Dentre as citocinas citadas acima, a IL-10 apresenta papel fundamental no desenvolvimento da doença, já que a sua ação anti-inflamatória inibiria a produção de TNF-α e NO, além de suprimir a resposta de ativação nos macrófagos, favorecendo a proliferação das leishmânias. Esse papel ficou evidente quando células de aspirado de baço de pacientes com leishmaniose visceral apresentaram diminuição no número de parasitos, além de aumento nos níveis de IFN-γ e TNF-α secretados, quando a IL-10 foi neutralizada [45, 46].

Diante da importância das citocinas pró-inflamatórias no controle da proliferação de *Leishmania*, os mecanismos de evasão adotados pelos parasitos consistem, principalmente, na inibição da produção das citocinas pró-inflamatórias, como também na inibição dos fatores microbicidas dos macrófagos e da ação do IFN-γ [47]. Cheekatla e colaboradores [48] demonstraram que *Leishmania donovani* é capaz de escapar da resposta imune mediante modulação da produção das citocinas em macrófagos humanos. Essa modulação ocorre por meio da ligação da *Leishmania* ao receptor TLR2, que ativa a fagocitose, ativando, posteriormente, a via de sinalização mTOR, tanto de maneira dependente quanto independente da via de sinalização da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K), culminando na inibição da produção de IL-12 e no aumento da produção de IL-10.

Outro mecanismo utilizado por *Leishmania donovani* para garantir a sobrevivência dentro do macrófago é a inativação de fatores de transcrição responsáveis pelo controle da expressão de diversos genes relacionados a resposta imune. Um dos fatores envolvidos nessa inativação é a ceramida, um segundo mensageiro lipídico envolvido em diferentes funções celulares como proliferação, diferenciação, inflamação induzida por citocinas e apoptose, que foi capaz de inibir a produção de NO, como também inativar os fatores de transcrição fator nuclear

Kappa B (NFκB) e proteína ativadora 1 (AP-1), também envolvidos na expressão de NO [49, 50, 51].

1.4 Nutrição e metabolismo nas amastigotas

Uma vez superadas as defesas do hospedeiro pela *Leishmania*, essas se estabelecem dentro dos macrófagos em vacúolos parasitóforos (VP). Dependendo da espécie de *Leishmania*, os VP apresentam diferentes características morfológicas. *Leishmania donovani* e *Leishmania major* são encontradas em fagolisossomos apertados, na maioria contendo apenas um parasito, e sua membrana apresenta-se em contato íntimo com a superfície do parasito. Já cepas de *Leishmania mexicana* e *Leishmania amazonensis* são internalizadas em fagolisossomos apertados que aumentam em tamanho, transformando-se em um enorme vacúolo parasitóforo que pode abrigar muitos parasitos. Uma vez limitadas dentro dos fagolissosomos, as amastigotas dependem de nutrientes, derivados da degradação de macromoléculas dentro dos macrófagos para sua sobrevivência e multiplicação [23, 52].

Parasitos dentro dos VPs têm fácil acesso aos metabólitos, já que esses compartimentos atuam como locais de degradação para numerosas macromoléculas, como proteínas, lipídios, ácidos nucléicos e polissacarídeos. Uma vez dentro desses locais, as leishmânias podem se beneficiar dos nutrientes de baixo peso molecular, que são gerados pelos processos digestivos no vacúolo. Os VPs das leishmânias podem fusionar-se ainda com vesículas endocitadas, autofagossomos e fagossomos, já que essas seriam entregues aos compartimentos endossomais tardios para posterior degradação. Essa interceptação seria possível devido às características de compartimentos endossomais tardios adquiridos pelos fagolisossomos durante seu processo de maturação. O aproveitamento dos produtos da degradação de macromoléculas pelas leishmânias só é possível devido a diferentes transportadores presentes na membrana dos vacúolos parasitóforos. Transportadores de ânions dependentes de energia podem transportar pequenas moléculas aniônicas do citoplasma do macrófago para o lúmem do parasitóforo, enquanto o transporte de

purinas, vitaminas e aminoácidos também pode ser realizado por meio da membrana do vacúolo. Além de pequenos metabólitos, as amastigotas também podem adquirir lipídios complexos e glicoproteínas do fagolisossomo. As formas amastigotas de todas as espécies de *Leishmania* parecem incorporar glicoesfingolipídios da célula hospedeira na sua membrana plasmática. Esses ou outros esfingolipídios da célula hospedeira parecem ser internalizados por amastigotas intracelulares e utilizados para sintetizar esfingolipídios endógenos. A degradação de esfingolipídos do hospedeiro também apresenta papel importante tanto na tolerância ao pH ácido dos fagolisossomos quanto na virulência de *Leishmania major*. Parasitos mutantes deficientes na proteína Inositol fosfoesfingolipídio semelhante à fosfolipase C (ISCL - *Inositol phosphoSphingolipid phospholipase C-Like*), envolvida na clivagem de esfingomielinases, foram incapazes de causar lesão em camundongos BALB/c susceptíveis à infecção por *Leishmania major*, como também de sobreviver e se multiplicar nos macrófagos infectados [53, 54, 55, 56, 57].

Sabe-se que ambas as formas de *Leishmania* podem expressar, constitutivamente, a maioria das enzimas envolvidas no metabolismo de carbono, incluindo as enzimas necessárias para o catabolismo de glicose, aminoácidos e ácidos graxos. No entanto, pouco se sabe sobre o metabolismo das amastigotas, já que as condições encontradas nos fagolisossomos são de difícil reprodução [58, 59].

Hart e Coombs [60] demonstraram que a diferenciação da promastigota em amastigota está associada com alterações marcantes na utilização de fontes de carbono. Amastigotas de diferentes espécies apresentaram redução na absorção de glicose, quando comparadas com as promastigotas, além de apresentarem um aumento na absorção de aminoácidos e ácidos graxos. Estudos utilizando mutantes de *Leishmania mexicana* e *Leishmania major* demonstraram que as amastigotas são altamente dependentes da absorção de hexose. Mutantes de *Leishmania mexicana* defectivos em transportadores de hexose exibiram um aumento na sensibilidade à temperatura, como também ao stress oxidativo, sendo incapazes de proliferar em macrófagos *in vitro*. Já mutantes de *Leishmania major* defectivos no catabolismo de aminoácidos apresentaram virulência atenuada tanto *in vitro* quanto *in vivo* [61, 62, 63].

Além disso, a absorção de glicose é indispensável para outros processos além da diferenciação, já que amastigotas totalmente diferenciadas também são incapazes

de proliferar na ausência de uma fonte de hexose [64]. Além das hexoses, as amastigotas parecem utilizar ácidos graxos como fonte de carbono, já que todas as enzimas envolvidas na β-oxidação desses lipídios são expressas nesta fase do parasito [65]. Como mencionado anteriormente, lipídios complexos da célula hospedeira podem ser intercalados na membrana plasmática das amastigotas, podendo ser utilizados como precursores para síntese de esfingolipídios do parasito, tais como *inositolphosphorylceramide* (IPC) [55].

Esses trabalhos sugerem que os produtos da via gliconeogênica são insuficientes para suprir as necessidades de hexose para ambas às formas de *Leishmania*, sugerindo que outras substâncias possam servir como fonte de carbono.

1.5 Importância do metabolismo de lipídios e do colesterol na Leishmaniose Visceral

Na Leishmaniose visceral (LV) ativa, além dos sintomas da doença, alterações lipídicas foram relatadas tanto em pacientes humanos quanto em cães domésticos. Essas alterações caracterizam-se, na maioria dos casos, por altos níveis séricos de triglicérides (TG), de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e aumento de apolipoproteína E (apoE), além de baixos níveis de colesterol total (TC) e das lipoproteínas de baixa (LDL) e alta (HDL) densidades [66, 67, 68, 69, 70, 71, 72].

Além dos dados presentes na literatura, nosso grupo realizou um estudo caso-controle em colaboração com o Prof. Paulo Eduardo Martins Ribolla, do Departamento de Parasitologia da UNESP de Botucatu, em uma área endêmica para LV em Teresina (PI) [73]. Nesse trabalho, os perfis lipídicos, como também polimorfismos nos íntrons 6 e 8 do gene que codifica a lipoproteína lipase (LPL), além de polimorfismos relacionados com as três isoformas principais do gene que codifica a apolipoproteína E (*apoE2*, *apoE3* e *apoE4*), de 156 indivíduos com LV ativa, pacientes infectados e assintomáticos e indivíduos não infectados foram analisados. Os resultados mostraram que o aumento nos níveis de TG e de VLDL e a redução de HDL, em pacientes infectados, estavam significativamente relacionados

com a mutação no íntron 8 do gene da LPL e com o alelo E2 da apoE. Além disso, a análise multivariada, utilizando indivíduos não infectados como controle, mostrou que a proteção contra a LV está significativamente associada com a presença dos genótipos selvagens em homozigose, tanto no íntron 8 do gene da LPL quanto no genótipo *apoE3*. Por outro lado, a presença do genótipo mutado em homozigose no íntron 8 do gene da LPL e níveis elevados de VLDL estão fortemente associados com a susceptibilidade a LV. Esses resultados demonstram não só a relação dos níveis lipídicos séricos alterados com a infecção por *Leishmania infantum*, como também o envolvimento dos genes da LPL e da apoE nessas alterações.

O colesterol e suas frações apresentam ainda papel relevante na interação parasito-macrófago, uma vez que estudos vêm demonstrando o envolvimento dos mesmos na internalização e proliferação das leishmânias. Em uma abordagem envolvendo a participação das lipoproteínas VLDL e HDL na infecção de células THP-1 por *Leishmania infantum*, observou-se um número significativamente maior de amastigotas nos macrófagos, quando infectados na presença de concentrações crescentes de VLDL e HDL. Por outro lado, a combinação das duas lipoproteínas, com a concentração de HDL sendo 10 vezes maior que a de VLDL, parece ter um efeito inibidor na proliferação das amastigotas, já que houve uma redução no parasitismo das células após 24 e 48 h de infecção. Esses resultados sugerem que as lipoproteínas podem apresentar papel importante no parasitismo das células e que, dependendo das suas concentrações, esse papel pode ser protetor [74].

Por ser um dos principais constituintes da membrana plasmática, o colesterol apresenta papel fundamental na entrada da *Leishmania* na célula hospedeira. O parasito utiliza as chamadas plataformas de lipídios (*lipid rafts*) para sua entrada, que são domínios especializados na membrana celular distribuídos de maneira não aleatória, ricos em colesterol e esfingolipídios. Essas plataformas apresentam ligação com proteínas específicas, relacionadas com a sinalização celular, e também com receptores que participam no reconhecimento e na entrada de microrganismos. A importância do colesterol na internalização do parasito em macrófagos foi demonstrada com a depleção do colesterol presente na membrana plasmática das células por drogas sequestrantes, resultando na redução da infecção por *Leishmania donovani*. Verificou-se ainda que a reposição do colesterol nas membranas celulares

promoveu o aumento da infecção das células, evidenciando assim o requerimento específico do colesterol no processo de internalização [75, 76].

Além da importância para a entrada do parasito na célula hospedeira, o colesterol presente nas membranas celulares dos macrófagos parece estar envolvido também na sobrevivência das leishmânias dentro da célula. Foi demonstrado que macrófagos infectados por *Leishmania donovani* apresentam uma diminuição na capacidade de apresentação eficiente de antígenos para as células T. Essa diminuição na capacidade de apresentação de antígenos poderia estar correlacionada com alterações nas propriedades físicas das membranas celulares dos macrófagos ou ainda poderia ser resultado da absorção do colesterol do hospedeiro pelo parasito [77, 78]. Outro estudo corrobora essa hipótese. Sen e colaboradores [79] demostraram que macrófagos infectados por *Leishmania donovani* tornam-se não responsivos à sinalização por IFN-γ, perdendo sua atividade microbicida, possivelmente, devido à capacidade do parasito em sequestrar colesterol da membrana celular tornando-a menos fluída. Como consequência, a expressão dos receptores para IFN-γ na membrana é alterada, evitando a ativação das células pela citocina.

Dessa maneira, o papel do colesterol e das diversas frações lipídicas na infecção e patogênese das leishmanioses vem sendo cada vez mais bem caracterizado.

1.6 Metabolismo de lipídios em macrófagos

Lipídios são substâncias orgânicas, insolúveis em meio aquoso, representados, principalmente, pelos ácidos graxos livres, triglicérides ou triacilgliceróis, fosfolipídios, colesterol livre e colesterol esterificado. Eles participam em diferentes funções celulares, como na composição de membranas, na sinalização intracelular, na produção de hormônios, na reserva de energia e como mensageiros secundários na sinalização intracelular. O metabolismo de lipídios atua tanto no processamento e na regulação da produção das diferentes moléculas

lipídicas, quanto na distribuição aos tecidos e na captação das moléculas em excesso para reciclagem [80, 81].

Os macrófagos e o metabolismo de lipídios são frequentemente associados ao desenvolvimento da aterosclerose. No entanto, estudos demonstrando o envolvimento do metabolismo de lipídios na regulação das funções dos macrófagos têm aumentado nos últimos anos. Como exemplos, podemos citar a oxidação de ácidos graxos, que está envolvida na diferenciação em macrófagos M2, que possui perfil anti-inflamatório. Esse processo é dependente da ativação dos fatores de transcrição STAT6 e receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ (PPARγ) e seu co-ativador PGC1β. Em compensação, a síntese de ácidos graxos parece estar ligada com a ativação de macrófagos por LPS e por citocinas inflamatórias, já que o aumento de triglicerídeos nas células foi observado após estímulo por essas moléculas [82, 83, 84].

A expressão dos genes envolvidos no metabolismo de lipídios no macrófago é bem regulada, principalmente, por fatores de transcrição que são ativados de acordo com a presença de colesterol dentro da célula. A entrada de colesterol no macrófago pode ocorrer mediada por receptores, como o de LDL e receptores tipo *scavengers* (SR-B1, CD36, SR-A1) ou por macropinocitose, sendo degradados pelos lisossomos, gerando ácidos graxos e colesterol livre, ou por enzimas como a LPL e a MGL [85, 86]. O acúmulo de colesterol processado no citoplasma celular ativa uma série de fatores de transcrição que irão promover a remoção dessas moléculas. Dentre os fatores de transcrição, o LXRα forma um heterodímero com o receptor de ácido retinóico RXRα para ativar genes relacionados ao efluxo do colesterol, como os dos transportadores ABCA-1 e ABCG-1 e também da proteína apoE, após receber estímulo de oxiesteróis. Com relação ao sistema imune, o resultado da ativação do LXRα em macrófagos está envolvido na supressão de diferentes mediadores, como NOS2, COX-2, IL-6, MCP-1 e MMP-9 [87]. Essa supressão parece estar relacionada com a expressão do transportador ABCA-1, que reduz o teor de colesterol nas plataformas de lipídios diminuindo o recrutamento das proteínas adaptadoras MyD88 e TRAF6, cruciais na resposta ativada pelos receptores TLR [88].

Outros fatores de transcrição envolvidos na regulação do metabolismo de lipídios são os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), que

são representados por três proteínas: PPARα, PPARγ e PPARδ. Assim como o fator de transcrição LXRα, as proteínas PPAR precisam formar heterodímeros para a ativação dos genes que regulam. Nos macrófagos, a formação do heterodímero ocorre entre o receptor de ácido retinóico RXRα e PPARγ, que têm como alvos os genes que codificam os receptores CD36 e SR-B1, a enzima LPL e o fator de transcrição LXRα. As outras duas proteínas apresentam baixos níveis de expressão nos macrófagos. Além de regularem genes do metabolismo de lipídios, as proteínas PPAR também exercem atividade na expressão de genes que codificam mediadores inflamatórios. Dentre elas, PPARγ inibe a expressão de TNF-α, IL-6, IL1-β e MMP-9 [87, 89].

As proteínas de ligação ao elemento responsivo a esteróide (SREBP) são fatores de transcrição que regulam os níveis de colesterol intracelulares, mantendo a homeostasia nas células. Essas proteínas se mantêm inseridas na membrana do retículo endoplasmático e são ativadas quando os níveis de colesterol intracelulares caem, deslocando-se para o complexo de Golgi onde sofrem clivagens proteolíticas subsequentes. Após clivagens, o sítio de ligação é liberado migrando para o núcleo, onde se ligará aos genes envolvidos na síntese de colesterol, como *HMGCR*, induzindo a síntese de colesterol. O aumento dos níveis de colesterol intracelulares mantém as SREBPs na membrana do retículo endoplasmático, regulando negativamente a produção de colesterol [82, 90]. A resposta inflamatória também é capaz de ativar o fator de transcrição SREBP, por meio da ativação do fator de transcrição NF-κB, que culmina na ativação do inflamassomo, produzindo as citocinas IL-1β e IL-18, além de induzir a síntese de colesterol. A indução da síntese de colesterol durante a ativação do macrófago é crucial para a promoção da resposta inflamatória nessas células [82, 83, 91]. Assim, estudos demonstram cada vez mais a ligação entre a via de metabolismo de lipídios e a reposta inflamatória.

1.7 Técnicas para determinação do perfil de expressão gênica

Ao infectar a célula hospedeira, a *Leishmania* causa uma série de alterações no padrão de expressão gênica da célula, que pode indicar a adaptação da célula à presença do parasito ou a ativação de mecanismos celulares necessários à sua eliminação. Essas alterações se caracterizam como variações no número de transcritos de determinados genes, que podem ser traduzidos ou não em proteínas, dependendo de processos de regulação transcricional ou pós-transcricional. A obtenção de dados do transcriptoma, ou seja, a determinação dos genes e das variações nos seus números de transcritos vem sendo realizada por técnicas como microarranjos de DNA ou sequenciamento de RNA. Por meio dessas técnicas é possível aprofundar o conhecimento dos processos celulares envolvidos no desenvolvimento da doença, como também identificar alvos terapêuticos ou de diagnóstico, além de permitir o descobrimento de novas isoformas e de elementos envolvidos na regulação da expressão gênica, principalmente, por meio do sequenciamento de RNA [92, 93, 94, 95, 96].

Antes do surgimento das tecnologias de sequenciamento de nova geração, o estudo da expressão gênica era realizada por meio da técnica de microarranjo de DNA, que consistia na hibridização das moléculas de cDNA, obtidas do material em estudo, marcadas por fluoróforos com sequências pré-determinadas complementares imobilizadas em uma superfície sólida. As moléculas hibridizadas emitiam fluorescência, sendo esse sinal capturado para posterior transformação em números correspondentes à expressão gênica [97]. Alguns estudos de determinação do perfil de expressão gênica envolvendo macrófagos infectados por diferentes espécies de *Leishmania*, como macrófagos derivados de medula óssea de camundongos Balb/c infectados por *Leishmania infantum*, *Leishmania major* e *Leishmania amazonensis*, além de macrófagos humanos obtidos de sangue periférico infectados por *Leishmania panamensis*, *Leishmania braziliensis* foram realizados utilizando essa técnica, como também células U937 infectadas por *Leishmania braziliensis* [40, 98, 99, 100, 101, 102]. Um estudo envolvendo o perfil de expressão gênica de células sanguíneas do sangue periférico de pacientes com a LV ativa, pós tratamento, assintomáticos e

indivíduos saudáveis também utilizou a técnica de microarranjo de DNA para geração dos dados [103]. Apesar de ainda ser muito utilizada atualmente, esta técnica vem sendo substituída pelo sequenciamento de RNA ou *RNA-seq*.

A técnica de *RNA-seq* consiste no sequenciamento dos fragmentos de cDNA correspondentes às moléculas de RNA de interesse, por meio das tecnologias de sequenciamento de nova geração, após o preparo de bibliotecas. Dentre as plataformas disponíveis no mercado atualmente, a *Illumina* é uma das mais utilizada e os dados gerados são consistentes e em grande volume, necessitando da utilização de ferramentas de bioinformática para o processamento e análise dos mesmos. Apesar da consistência dos dados gerados no sequenciamento, alguns fatores devem ser levados em consideração ao optar-se por essa técnica. Uma das desvantagens é o custo, uma vez que os *kits* utilizados no preparo das bibliotecas como também os insumos utilizados no sequenciamento são elevados. Outros fatores que influenciam no custo são a quantidade de amostras a serem sequenciadas, já que são necessárias replicatas para a obtenção de dados estatisticamente significantes e a profundidade do sequenciamento, que também impacta diretamente nos resultados, dependendo dos objetivos do sequenciamento. Apesar das desvantagens, a técnica de *RNA-seq* é uma das mais empregadas atualmente no estudo de transcriptomas de diferentes organismos. Uma das abordagens que vem sendo utilizada é a determinação do perfil de expressão gênica simultânea para obtenção de dados referentes tanto ao hospedeiro quanto ao patógeno [104, 105, 106, 107, 108, 109].

Nos estudos das leishmanioses, a técnica de RNA-*seq* já foi utilizada para a determinação das alterações na expressão gênica durante o processo de metaciclogênese das promastigotas de *Leishmania major* em seu vetor natural. Já a abordagem para determinação do perfil de expressão gênica simultâneo foi utilizado em macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados por *L. major*, em macrófagos obtidos de sangue periférico humano infectados por *Leishmania major* e *Leishmania amazonensis*, como também de biópsias retiradas de pacientes com *Leishmania braziliensis* [110, 111, 112, 113].

Esses dados demonstram que a tecnologia de sequenciamento de RNA é robusta e vem sendo utilizada em muitos estudos envolvendo a relação patógeno-hospedeiro nas leishmanioses.

1.8 **Abordagens para análise de dados de expressão gênica**

Diferentes metodologias podem ser utilizadas na análise dos dados gerados pelas técnicas de microarranjos de DNA ou *RNA-seq*. Uma das mais utilizadas é a expressão diferencial de genes, que consiste na comparação dos dados de expressão gênica entre duas condições experimentais. Nesse tipo de análise são realizadas análises estatísticas por meio de ferramentas de bioinformática, que geram uma lista de genes diferencialmente expressos entre as duas condições. Essa lista de genes pode ser então analisada em bancos de dados, para o enriquecimento funcional e identificação das vias e dos processos biológicos nos quais esses gene estão envolvidos [104, 114].

Outra abordagem utilizada na análise de dados de expressão gênica é a obtenção de redes de co-expressão gênica, que são construídas com base na correlação entre os genes de um conjunto de dados para verificar a relação entre eles. Uma rede de co-expressão gênica pode ser representada como um diagrama, onde os nós correspondem aos genes e as arestas correspondem as interações entre eles. A interação entre os genes segue o princípio de associação por culpa, onde os genes que apresentam funções semelhantes tendem a interagir ou exibir um padrão de expressão semelhante em uma dada rede de co-expressão. Assim, a construção de uma rede de co-expressão pode ajudar na identificação de módulos biológicos significativos constituídos por genes altamente relacionados e que estão fortemente associados dentro de um processo biológico específico [114, 115, 116]. A Figura 2 exemplifica a análise de dados por redes de co-expressão gênica.

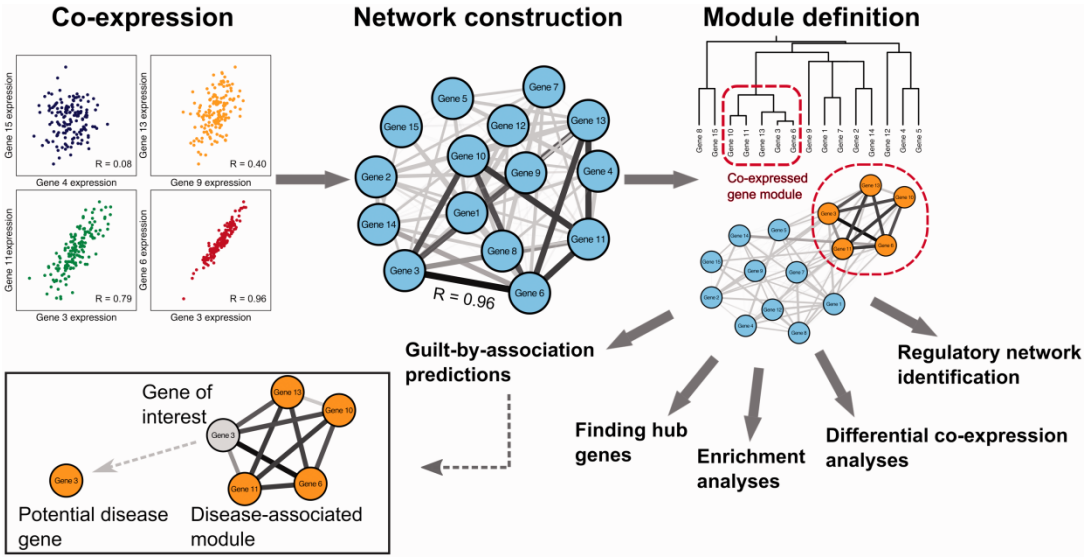

Figura 2 – Exemplo da análise de dados por redes de co-expressão gênica. Reproduzido de van Dam e colaboradores [117].

Dentre os programas utilizados na construção de redes de co-expressão gênicas, o programa *Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA)* é o mais utilizado. Esse programa utiliza cálculos estatísticos para construção de redes de co-expressão gênica e identificação de módulos altamente associados a determinadas características em estudo, levando em consideração a independência entre as amostras. Após a identificação dos módulos, o enriquecimento funcional dos seus genes permite a determinação das vias biológicas ou processos biológicos relacionados com as condições em estudo, além de medir a correlação desses genes com as características em estudo e a importância do gene dentro do módulo, por meio dos parâmetros Significância do Gene (*Gene Significance = GS*) e *Module Membership* (*MM*), respectivamente. O parâmetro *MM* pode ser adotado ainda como uma medida indireta da conectividade intramodular, sendo utilizado para a identificação dos chamados genes *hub*, que são considerados genes de alta hierarquia no módulo, já que a não funcionalidade desses genes pode afetar todos os outros que estão interligados a ele. Além disso, os genes *hub* são muitas vezes funcionalmente importantes, podendo desempenhar papel fundamental no modelo em análise e representar candidatos a biomarcadores diagnósticos e prognósticos ou potenciais alvos terapêuticos [118, 119, 120, 121].

O programa *WGCNA* vem sendo utilizado na análise de diferentes conjuntos de dados, principalmente, os que envolvem interações complexas e que são influenciadas por diferentes fatores, como no estudo de câncer, esquizofrenia, na resposta humoral e celular na resposta à vacina da gripe dentre outros [122, 123, 124].

No estudo das leishmanioses, o programa *WGCNA* foi utilizada na análise de diferentes tipos de dados. Gardinassi e colaboradores [103] avaliaram as diferenças nos padrões de expressão de células sanguíneas do sangue periférico de pacientes com a leishmaniose visceral ativa, pós-tratamento, assintomáticos e indivíduos controle e verificaram que as diferentes condições clínicas estavam associadas a diferentes módulos. O enriquecimento funcional dos genes contidos nos módulos associados aos pacientes com a doença ativa, por exemplo, mostrou que os genes pertenciam às vias biológicas relacionadas com a apresentação de antígenos e com a sinalização via receptor de células T. Já Christensen e colaboradores [113] identificaram módulos correlacionados às biópsias de pacientes com *Leishmania braziliensis*, que foram associados com os transcritos mais abundantes do parasito. Eles verificaram que o módulo que apresentou maior associação com os transcritos do parasito continham genes codificadores de citocinas inflamatórias, que apresentaram alta expressão nas biópsias dos pacientes. O programa *WGCNA* foi adotado ainda no estudo do desenvolvimento de *Leishmania major* em seu vetor natural para detectar grupos de genes do parasito com padrões de expressão semelhantes nos diferentes estágios de desenvolvimento e condições de crescimento [110].

Os estudos descritos acima revelam a versatilidade do programa WGCNA na análise de diferentes conjuntos de dados envolvendo o estudo das leishmanioses.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos inúmeros estudos focados na participação dos sistemas imunes inato e adaptativo na proteção ou desenvolvimento da doença pouco se conhece das alterações que ocorrem na célula hospedeira no início da infecção. Ao mesmo tempo em que as células suscitam respostas que levam à eliminação do parasito, esse pode induzir alterações nos processos celulares para sua evasão, sobrevivência e proliferação. Para o entendimento desses processos, propomos identificar as vias biológicas moduladas na infecção de células THP-1 por *Leishmania infantum*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo identificar as vias biológicas moduladas na infecção de células THP-1 por *Leishmania infantum*.

3.2 Objetivos específicos

a) Determinar o parasitismo nas células THP-1 infectadas por promastigotas de *Leishmania infantum*;
b) Obter dados de expressão gênica global das células THP-1 infectadas por *Leishmania infantum* utilizando a técnica de *RNA-seq* em plataforma *Illumina*;
c) Obter redes de co-expressão gênica baseadas nos dados de expressão global das células THP-1 infectadas por *Leishmania infantum* utilizando o programa *Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA)*;
d) Determinar o perfil de expressão gênica das células THP-1 infectadas por *Leishmania infantum* nos diferentes períodos de infecção;
e) Identificar genes *HGS-hub* envolvidos na infecção das células THP-1 por *Leishmania infantum*, nos diferentes períodos de infecção.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A abordagem experimental adotada neste trabalho compreendeu duas partes, na qual a primeira envolveu os ensaios biológicos entre os macrófagos e a *Leishmania infatum* e a obtenção dos dados de expressão gênica global. Já a segunda parte envolveu a análise dos dados utilizando o programa *Weighted Gene Co-expression Network Analysis* (WGCNA). As etapas da primeira parte da abordagem estão resumidas na Figura 3.

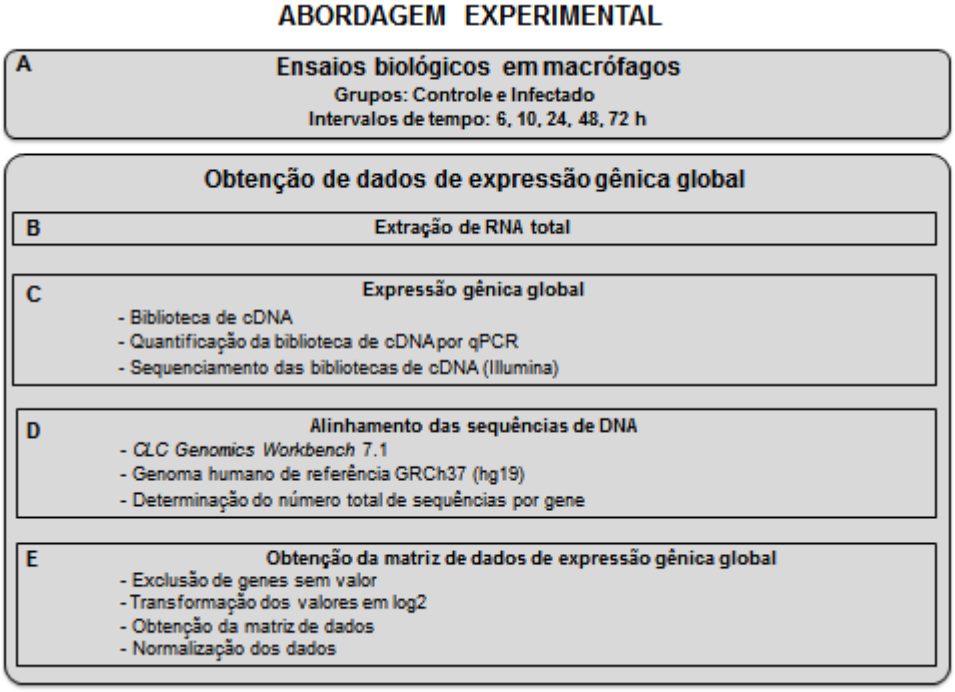

Figura 3 - Resumo das etapas envolvidas no ensaio biológico entre macrófagos e *Leishmania infantum* e a obtenção dos dados de expressão gênica global.

4.1 Células THP-1

Neste trabalho foram utilizadas células da linhagem monocítica humana THP-1 [125] (TIB-202 - ATCC - The Global Bioresource Center, EUA) para evitarmos a variação na resposta celular e garantir a reprodutibilidade nos experimentos. As células foram cultivadas com meio RPMI 1640 (Gibco, EUA) acrescido de 100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de gentamicina, 2 mM de L-glutamina, 11 mM de bicarbonato de sódio e suplementado com soro fetal bovino 10% (SFB) inativado pelo calor (Gibco, EUA) (meio completo), em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO_2, a 37 ºC.

4.2 Parasito e manutenção de amastigotas de *Leishmania infantum*

Para a manutenção da cepa de *Leishmania infantum* MHOM/BR/1972/LD (*syn chagasi*) utilizada nos experimentos foram utilizados hamsteres (*Mesocricetus auratus*) não isogênicos, machos, com 45 a 60 dias de idade, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP. O uso dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT-USP), sob o número 289A.

Os hamsteres foram inoculados via intraperitoneal com uma suspensão do homogeneizado de baço de hamster infectado, sendo mantidos no Biotério de Experimentação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, da Universidade de São Paulo (USP), em ambiente com ventilação natural, ração (Purina-Brasil) e água à vontade.

4.3 Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania infantum*

Para a obtenção das formas promastigotas, o baço de hamster infectado foi retirado assepticamente, macerado e a suspensão celular passada em agulhas de 21G por 2 vezes e 23G por 3 vezes. Em seguida, o lisado celular foi centrifugado por 3 vezes a 394 x g por 10 minutos. O sobrenadante contendo as formas amastigotas foi centrifugado a 788 x g por 30 minutos e o precipitado ressuspendido em meio 199 (Sigma Aldrich, EUA) acrescido de 10% de SFB, 100 UI/mL de penicilina, 10 µg/mL de gentamicina, 2 mM de L-glutamina, 10 mM de Hepes, 20 mg/mL de Hemina e 5% de urina humana (meio completo). As formas amastigotas foram mantidas a 26 ºC até se diferenciarem em formas promastigotas. Uma vez em fase logarítmica, 1 x 10^5 parasitos por mL foram transferidos para novo meio 199 completo, totalizando 5 mL, e cultivados a 26 ºC por 7 dias, tendo o seu crescimento monitorado por meio da contagem em câmara de Neubauer para a determinação da fase estacionária.

4.4 Infecção de células THP-1 com promastigotas de *Leishmania infantum*

4.4.1 Diferenciação das células THP-1 com *phorbol 12-myristate 13 acetate* (PMA) em macrófagos

Para diferenciação das células THP-1, essas foram plaqueadas em poços de placas de 24 poços (JetBiofil, Coreia do Sul), contendo lamínulas de 13 mm de diâmetro estéreis (Knitell Glass, Alemanha), em meio RPMI 1640 (Gibco, EUA) com 5% de SFB e 20 ng/mL de *phorbol 12-myristate 13 acetate* (PMA) (Sigma-Aldrich, EUA), sendo incubadas em atmosfera úmida com 5% de CO_2 a 37 ºC por 24 horas para diferenciação em macrófagos. Após incubação, as células foram lavadas com salina tamponada com fosfato 0,01 M (PBS) pH 7,2 para a retirada das células

não aderentes, sendo incubadas novamente por 48 h em meio RPMI 1640 com 5% de SFB.

4.4.2 Padronização da infecção de células THP-1 com *Leishmania infantum*

Após a diferenciação das células THP-1 em macrófagos, esses foram infectados com formas promastigotas de *Leishmania infantum* em fase estacionária, que foram cultivados por até três passagens, utilizando três proporções parasito:célula: 5:1, 8:1 e 10:1, com incubação inicial de 6 h em meio RPMI com 5% de SFB, em atmosfera úmida com 5% de CO_2 a 37 ºC. Após incubação inicial, as células foram lavadas com PBS para retirada dos parasitos não internalizados, sendo incubadas por 24 h e 48 h. Ao final das incubações, as células foram coradas com corante panótico (NewProv, Brasil) e as lamínulas foram montadas em lâminas para microscopia óptica com meio de montagem *Permount* (Fisher Scientific, EUA).

O parasitismo (número de amastigotas/100 células) foi determinado com a contagem de 300 células por lamínulas em microscópio óptico (Zeiss, Alemanha), com objetiva de 100X, sendo utilizada a seguinte fórmula:

$$\textbf{Parasitismo} = \frac{\text{Nº de parasitos}}{\text{Nº de células infectadas}} \times \frac{\text{Nº de células infectadas}}{\text{Nº total de células}} \times 100$$

4.4.3 Infecção das células THP-1 com *Leishmania infantum* para extração de RNA total

Para a extração de RNA, $1x10^6$ células THP-1 foram plaqueadas em placas de 24 poços, em sextuplicatas, sendo 3 poços utilizados como controle (células não infectadas) e 3 poços utilizados para a infecção (células infectadas). Após o processo de diferenciação em macrófagos, conforme descrito no item 4.4.1, as células foram infectadas com formas promastigotas de *Leishmania infantum* na proporção de 10:1

(parasito:célula) em meio RPMI com 5% de SFB, em atmosfera úmida com 5% de CO_2 a 37 ºC. Após as 6 h iniciais de infecção, tanto as células infectadas quanto as não infectadas foram lavadas com PBS, sendo incubadas novamente por diferentes intervalos de tempo: 4 h, 24 h, 48 h e 72 h, em meio RPMI com 5% de SFB. Ao final de cada intervalo de tempo, os sobrenadantes de cultura foram retirados, 1 mL do reagente *TRIzol* (Life Technologies, EUA) foi adicionado em cada poço e as placas foram armazenadas a -80 ºC para posterior extração de RNA.

Incluindo as 6 horas iniciais de infecção, 5 grupos com 2 amostras cada (1 controle e 1 infectado) em triplicatas foram obtidos, totalizando 30 amostras. Os grupos e suas respectivas amostras estão listados na Tabela 1. O grupo correspondente às amostras incubadas por 4 h após a lavagem com PBS foi denominado 10 h para facilitar a visualização da cinética de interação parasito-célula. Em paralelo foram realizadas infecções das células THP-1 nas mesmas condições, com exceção do número de células por poço ($5x10^5$ células), para a determinação do parasitismo.

Tabela 1 - Nomenclatura dos grupos obtidos, de acordo com os tempos de incubação.

	Amostras	
Grupos	**Controle**	**Infectado**
6 h	C06_1	I06_1
	C06_2	I06_1
	C06_3	I06_3
10 h	C10_1	I10_1
	C10_2	I10_2
	C10_3	I10_3
24 h	C24_1	I24_1
	C24_2	I24_2
	C24_3	I24_3
48 h	C48_1	I48_1
	C48_2	I48_2
	C48_3	C48_3
72 h	C72_1	I72_1
	C72_2	I72_2
	C72_3	I72_3

C = Controle não-infectado; I = Infectado

4.5 Extração de RNA total

O RNA total das células, infectadas ou não, foi extraído utilizando o reagente *TRIzol* em conjunto com o kit de extração de RNA *Direct-zol RNA MiniPrep* (Zymo Research, EUA). Para cada 1 mL de lisado celular em *TRIzol* foi adicionado 1 volume de etanol 100% (Labsynth, Brasil) e homogeneizado com o vórtex. Em seguida, as suspensões foram adicionadas às colunas *Zymo-spin IIIC column* e centrifugadas por 1 min. Posteriormente, 400 µL da solução *Direct-zol RNA PreWash* foram adicionados às colunas, sendo centrifugadas por 1 min. Esse passo foi repetido novamente antes da adição de 700 µL da solução *RNA Wash Buffer* às colunas, que foram centrifugadas por 1 min. Para a remoção total da solução de lavagem, as colunas foram centrifugadas por mais 2 min. O RNA total foi eluído com a adição de 25 µL de água ultrapura, após 1 min de incubação em temperatura ambiente e centrifugação por 1 min. Todas as etapas de centrifugação foram realizadas a 12.000 x g, em temperatura ambiente.

Após eluição, o RNA total das amostras foi quantificado no espectrofotômetro *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific, EUA).

4.6 Sequenciamento de Nova Geração (NGS) em Plataforma *Illumina*

O preparo das bibliotecas com o RNA total extraído das células THP-1 infectadas ou não, como também o sequenciamento das bibliotecas e o alinhamento das sequências obtidas foram realizados no Instituto de Biotecnologia, em colaboração com o Prof. Paulo Eduardo Martins Ribolla, do Departamento de Parasitologia, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Câmpus de Botucatu.

4.6.1 Preparo das bibliotecas de cDNA para sequenciamento de nova geração

As bibliotecas de cDNA das 30 amostras foram preparadas concomitantemente com o kit *SureSelect Stranded-specific RNA Library Prep for Illumina Multiplexed Sequencing* (Agilent Technologies, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O mRNA das amostras foi purificado a partir 1 µg de RNA total, em um volume final de 25 µL, utilizando-se 25 µL de *Oligo(dT) beads* em microplaca de 96 poços (Kasvi, Brasil). Após homogeneização das soluções contendo o RNA total e as *beads*, estas foram aquecidas a 65 °C por 5 min, resfriadas a 4 °C por 1 min e incubadas a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, a solução foi retirada e as *beads* foram lavadas com 200 µL da solução *RNA Seq Bead Washing Buffer*. Após remoção da solução de lavagem, 25 µL da solução *RNA Seq Elution Buffer* foram adicionados às *beads*, sendo aquecidas a 80 °C por 2 min e resfriadas a 4 °C por 1 min. Ao final do resfriamento, 25 µL da solução *RNA Seq Binding Buffer* foram adicionados seguida da incubação a temperatura ambiente por 5 min e retirada da solução para nova lavagem das *beads* com 200 µL da solução *RNA Seq Bead Washing Buffer*.

Com a retirada da solução de lavagem, iniciou-se o processo de fragmentação das moléculas de mRNAs que se ligaram às *beads*, seguida da síntese da primeira fita de cDNA. Para isso, 19 µL da solução *RNA Seq Fragmentation Mix* foram adicionados, aquecidos a 94 °C por 8 min e resfriados a 4 °C. Em seguida, a microplaca foi mantida na estante magnética para a retirada de 17 µL da solução contendo o mRNA fragmentado de cada amostra, sendo esse volume transferido para nova microplaca que foi mantida em gelo.

Para síntese da primeira fita de cDNA foram adicionados 0,5 µL de *Actinomicyn D* (120 ng/µL) e 8 µL da solução *RNA Seq First Strand Master Mix* aos 17 µL de mRNA fragmentado de cada amostra, que foram homogeneizados e incubados a 25 °C por 10 min, 37 °C por 40 min, com posterior resfriamento a 4 °C. Antes de síntese da segunda fita de cDNA, as primeiras fitas de cDNA foram purificadas utilizando *AMPure XP Beads* (Beckman Coulter Genomics, EUA), que foram adicionadas (46 µL) aos 25,5 µL da solução contendo a primeira fita de

cDNA, homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente por 5 min. Após incubação, a solução foi retirada e as *beads* foram lavadas em 200 µL de etanol 70% por 1 min. A lavagem com o etanol foi repetida por mais uma vez antes da secagem das *beads* a 37 °C por 1 min. Para a eluição das moléculas de cDNA, as *beads* foram ressuspendidas com 21 µL de água ultrapura em cada poço sendo incubadas por 2 min em temperatura ambiente. Vinte microlitros dessa solução foram recuperados, transferidos para novo poço e utilizados para a síntese da segunda fita de cDNA.

Para a síntese da segunda fita de cDNA, 25 µL da solução *RNA Seq Second Strand + End Repair Enzyme Mix* foram adicionados aos 20 µL da solução contendo a primeira fita de cDNA, sendo homogeneizados e mantidos no gelo. Em seguida, 5 µL da solução *RNA Seq Second Strand + End Repair Oligo Mix* foram adicionados, homogeneizados e incubados a 16 °C por 30 min e resfriados a 4 °C. Após a síntese da segunda fita, as moléculas de cDNA foram purificadas utilizando as *AMPure XP Beads* conforme descrito acima.

Com a síntese das moléculas de cDNA, o próximo passo foi a adição de um nucleotídeo adenina na extremidade 3' das moléculas. Para isso, 20 µL da solução *RNA Seq dA Tailing Master Mix* foram adicionados aos 20 µL da solução contendo as moléculas de cDNA recuperadas da purificação com as *beads AMPure XP*, homogeneizados, incubados a 37 °C por 15 min e resfriados a 4 °C. Em seguida, a reação para a ligação dos adaptadores foi realizada com incubação a 20 °C por 15 min, seguido de resfriamento a 4 °C após a adição de 5 µL da solução *SureSelect Ligation Master Mix* a cada uma das amostras, homogeneização e posterior adição de 5 µL de *SureSelect Oligo Adaptor Mix*. Ao final da reação, as moléculas de cDNA com os adaptadores ligados às suas extremidades foram purificadas com as *AMPure XP Beads* e um volume de 17 µL de cada amostra foi recuperado.

A amplificação das bibliotecas de cDNA, como também a indexação das mesmas, foram realizadas por meio de Reação em cadeia da Polimerase (PCR) que continha: 25 µL de *RNA Seq PCR Master Mix*, 1 µL de *Uracil DNA Glycosylase (UDG)*, 1 µL de *SureSelect Primer*, 1 µL de *RNA Seq ILM Reverse PCR Primer* (1:20), totalizando 28 µL. Esse volume foi adicionado aos 17 µL recuperados da purificação com as *AMPure XP Beads* de cada amostra, como também 5 µL de

indexing primer. Após homogeneização, as amostras foram incubadas em termociclador, conforme as condições descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições da PCR para amplificação das bibliotecas de cDNA

Nº de ciclos	**Temperatura**	**Tempo**
1	37 °C	15 min
1	95 °C	2 min
	95 °C	30 seg
13	65 °C	30 seg
	72 °C	1 min
1	72 °C	5 min
1	4° C	*Hold*

Uma vez amplificadas, as bibliotecas foram purificadas 2 vezes seguidas com as *AMPure XP Beads*, conforme descrito acima, com exceção dos volumes de *beads* e de água ultrapura utilizados. Na primeira purificação, as bibliotecas foram homogeneizadas com 60 µL de beads, sendo eluídas com 50 µL de água ultrapura. Já na segunda purificação, foram utilizados 45 µL de *beads* e eluição em 40 µL de água.

Durante o processo da obtenção das bibliotecas, todas as incubações foram realizadas em termociclador *Biometra T-Gradient ThermoBlock* (Analityk Jena, Alemanha), exceto as realizadas em temperatura ambiente, com a microplaca de 96 poços selada. Já nas etapas de purificação do mRNA, dos fragmentos de cDNA, como também os produtos da amplificação das bibliotecas foi utilizado o separador magnético (Invitrogen, EUA) para a retirada das soluções com pipetador multicanal *Eppendorf*.

4.6.2 Quantificação das bibliotecas de cDNA por PCR quantitativa

As bibliotecas de cDNAs obtidas foram quantificadas por meio de PCR quantitativa (qPCR) utilizando *Kapa Library Quantification Kit for Illumina Platforms* (Roche, Suiça), de acordo com as instruções do fabricante, no termociclador *7500 Fast Real-time PCR System* (Applied Biosystems, EUA). Para cada reação foram utilizados 12 µL de *Kapa Sybr Fast qPCR Mastermix* (2x) + *Primer Premix* (10x), 0,4 µL de *Rox Low* (50x), 3,6 µL de água ultrapura, 4 µL de biblioteca de cDNA (1:10.000) ou 4 µL de DNA (20 pM a 0,0002 pM) para curva padrão. As amplificações ocorrem nas seguintes condições: 95 °C por 20 seg (1 ciclo), 95 °C por 3 seg e 60 °C por 30 seg em um total de 40 ciclos, sendo os valores de CT (*Cycle Threshold*) obtidos utilizados para a determinação das concentrações.

4.6.3 Sequenciamento das bibliotecas de cDNA na plataforma *Illumina*

Após quantificação, as bibliotecas foram normalizadas para 2 nM em 10 mM de Tris-HCl - pH 8,0 (Serva, Alemanha) acrescido de 0,1% de Tween 20 (Sigma Aldrich, EUA), sendo utilizados 10 µL de cada uma das bibliotecas normalizadas para formar um *pool*. Uma vez homogeneizados, 10 µL desse *pool* foram diluídos em 10 µL de 0,2 N de NaOH (Merck, EUA), sendo incubados por 5 min em temperatura ambiente, antes da adição de 10 µL de 200 mM de Tris-HCl – pH 7,0. O *pool* foi então diluído a 20 pM com a adição de 970 µL da solução de hibridização HT1 e 117 µL dessa diluição foram utilizados para a diluição final a 1,8 pM, com a adição de 1183 µL da solução HT1, totalizando 1,3 mL. Esse volume foi aplicado no cartucho de sequenciamento do kit *NextSeq 500/550 High Output v2 kit (75 cycles)* (Illumina, EUA), sendo distribuído nas 4 *lanes* da *flowcell* e o sequenciamento foi realizado no sequenciador *NextSeq 500* (Illumina, EUA), utilizando o protocolo *single-end*, de acordo com as instruções do fabricante.

4.6.4 Alinhamento das sequências obtidas

Com o software *CLC Genomics Workbench 7.1* (Qiagen, Alemanha), as sequências obtidas de cada amostra com o sequenciamento foram alinhadas contra o genoma humano de referência GRCh37 (hg19), disponível no banco de dados ENSEMBL [126], e quantificadas para a determinação do número total de sequências alinhadas por gene (expressão). Para a quantificação da expressão foram consideradas as sequências alinhadas uma única vez ao genoma.

4.6.5 Obtenção da matriz de dados de expressão gênica global

A matriz de dados de expressão gênica foi obtida após a exclusão dos genes que não apresentaram valor de expressão gênica em pelo menos uma das 30 amostras. Os valores foram então transformados em log2 e normalizados utilizando o método *Lowess* do software *Limma* [127].

4.7 *Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA)*

A obtenção das redes de co-expressão gênica foi realizada em colaboração com a Dra. Silvia Yumi Bando, do Laboratório de Genômica Pediátrica do Departamento de Pediatria da FMUSP. As etapas envolvidas na obtenção das redes de co-expressão, utilizando o programa *Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA)*, e análise dos dados estão resumidas na Figura 4.

4.7.1 Construção das redes de co-expressão gênica

As redes de co-expressão gênicas foram construídas com o pacote *Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA)* [118, 119], do *software R*.

Antes da construção das redes de co-expressão gênica, os dados de expressão normalizados das 30 amostras (item 4.6.5) foram checados para a remoção de amostras com valores de expressão discrepantes (*outliers*) (Figura 4A). Em seguida, as redes de co-expressão foram construídas a partir de uma matriz de similaridade obtida utilizando o valor absoluto da correlação de Pearson entre os perfis de expressão gênica de todas as amostras. Essa matriz de similaridade foi então transformada em uma matriz de adjacência elevada a uma potência β (*soft-threshold*), enfatizando assim as correlações fortes e atenuando as correlações fracas em uma escala exponencial (mimetizando uma distribuição *scale-free*). (Figura 4B). As correlações ponderadas ou *weighted* representam as forças de ligação entre os genes na rede. O critério para escolha da potência β considera valores em que a rede satisfaça a topologia *scale-free*, descrito por Zhang e Horvath [118]. Geralmente, utiliza-se a menor potência β onde a curva de saturação é alcançada, com valores de $R^2 > 0{,}80$.

A adjacência do *soft-threshold* é então transformada em um elemento de matriz de sobreposição topológica (TOM, *topological overlaping matrix*), identificando-se assim as estruturas modulares. Ou seja, é feita uma conversão da medida de dissimilaridade para o agrupamento hierárquico, onde se agrupam os nós estreitamente conectados formando os módulos da rede. A sobreposição topológica serve como filtro para excluir conexões fracas durante a construção da rede. Por meio do agrupamento é obtido um dendrograma da rede, sendo escolhido um ponto de corte dos ramos do dendrograma. Os módulos correspondentes aos ramos do dendrograma são estabelecidos pelo *Dynamic Tree Cut*. Para cada módulo de genes formado é atribuída uma cor diferente, sendo agrupados no módulo *Grey* os genes que não foram atribuídos a nenhum módulo (Figura 4C).

4.7.2 Associação dos módulos de co-expressão gênica às amostras dos grupos analisados

Para correlacionarmos os módulos transcricionais com uma determinada característica das amostras, que neste estudo corresponde à infecção ou não das células THP-1 nos diferentes períodos de incubação, é necessário obter medidas de significância tanto para cada gene quanto para o módulo. Assim, os valores de *GS* (do inglês *Gene Significance*) foram obtidos por meio da correlação entre cada gene contido na rede e as amostras utilizando a correlação de Pearson. Para cada valor de *GS* foi calculado também um valor p pelo teste t. A partir dos valores de *GS* foi calculada então a significância do módulo, que corresponde à média absoluta dos valores de GS dos genes pertencentes ao módulo. Os módulos que apresentaram maior valor de significância do módulo e valor de $p < 0,05$ foram selecionados para as análises posteriores (Figura 4D).

4.7.3 Identificação de genes *hub*

Os genes *hub* foram selecionados dentre os genes contidos nos módulos selecionados, conforme item 4.7.2, por meio dos valores absolutos de GS (*Gene Significance*) > 0,7 e MM (*Module Membership*) > 0,7, sendo selecionados até 20 genes com os maiores valores (Figura 4D). Para verificar a expressão dos mesmos, foram utilizados os valores de expressão transformados em log2 e normalizados, comparando-os entre as amostras Controle e Infectado em todos os períodos de infecção avaliados. A análise estatística foi realizada por meio do teste-t do programa *GraphPad Prism 7.0* entre as amostras, sendo a diferença na expressão considerada estatisticamente significante para $p < 0,05$. Além do valor de p, a tendência de aumento ou diminuição na expressão também foi considerada para a seleção. Os genes *hub* que apresentaram diferença estatisticamente significante na expressão foram denominados genes *HGS-hub* (*High Gene Significance hub*) (Figura 4D).

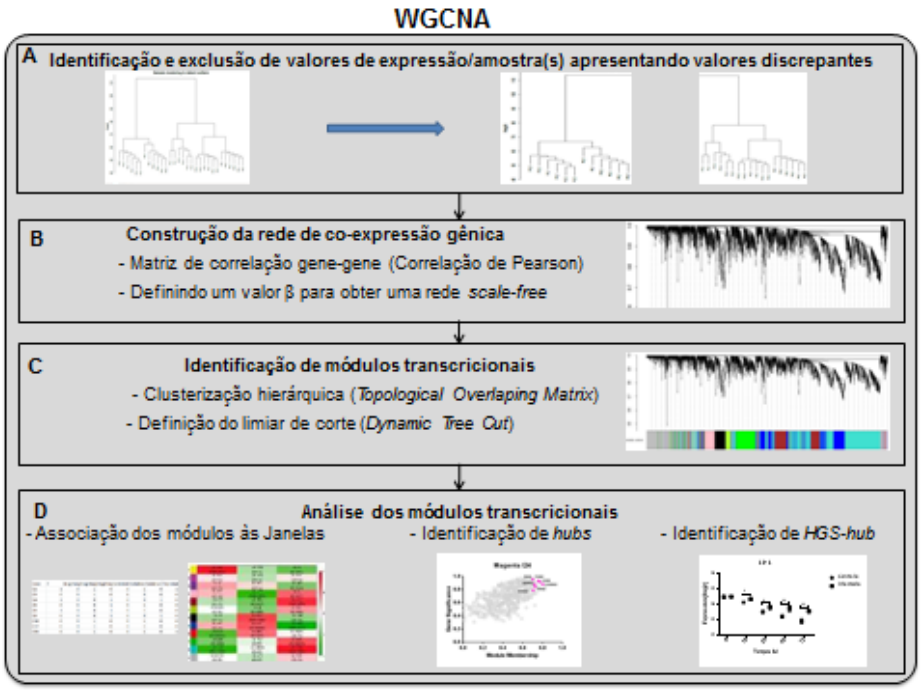

Figura 4 - Etapas envolvidas na obtenção das redes de co-expressão gênica, na identificação e na análise dos módulos trasncricionais.

4.7.4 Análise de enriquecimento funcional dos módulos e *HGS-hub*

A análise de enriquecimento funcional dos módulos selecionados foi realizada na ferramenta *online* *Enrichr* (disponível em: http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/) [128, 129], utilizando o banco de dados KEGG (disponível em: https://www.genome.jp/kegg) [130], sendo considerados os termos que apresentaram valor de $p<0,05$.

Já as análises dos genes *hub* diferencialmente expressos (*HGS-hub*) foram realizadas nos bancos de dados *online Source Search* (disponível em: https://source-search.princeton.edu) [131], NCBI (disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene), *Enrichr* e *GeneCards* (disponível em: https://www.genecards.org) [132] para os termos de *Gene Ontology* e informações sobre os genes.

5 RESULTADOS

5.1 Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania infantum*

A curva de crescimento foi realizada para monitorar a proliferação das promastigotas de *Leishmania infantum* em cultura e assim determinar o período em que a fase estacionária de crescimento fosse atingida. Como podemos observar na Figura 5, a fase estacionária foi alcançada entre o quarto e o quinto dia de cultura.

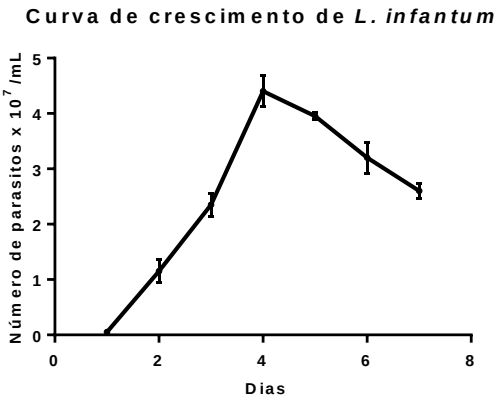

Figura 5 - Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania infantum*. Número de parasitos x 10^7/mL (média ± desvio-padrão) da contagem de duas culturas independentes.

5.2 Infecção de células THP-1 por *Leishmania infantum*

Uma vez determinada a fase estacionária de crescimento das promastigotas, estas foram utilizadas para a padronização da infecção de células THP-1. Para isso, as células foram infectadas com diferentes proporções parasito:célula e como podemos observar na Figura 5, as proporções 8:1 e 10:1 foram as que apresentaram

maior número de amastigotas por 100 células (Figura 6A), como também as maiores porcentagens de infecção, após 24 horas de incubação (Figura 6B).

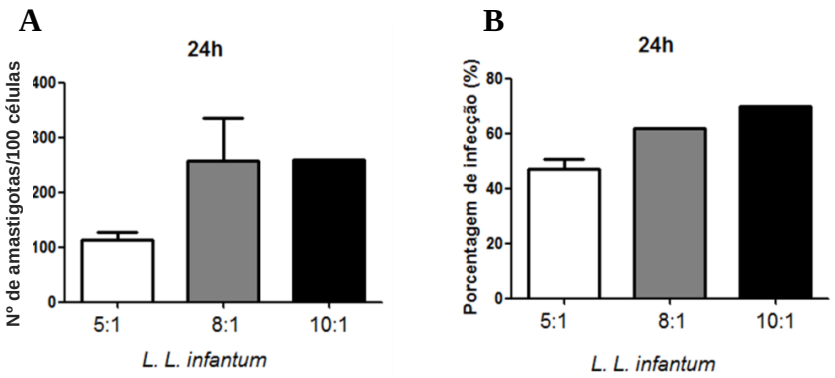

Figura 6 - Padronização da infecção de células THP-1 infectadas com promastigotas de *Leishmania infantum*. Células THP-1 foram infectadas nas proporções de 5:1, 8:1 e 10:1 (parasito:célula), com 6 h de infecção e incubadas por 24 horas. **(A)** Parasitismo das células THP-1 (média). **(B)** Porcentagem de infecção. Resultado representativo de três experimentos independentes.

Ao analisarmos o parasitismo após 48 horas de incubação, podemos observar na Figura 7A que ambas as proporções (8:1 e 10:1) apresentaram um número semelhante de amastigotas/100 células. No entanto, a porcentagem de infecção da proporção 8:1, que foi menor após 24 horas de incubação, tornou-se semelhante à proporção 10:1 (Figura 7B). Assim, a proporção 10:1 com infecção por 6 horas foi adotada para os experimentos posteriores.

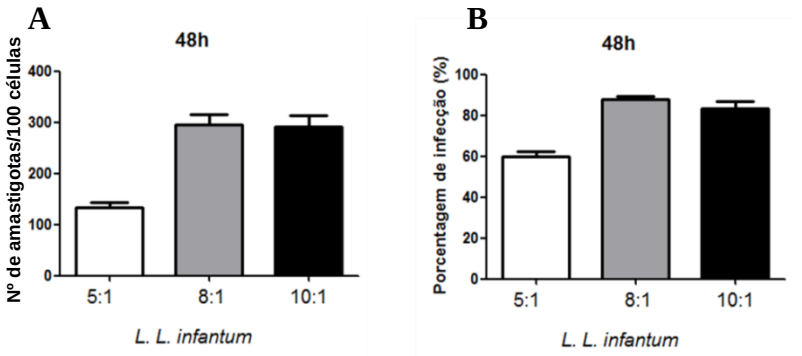

Figura 7 – Padronização da infecção de células THP-1 infectadas com promastigotas de *Leishmania infantum*. Células THP-1 foram infectadas nas proporções de 5:1, 8:1 e 10:1 (parasito:célula), com 6 h de infecção e incubadas por 48 horas. **(A)** Parasitismo das células THP-1 (mediana). **(B)** Porcentagem de infecção. Resultado representativo de três experimentos independentes.

Uma vez determinadas as condições de infecção, as células THP-1 foram infectadas em triplicatas para a extração de RNA sendo realizada em paralelo a infecção para a determinação do parasitismo. Como podemos observar na Figura 8, tanto o parasitismo (Figura 8A) quanto a porcentagem de infecção (Figura 8B) apresentaram aumento nas primeiras 24 h de incubação e diminuição nos períodos posteriores. O número de amastigotas por 100 células atingiu valor máximo (217) após 24 h de incubação e esse número diminuiu nos períodos de 48 e 72 h, apresentando 168 e 142 amastigotas por 100 células, respectivamente.

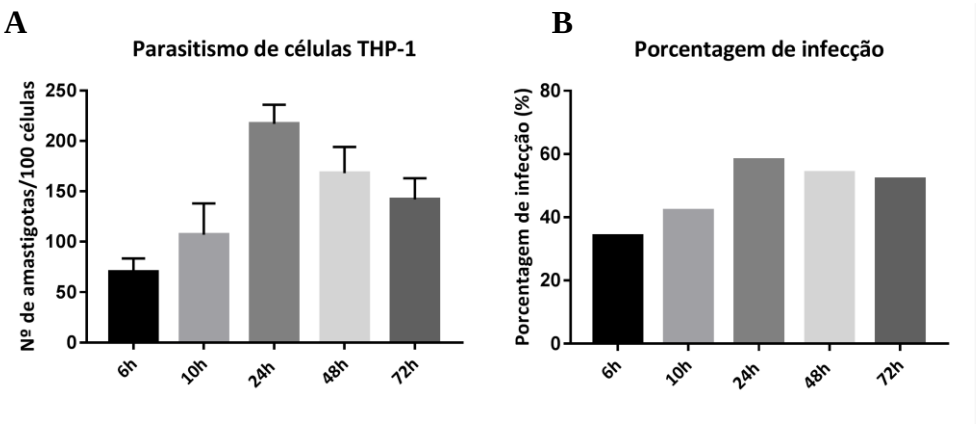

Figura 8 – Parasitismo de células THP-1 infectadas com formas promastigotas de *Leishmania infantum* na proporção 10:1. As células infectadas foram incubadas por 6 h, 10 h, 24 h, 48 h, 72 h. (A) Parasitismo das células THP-1 (média). (B) Porcentagem de infecção.

5.3 Sequenciamento das bibliotecas de cDNA

5.3.1 Concentração das bibliotecas de cDNA

Após o preparo das bibliotecas de cDNA, conforme desrito no item 4.6.1, essas foram quantificadas por meio de qPCR antes do sequenciamento. Na Figura 9, podemos observar que as curvas de amplificação das bibliotecas geradas se localizam entre as curvas amplificadas dos padrões correspondentes a 20 e 0,2 pM, representadas na curva de amplificação como a primeira e a terceira curvas na cor vermelha, respectivamente, da esquerda para direita.

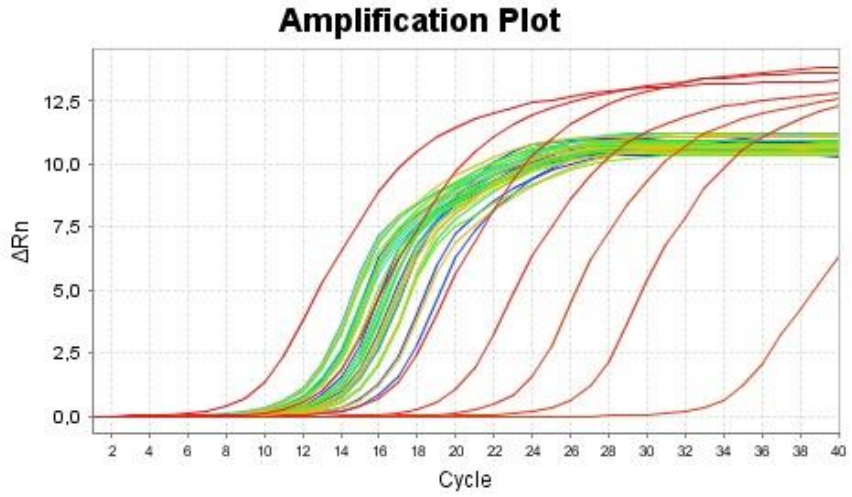

Figura 9 - Quantificação das bibliotecas de cDNA por qPCR. Curvas de amplificação das bibliotecas geradas a partir do RNA total extraído das amostras.

Com base nos CTs das curvas de amplificação, a concentração de cada biblioteca foi determinada (Tabela 3) e podemos observar que todas as amostras dos grupos apresentaram variação na concentração das bibliotecas, com pelo menos uma das triplicatas apresentando valores inferiores a 10 nM, com exceção das amostras do grupo 48 h e das amostras Infectadas dos grupos 10 h e 24 h. Dentre as amostras que apresentaram concentrações inferiores a 10 nM, a biblioteca da amostra C72_1 do grupo 72 h apresentou a menor concentração (2,7 nM). E dentre as amostras que apresentaram maior concentração, podemos citar a amostra I48_3 do grupo 48 h (58,07 nM).

Tabela 3 – Concentração das bibliotecas de cDNA

Grupo	Amostras	CT	Concentração (nM)
6 h	C06_1	14,48	11,29
	C06_2	15,99	4,10
	C06_3	12,15	53,94
	I06_1	14,35	12,32
	I06_2	12,97	31,11
	I06_3	15,07	7,60
10 h	C10_1	12,17	53,22
	C10_2	15,04	7,75
	C10_3	13,27	25,44
	I10_1	12,88	33,05
	I10_2	13,75	18,43
	I10_3	14,04	15,17
24 h	C24_1	12,64	38,82
	C24_2	13,96	16,01
	C24_3	15,01	7,91
	I24_1	12,26	50,10
	I24_2	14,64	10,14
	I24_3	14,02	15,38
48 h	C48_1	12,8	34,87
	C48_2	12,94	31,74
	C48_3	12,94	31,74
	I48_1	14,51	11,07
	I48_2	13,83	17,47
	I48_3	12,04	58,07
72 h	C72_1	16,57	2,78
	C72_2	14,25	13,18
	C72_3	14,65	10,07
	I72_1	15,89	4,38
	I72_2	12,68	37,79
	I72_3	13,57	20,80

C = Controle; I = Infectado

5.4 Análise dos dados gerados no sequenciamento

O sequenciamento das bibliotecas distribuídas nas 4 *lanes* da *flowcell* gerou um total de 579.256.144 sequências, com uma média de *Phred score* ≥ Q30 de 85%. Desse total de sequências, cerca de 90% (525.369.226) foram identificadas por meio de seus *index*. A maioria das amostras apresentou números de sequência semelhantes, com exceção das amostras C06_1 e I06_2 do grupo 6 h, I10_3 do grupo 10 h e I24_2 do grupo 24 h, que apresentaram números superiores a 20 milhões de sequências. Já as amostras C10_3 do grupo 10 h e C72_3 do grupo 72 h foram as que apresentaram os menores números de sequências, como podemos observar na Tabela 4.

Tabela 4 – Número de sequências geradas no Sequenciamento das bibliotecas de cDNA

Grupo	Amostra	Número de sequências (milhões)
6 h	C06_1	23.469.817
	C06_2	18.155.691
	C06_3	18.938.573
	I06_1	17.520.858
	I06_2	23.205.045
	I06_3	14.925.983
10 h	C10_1	18.794.783
	C10_2	16.043.406
	C10_3	11.800.947
	I10_1	13.497.008
	I10_2	26.729.899
	I10_3	16.445.444
24 h	C24_1	17.002.153
	C24_2	17.134.488
	C24_3	14.139.278
	I24_1	16.820.933
	I24_2	21.108.135
48 h	C48_1	19.595.865
	C48_2	16.616.564
	C48_3	15.814.038
	I48_1	18.427.418
	I48_2	16.715.242
	I48_3	18.702.382
72 h	C72_1	17.702.387
	C72_2	18.498.842
	C72_3	10.899.219
	I72_1	15.967.924
	I72_2	16.865.320
	I72_3	17.768.803

C = Controle; I = Infectado

Uma vez obtidas, as sequências de cDNA foram utilizadas para o alinhamento contra o genoma humano de referência para determinar a expressão gênica, sendo identificados um total de 23.580 genes. Desse total, 7.797 genes foram

excluídos, pois não apresentaram expressão em pelo menos uma das 30 amostras, totalizando 15.783 genes, que foram utilizados para a construção da matriz de expressão gênica global. Após a construção, esta matriz foi analisada para verificar a variação nos valores de expressão entre as amostras. Como podemos observar na Figura 10A, a expressão gênica foi variável, sendo necessária a normalização dos valores de expressão global antes da construção da rede de co-expressão (Figura 10B).

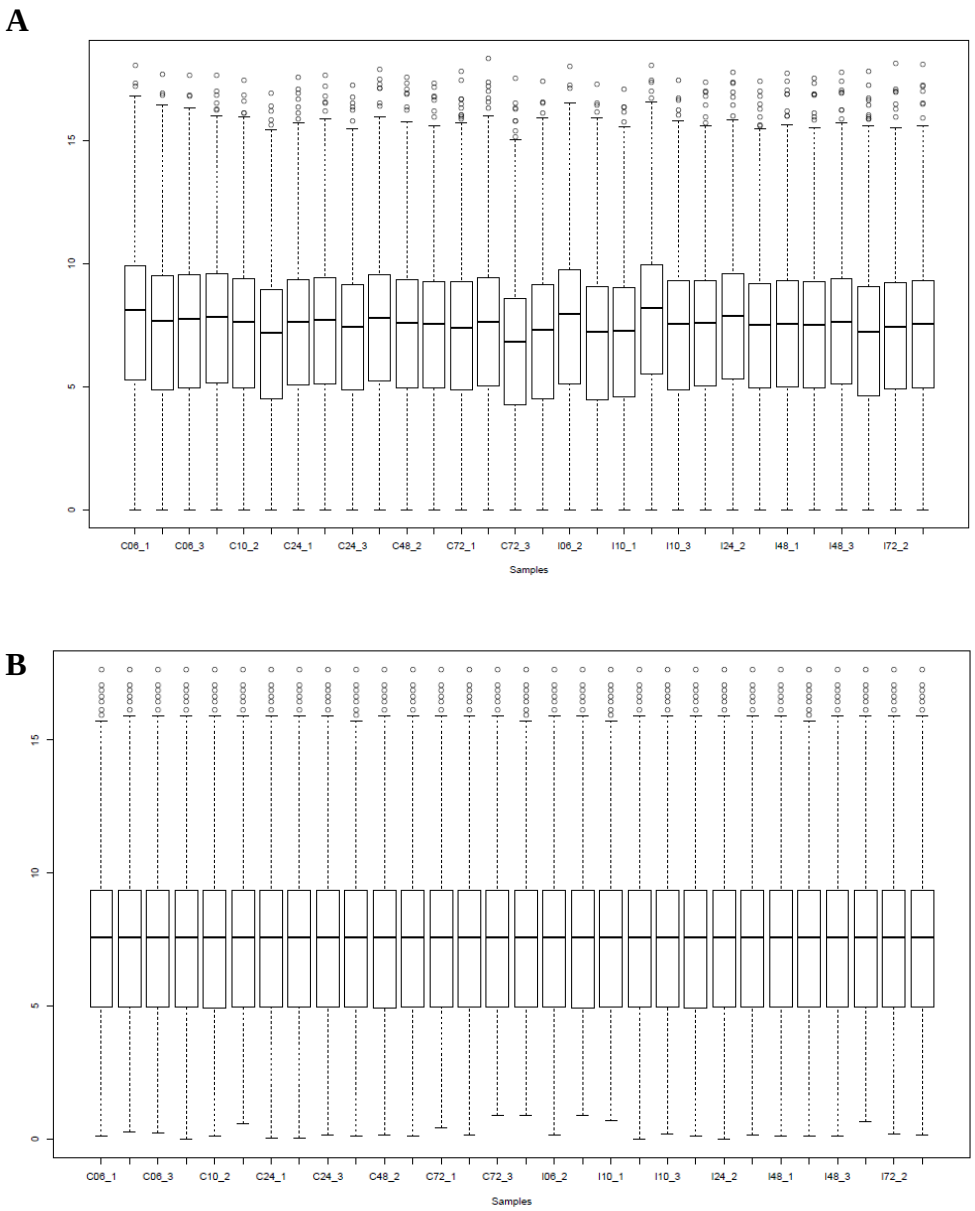

Figura 10 – Valores de expressão gênica global das amostras Controle e Infectado de células THP-1 infectadas com *Leishmania infantum*. **(A)** Valores de expressão não normalizados. **(B)** Valores de expressão normalizados.

5.5 Análise das redes de co-expressão gênicas geradas pelo software WGCNA

A matriz de expressão gênica normalizada foi utilizado para a análise de clusterização hierárquica das amostras para a detecção daquelas que poderiam apresentar valores de expressão discrepantes (*outliers*). Como podemos verificar na Figura 11, as amostras foram agrupadas em dois grandes grupos: um deles compostos por amostras dos grupos 6 h e 10 h e o outro composto por amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h. Porém nenhum dos dois grupo apresentaram amostras com valores de expressão discrepantes.

Com base nesse agrupamento hieráquico definiu-se a estratégia para construção e análise de duas redes de co-expressão. A primeira delas foi composta pelas amostras dos grupos 6 h e 10 h, a segunda pelas amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h. Após a obtenção das redes, estas foram submetidas às análises de seleção dos módulos correlacionados às amostras Controles e Infectadas. Os genes dos módulos altamente associados às amostras foram analisados por meio de enriquecimento funcional, como também foi possível identificar os genes *HGS-hubs*.

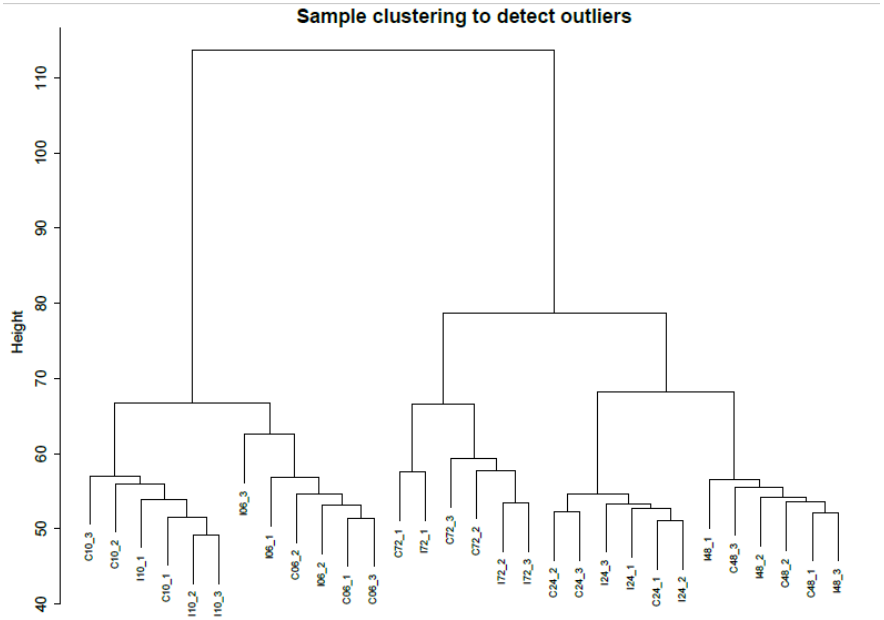

Figura 11 – Agrupamento hierárquico das amostras Controle e Infectado para detecção de valores de expressão gênica discrepantes.

5.5.1 Rede de co-expressão gênica das amostras dos grupos 6 h e 10 h

Uma vez verificada a ausência de amostras com valores de expressão discrepantes, os valores de expressão correspondentes às amostras dos grupos 6 h e 10 h foram utilizados para a obtenção da rede de co-expressão gênica. Após obtenção da matriz de correlação entre os genes, essa foi transformada em uma matriz de adjacência utilizando o valor de β = 10 (R^2 = 0.915), de acordo com o critério *scale free*, como podemos observar na Figura 12A. A Figura 12B, ilustra a média da conectividade entre os genes na rede de acordo com os diferentes valores de β.

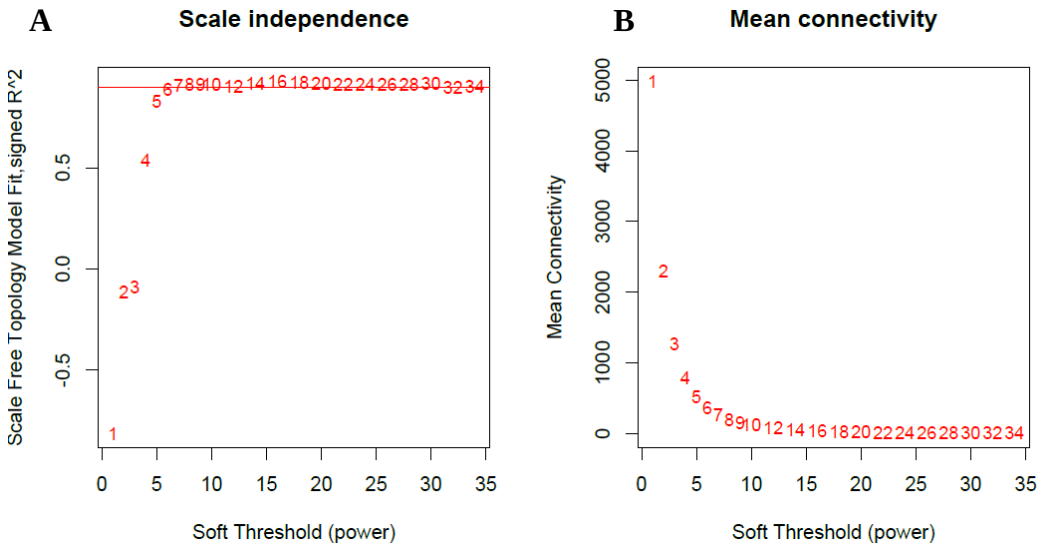

Figura 12 - Escolha do valor de β baseado no critério de rede *scale free* para a construção da rede de co-expressão das amostras dos grupos 6 h e 10 h. **(A)** Curva de variação topológica da rede *scale free* para diferentes valores de β. **(B)** Média da conectividade em função do valor de β. A linha vermelha indica o valor de corte (R^2 = 0.9).

Após a determinação do valor de β, a matriz de sobreposição topológica (TOM) foi obtida, resultando no dendrograma dos genes co-expressos, após a adoção dos critérios de tamanho mínimo do módulo = 100 e limiar de corte dos ramos =

0,23. Com base nesses critérios, os genes foram agrupados em 22 módulos, identificados por diferentes cores, como podemos observar na Figura 13.

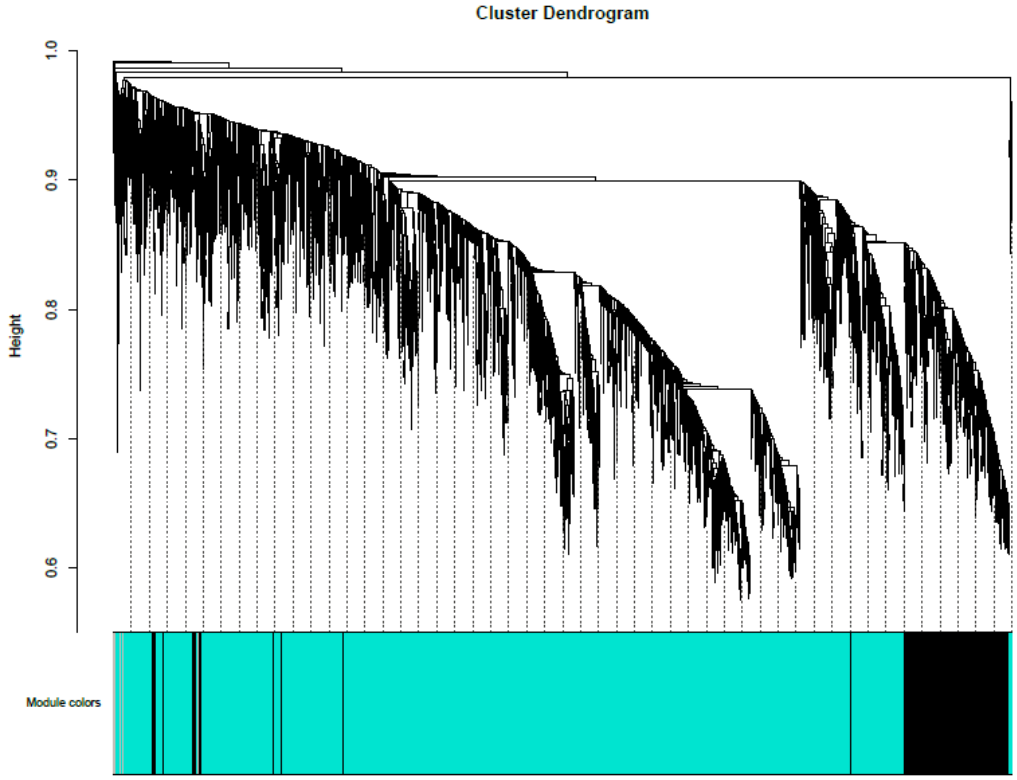

Figura 13 - Dendrograma dos genes e módulos relacionados à rede de co-expressão das amostras dos grupos 6 h e 10 h.

O dendrograma dos genes co-expressos apresentou predomínio da cor *Turquoise* já que esse foi o módulo que apresentou o maior número de genes (4843). Já o módulo *Darkred* foi o menor, apresentando 137 genes. Os genes incluídos no módulo *Grey* foram aqueles que não se agruparam em nenhum outro. As cores dos módulos e seus respectivos números de genes estão listados na Tabela 5.

Tabela 5 – Módulos da rede de co-expressão das amostras dos grupos 6 h e 10 h e seus respectivos números de genes.

Módulo	Número de genes
Grey 60	178
Red	655
Cyan	244
Lightyellow	147
Midnightblue	233
Black	640
Lightgreen	167
Salmon	301
Purple	381
Tan	356
Turquoise	4843
Greenyellow	375
Magenta	498
Lightcyan	217
Blue	1416
Royalbue	146
Darkred	137
Green	1031
Yellow	1071
Brown	1240
Pink	520
Grey	987

5.5.1.1 Módulos correlacionados às amostras dos grupos 6 h e 10 h

Após a determinação dos módulos de co-expressão, esses foram correlacionados às amostras Controle e Infectado dos grupos 6 h e 10 h. Dentre os 22 módulos obtidos na rede de co-expressão, foram selecionados até dois módulos para

as análises posteriores, um com correlação positiva e um com correlação negativa, levando em consideração o valor da média absoluta de *GS* (significância do módulo) e o valor de $p < 0,05$. Quando um mesmo módulo apresentou correlação com duas amostras, optamos pela escolha do módulo que apresentou maior valor de correlação.

A correlação dos módulos com as amostras dos grupos 6 h e 10 h pode ser visualizada no gráfico *Heatmap* (Figura 14), no qual cada linha corresponde a um módulo e cada coluna corresponde a uma amostra. A intensidade da cor no gráfico indica o valor da correlação, que varia de 1 a -1, de acordo com a barra de cor situada do lado direito. Além da cor, podem-se observar os valores de correlação correspondentes a cada módulo, como também o valor de p (entre parênteses) calculado pelo t-teste. Podemos observar na Figura 14 que os módulos que apresentaram maior valor de significância do módulo, quando correlacionados à amostra C06 foram o *Salmon* (*GS* = -0,63; p = 0,03) e o *Brown* (*GS* = 0,79; p = 0,002). Já os módulos *Blue* (*GS* = -0,78; p = 0,003) e *Black* (*GS* = 0,81; p = 0,001) foram os que apresentaram maior média de *GS* após correlação com a amostra I06. Dentre os módulos correlacionados com a amostra C10 foram selecionados os módulos *Lightyellow* (*GS* = -0,79; p = 0,002) e *Tan* (*GS* = 0,62; p = 0,03). Já o módulo *Magenta* (GS = 0,67; p = 0,02) foi o único selecionado na correlação dos módulos com a amostra I10.

Além da correlação, o gráfico *Heatmap* pode ser utilizado para observarmos o padrão de expressão dos genes contidos nos módulos. A média dos valores de *GS* dos genes de cada módulo pode indicar também o padrão de expressão do módulo para um determinado período. Desta forma, a cor vermelha indica que a média da expressão dos genes do módulo está aumentada (hiper-expresso) em comparação aos outros módulos, enquanto a cor verde indica que a média da expressão dos genes do módulo está diminuída (hipo-expresso). Assim, ao compararmos as amostras não infectadas (C06, C10) com as amostras infectadas (I06, I10) podemos observar uma mudança no perfil de expressão dos genes, como no módulo *Salmon*, que apresenta o módulo hipo-expresso no grupo C06 em relação ao grupo I06.

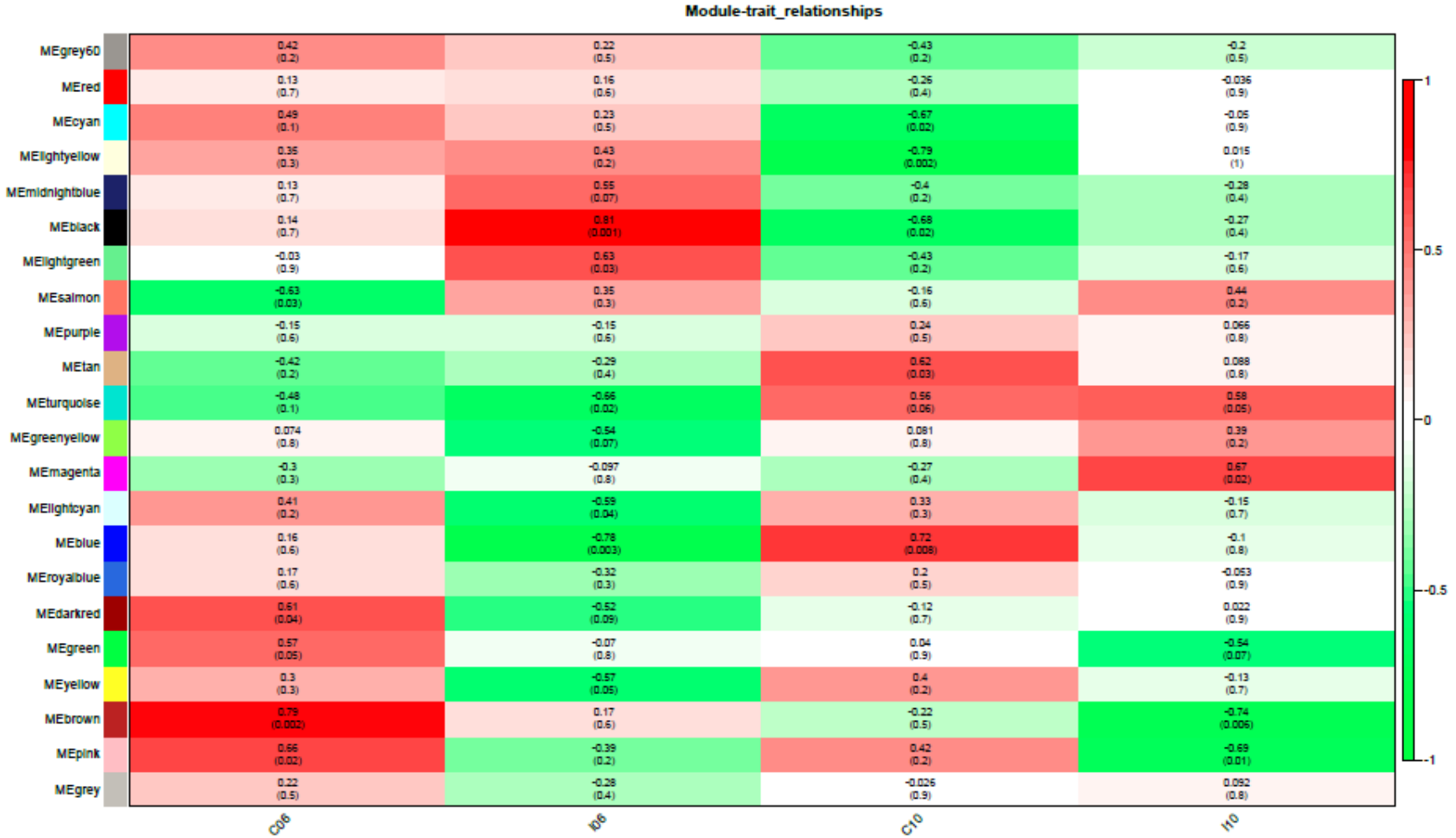

Figura 14 - Gráfico *Heatmap* das correlações entre os módulos e as amostras pertencentes aos grupos 6 h e 10 h. O valor entre parênteses indica o valor de p. A barra à direita indica o valor da correlação. C = Controle; I = Infectado.

5.5.1.2 Enriquecimento funcional dos módulos selecionados

Uma vez selecionados os módulos altamente correlacionados às amostras dos grupos 6 h e 10 h, os genes contidos em cada módulo foram submetidos ao enriquecimento funcional para verificar as vias biológicas (baseado no banco de dados KEGG, $p < 0,05$) relacionadas a elas. As Figuras abaixo apresentam um resumo das vias selecionadas e o número de genes pertencentes a essas vias. A listagem completa com as vias e os respectivos genes estão apresentadas no Anexo A.

Como podemos verificar na Figura 15, o módulo *Salmon* possui genes pertencentes às vias biológicas relacionadas com: o metabolismo de purinas (7) e pirimidinas (5), ribossomo (7) e RNA polimerase (3). Já o módulo *Brown* possui genes relacionados à biogênese de ribossomos (13), a exportação de proteínas (5) e a síntese de N-glicanos (7).

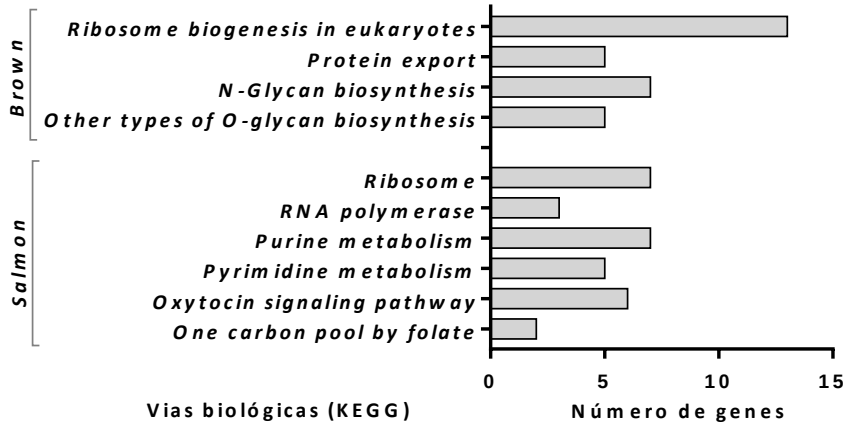

Figura 15 - Enriquecimento funcional dos genes contidos nos módulos *Brown* e *Salmon* associados à amostra C06.

A mesma análise foi realizada com os genes dos módulos *Black* e *Blue*, correlacionados com a amostra I06 (Figura 16). Dos genes presentes no módulo *Blue*, 15 pertencem a via de sinalização mTOR e 11 genes pertencem a via de

sinalização HIF (Fator Induzido por Hipóxia), enquanto a via de metabolismo de glutationa possui 8 genes. Muitas das vias relacionadas aos genes do módulo *Black* estão envolvidas na resposta imune, como a via de sinalização do receptor T (7), a via da fagocitose mediada pelo receptor *Fc gamma* (7) e a via de sinalização do receptor *Toll-like* (9). Além dessas vias, estão presentes também as vias envolvidas no metabolismo de lipídios, como a de ácidos graxos (5), de glicerofosfolipídios (7), de glicerolipídio (5) e a via de sinalização de PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) (7).

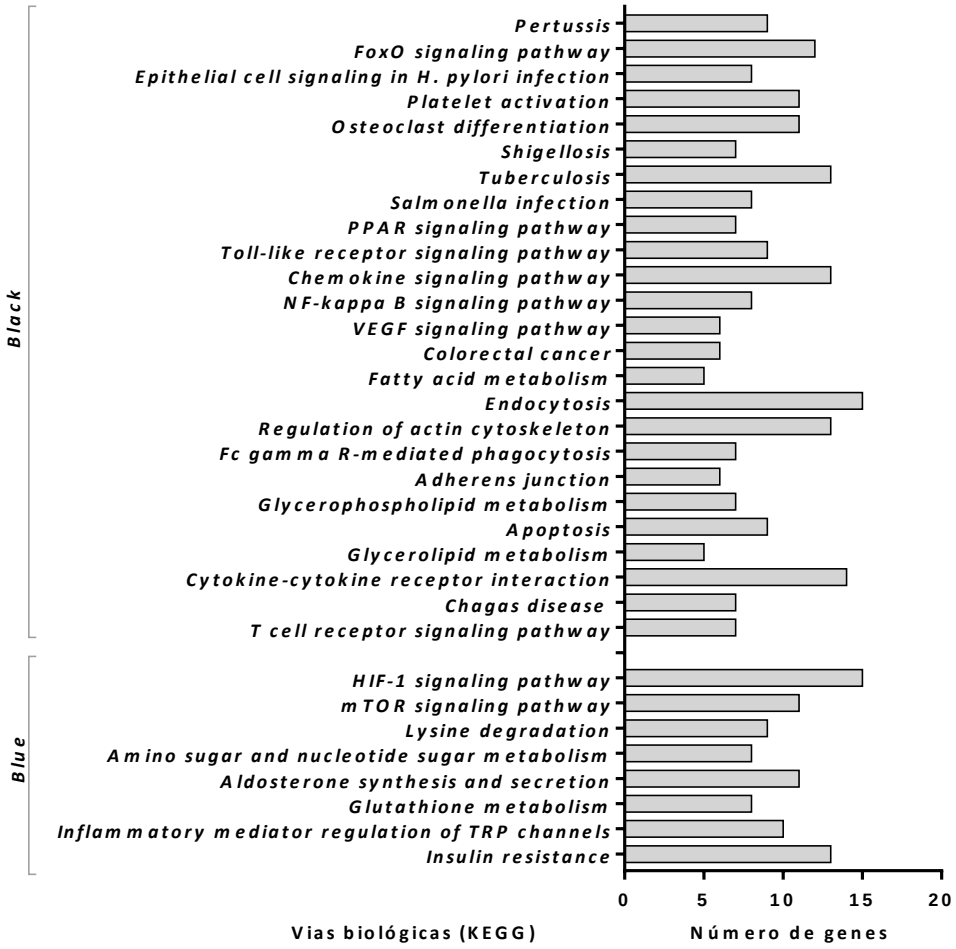

Figura 16 - Enriquecimento funcional dos genes contidos nos módulo *Black* e *Blue* associados à amostra I06.

A doença da Chagas e a reabsorção de cálcio regulada por fatores endócrinos foram as vias relacionadas com 3 e 2 genes, respectivamente, contidos no módulo

Lightyellow, correlacionado com a amostra C10. O módulo *Tan* também correlacionado com a amostra C10 apresentou genes relacionados com a via de sinalização Wnt (7), a da p53 (5), além da via de sinalização do glucagon (7) entre outras (Figura 17).

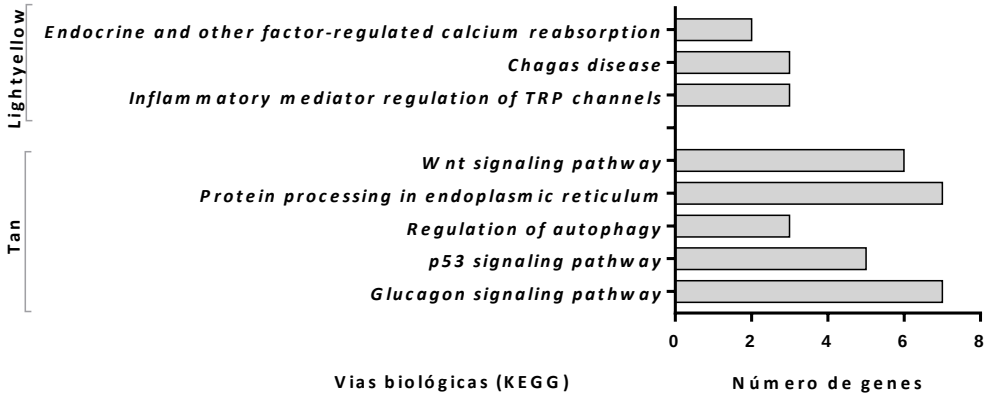

Figura 17 - Enriquecimento funcional dos genes contidos nos módulos *Lightyellow* e *Tan* associados à amostra C10.

Já o módulo *Magenta*, correlacionado com a amostra I10, apresentou 7 genes ligados à via de sinalização do fosfatidilinositol, como podemos verificar na Figura 18.

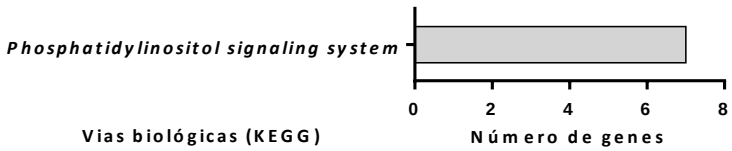

Figura 18 - Enriquecimento funcional dos genes contidos no módulo *Magenta* associado à amostra I10.

5.5.1.3 Análise dos genes *hub* de alto valor GS (*HGS-hub*)

Os genes *hub* foram selecionados para cada um dos módulos correlacionados com as amostras dos grupos 6 h e 10 h, de acordo com valores de *Genes significance* (*GS*) e *Modulo membership* (*MM*). Após a seleção, a expressão gênica dos genes *hub* foi avaliada em todos os períodos de infecção, comparando-se as amostras Controle e Infectado, sendo selecionados aqueles que apresentaram diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) em pelo menos um dos períodos de infecção. Tanto a lista contendo os genes *hub* selecionados para cada módulo quanto os gráficos daqueles que apresentaram diferença estatisticamente significante (*HGS-hub*) estão apresentados nos Anexo B e Anexo C, respectivamente.

Para os módulos *Brown* e *Salmon*, correlacionados com a amostra C06, foram selecionados 20 e 14 genes *hub*, respectivamente. Após a análise da expressão gênica verificou-se que 12 genes *hub* do módulo *Brown* apresentaram diferença estatisticamente significante ao compararmos as amostras Controle e Infectado: *MCOLN3*, *ARHGEF40*, *GUCY1A2*, *CRIP1*, *DIRAS1*, *SASH1*, *BRIX1*, *URB1*, *NSUN2*, *TNFRSF10B*, *ALDH1L2*, *SEC24D* (Figura 19A). Desses *hubs*, 5 apresentaram aumento na expressão gênica (*MCOLN3*, *ARHGEF40*, *GUCY1A2*, *CRIP1*, DIRAS1) e 7 apresentaram diminuição na expressão (*SASH1*, *BRIX1*, *URB1*, *NSUN2*, *TNFRSF10B*, *ALDH1L2*, *SEC24D*). Dentre os genes *hub* selecionados no módulo *Salmon*, apenas 3 apresentaram diferença estatisticamente significante: *EIF2B1*, *ELMO1*, *ATP6V0D2* (Figura 19B), dos quais 1 gene apresentou aumento na expressão nas células infectadas (*ATP6V0D2*) e 2 genes apresentaram diminuição na expressão (*EIF2B1*, *ELMO1*). Ao contabilizarmos o número de genes que apresentaram diferença estatisticamente significante em ambos os módulos, esse total foi de 15 genes e o termo *Gene Ontology* para processo biológico associado a eles estão descritos na Tabela 6.

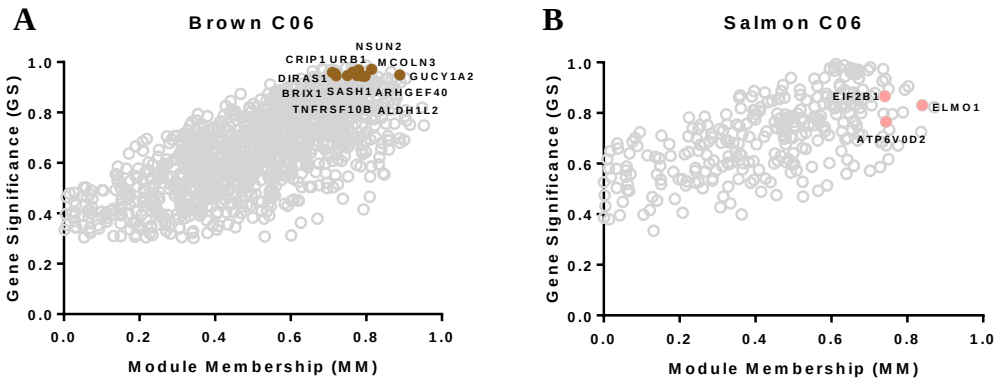

Figura 19 – Genes *hub* diferencialmente expressos nos módulos correlacionados com a amostra C06. **(A)** Módulo *Brown*. **(B)** Módulo *Salmon*.

Tabela 6 – Descrição dos genes *HGS-hub* pertencentes aos módulos *Brown* e *Salmon* correlacionados à amostra C06 e seus respectivos processos biológicos.

Amostra	Módulo	Gene	Expressão	Termo GO	Processo Biológico
C06	*Brown*	*MCOLN3*	↑	*Transmembrane transport*	*Other process*
	Brown	*ARHGEF40*	↑	*Positive regulation of GTPase activity*	*Other process*
	Brown	*GUCY1A2*	↑	*Positive regulation of cGMP biosynthetic process*	*Other process*
	Brown	*CRIP1*	↑	*Cellular response to UV-B*	*Other process*
	Brown	*DIRAS1*	↑	*Metabolic process*	*Other process*
	Brown	*SASH1*	↓	*Positive regulation of p38MAPK cascade*	*Immune response*

Continua

Tabela 6 – Descrição dos genes *HGS-hub* pertencentes aos módulos *Brown* e *Salmon* correlacionados à amostra C06 e seus respectivos processos biológicos.

Continuação

Amostra	Módulo	Gene	Expressão	Termo GO	Processo biológico
C06	*Brown*	*BRIX1*	↓	*Ribosomal large subunit assembly*	*mRNA binding*
	Brown	*URB1*	↓	*Maturation of 5.8S rRNA from tricistronic rRNA transcript*	*mRNA binding*
	Brown	*NSUN2*	↓	*tRNA methylation*	*mRNA binding*
	Brown	*TNFRSF10B*	↓	*Tumor necrosis factor-mediated signaling pathway*	*Other process*
	Brown	*ALDH1L2*	↓	*Folic acid metabolic process*	*Other process*
	Brown	*SEC24D*	↓	*ER to Golgi vesicle-mediated transport*	*Other process*
	Salmon	*ATP6V0D2*	↑	*Phagosome acidification*	*Immune response*
	Salmon	*EIF2B1*	↓	*Response to hexose*	*Other process*
	Salmon	*ELMO1*	↓	*Fc-gamma receptor signaling pathway involved in phagocytosis*	*Immune response*

↑ = Diminuição da expressão; ↓ = aumento da expressão; GO = *Gene Ontology*

Dos módulos *Black* e *Blue* correlacionados com a amostra I06 foram selecionados 20 genes *hub* de cada, dos quais 9 e 15 genes, respectivamente, apresentaram diferença estatística na expressão gênica, totalizando 24 genes. Os 9 genes *HGS-hub* do módulo *Black* apresentaram aumento na expressão gênica, sendo eles: *NUMB*, *RGCC*, *ITGB3*, *PIM1*, *NEDD9*, *RND3*, *CCL3L3*, *KLF6*, *EGR2*. Já dentre os 15 genes *HGS-hub* do módulo *Blue*, 9 genes apresentaram aumento na expressão (*NR1H3*, *PALLD*, *CD44*, *RALA*, *ATP6V1H*, *ATF3*, *RTN4RL2*, *BHLHE41*, *MGLL*), enquanto os outros 6 genes apresentaram diminuição na expressão (*GALNT1*, *DHCR7*, *NUP133*, *QSOX1*, *PPIE*, *PCYOX1L*). Tanto os genes *HGS-hub* diferencialmente expressos do módulo *Black* quanto os do módulo *Blue* estão ilustrados na Figura 20A e Figura 20B, respectivamente, assim como seus respectivos processos biológicos listados na Tabela 7.

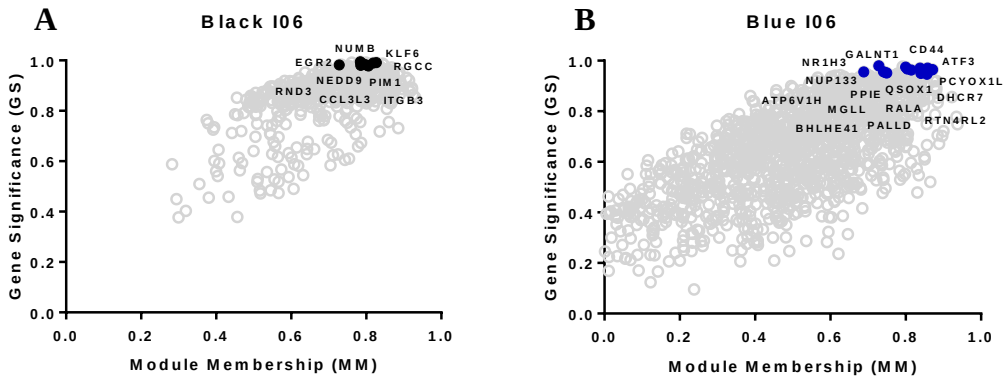

Figura 20 - Genes *hub* diferencialmente expressos nos módulos correlacionados com a amostra I06. **(A)** Módulo *Black*. **(B)** Módulo *Blue*.

Tabela 7 - Descrição dos genes *HGS-hub* pertencentes aos módulos *Black* e *Blue* correlacionados à amostra I06 e seus respectivos processos biológicos.

Amostra	Módulo	Gene	Expressão	Termo GO	Processo biológico
I06	*Black*	*NUMB*	↑	*Positive regulation of neurogenesis*	*Other process*
	Black	*RGCC*	↑	*Negative regulation of mitotic cell cycle*	*Regulation of mitotic cell cycle*
	Black	*ITG3B*	↑	*Negative regulation of lipid storage*	*Lipid metabolic process*
	Black	*PIM1*	↑	*Cytokine-mediated signaling pathway*	*Immune response*
	Black	*NEDD9*	↑	*Cytoskeleton reorganization*	*Actin cytoskeleton organization*
	Black	*RND3*	↑	*Cytoskeleton organization*	*Actin cytoskeleton organization*
	Black	*CCL3L3*	↑	*Cell chemotaxis*	*Immune response*
	Black	*KLF6*	↑	*Positive regulation of transcription*	*Regulation of transcription*
	Black	*EGR2*	↑	*Positive regulation of transcription*	*Regulation of transcription*
	Blue	*NR1H3*	↑	*Cholesterol homeostasis*	*Lipid metabolic process*
	Blue	*PALLD*	↑	*Cytoskeleton organization*	*Actin cytoskeleton organization*
	Blue	*CD44*	↑	*Phagocytosis*	*Immune response*

Continua

Tabela 7 - Descrição dos genes *HGS-hub* pertencentes aos módulos *Black* e *Blue* correlacionados à amostra I06 e seus respectivos processos biológicos.

Continuação

Amostra	Módulo	Gene	Expressão	Termo GO	Processo biológico
I06	*Blue*	*RALA*	↑	*Actin cytoskeleton reorganization*	*Actin cytoskeleton organization*
	Blue	*ATP6V1H*	↑	*Phagosome acidification*	*Immune response*
	Blue	*ATF3*	↑	*Positive regulation of transcription*	*Regulation of transcription*
	Blue	*RTN4RL2*	↑	*Axon regeneration*	*Other process*
	Blue	*BHLHE41*	↑	*Negative regulation of transcription*	*Lipid metabolic process*
	Blue	*MGLL*	↑	*Fatty acid biosynthetic process*	*Lipid metaolic process*
	Blue	*GALNT1*	↓	*Protein O-linked glycosylation*	*Other process*
	Blue	*DHCR7*	↓	*Cholesterol biosynthetic process*	*Lipid metabolic process*
	Blue	*NUP133*	↓	*mRNA export from nucleus*	*Other process*
	Blue	*QSOX1*	↓	*Platelet degranulation*	*Platelet degranulation*
	Blue	*PPIE*	↓	*Regulation of transcription*	*Regulation of transcription*
	Blue	*PCYOX1L*	↓	*Platelet degranulation*	*Platelet degranulation*

↓ = Diminuição da expressão; ↑ = aumento da expressão; GO = *Gene Ontology*

Dos dois módulos correlacionados a amostra C10, somente o módulo *Lightyellow* apresentou genes *hub* com diferença estatisticamente significante na expressão, como podemos observar na Figura 21A. Por isso o módulo *Tan* não está

representado. Dos 20 genes *hub* selecionados no módulo, somente 4 genes apresentaram expressão diferencial, sendo eles: *FRAT2*, *RAMP1*, *PCF11* e *HCP5*. Dos genes citados, o *FRAT2* e o *RAMP1* apresentaram aumento na expressão, enquanto os outros dois genes apresentaram diminuição na expressão. Já o módulo *Magenta*, correlacionado com a amostra I10, apresentou somente 2 genes *hub* diferencialmente expressos (*CCDC69*, *CFL1*) dos 14 marcadores selecionados, que apresentaram aumento na expressão gênica nas células infectadas (Figura 21B). Os processos biológicos relacionados aos genes *HGS-hub* associados com as amostras C10 e I10 podem ser observados na Tabela 8.

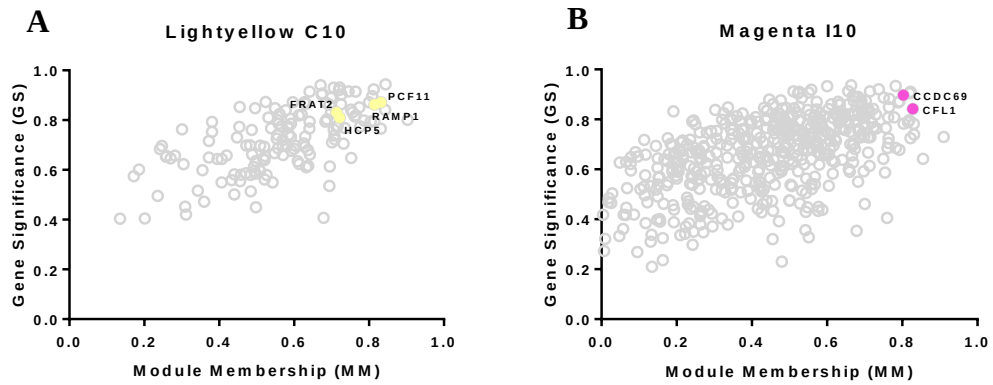

Figura 21 - Genes *hub* diferencialmente expressos nos módulos correlacionados às amostras C10 e I10. **(A)** Módulo *Lightyellow*. **(B)** Módulo *Magenta*.

Tabela 8 – Descrição dos genes *HGS-hub* pertencentes aos módulos *Black* e *Blue* correlacionados às amostras C10 e I10 e seus respectivos processos biológicos.

Amostra	Módulo	Gene	Expressão	Termo GO	Processo biológico
C10	*Lightyellow*	*RAMP1*	↑	*Positive regulation of cAMP biosynthetic process*	*Other process*
	Lightyellow	*FRAT2*	↑	*Wnt signaling pathway*	*Other process*
	Lightyellow	*PCF11*	↓	*mRNA cleavage*	*mRNA binding*
	Lightyellow	*HCP5*	↓	*Defense response*	*Immune response*
I10	*Magenta*	*CCDC69*	↑	*Spindle midzone*	*Other process*
	Magenta	*CFL1*	↑	*Actin cytoskeleton organization*	*Actin cytoskeleton organization*

↓ = Diminuição da expressão; ↑ = aumento da expressão; GO = *Gene Ontology*

5.5.2 Rede de co-expressão gênica das amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h

Com o término das análises da primeira rede de co-expressão, iniciou-se a análise da segunda rede composta pelas amostras dos grupos 24, 48 e 72 h, que foi gerada utilizando os parâmetros de $\beta = 10$ ($R^2 = 0.858$), de acordo com o critério *scale free*, como podemos observar na Figura 22A. A Figura 22B, ilustra a média da conectividade entre os genes na rede de acordo com os diferentes valores de β.

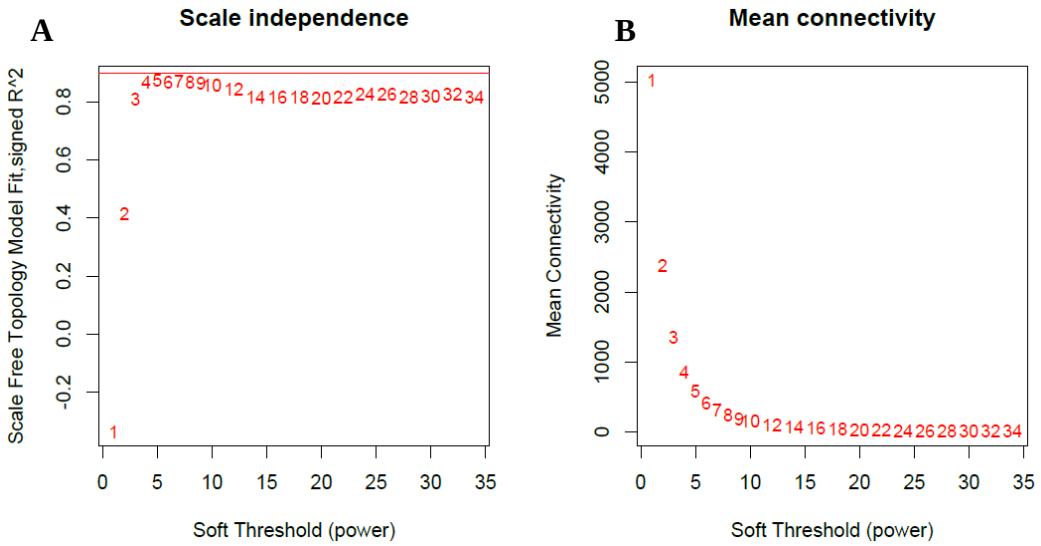

Figura 22 - Escolha do valor de β baseado no critério de rede *scale free* para a construção da rede de co-expressão das amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h. (A) Curva de variação topológica da rede *scale free* para diferentes valores de β. (B) Média da conectividade em função do valor de β. A linha vermelha indica a linha de corte ($R^2 = 0.9$).

Com a adoção dos critérios de tamanho mínimo do módulo = 80 e limiar do corte dos ramos = 0.25, a matriz de sobreposição topológica (*TOM*) foi obtida, resultando no dendrograma dos genes co-expressos. Os genes foram então agrupados em 14 módulos, aos quais foram atribuídos diferentes cores, como podemos observar na Figura 23. Os módulos gerados apresentaram tamanhos diferentes, dentre os quais o *Turquoise* foi o maior com 4136 genes e o *Salmon* foi o menor com 205 genes (Tabela 9).

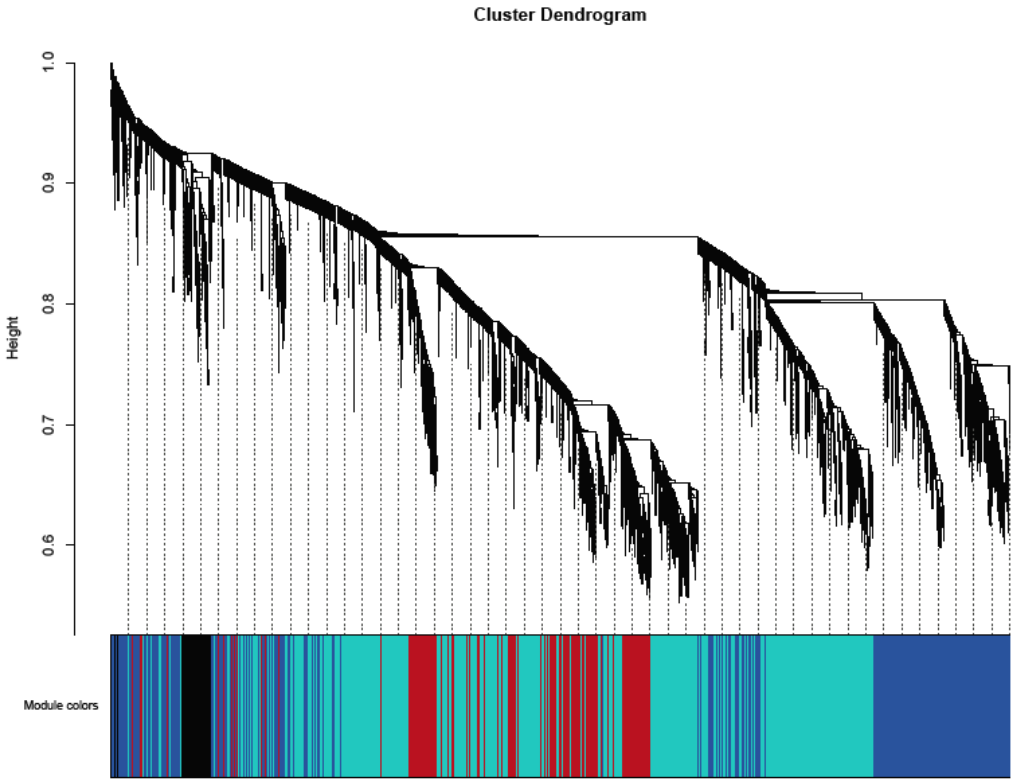

Figura 23 - Dendrograma dos genes e módulos relacionados à rede de co-expressão das amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Tabela 9 – Módulos da rede de co-expressão das amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h e seus respectivos números de genes.

Módulo	**Número de genes**
Pink	547
Tan	316
Black	597
Greenyellow	487
Brown	1951
Turquoise	4136
Blue	2202
Salmon	205
Red	602
Green	722
Magenta	509
Purple	503
Yellow	916
Grey	2103

5.5.2.1 Módulos correlacionados com as amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h

Após a obtenção dos módulos esses foram correlacionados com as amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h, de acordo com o valor médio absoluto de significância do gene (*GS*) e valor de $p < 0,05$. Como podemos verificar na Figura 24, o módulo *Red* apresentou correlação com a amostra C24, apresentando valor médio de *GS* = 0,6 e p = 0,009. Já a amostra I24 apresentou maior correlação com os módulos *Brown* (*GS* = 0,57 e p = 0,01) e *Magenta* (*GS* = 0,65 e p = 0,004). O módulo *Tan* apresentou alta correlação com o a amostra C48, com valor médio de *GS* = 0,58 e p = 0,01. Já para a amostra I48 foi o módulo *Green* que apresentou maior valor de significância (*GS* = 0,59 e p = 0,01). A amostra C72 está correlacionada com o módulo *Turquoise*, que apresentou valor médio de *GS* = 0,53 e p = 0,02. Já amostra I72 apresentou dois módulos correlacionados, com valores médios absolutos de *GS* = 0,61 e p = 0,007 para o módulo *Black* e *GS* = 0,65 e p = 0,003 para o módulo *Blue*.

Como mencionado nos resultados relacionados ao gráfico *Heatmap* correspondente à rede de co-expressão dos grupos 6 h e 10 h, esse gráfico pode ser utilizado para avaliarmos o padrão de expressão dos genes dentro dos módulos. De maneira geral, ao compararmos o padrão de expressão entre as amostras não infectadas e infectadas de um mesmo grupo, podemos observar que há pouca variação na expressão dos genes contidos nos módulos nos períodos de infecção a partir de 24 h (Figura 24).

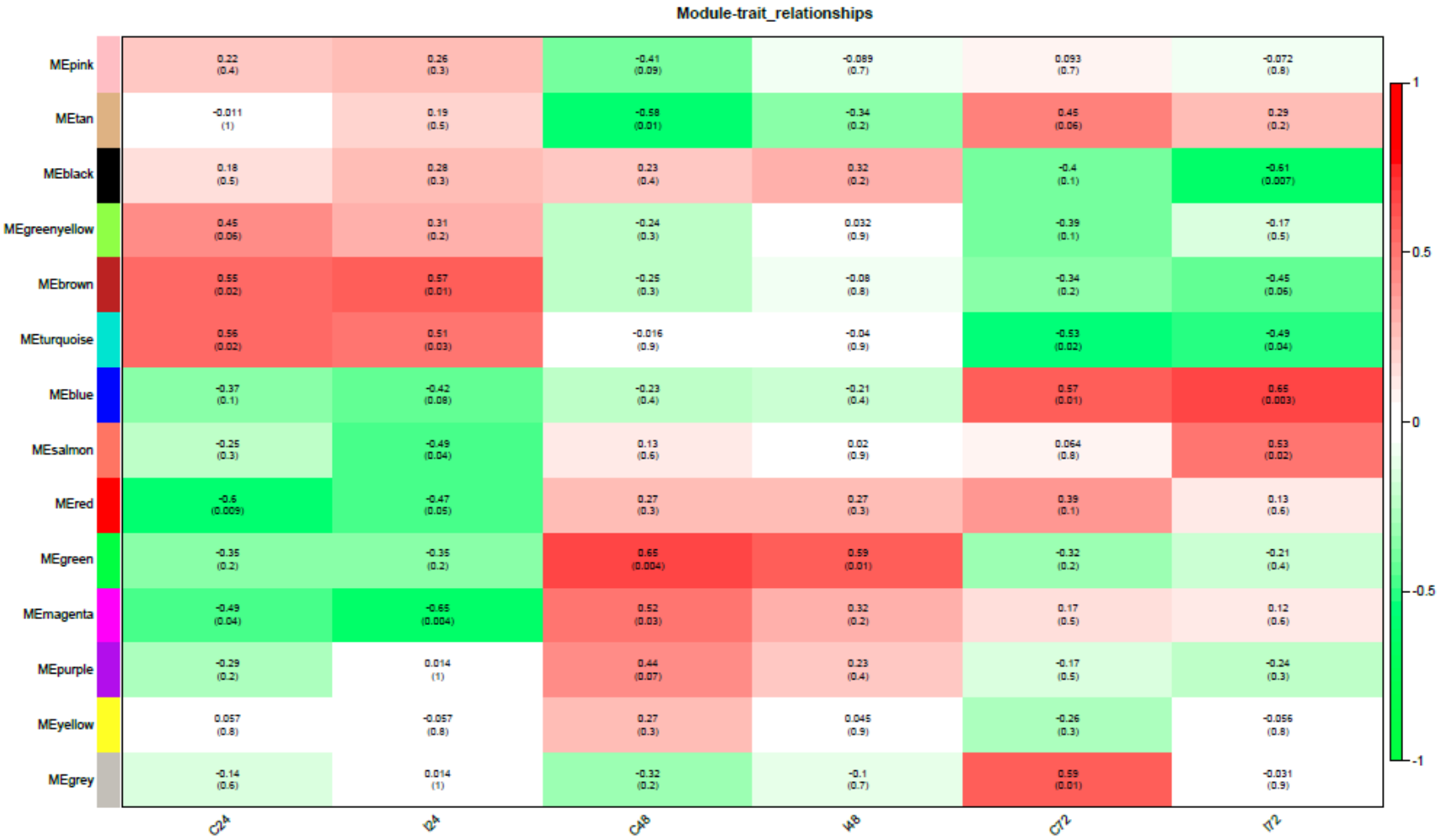

Figura 24 - Gráfico *Heatmap* das correlações entre os módulos e as amostras pertencentes aos grupos 24 h, 48 h e 72 h. O valor entre parênteses indica o valor de p. A barra à direita indica o valor da correlação. C=Controle; I= Infectado.

5.5.2.2 Enriquecimento funcional dos módulos selecionados

Após a seleção dos módulos altamente correlacionados com as amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h, os genes pertencentes aos módulos foram submetidos ao enriquecimento funcional no banco de dados KEGG. Os termos que apresentaram valor de $p < 0,05$ no enriquecimento foram exemplificados nas figuras abaixo e a listagem completa está contida no Anexo D.

Como podemos observar na Figura 25, os genes do módulo *Red*, correlacionado com a amostra C24 estão envolvidos em diferentes vias biológicas, como a via do metabolismo de piruvato que apresentou 4 genes, a via de resistência à insulina e a do ciclo celular com 7 e 10 genes, respectivamente, entre outros.

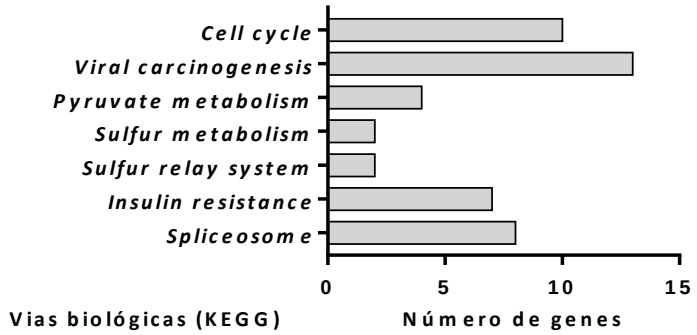

Figura 25 - Enriquecimento funcional dos genes contidos no módulo *Red* associado à amostra C24.

Já a amostra I24 apresentou altas correlações com o módulo *Brown*, como também com o *Magenta*. Dos genes contidos no módulo Brown, a via biológica de processamento e apresentação de antígenos apresentou 10 genes, enquanto 26 genes estavam presentes na via de apoptose. Já no módulo *Magenta* havia 5 genes da via biológica da legionelose e 2 genes da via de biossíntese da glicerofosfolipídios. As vias citadas para ambos os módulos podem ser observadas na Figura 26.

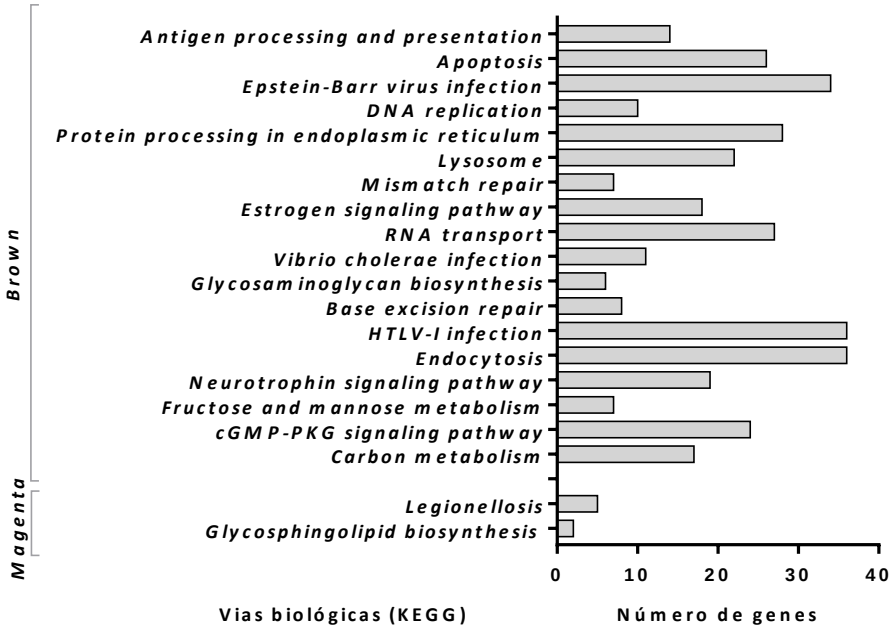

Figura 26 - Enriquecimento funcional dos genes contidos nos módulos *Brown* e *Magenta* associados à amostra I24.

A amostra C48 mostrou alta associação com o módulo *Tan*, que apresentou genes pertencentes às vias biológicas do spliceossomo (6), da via da sinalização da p53 (4) e da biossíntese de arginina (2) (Figura 27).

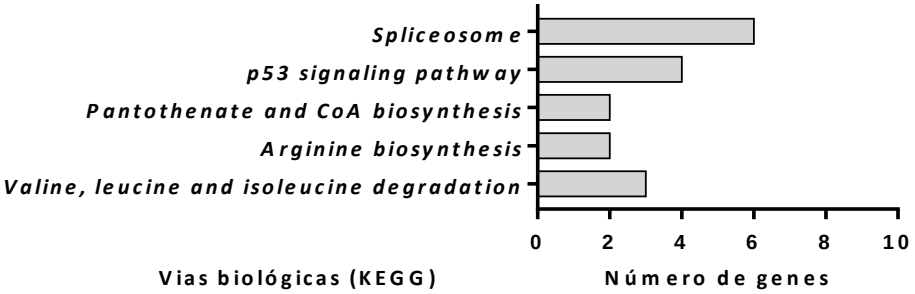

Figura 27 - Enriquecimento funcional dos genes contidos no módulo *Tan* associado à amostra C48.

O módulo *Green* foi correlacionado com a amostra I48 e continha genes que participam de diversas vias biológicas relacionadas às infecções, como a Influenza A (20), Hepatite C (12) e Herpes (18). Além disso, as vias de degradação do RNA e da sinalização do NF-kappa B, que apresentaram 8 genes cada, incluindo a do transporte do RNA com 11 genes, também foram observadas (Figura 28).

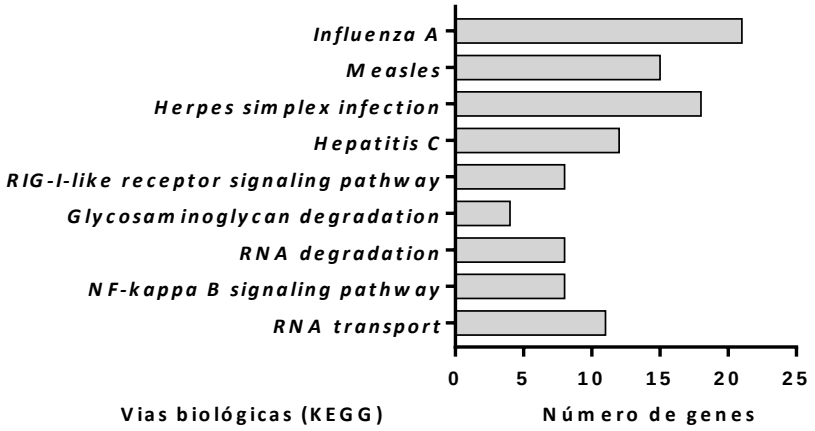

Figura 28 - Enriquecimento funcional dos genes contidos no módulo *Green* associados à amostra I48.

O módulo *Turquoise*, associado à amostra C72, apresentou 287 genes presentes na via de metabolismo, como também 59 e 11 genes pertencentes às vias de ciclo celular e elongação de ácidos graxos, respectivamente (Figura 29).

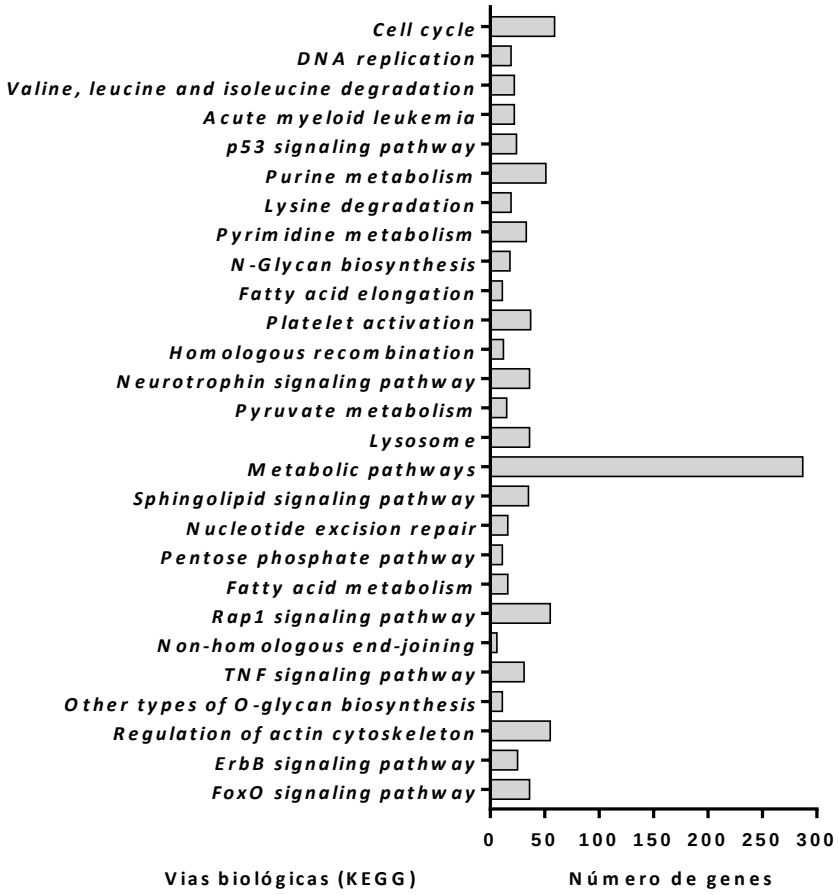

Figura 29 - Enriquecimento funcional dos genes contidos no módulo *Turquoise* associado à amostra C72.

Já a amostra I72 apresentou dois módulos com alta correlação, o *Black* e o *Blue*, que possuíam genes pertencentes a diferentes vias biológicas, como a via de sinalização de cAMP com 11 genes e a via de endocitose com 13 genes, ambas fazendo parte do módulo *Black*. Já as vias da endocitose, do processamento de proteínas no retículo endoplasmático e do fagossomo apresentaram 41, 27 e 24 genes, respectivamente no módulo *Blue*, como ilustra a Figura 30.

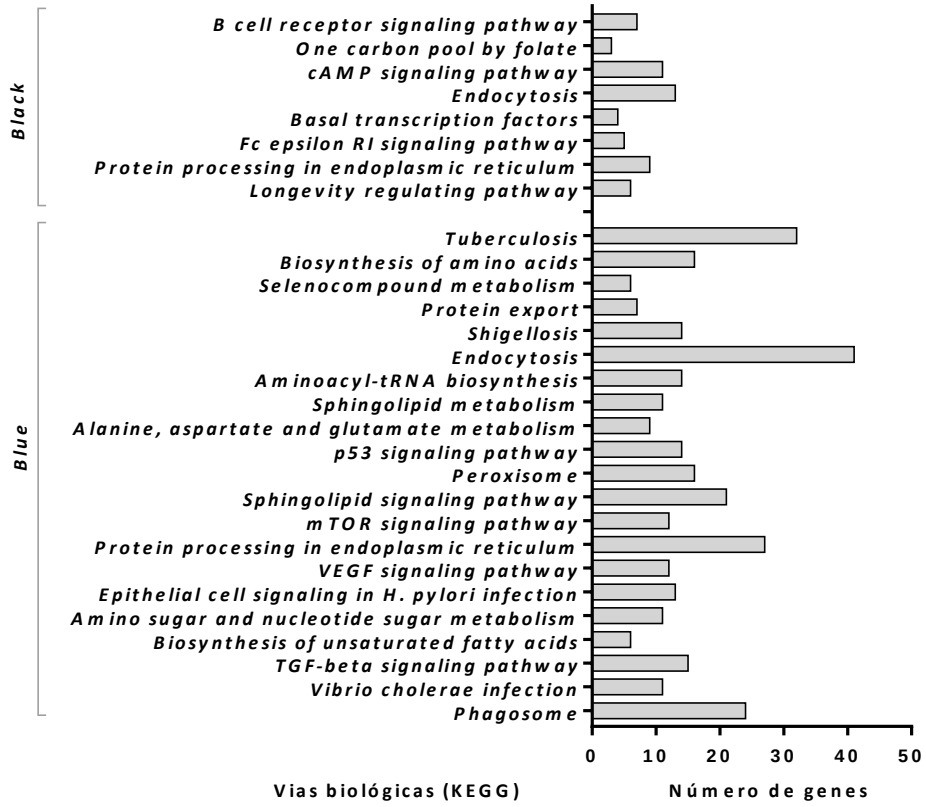

Figura 30 - Enriquecimento funcional dos genes contidos nos módulos *Black* e *Blue* associados à amostra I72.

5.5.2.3 Análise dos genes *hub*

Os genes *hub* também foram selecionados nos módulos correlacionados com as amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h, por meio dos maiores valores de *GS* e *MM*, que estão relacionados no Anexo E. Os gráficos correspondentes aos genes que apresentaram expressão estatisticamente significante (*HGS-hub*) estão ilustrados no Anexo F.

Do módulo *Red* foram selecionados 8 genes *hub*, dos quais 3 apresentaram expressão diferencial ao compararmos as amostras Controle e Infectado (Figura 31). Os genes *MARCKS*, *IL18BP* e *PTPRN2* apresentaram aumento na expressão e os processos biológicos nos quais estão envolvidos apresentam-se listados na Tabela 10.

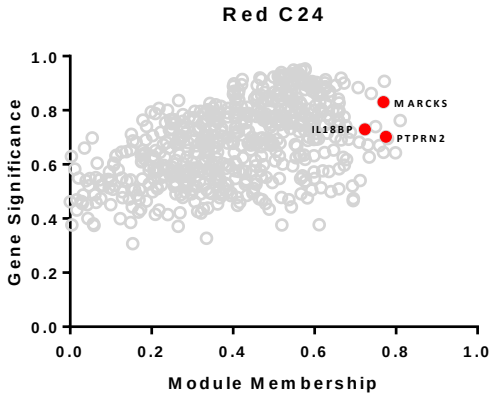

Figura 31 - Genes *hub* diferencialmente expressos no módulo *Red*, correlacionado com a amostra C24.

Tabela 10 – Descrição dos genes *HGS-hub* pertencentes ao módulo *Red* correlacionados à amostra C24 e seus respectivos processos biológicos.

Amostra	Módulo	Gene	Expressão	Termo GO	Processo biológico
C24	*Red*	*MARCKS*	↑	*Energy reserve metabolic process*	*Other process*
	Red	*IL18BP*	↑	*T-helper 1 type immune response*	*Immune response*
	Red	*PTPRN2*	↑	*Protein dephosphorylation*	*Other process*

↓ = Diminuição da expressão; ↑ = aumento da expressão; GO = *Gene Ontology*

Para os módulos *Brown* e *Magenta*, correlacionados com a amostra I24, foram selecionados 17 e 20 genes *hub*, respectivamente. Desses genes, 11 apresentaram diferença estatisticamente significante, dos quais 4 genes apresentaram expressão diferencial no módulo *Brown* (*ACO2*, *ALAS1*, *SLC9A3R1*, *USP34*) (Figura 32A) e 6 genes no módulo *Magenta* (*STAC2*, *THBD*, *CD93*, *CADM2*, *MMP2*, *FBN2*) (Figura 32B). Dos 4 genes *hub* com expressão diferencial do módulo *Brown*, 3 apresentaram aumento na expressão: *ACO2*, *ALAS1*, *SLC9A3R1* e 1 apresentou diminuição na expressão: *USP34*. Já dos genes *HGS-hub* do módulo *Magenta*, 7 apresentaram diminuição da expressão: *THBD*, *CD93*, *CADM2*, *MMP2*, *FBN2* e

somente 1 apresentou aumento: *STAC2*. Os genes *hub* com expressão diferencial em ambos os módulos e os processos biológicos associados a eles estão listados na Tabela 11.

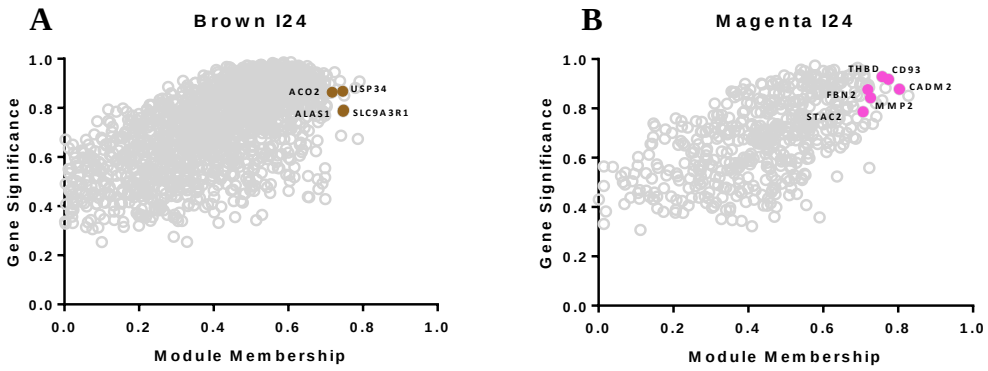

Figura 32 - Genes *hub* diferencialmente expressos nos módulos correlacionados à amostra I24. **(A)** Módulo *Brown*. **(B)** Módulo *Magenta*.

Tabela 11 – Descrição dos genes *HGS-hub* pertencentes aos módulos *Brown* e *Magenta* correlacionados à amostra I24 e seus respectivos processos biológicos.

Amostra	Módulo	Gene	Expressão	Termo GO	Processo biológico
I24	*Brown*	*ACO2*	↑	*Tricarboxylic acid cycle*	*Other process*
	Brown	*ALAS1*	↑	*Cellular lipid metabolic process*	*Lipid metabolic process*
	Brown	*SLC9A3R1*	↑	*Negative regulation of mitotic cell cycle*	*Regulation of mitotic cell cycle*
	Brown	*USP34*	↓	*Wnt signaling pathway*	*Other process*

Continua

Tabela 11 – Descrição dos *HGS-hub* pertencentes ao módulo *Brown* e *Magenta* correlacionados à amostra I24 e seus respectivos processos biológicos.
Continuação

Amostra	Módulo	Gene	Expressão	Termo GO	Processo biológico
I24	*Magenta*	*STAC2*	↑	*Positive regulation of protein localization to plasma membrane*	*Other process*
	Magenta	*CADM2*	↓	*Cell adhesion*	*Other process*
	Magenta	*THBD*	↓	*Negative regulation of fibrinolysis*	*Other process*
	Magenta	*CD93*	↓	*Positive regulation of defense response to virus by host*	*Immune response*
	Magenta	*MMP2*	↓	*Positive regulation of innate immune response*	*Immune response*
	Magenta	*FBN2*	↓	*Regulation of cellular response to growth factor stimulus*	*Other process*

↓ = Diminuição da expressão; ↑ = aumento da expressão; GO = *Gene Ontology*

Os módulos *Tan* e *Green* correlacionados com as amostras C48 e I48, respectivamente, não apresentaram valores de *GS* e *MM* maiores do que 0,7 e por isso não tiveram genes *hub* selecionados.

Do módulo *Turquoise* foram selecionados 20 genes *hub*, porém nenhum apresentou diferença estatisticamente significante. O mesmo ocorreu com o módulo *Black*, correlacionado com a amostra I72. Somente os genes *hub* do módulo *Blue*, também correlacionado com a amostra I72, apresentaram diferença na expressão. Dos 20 genes selecionados, 6 apresentaram expressão diferencial, dos quais 2

apresentaram aumento na expressão gênica nas células infectadas (*MAPK13*, *UGDH*) e 4 apresentaram diminuição na expressão (*SLA*, *TNFRSF21*, *NMD3*, *ALOX5*) (Figura 33). Os processos biológicos e os respectivos genes diferencialmente expressos no módulo *Blue* estão listados na Tabela 12.

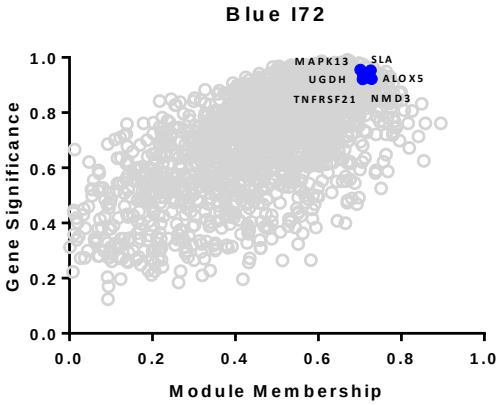

Figura 33 - Genes *hub* diferencialmente expressos no módulo *Blue* correlacionado com a amostra I72.

Tabela 12 – Descrição dos *HGS-hub* pertencentes ao módulo *Blue* correlacionado à amostra I72 e seus respectivos processos biológicos.

Amostra	Módulo	Gene	Expressão	Termo GO	Processo biológico
I72	*Blue*	*MAPK13*	↑	*Positive regulation of inflammatory response*	*Immune response*
	Blue	*UGDH*	↑	*UDP-glucuronate biosynthetic process*	*Other process*
	Blue	*SLA*	↓	*Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway*	*Immune response*
	Blue	*TNFRSF21*	↓	*Tumor necrosis factor-mediated signaling pathway*	*Immune response*
	Blue	*NMD3*	↓	*Ribosomal large subunit export from nucleus*	*Other process*
	Blue	*ALOX5*	↓	*Leukotriene biosynthetic process*	*Immune response*

↓ = Diminuição da expressão; ↑ = aumento da expressão; GO = *Gene Ontology*

5.6 Análise global dos processos biológicos associados aos genes *hub* diferencialmente expressos

De acordo com os resultados demostrados acima, os genes *HGS-hub* apresentaram associação com diferentes processos biológicos, sendo necessária uma análise global para facilitar a identificação de possíveis vias biológicas das quais fazem parte. Para isso, os genes foram separados de acordo com o tipo de amostra

(Controle e Infectado) e agrupados conforme a função molecular ou processos biológicos nos quais estão envolvidos.

Os genes *HGS-hub* pertencentes às amostras Controle dos grupos 6 h, 10 h e 24 h, pertencentes às duas redes de co-expressão totalizaram 22 genes (Figura 34), sendo 9 genes divididos em dois processos biológicos e os demais participando de outras funções. Dos 9 genes divididos em dois processos, 4 estão associados à ligação ao mRNA (*PCF11*, *BRIX1*, *URB1*, *NSUN2*) e 5 estão relacionados à resposta imune (*ATP6V0D2*, *SASH1*, *ELMO1*, *IL18BP*, *HCP5*). Os outros 13 genes (*MCOLN3*, *ARHGEF40*, *CRIP1*, *PTPRN2*, *SEC24D*, *EIF2B1*, *FRAT2*, *MARCKS*, *DIRAS1*, *ALDH1L2*, *RAMP1*, *GUCY1A2*, *TNFRSF10B*) pertencem a outros processos, como transporte via transmembrana, via de sinalização Wnt, regulação da secreção de insulina, entre outros.

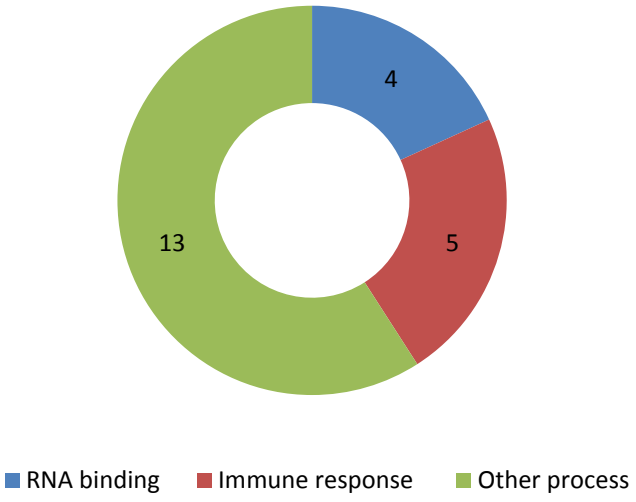

Figura 34 - Agrupamento dos genes diferencialmente expressos das amostras controle dos grupos 6 h, 10 h e 24 h de acordo com os processos biológicos associados a eles.

Já as amostras Infectadas das duas redes de co-expressão analisadas tiveram genes diferencialmente expressos nos grupos 6 h, 10 h, 24 h e 72 h, totalizando 42 genes, que foram agrupados em sete processos biológicos, como podemos observar na Figura 35. Os processos de degranulação de plaquetas e de regulação do ciclo celular mitótico tiveram 2 genes participantes em cada, sendo eles: *PCYOX1L*,

QSOX1 e *SLC9A3R1*, *RGCC*, respectivamente. Quatro genes fazem parte do processo de regulação da transcrição (*ATF3*, *KLF6*, *EGR2*, *PPIE*) e 5 da organização do citoesqueleto (*NEDD9*, *RND3*, *RALA*, *PALLD*, *CFL1*). A resposta imune foi o processo que apresentou o maior número de genes (10), sendo eles: *CCL3L3*, *CD44*, *PIM1*, *ATP6V1H*, *MMP2*, *CD93*, *MAPK13*, *SLA*, *TNFRSF21*, *ALOX5*. Já o metabolismo de lipídios apresentou 6 genes (*ALAS1*, *BHLHE41*, *ITGB3*, *MGLL*, *NR1H3*, *DHCR7*). Os demais genes (*ACO2*, *STAC2*, *GALNT1*, *USP34*, *NUMB*, *UGDH*, *CADM2*, *FBN2*, *THBD*, *CCDC69*, *NMD3*, *NUP133*, *RTN4RL2*) não se agruparam em nenhum dos processos biológicos citados acima, sendo incluídos em outros processos biológicos.

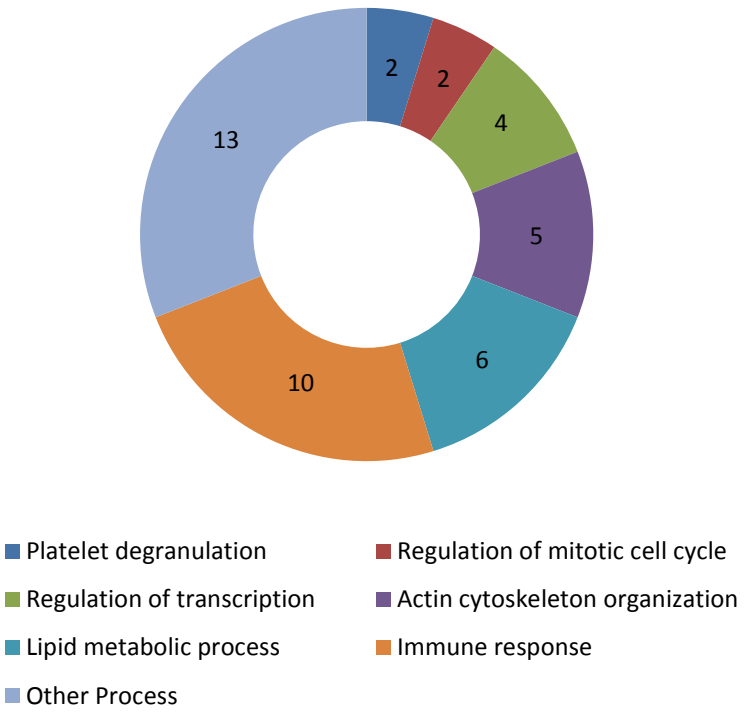

Figura 35 - Agrupamento dos genes diferencialmente expressos das amostras infectadas dos grupos 6 h, 10 h, 24 h e 72 h de acordo com os processos biológicos associados a eles.

6 DISCUSSÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por parasitos de diferentes espécies do gênero *Leishmania*, sendo a leishmaniose visceral a causa de grande morbidade e mortalidade, principalmente, em países em desenvolvimento como o Brasil [133]. Apesar dos inúmeros estudos focados na participação dos sistemas imunes inato e adaptativo na proteção ou desenvolvimento da doença [134, 135, 136], pouco se conhece das alterações que ocorrem na célula hospedeira no início da infecção. Ao mesmo tempo em que as células suscitam respostas que levam à eliminação do parasito, esse pode induzir alterações nos processos celulares para sua evasão, sobrevivência e proliferação. Para o entendimento desses processos, propomos identificar as vias biológicas moduladas na infecção de células THP-1 infectadas por *Leishmania infantum*.

No estudo das leishmanioses, células de linhagens macrofágicas são comumente utilizadas nas infecções *in vitro*, já que estas são as células hospedeiras que permitem o estabelecimento da infecção e a multiplicação das amastigotas [137, 138]. Dentre essas linhagens, a linhagem monocítica humana THP-1 vem sendo utilizada como célula hospedeira para diversas espécies de leishmânias em trabalhos com diferentes abordagens, que possibilitaram o estudo dos vários aspectos envolvidos não só no estabelecimento da infecção como também na descoberta de novas drogas para o tratamento da doença [139, 140, 141]. As células THP-1 foram utilizadas como hospedeiras neste trabalho e incubadas por 6, 10, 24, 48 e 72 h para verificarmos a cinética na mudança do perfil de expressão gênica das células com o intuito de correlacioná-las ao parasitismo, desde a fase inicial da infecção (6 a 10 h) até o estabelecimento e a manutenção da mesma (24 a 72 h). No parasitismo das células THP-1 infectadas por *Leishmania infantum* (Figura 8) foi possível verificar o aumento do número de amastigotas nas primeiras 24 horas de incubação, indicando o estabelecimento da infecção.

Para verificar as alterações causadas pelo parasito na célula hospedeira, o estudo do perfil da expressão gênica de células infectadas por *Leishmania* vem sendo realizado por diversos grupos de pesquisa [98, 99, 111]. Das técnicas adotadas para a determinação do perfil de expressão gênica, o sequenciamento de RNA vem

substituindo a técnica de microarranjos de DNA e dentre as plataformas de Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing* = NGS) disponíveis no mercado atualmente, a plataforma *Illumina* é uma das mais utilizadas [94, 96, 142].

No Sequenciamento de Nova Geração, uma das variáveis que pode afetar o resultado na análise de dados é a profundidade do sequenciamento, que pode variar de acordo com o objetivo do estudo e seu custo, já que uma maior profundidade no sequenciamento gera um custo maior. No entanto, não há um consenso no número de sequências necessárias para os estudos do perfil de expressão gênica ou de expressão diferencial de genes, podendo variar entre 5 a 100 milhões de sequências alinhadas. Um número maior de sequências facilitaria a identificação de genes com baixa expressão gênica, enquanto um número menor seria suficiente para a identificação de genes com média e alta expressão. Estudos apontam ainda a importância do número de replicatas para obtenção de resultados com diferenças estatisticamente significantes, sendo a triplicata o número mínimo de replicatas aconselhável [105, 106, 107]. Nesse estudo, como abordagem inicial, foi realizado o sequenciamento das amostras que atingiu baixa profundidade, sendo geradas de 10 a 23 milhões de sequências brutas, dependendo da amostra (Tabela 4). Essa quantidade de sequências pode ser considerada baixa para determinados tipos de análise, mas foi o suficiente para a identificação dos genes marcadores com altos e médios níveis de expressão. Entretanto, a baixa profundidade no sequenciamento teve como consequência a exclusão de genes como o da arginase (*ARG1*) e do IGF-I (*IGF1*), que apresentam importante papel na patogenia da leishmaniose cutânea [143, 144, 145], limitando a investigação da participação dos mesmos no modelo experimental adotado.

Uma vez que a entrada do parasito na célula, como também o seu estabelecimento e multiplicação envolvem diferentes mecanismos celulares, uma análise de dados que fosse capaz de considerar esse dinamismo seria a mais indicada. Para isso, o programa *WGCNA* foi adotado já que esse utiliza abordagem da Biologia de Sistemas para descrever os padrões de correlação entre os genes, permitindo a identificação de genes marcadores ou vias biológicas associadas a determinadas características ou doenças [119]. Por meio desse programa, foi possível

realizar o agrupamento de genes que apresentaram alta correlação entre si em módulos, com posterior correlação desses módulos com as amostras infectadas ou não por *Leishmania infantum* e seus respectivos períodos de incubação e determinar genes *HGS-hub* associados aos módulos altamente correlacionados com as amostras. Outros estudos também utilizaram esse *software* para investigar tanto as alterações transcricionais ocorridas no hospedeiro pela infecção por *Leishmania*, quanto as ocorridas durante o seu desenvolvimento no vetor [103, 110, 113].

No curso da infecção por *Leishmania in vitro*, as primeiras horas são as que apresentam uma maior mudança no padrão de expressão gênica da célula hospedeira (Figura 14) [98, 100, 101, 111, 112], já que há grande mobilização de diferentes elementos celulares, como os envolvidos no reconhecimento do parasito, no processo de fagocitose, formação do vacúolo parasitóforo e consequente rearranjo do citoesqueleto, além da resposta imunológica induzida contra ele [23, 146]. O enriquecimento funcional dos genes contidos nos módulos associados à amostra infectada por 6 h (I06) (Figura 16) reflete esse processo, uma vez que há predomínio de vias biológicas ligadas à resposta imune inata, como a do receptor *Toll-like*, a de sinalização das quimiocinas e a de sinalização da citocina-receptor de citocina, a de sinalização de mTOR [147] e de *HIF-1* [148], além das vias de regulação do citoesqueleto e da endocitose. Vale destacar ainda a presença de vias biológicas ligadas ao metabolismo de lipídios, como a do metabolismo de ácidos graxos, de glicerofosfolipídio e de glicerolipídio, como também a via de sinalização de *PPAR*, sugerindo uma modulação na expressão desses genes pela *Leishmania*, já que as células não infectadas não apresentam tais vias (Figura 15). Na análise transcriptômica de células murinas infetadas por *Leishmania major*, um perfil semelhante de vias biológicas foi encontrado após o enriquecimento funcional dos genes que apresentaram diferença na expressão gênica em relação às células não infectadas após 4 h de infecção [111].

Após 10 h de infecção, somente a via de sinalização do fosfatidiinositol se destacou com o enriquecimento funcional dos genes presentes no módulo associado à amostra infectada (I10) (Figura 18). Os componentes dessa via participam na regulação de diferentes funções celulares, como o tráfego intracelular, proliferação e

divisão celular e endocitose [149], podendo ser de grande importância na coordenação dos eventos em processo na célula após a entrada do parasito.

A partir de 24 h de infecção, as células infectadas apresentaram pouca alteração no perfil de expressão gênica quando comparadas às células não infectadas (Figura 24). O enriquecimento funcional dos genes contidos nos módulos correlacionados com as amostras infectadas dos períodos de 24, 48 e 72 h mostra uma mudança no perfil de expressão gênica em relação ao primeiro intervalo de tempo avaliado, já que poucas vias biológicas relacionadas ao sistema imune estão presentes (Figuras 26, 28, 30) . Essa diminuição no número de vias relacionadas ao sistema imune pode indicar uma modulação da resposta imune pelo parasito, possibilitando a sua proliferação [150], uma vez que o número de amastigotas foi maior com 24 h de infecção quando comparado aos outros períodos. Outros estudos também verificaram uma diminuição no número de genes diferencialmente expressos relacionados ao sistema imune, principalmente, a partir de 24 h de infecção [100, 111, 112]. A via da endocitose também foi observada no enriquecimento funcional dos genes contidos nos módulos associados com as amostras infectadas por 24 h (I24) e 72 h (I72), podendo sugerir a entrada de macromoléculas no macrófago infectado por esse processo. Uma vez internalizadas em endossomos, esses podem se fusionar com os fagossomos contendo as leishmânias e assim fornecer os nutrientes necessários para a sobrevivência das mesmas [53].

Os metabolismos de carbono e de frutose e manose são importantes vias para obtenção de energia pela célula e essas foram as vias metabólicas que apresentaram grande modulação em células murinas infectadas por *Leishmania major* até 12 h de infecção [98]. No entanto, em nosso modelo experimental, essas vias foram observadas no enriquecimento funcional do módulo *Black* associado com a amostra I24, sugerindo um maior requerimento de energia para a manutenção da infecção nas células, já que nesse período foi observado o maior número de amastigotas por célula.

Nos períodos de 48 e 72 h, genes da via de sinalização da p53 podem ser notados nos módulos associados com as amostras controle C48 (Figura 27), C72 (Figura 29) e infectada I72 (Figura 30) indicando um possível sofrimento das células em cultura, já que essa via de sinalização é ativada por fatores que causam estresse

celular, como a falta de nutrientes, choque térmico, entre outros [151]. Além da via da p53, genes da via de regulação da longevidade e da via de sinalização de mTOR também estão presentes no módulo correlacionado com a amostra infectada por 72 h (I72), sugerindo o sofrimento celular, já que ambas as vias podem desencadear respostas voltadas para a sobrevivência da célula [152]. A diminuição no número de amastigotas nos períodos mais tardios da infecção (Figura 8) poderia ser explicada pela queda na viabilidade das células em cultura devido à diminuição dos nutrientes presentes no meio de cultivo, corroborando com o enriquecimento funcional dos módulos correlacionados com as amostras dos períodos mais tardios.

O conhecimento das vias biológicas envolvidas no processo de infecção do macrófago pela *Leishmania* é importante para que possamos ter uma visão global dos processos envolvidos nessa interação. No entanto, a determinação de genes marcadores ou ainda de biomarcadores envolvidos nesse processo é de suma importância para o desenvolvimento de estratégias de tratamento, diagnóstico e prognóstico da doença [73, 93, 153]. O programa *WGCNA* permitiu a determinação de genes *HGS-hub* associados aos módulos altamente correlacionados às amostras não infectadas e infectadas, nos diferentes períodos avaliados, por meio dos parâmetros *GS* (*Gene Significance*) e *MM* (*Module Membership*). O parâmetro *GS* é uma medida de correlação da expressão de um gene presente na rede com uma determinada característica e quanto maior o seu valor absoluto, maior a significância com a característica. Já o parâmetro *MM* mede a importância do gene dentro do módulo, podendo ser considerado também como uma medida indireta da conectividade intramodular. Genes com alta conectividade intramodular apresentam altos valores de *MM*, podendo ser considerados genes de alta hierarquia no módulo, aqui nomeados de *hubs* e ter função biológica relevante [119, 154]. Em nosso estudo, a característica é a célula infectada ou não por *Leishmania infantum* nos diferentes períodos de tempo.

Os genes *HGS-hub* determinados tanto para as amostras Controle como para as amostras Infectadas participam de diferentes processos biológicos e para facilitar a compreensão do envolvimento dos mesmos na infecção por *Leishmania*, esses foram agrupados de acordo com os processos biológicos dos quais participam. Para

a discussão desse trabalho foram considerados os genes contidos nos processos biológicos que apresentaram o maior número de genes diferencialmente expressos.

Dos genes *HGS-hub* determinados nas amostras Controles, 22 genes apresentaram expressão diferencial quando comparadas com as amostras Infectadas, dos quais 5 estão envolvidos na resposta imune, 4 participam de processos relacionados com a ligação ao RNA e 13 genes participam de outros processos (Figura 34). Dos genes envolvidos na ligação ao RNA, todos apresentaram diminuição na expressão nas células infectadas nas primeiras 10 h de infecção (Anexo C). Os genes *URB1* e *BRIX1* participam na biogênese da subunidade maior do ribossomo [155, 156], enquanto o gene *PCF11* codifica uma proteína que participa do complexo de clivagem II de pré-mRNA [157]. Já o gene *NSUN2* codifica uma metiltransferase que metila tRNAs [158]. Assim, a diminuição na expressão desses genes nas células infectadas sugere uma repressão nos processos de transcrição e tradução da célula hospedeira com o intuito de propiciar as condições ideais para que o parasito se estabeleça. Estudos já demonstraram que a *Leishmania* é capaz de inativar o fator de transcrição AP-1, envolvido na transcrição de genes que codificam fatores microbicidas no macrófago [159], como também de inibir a síntese de proteínas controlada por mTOR para o estabelecimento da infecção [160].

Dos 5 genes marcadores envolvidos na resposta imune, 2 apresentaram aumento na expressão (*ATP6V0D2* e *IL18BP*) e 3 apresentaram diminuição na expressão (*SASH1*, *ELMO1* e *HCP5*). O gene *ATPase H+ transporting V0 subunit d2* (*ATP6V0D2*) codifica uma das subunidades do complexo da bomba de prótons V-ATPase, sendo responsável pela acidificação de diversos compartimentos intracelulares, como os endossomos [161]. O aumento da sua expressão nas células infectadas pode estar relacionado com a formação dos vacúolos parasitóforos no macrófago, após a internalização das leishmânias. Esse aumento na expressão já foi verificado em macrófagos murinos infectados por *Leishmania amazonensis* [99].

O gene *IL18BP* codifica a proteína ligadora a citocina IL-18, exercendo atividade anti-inflamatória ao se ligar à IL-18, já que esta citocina apresenta ação pró-inflamatória [162]. Uma vez que a proteína ligadora a IL-18 é constitutivamente expressa por células mononucleares, o aumento da sua expressão nas células infectadas pode indicar um mecanismo de evasão da *Leishmania*, evitando assim a

ativação da resposta Th1 pela citocina IL-18 produzida pelos macrófagos. Ontoria e colaboradores [163] também verificaram um aumento da expressão do gene *IL18BP* em células do baço de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum*.

O gene *ELMO1* codifica a proteína de englobamento e motilidade celular 1 (ELMO1), que possui papel importante na fagocitose ao interagir com a proteína *Dock180* e promover a polimerização da actina por meio da ativação de *Rac1* [164]. Estudos utilizando macrófagos e camundongos *knockout* para o gene *ELMO1* infectados com *Salmonella thyphimurium* demonstraram que a proteína ELMO1, juntamente com a Rac1, têm papel fundamental na internalização e na resposta inflamatória contra a bactéria já que ambos apresentaram uma menor carga bacteriana, como também uma menor produção das citocinas pró-inflamatórias *TNF-α* e *MCP-1* em relação aos modelos selvagens [165,166]. Já o gene *SAM and SH3 domain containing 1* (*SASH1*) codifica uma proteína que regula positivamente a cascata de sinalização do receptor *Toll-like* 4 em células epiteliais humanas, aumentando a ativação de *NF-κB* e das proteínas quinases ativadas por mitógenos (*MAPKs*) com consequente aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias [167]. Uma vez que os genes *ELMO1* e *SASH1* estão relacionados com a produção de citocinas pró-inflamatórias, a diminuição da expressão dos mesmos nas células infectadas pode indicar uma tentativa da leishmânia em reprimir a produção dessas citocinas para que possa sobreviver à resposta imune induzida contra ela.

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) é composto tanto por genes reguladores da resposta imune, como por outros genes com papéis não relacionados ao sistema de defesa. Recentemente, genes RNA não codificadores, incluindo pseudogenes expressos, também foram identificados nessa região do genoma. Pelo fato desse complexo ser uma região genômica altamente polimórfica, diversas doenças foram associadas a ele [168]. Podemos citar como exemplo a susceptibilidade à leishmaniose visceral das populações indiana e brasileira, que foi associada à região genômica *HLA-DRB1–HLA*-DQA1, pertencente ao Complexo Principal de Histocompatibilidade II (MHC-II) [169]. O gene *HLA Complex P5* (*HCP5*) é um RNA não codificante, que está localizado na região genômica do Complexo Principal de Histocompatibilidade I (MHC-I) [170]. Estudos de associação genômica ampla (*GWAS*) mostraram a associação desse gene com a psoríase em

pacientes americanos, como também com o carcinoma hepatocelular causado pelo vírus da hepatite C em pacientes japoneses e caucasianos [171, 172]. No entanto, até o momento não há relatos da associação desse gene com a leishmaniose.

Os 42 genes *hub* diferencialmente expressos nas amostras Infectadas foram agrupados em 6 processos biológicos diferentes, refletindo as alterações causadas nas células pelo parasito. Dentre esses processos, a degranulação de plaquetas e a regulação do ciclo celular mitótico apresentaram 2 genes cada, a organização do citoesqueleto foi representada por 5 genes, enquanto a regulação da transcrição, o metabolismo de lipídios e a resposta imune apresentaram 4, 6 e 10 genes, respectivamente. Os demais genes (13) foram agrupados em outros processos (Figura 35).

Como observado nos processos biológicos associados aos marcadores determinados para as amostras Controle, a resposta imune foi o processo que mais apresentou genes diferencialmente expressos, confirmando o número de vias biológicas verificadas no enriquecimento funcional realizado com os genes contidos nos módulos correlacionados com a amostra infectada por 6 h (I06), principalmente (Figura 16). Essa modulação na expressão dos genes da resposta imune já era esperada devido à natureza da célula hospedeira utilizada como modelo experimental, uma vez que os macrófagos constituem a primeira linha de defesa contra microrganismos, produzindo uma diversa gama de efetores da resposta imune. Dentre esses efetores, podemos citar as citocinas e quimiocinas, sendo essenciais para a função dos mesmos e para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa [173, 174].

Dos 10 genes *hub* diferencialmente expressos e relacionados com a resposta imune, 5 apresentaram aumento na expressão, sendo eles: *CCL3L3*, *CD44*, *PIM1*, *ATP6V1H* e *MAPK13*. O aumento na expressão desses genes reflete a cinética da infecção pelo parasito, já que esses genes estão relacionados com a quimiotaxia de linfócitos e macrófagos, fagocitose, resposta à citocinas, acidificação de fagossomos e regulação positiva da resposta inflamatória, respectivamente.

Uma das primeiras respostas do macrófago frente à infecção por *Leishmania* é o recrutamento de leucócitos para o sítio de infecção por meio da secreção de quimiocinas e citocinas. O gene *CCL3L3* é uma isoforma do gene *MIP1-α* (CCL3),

que codifica a quimiocina LD78β. Ela apresenta 96% de identidade na sequência de aminoácidos com a quimiocina CCL3 e ambas estão envolvidas na quimiotaxia de leucócitos para o sítio da infecção. Além disso, a LD78β está envolvida na inibição da entrada do vírus HIV em macrófagos por meio da ligação ao receptor de quimiocina CCR5 [175, 176, 177, 178]. Apesar de não haver estudos que relacionem especificamente a LD78β com a leishmaniose, o aumento da expressão da CCL3 já foi demostrado na infecção por *Leishmania* [98, 163, 179, 180].

O gene *CD44* codifica um receptor de ácido hialurônico e a sua expressão é altamente regulada nos leucócitos, sendo induzida por citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, como IL-2, TNF-α, MIP-1β e IL-8 e inibida por citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-13 e IL-10. Quando expressos, eles se localizam em regiões da membrana celular chamadas de plataformas de lipídios (*lipid rafts*). As suas funções estão relacionadas com: adesão dos monócitos às paredes do endotélio durante a migração para o sítio de infecção; inflamação; ativação e proliferação de monócitos e linfócitos, como também com a ligação a microrganismos [181, 182, 183, 184]. O receptor CD44 parece estar envolvido ainda na fagocitose, já que o seu bloqueio por anticorpo monoclonal inibiu a fagocitose de hemácias opsonizadas por anticorpos IgG de coelho e fragmento C3b inativado (C3bi) via receptor Fcγ e CR3, respectivamente, em macrófagos [185]. Esses dados indicam que o receptor CD44 pode ser utilizado pela *Leishmania* como porta de entrada nos macrófagos, juntamente com os receptores Fcγ e CR3, já descritos como responsáveis pela internalização do parasito [16]. Outro dado que corrobora essa ideia é a localização desses receptores nas plataformas de lipídios, uma vez que já ficou demonstrada a importância dessas estruturas na entrada do parasito na célula para a sobrevivência e estabelecimento da infecção [75, 186].

O gene *PIM1* codifica uma serina/treonina quinase, que pertence ao grupo das quinases reguladas por cálcio/calmodulina e a sua expressão é induzida, principalmente, pelos transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT), como STAT3 e STAT5, que podem ser ativados pelas citocinas IFN-γ e IL-2, respectivamente. Nesse contexto, a expressão de *PIM1* contribuiria com a resposta imune ao induzir a produção dos mediadores efetores contra o parasito. No entanto, *PIM1* pode regular negativamente a via Jak/STAT ligando-se às proteínas SOCS-1 e

SOCS-3, interferindo assim na resposta mediada por citocinas [187, 188, 189]. Na infecção de macrófagos humanos por *Leishmania donovani* já foi demonstrado que o parasito é capaz de induzir a expressão de SOCS-3, sendo considerado um mecanismo de supressão da ativação de macrófagos no início da infecção [190]. Em nosso modelo experimental, houve aumento tanto da expressão do gene *PIM1* como de *SOCS-3* (dados não mostrados) nas células infectadas por *Leishmania*, sugerindo uma possível associação entre eles na evasão da resposta imune que deve ser considerada.

O gene *ATP6V1H* codifica uma das subunidades do complexo da bomba de prótons ATPase vacuolar (V-ATPase) e, juntamente com a subunidade codificada pelo gene *ATP6V0D2*, participa da acidificação de diversos compartimentos intracelulares [161]. Assim como observado no gene *ATP6V0D2*, o aumento na expressão do gene *ATP6V1H* também foi verificado em macrófagos infectados por *Leishmania amazonensis* [99].

Uma série de vias de sinalização intracelulares é ativada quando as células são infectadas por *Leishmania*. Uma dessas vias é a da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) p38, que está associada com a proliferação, crescimento e morte celular, como também com a produção de citocinas e a inflamação, sendo ativada pelas citocinas IL-1β e TNF-α, fatores de crescimento, lipopolissacarídeo (LPS) e estresse. A proteína p38 possui quatro isoformas (α, β, γ, δ), que apresentam cerca de 60% de similaridade na sequência de aminoácidos entre si, mas diferem quanto à expressão nos tecidos, regulação na ativação da proteína quinase e na cadeia de fosforilação na via de sinalização. O gene *MAPK13* codifica a isoforma p38δ, também conhecida como proteína quinase ativada por estresse 4 (SPK4), e dentre as quatro isoformas é uma das mais abundantes, juntamente com a isoforma p38α, em macrófagos, neutrófilos e linfócitos T $CD4^+$ humanos [191, 192, 193, 194, 195]. O aumento na expressão do gene *MAPK13* nas células THP-1 infectadas por *Leishmania infantum* indica que a via da p38 está sendo ativada pelo parasito, provavelmente, pela ação da citocina TNF-α ou via ativação do receptor TLR4, já que estudos demonstraram que a *Leishmania* é capaz de ativar o receptor TLR4, como também de induzir a produção de TNF- α [31, 32, 42].

Dentre os 10 genes relacionados ao sistema imune e que apresentaram diminuição na expressão nas células infectadas estão: *CD93*, *MMP2*, *SLA*, *TNFRSF21* e *ALOX5*. O gene *CD93* codifica uma glicoproteína transmembrana do tipo 1, que serve de receptor para o componente C1q do sistema complemento, para lectina ligada à manose 2 (MBL2) e para proteína surfactante de pulmão A (SLA). Ele é expresso em uma variedade de células, como monócitos, neutrófilos, macrófagos, células endoteliais e plaquetas, participando na regulação célula-célula durante o desenvolvimento e na fagocitose de células apoptóticas *in vivo* [196]. Além da forma transmembrana, o CD93 também pode ser clivado da membrana por metaloproteínases, tornando-se solúvel. Esta clivagem ocorre mediante estímulos de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-α, além do LPS [197]. Apesar do CD93 solúvel ser encontrado no plasma de indivíduos saudáveis, a molécula já foi associada à asma, alergia e infarto do miocárdio agudo [198, 199, 200]. Greenle e colaboradores [201] investigaram o papel do CD93 solúvel na inflamação e identificaram os macrófagos inflamatórios como fonte da molécula na peritonite em camundongos. O envolvimento do CD93 solúvel na inflamação também foi investigado por Jeon e colaboradores [202], que demonstraram que células THP-1 adquiriram o fenótipo semelhante a macrófagos após a incubação com a molécula. Além disso, as células apresentaram aumento na resposta inflamatória induzida por LPS via receptores TLR e produção de citocinas pró-inflamatórias mediadas por NFkB. Esses estudos indicam que o CD93 solúvel pode contribuir na ativação de macrófagos, promovendo uma resposta inflamatória. Assim, a diminuição na expressão do gene *CD93* nas células infectadas por *Leishmania infantum*, que ocorreu em todos os tempos de incubação analisados, sendo estatisticamente significantes nos períodos de 10, 24, 48 e 72 h (Anexo F), pode sugerir uma possível estratégia da *Leishmania* em evitar a ativação dos macrófagos para o estabelecimento da infecção.

A família das metaloproteínases (MMP) é composta por 23 membros, as endopeptidades dependentes de zinco, envolvidas em diferentes processos celulares. O gene *MMP2* codifica um dos membros dessa família, a gelatinase A, uma enzima secretada por células estromais ou inflamatórias em resposta a estímulos externos ou de citocinas pró-inflamatórias. Assim como algumas citocinas podem ativar a

expressão das metaloproteínases, outras como a IL-10, IL-4 e IFN-γ parecem inibir a sua expressão. Na resposta imune, as metaloproteínases apresentam diversas funções desde a degradação da matriz extracelular para permitir a migração dos leucócitos para o sítio da infecção até a modulação da atividade das citocinas e quimiocinas. Dentre essas atividades na modulação das citocinas, a gelatinase A está envolvida na clivagem, liberação e ativação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-1β, além de liberar fatores de crescimento, como o IGF-I, de sua proteína de ligação (IGFBP) ativando-a [203, 204, 205, 206]. Na infecção por *Leishmania*, estudos evidenciaram o envolvimento da gelatinase B, codificada pelo gene *MMP*9, principalmente nas leishmanioses cutâneas onde a falha na resposta terapêutica após o tratamento das lesões como também na patologia das mesmas foram atribuídas aos altos níveis dessa molécula [207, 208]. Melo e colaboradores também demonstraram o envolvimento das gelatinases na leishmaniose cerebral em camundongos infectados por *Leishmania donovani* [209]. Nesse estudo foi relatado um aumento nos níveis das gelatinases nos modelos estudados. No entanto, em nosso modelo, observamos uma redução na expressão do gene *MMP2* como também do gene *MMP9* (dados não mostrados), nas células infectadas em relação ao controle. Uma vez que a citocina IL-10 é uma das citocinas produzidas na infecção por *Leishmania infantum*, esta pode ser a causa da inibição na expressão desses genes. Stearns e colaboradores [210] demostraram que a IL-10 é capaz de ativar o fator de transcrição ATF3, inibindo a expressão do gene *MMP2*. É interessante citar que o aumento na expressão do gene *ATF3* também foi observado nas células infectadas (Anexo C), corroborando esta hipótese.

Na inflamação, outras moléculas além das citocinas e quimiocinas desempenham papel importante no combate aos microrganismos. Dentre essas moléculas, podemos citar os leucotrienos, mediadores inflamatórios lipídicos, sintetizados a partir do ácido araquidônico por meio da enzima araquidonato 5-lipoxigenase (5-LOX), que é codificada pelo gene *ALOX5*. A produção dos leucotrienos ocorre nos leucócitos e pode ser induzida por meio do aumento dos níveis de cálcio intracelular. Diferentes estímulos podem induzir esse aumento, como a fagocitose mediada pelo receptor Fcγ, ativação dos receptores de manose e TLR2, por exemplo. Após produção dos leucotrienos, esses ativam uma série de

mecanismos microbicidas nas células, dentre os quais podemos citar a produção de citocinas e espécies reativas de oxigênio, acúmulo de leucócitos e fagocitose. Além disso, os leucotrienos são capazes de atrair células T dos linfonodos para o local da infecção, promovendo a resposta imune adaptativa [211, 212]. Trabalhos envolvendo diferentes espécies de *Leishmania*, como também outros patógenos, observaram que os leucotrienos e a enzima 5-LOX apresentam papel protetor na infecção [213, 214, 215, 216]. No entanto, observamos a redução na expressão do gene *ALOX5*, como também do gene *ALOX5AP* que codifica a proteína reguladora da enzima (dados não mostrados), em todos os períodos avaliados em nosso estudo (Anexo F). Esses resultados sugerem a ausência na produção e na atividade dos leucotrienos, que são concordantes com o aumento no número de leishmânias nas células infectadas. Como esses resultados vão de encontro aos dados presentes na literatura, o envolvimento do gene *ALOX5* na infecção por *Leishmania infantum* deve ser explorado com mais detalhes para elucidarmos o papel dessa enzima na infecção.

O gene *TNFRSF21* apresentou diminuição na expressão nas primeiras 10 h de infecção, como também aumento na expressão após 72 h de infecção (Anexo F). Esse gene codifica um receptor da superfamília de receptores TNF, o *Death Receptor 6* (DR6), que está envolvido na apoptose de células eucarióticas e na resposta inflamatória. O envolvimento desse receptor na resposta inflamatória foi comprovado em células T $CD4^+$ de camundongos *knockout* para o receptor, que produziram níveis mais elevados de citocinas Th2, como IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, quando estas foram estimuladas [217, 218]. O aumento na expressão do receptor DR6 em células infectadas com o vírus da hepatite C (HCV) motivou a investigação do seu papel na patogênese do vírus [219]. O estudo demonstrou que o vírus modulou a expressão do receptor por meio da produção de ROS ativando o fator de transcrição NF-kB, além de explorar a via de sinalização do receptor DR6, para facilitar a sua multiplicação, utilizando as vias de sinalização JNK, p38 MAPK, STAT3 e Akt [220]. Além desse estudo, o envolvimento do receptor DR6 com as vias de sinalização JNK, p38 MAPK e STAT3 já foi demonstrado em outro trabalho [221]. O papel do receptor DR6 em outras patologias ainda foi pouco explorado e a sua ligação com as vias de sinalização JNK, p38 MAPK e STAT3 sugere um possível envolvimento na

infecção por *Leishmania*, uma vez que essas vias já foram implicadas na infecção e na evasão do sistema imune pelo parasito [222, 223].

A sinalização intracelular desempenha papel importante na manutenção da homeostasia da célula, assim como na resposta a diversos estímulos. O gene *SLA* codifica a proteína *Src Like Adaptor* (SLPA), que está envolvida na regulação da sinalização intracelular de vários receptores de membrana, atuando na reciclagem dos mesmos ou modulando a cascata de sinalização ativada pelo receptor. Esse mecanismo ocorre por meio da ligação da SLPA aos receptores ou às proteínas associadas a eles, sinalizando para a maquinaria de ubiquitinação para degradação. A expressão do gene *SLA* ocorre em diferentes tipos celulares, como em células do sangue periférico e tecidos linfóides [224, 225]. O papel da SLPA foi bem caracterizado nas vias de sinalização mediadas pelos receptores de células T (TCR) e de células B (BCR). A superexpressão de SLPA em ambos os tipos celulares inibiu a sinalização mediada pelos receptores de antígeno, que culminaria na regulação positiva do marcador de superfície CD69, ativação do fator de transcrição Fator Nuclear de Células T ativadas (NFAT), o influxo de cálcio, assim como a transcrição do gene da IL-2. Esses eventos são necessários para ativação e diferenciação das células B e T [226, 227]. O envolvimento do gene *SLA* em doenças infecciosas foi observado na infecção de galinhas com o vírus causador de anemia (CAV). Nesse trabalho, os autores associaram a baixa expressão de diversos genes, incluindo o *SLA*, com a disfunção das células T, que foram incapazes de responder eficientemente contra o vírus [228]. Em nosso modelo experimental, a expressão do gene *SLA* foi menor nas células infectadas em praticamente todos os períodos, sendo estatisticamente significante, com 6, 10 e 72 h de infecção (Anexo F). Devido às funções atribuídas à proteína SPLA, o seu papel na infecção por *Leishmania* parece relevante e deve ser investigado, principalmente na resposta adaptativa que requer a ativação e diferenciação das células T para uma resposta eficiente contra o parasito.

Além da resposta imune, o metabolismo de lipídios foi outro processo biológico que apresentou grande número de genes *hub* diferencialmente expressos. Na infecção de macrófagos murinos por outras espécies de *Leishmania*, alterações na expressão de genes relacionados com essa via metabólica também foram verificadas [98, 99, 111]. Essa alteração na expressão dos genes pertencentes à via

metabólica de lipídios já era esperada, devido ao envolvimento do colesterol na patogenia da leishmaniose visceral. Além das alterações nos níveis lipídicos das lipoproteínas em humanos e em cães com a doença ativa, o colesterol é importante para internalização das promastigotas no macrófago e na evasão da resposta imune [50, 66, 69, 71, 75, 77]. Um elegante trabalho utilizando camundongos infectados por *Leishmania donovani* mostrou que a glicoproteína GP63 do parasito é responsável pela clivagem da proteína DICER1, componente do complexo de processamento de microRNA, impedindo a formação do microRNA miR-122. Sem a atividade desse microRNA, o metabolismo do colesterol é alterado, diminuindo os níveis séricos das lipoporoteínas no hospedeiro [229]. Apesar do papel do colesterol na leishmaniose visceral, pouco se conhece das alterações causadas pelos parasitos no metabolismo de lipídios dos macrófagos infectados.

Dos seis genes que apresentaram expressão diferencial e que fazem parte do metabolismo de lipídios nas células infectadas, cinco apresentaram aumento na expressão (*BHLHE41*, *ALAS1*, *ITGB3*, *MGLL*, *NR1H3*) e um gene apresentou diminuição na expressão (*DHCR7*). Todos os genes, com exceção do *ALAS1* que está associado ao período de 24 h de infecção, são genes *HGS-hub* das células infectadas por 6 h.

O gene *NR1H3* codifica um fator de transcrição da família dos receptores nucleares, o LXRα, um dos responsáveis pela homeostasia do colesterol em macrófagos. Esse fator de transcrição age como um sensor de colesterol, que ativa a expressão de diversos genes implicados no transporte reverso do colesterol, como o *ABCA1*, *ABCG1* e *ApoE*, quando os níveis dessa molécula estão aumentados dentro da célula [82, 230]. Para que a ativação desses genes aconteça é necessária a formação de um heterodímero com o receptor de ácido retinóico RXRα, codificado pelo gene *RXRA* [231]. Nas células THP-1 infectadas por *Leishmania infantum*, observamos o aumento na expressão do gene *NR1H3*, tanto em 6 h quanto em 10 h de infecção (Anexo C). No entanto, o mesmo não ocorreu com a expressão do gene *RXRA*, que apresentou os mesmos níveis de expressão das células não infectadas (dados não mostrados). Essa diferença na expressão dos dois ativadores sugere a inibição da formação do heterodímero e, consequentemente, a inibição da expressão dos genes relacionados ao transporte reverso do colesterol A*BCA1*, *ABCG1* e *ApoE*. Vale

ressaltar que esses genes apresentaram diminuição na expressão nas células infectadas (dados não mostrados), evidenciando a inibição da transcrição. Assim, a inibição no efluxo do colesterol poderia causar o acúmulo de colesterol e de outras substâncias envolvidas na formação de corpúsculos de lipídios (*lipid bodies*), estruturas ricas em diferentes tipos de lipídios localizadas nos citoplasmas das células. Estudos demonstraram a interação dessas estruturas com os fagossomos, sugerindo o fornecimento de nutrientes para os parasitos abrigados nesses compartimentos. Além disso, estudos utilizando macrófagos e células dendríticas infectadas por *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis*, respectivamente, demonstraram o aumento dos corpúsculos após infecção, corroborando essa hipótese [232, 233, 234, 235].

O gene *MGLL* codifica uma enzima envolvida na hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol, a monoacilglicerol lipase (MGL), sendo expresso em uma variedade de tecidos e células, sob a regulação do fator de transcrição PPARα [86]. A expressão do gene *MGLL* se mostrou aumentada nas células infectadas nos períodos de 6 h e 10 h, como também o gene *PPARα* que controla a sua expressão (dados não mostrados). A menos que haja um controle pós-transcricional da atividade dessa enzima, o aumento na expressão do seu gene sugere a sua atividade na degradação dos lipídios. Observamos também o aumento na expressão de outro gene que codifica uma enzima responsável pela degradação de triglicerídeos, a lipoproteína lipase (*LPL*) [85], a partir de 10 h de infecção (dados não mostrados). O aumento na expressão desses genes reforça a hipótese sugerida acima de que a *Leishmania* estaria promovendo o acúmulo de colesterol e de seus produtos nas células para a formação dos corpúsculos de lipídios. O aumento na expressão dos genes *MGLL* e *LPL* também foi observado em células dendríticas infectadas por *Leishmania amazonensis*, que apresentaram acúmulo de corpúsculos de lipídios após infecção [235].

O aumento na expressão dos genes de degradação de triglicerídeos indica a disponibilidade desses lipídios nas células infectadas. A entrada de lipídios no macrófago pode ocorrer mediada por receptores, como o de LDL e receptores tipo *scavengers* (SR-B1, CD36, SR-A1) ou por macropinocitose [82]. Nas células infectadas por *Leishmania infantum*, verificamos o aumento na expressão do gene

que codifica o receptor CD36 (dados não mostrados), como também do gene *ITGB3*. *O* gene *ITGB3* codifica a cadeia β3 das integrinas, que são proteínas transmembranas compostas pela associação entre uma cadeia α e uma cadeia β, formando um heterodímero, com as porções extracelulares e citoplasmáticas atuando como receptores e transdutores de sinal, respectivamente. Dependendo da combinação entre essas cadeias, as integrinas podem apresentar especificidade de ligação a diferentes moléculas, o que acarreta diversas funções biológicas. A cadeia β3 pode se combinar com as cadeias α2b e α5, constituindo as integrinas αIIbβ3 e αVβ3 [236, 237, 238]. Além das diversas funções atribuídas à integrina αVβ3, ela também parece estar envolvida na captação de lipídios em macrófagos. Antonov e colaboradores [239] demonstraram que a não ativação contínua dessa integrina aumentava a expressão dos receptores do tipo *scavenger* CD36 e SRA aumentando, consequentemente, a captação de colesterol oxidado pelos macrófagos. Em nosso estudo, o aumento na expressão do gene *CD36* e do gene *ITGB3* sugere um aumento na captação de lipídios que podem ser degradados pelas enzimas MGL e LPL. Entretanto, devido às outras funções da integrina αVβ3, o aumento na expressão do gene *ITGB3* também pode estar relacionado com a resposta imune, uma vez que a mesma já foi associada à regulação da resposta inflamatória em macrófagos via ativação do fator de transcrição NF-κB [240]. Ramirez e colaboradores [100] também observaram o aumento na expressão do gene *ITGB3* na infecção de macrófagos por *Leishmania panamensis*, relacionando-o à resposta imune.

O gene *BHLHE41* codifica um fator de transcrição envolvido na regulação do ritmo circadiano, o DEC2 [241]. Apesar do seu papel na regulação de genes dessa via biológica, estudos verificaram que a proteína DEC2 está envolvida também na inibição de fatores de transcrição e genes pertencentes ao metabolismo de lipídios em diferentes tipos celulares. Cho e colaboradores [242] verificaram que a expressão da proteína DEC2 inibe a transcrição ativada pelo heterodímero LXRα/RXRα, inibindo a ativação de genes envolvidos no efluxo do colesterol. Já Choi e colaboradores [243] demonstraram ainda que a hipóxia pode induzir a expressão do fator de transcrição DEC2, inibindo da atividade do fator de transcrição SREBP-1c, importante ativador de genes que codificam enzimas lipogênicas, como também inibiu a transcrição do gene *FAS*, que codifica uma enzima responsável pela síntese

de ácidos graxos. Embora esses estudos demonstrem o envolvimento do fator de transcrição DEC2 na regulação de genes da via do metabolismo de lipídios, o seu envolvimento na modulação da expressão de genes dessa via em doenças infecciosas ainda não foi definido.

Na infecção por *Leishmania*, observamos o aumento na expressão dos fatores de transcrição LXR e PPAR-α, que regulam tanto a expressão dos diversos genes do metabolismo de lipídios, como também de outros genes relacionados a outras vias biológicas. Podemos citar como exemplo, o gene *ALAS1*, que codifica uma enzima mitocondrial, a aminolevulinato Sintase (ALA-S), envolvida na primeira etapa da síntese do grupo heme. O grupo heme faz parte da composição de diferentes proteínas, como as hemoglobinas, citocromos, guanilatos ciclases e óxido nítrico sintase, que atuam em inúmeros processos celulares, como no transporte de oxigênio, no transporte de elétrons na mitocôndria, no metabolismo de drogas e esteroides e na transdução de sinal [244, 245, 246]. O grupo heme também apresenta grande importância para os tripanossomatídeos, como as leishmânias, já que eles não possuem todas as enzimas necessárias para a síntese dessa molécula, que é utilizada na síntese de esteróis e ácidos graxos poli-insaturados pelos parasitos. Devido à ausência dessas enzimas para a síntese, os parasitos adquirem as moléculas heme do hospedeiro [247, 248]. Nas células infectadas por *Leishmania infantum*, o aumento na expressão do gene *ALAS1* foi observado no período de 24 h de infecção (Anexo F), indicando um aumento na produção do precursor das moléculas heme, que coincide com o maior número de amastigotas nas células (Figura 8). Esse aumento na produção do precursor de heme pode estar relacionado com um maior requerimento das moléculas heme pelas leishmânias.

O gene *DHCR7* codifica uma enzima que participa da última etapa da síntese do colesterol, a dehidrocolesterol-delta-7-redutase (DHCR7). A sua expressão é regulada pelo fator de transcrição SREBP, que é ativado em resposta aos baixos níveis de colesterol intracelulares, ativando a transcrição de genes responsáveis pela síntese do colesterol [249]. O gene *DHCR7* apresentou diminuição nas células infectadas em todos os períodos de infecção avaliados (Anexo C), com exceção do período de 24 h. Além desse gene, outros genes que participam da via da síntese do colesterol, como o *HMGCR* e o *SQLE*, também apresentaram diminuição na

expressão nas células infectadas (dados não mostrados). A diminuição na expressão desses genes sugere que a via da síntese do colesterol está inibida e como a enzima HMGCR é uma das primeiras a atuar na síntese de colesterol, provavelmente, a sua inibição tenha causado a inibição das demais enzimas na síntese. Essa diminuição na síntese do colesterol deve ter ocorrido devido ao aumento da degradação do colesterol pelas enzimas MGL e LPL, como também à inibição do efluxo do colesterol, já que níveis altos de colesterol intracelular podem inibir a síntese do mesmo [250]. Células U937 infectadas por *Leishmania braziliensis,* por 72 h, também apresentaram diminuição na expressão dos mesmos genes relacionados à via da síntese de colesterol observados neste trabalho [102].

Os dados apresentados neste trabalho abrem novas perspectivas para o estudo da interação macrófago-*Leishmania*, já que muitos dos genes apontados como diferencialmente expressos nas células infectadas ainda não foram investigados. Além disso, o aprofundamento no estudo da modulação dos genes do metabolismo de lipídios na infecção por *Leishmania* se faz necessário para possamos entender a relação com as diferentes espécies e os mecanismos envolvidos nesse processo. O uso de técnicas como a de RNA de interferência, CRISPR ou mesmo o uso de antagonista dos fatores de transcrição, que regulam a expressão dos genes envolvidos no metabolismo, poderiam ser utilizados como ferramentas nesses estudos.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho envolvendo a identificação de vias biológicas moduladas na infecção de células THP-1 por *Leishmania infantum*, nos permite concluir que:

a) No curso da infecção por *Leishmania infantum in vitro*, as maiores mudanças no perfil de expressão gênica das células infectadas, em relação às células não infectadas, ocorreram nas primeiras 10 h de infecção;
b) Nas primeiras 6 h de infecção, os genes modulados estão relacionados às vias biológicas pertencentes à resposta imune inata, como a do receptor *Toll-like*, a de sinalização das quimiocinas e de citocina-receptor de citocina, além das vias de sinalização mTOR e *HIF-1*, regulação do citoesqueleto, endocitose, como também ao metabolismo de lipídios, como metabolismo de ácidos graxos, de glicerofosfolipídio e de glicerolipídio e a via de sinalização de *PPAR*;
c) Após 10 h de infecção, somente a via de sinalização do fosfatidiinositol se destacou nas células infectadas, estando relacionada com o tráfego intracelular, proliferação e divisão celular e endocitose, podendo ser de grande importância na coordenação dos eventos da célula após a entrada do parasito;
d) A partir de 24 h de infecção, as células infectadas apresentaram pouca alteração no perfil de expressão gênica quando comparadas às células não infectadas e poucas vias biológicas relacionadas ao sistema imune estão presentes;
e) A modulação dos genes *IL18BP*, *ELMO1*, *SASH1*, *CD93* e *PIM1*, *MMP2* e *ALOX5* sugere um mecanismo de evasão do sistema imune pelo parasito;
f) A modulação dos genes *ITGB3*, *MGLL*, *NR1H3* e *DHCR7* sugere que a *Leishmania* estaria promovendo o acúmulo de colesterol e de

seus produtos nas células para a formação dos corpúsculos de lipídios e assim promover sua sobrevivência dentro das células;

g) Os dados apresentados neste trabalho abrem novas perspectivas para o estudo da interação macrófago-*Leishmania*, já que muitos dos genes apontados como diferencialmente expressos nas células infectadas ainda não foram investigados.

REFERÊNCIAS

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. Kirk M, editor. PLoS One. 2012 May 31;7(5):e35671.

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

3. Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. Adv Parasitol. 2007;64:1–109.

4. Bates PA. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int J Parasitol. 2007;37(10):1097–106.

5. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. Nat Rev Microbiol. 2011;9(8):604–15.

6. Pace D. Leishmaniasis. J Infect. 2014 Nov;69(S1):S10–8.

7. Organização Mundial de Saúde. Leishmaniasis country profile — Brazil - 2015. Organização Mundial de Saúde; 2017.

8. WHO Expert Comittee. Control of the leishmaniases: Report of a meeting of the WHO Expert Comittee on the Control of Leishmaniases. Geneva, 22-26 March 2010.

9. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nat Rev Microbiol. 2007 Nov;5(11):873–82.

10. Werneck GL. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. Rev Saude Publica. 2014 Oct;48(5):851–6.

11. Brasil. Ministério da Saúde. Casos confirmados de leishmaniose visceral registrados em 2017 [Internet]. [cited 2018 Dec 3]. Available from: http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/novembro/12/LV-Casos.pdf

12. Mosser DM, Brittingham A. Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. Parasitology. 1997;115(7):S0031182097001789.

13. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. Nat Immunol. 2010 Sep 19;11(9):785–97.

14. Turco SJ, Descoteaux A. The Lipophosphoglycan of Leishmania Parasites. Annu Rev Microbiol. 1992 Oct;46(1):65–92.

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

16. Ueno N, Wilson ME. Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: Implications for intracellular survival. Trends Parasitol. 2012;28(8):335–44.

17. Rosenthal LA, Sutterwala FS, Kehrli ME, Mosser DM. *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. Infect Immun. 1996 Jun;64(6):2206–15.

18. Verma S, Mandal A, Ansari MY, Kumar A, Abhishek K, Ghosh AK, et al. *Leishmania donovani* Inhibitor of Serine Peptidases 2 Mediated Inhibition of Lectin Pathway and Upregulation of C5aR Signaling Promote Parasite Survival inside Host. Front Immunol. 2018 Jan 29;9(JAN).

19. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, et al. In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. Science. 2008 Aug 15;321(5891):970–4.

20. Regli IB, Passelli K, Hurrell BP, Tacchini-Cottier F. Survival Mechanisms Used by Some Leishmania Species to Escape Neutrophil Killing. Front Immunol. 2017 Nov 16;8(NOV):1–8.

21. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. J Immunol. 2004 Dec 1;173(11):6521–5.

22. Antoine J, Prina E, Lang T, Courret N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages. Trends Microbiol. 1998;(98):392–401.

23. Desjardins M, Descoteaux A. Phagocytosis of Leishmania. Adv Cell Mol Biol Membr Organelles. 1999;6:297–316.

24. Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K, Shio MT. Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. Microbes Infect. 2012 Dec;14(15):1377–89.

25. Kawai T, Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. Immunity. 2011;34(5):637–50.

26. Faria MS, Reis FCG, Lima APCA. Toll-Like Receptors in Leishmania Infections: Guardians or Promoters? J Parasitol Res. 2012;2012:1–12.

27. Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, AlMusawi T, Duarte MI, Neto VA. Toll-like receptors and leishmaniasis. Infect Immun. 2008;76(3):866–72.

28. Gupta G, Oghumu S, Satoskar AR. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. Vol. 82, Advances in Applied Microbiology. Elsevier; 2013. 155-184 p.

29. de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, et al. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. Eur J Immunol. 2003 Oct;33(10):2822–31.

30. Chandra D, Naik S. *Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. Clin Exp Immunol. 2008;154(2):224–34.

31. Gurung P, Kanneganti T-D. Innate immunity against Leishmania infections. Cell Microbiol. 2015 Sep 7;17(9):1286–94.

32. Das S, Pandey K, Kumar A, Sardar AH, Purkait B, Kumar M, et al. TGF-β 1 re-programs TLR4 signaling in *L. donovani* infection: enhancement of SHP-1 and ubiquitin-editing enzyme A20. Immunol Cell Biol. 2012 Jul;90(6):640–54.

33. Faria MS, Reis FCG, Azevedo-Pereira RL, Morrison LS, Mottram JC, Lima APCA. Leishmania Inhibitor of Serine Peptidase 2 Prevents TLR4 Activation by Neutrophil Elastase Promoting Parasite Survival in Murine Macrophages. J Immunol. 2011;186(1):411–22.

34. Shweash M, Adrienne McGachy H, Schroeder J, Neamatallah T, Bryant CE, Millington O, et al. *Leishmania mexicana* promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2, iNOS and arginase-1 expression. Mol Immunol. 2011;48(15–16):1800–8.

35. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunologia Celular e Molecular. 6ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. 564 p.

36. Rossi M, Fasel N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions! Int Immunol. 2018;30(3):103–11.

37. Sorci G, Cornet S, Faivre B. Immune evasion, immunopathology and the regulation of the immune system. Pathog (Basel, Switzerland). 2013 Feb 13;2(1):71–91.

38. Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. Immunol Lett. 2005 Jun 15;99(1):17–23.

39. McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? Immunol Rev. 2004 Oct;201(10):206–24.

40. Rodriguez NE, Chang HK, Wilson ME. Novel Program of Macrophage Gene Expression Induced by Phagocytosis of *Leishmania chagasi*. Infect Immun. 2004 Apr 1;72(4):2111–22.

41. Bacellar O, Carvalho EM. Immunopathogenesis of Visceral Leishmaniasis. Gaz Médica da Bahia. 2005;75(1):24–34.

42. Costa ASA, Costa GC, Aquino DMC de, Mendonça VRR de, Barral A, Barral-Netto M, et al. Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012 Sep;107(6):735–9.

43. Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva LDA, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-γ and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-α + monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to Leishmania chagasi infecti. Clin Exp Immunol. 2006 Oct;146(1):124–32.

44. dos Santos PL, de Oliveira FA, Santos MLB, Cunha LCS, Lino MTB, de Oliveira MFS, et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. Oliveira SC, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Jan 27;10(1):e0004375.

45. Nylén S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. Trends Immunol. 2007 Sep;28(9):378–84.

46. Gautam S, Kumar R, Maurya R, Nylén S, Ansari N, Rai M, et al. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. J Infect Dis. 2011;204(7):1134–7.

47. Kima PE. Update on Leishmania Mediators That Promote Immune Evasion. In: Satoskar A, Durvasula R, editors. Pathogenesis of Leishmaniasis. New York, NY: Springer New York; 2014. p. 15–24.

48. Cheekatla SS, Aggarwal A, Naik S. mTOR signaling pathway regulates the IL-12/IL-10 axis in Leishmania donovani infection. Med Microbiol Immunol. 2012 Feb;201(1):37–46.

49. Ballou LR, Laulederkind SJF, Rosloniec EF, Raghow R. Ceramide signalling and the immune response. Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab. 1996;1301(3):273–87.

50. Ghosh S, Bhattacharyya S, Das S, Raha S, Maulik N, Das DK, et al. Generation of ceramide in murine macrophages infected with *Leishmania donovani* alters macrophage signaling events and aids intracellular parasitic survival. Mol Cell Biochem. 2001 Jul;223(1–2):47–60.

51. Ghosh S, Bhattacharyya S, Sirkar M, Sa GS, Das T, Majumdar D, et al. *Leishmania donovani* Suppresses Activated Protein 1 and NF- B Activation in Host Macrophages via Ceramide Generation: Involvement of Extracellular Signal-Regulated Kinase. Infect Immun. 2002 Dec 1;70(12):6828–38.

52. Swanson MS, Fernandez-Moreira E, Fernandez-Moreia E. A microbial strategy to multiply in macrophages: the pregnant pause. Traffic. 2002 Mar;3(3):170–7.

53. Burchmore RJS, Barrett MP. Life in vacuoles - Nutrient acquisition by Leishmania amastigotes. Int J Parasitol. 2001;31(12):1311–20.

54. McConville MJ, de Souza D, Saunders E, Likic VA, Naderer T. Living in a phagolysosome; metabolism of Leishmania amastigotes. Trends Parasitol. 2007 Aug;23(8):368–75.

55. Naderer T, McConville MJ. The Leishmania-macrophage interaction: a metabolic perspective. Cell Microbiol. 2007 Dec 9;10(2):301–8.

56. Zhang O, Wilson MC, Xu W, Hsu F-F, Turk J, Kuhlmann FM, et al. Degradation of Host Sphingomyelin Is Essential for Leishmania Virulence. Kim K, editor. PLoS Pathog. 2009 Dec 11;5(12):e1000692.

57. Xu W, Xin L, Soong L, Zhang K. Sphingolipid degradation by *Leishmania major* is required for its resistance to acidic pH in the mammalian host. Infect Immun. 2011;79(8):3377–87.

58. Saunders EC, Ng WW, Kloehn J, Chambers JM, Ng M, McConville MJ. Induction of a Stringent Metabolic Response in Intracellular Stages of *Leishmania mexicana* Leads to Increased Dependence on Mitochondrial Metabolism. PLoS Pathog. 2014;10(1).

59. Opperdoes FR, Coombs GH. Metabolism of Leishmania: proven and predicted. Trends Parasitol. 2007;23(4):149–58.

60. Hart DT, Coombs GH. *Leishmania mexicana*: energy metabolism of amastigotes and promastigotes. Exp Parasitol. 1982 Dec;54(3):397–409.

61. Burchmore RJS, Rodriguez-Contreras D, McBride K, Merkel P, Barrett MP, Modi G, et al. Genetic characterization of glucose transporter function in *Leishmania mexicana*. Proc Natl Acad Sci. 2003;100(7):3901–6.

62. Feng X, Rodriguez-Contreras D, Buffalo C, Bouwer HGA, Kruvand E, Beverley SM, et al. Amplification of an alternate transporter gene suppresses the avirulent phenotype of glucose transporter null mutants in *Leishmania mexicana*. Mol Microbiol. 2009;71(2):369–81.

63. Naderer T, Heng J, McConville MJ. Evidence that intracellular stages of *Leishmania major* utilize amino sugars as a major carbon source. PLoS Pathog. 2010;6(12).

64. Rodriguez-Contreras D, Feng X, Keeney KM, Bouwer HGA, Landfear SM. Phenotypic characterization of a glucose transporter null mutant in *Leishmania mexicana*. Mol Biochem Parasitol. 2007;153(1):9–18.

65. Naderer T, McConville MJ. Intracellular growth and pathogenesis of Leishmania parasites. Essays Biochem. 2011;51:81–95.

66. Bekaert ED, Kallel R, Bouma ME, Lontie JF, Mebazaa A, Malmendier CL, et al. Plasma lipoproteins in infantile visceral Leishmaniasis: deficiency of apolipoproteins A-I and A-II. Clin Chim Acta. 1989;184(2):181–91.

67. Bekaert ED, Dole E, Dubois DY, Bouma ME, Lontie JF, Kallel R, et al. Alterations in lipoprotein density classes in infantile visceral leishmaniasis: presence of apolipoprotein SAA. Eur J Clin Invest. 1992 Mar;22(3):190–9.

68. Nieto CG, Barrera R, Habela MA, Navarrete I, Molina C, Jiménez A, et al. Changes in the plasma concentrations of lipids and lipoprotein fractions in dogs infected with *Leishmania infantum*. Vet Parasitol. 1992;44(3–4):175–82.

69. Liberopoulos E, Alexandridis G, Bairaktari E, Elisaf M. Severe hypocholesterolemia with reduced serum Lipoprotein(a) in a patient with visceral leishmaniasis. Ann Clin Lab Sci. 2002;32(3):305–8.

70. Liberopoulos EN, Apostolou F, Gazi IF, Kostara C, Bairaktari ET, Tselepis AD, et al. Visceral leishmaniasis is associated with marked changes in serum lipid profile. Eur J Clin Invest. 2014;44(8):719–27.

71. Lal CS, Kumar A, Kumar S, Pandey K, Kumar N, Bimal S, et al. Hypocholesterolemia and increased triglyceride in pediatric visceral leishmaniasis. Clin Chim Acta. 2007;382(1–2):151–3.

72. Soares NM, Leal TF, Fiúza MC, Reis EAG, Souza MAL, Dos-Santos WL, et al. Plasma lipoproteins in visceral leishmaniasis and their effect on Leishmania-infected macrophages. Parasite Immunol. 2010;32(4):259–66.

73. Carvalho MDT, Alonso DP, Vendrame CMV, Costa DL, Costa CHN, Werneck GL, et al. Lipoprotein lipase and PPAR alpha gene polymorphisms, increased very-low-density lipoprotein levels, and decreased high-density lipoprotein levels as risk markers for the development of visceral leishmaniasis by *Leishmania infantum*. Mediators Inflamm. 2014;2014(Vl).

74. Santos AMR dos. Efeito das lipoproteínas plasmáticas no parasitismo de células monocíticas humanas infectadas com *Leishmania Leishmania infantum*. Universidade de São Paulo; 2016.

75. Pucadyil TJ, Tewary P, Madhubala R, Chattopadhyay A. Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: Implications in leishmaniasis. Mol Biochem Parasitol. 2004;133(2):145–52.

76. Tewary P, Veena K, Pucadyil TJ, Chattopadhyay A, Madhubala R. The sterol-binding antibiotic nystatin inhibits entry of non-opsonized *Leishmania donovani* into macrophages. Biochem Biophys Res Commun. 2006;339(2):661–6.

77. Chakraborty D, Banerjee S, Sen A, Banerjee KK, Das P, Roy S. *Leishmania donovani* Affects Antigen Presentation of Macrophage by Disrupting Lipid Rafts. J Immunol. 2005;175(5):3214–24.

78. Pucadyil TJ, Chattopadhyay A. Cholesterol: a potential therapeutic target in Leishmania infection? Trends Parasitol. 2007;23(2):49–53.

79. Sen S, Roy K, Mukherjee S, Mukhopadhyay R, Roy S. Restoration of IFNγR subunit assembly, ifnγ signaling and parasite clearance in *Leishmania donovani* infected macrophages: Role of membrane cholesterol. PLoS Pathog. 2011;7(9).

80. Passarelli M. Lipoproteínas. In: Quintão ECR, Passarelli M, Nakandakare ER, editors. Lípides: do metabolismo à aterosclerose. 1ª Edição. São Paulo: Sarvier; 2011. p. 633.

81. Neyen CD, Gordon S. Macrophages in Lipid and Immune Homeostasis. In: eLS. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2014.

82. Remmerie A, Scott CL. Macrophages and lipid metabolism. Cell Immunol. 2018 Aug;330(January):27–42.

83. O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. Nat Rev Immunol. 2016 Sep 11;16(9):553–65.

84. Feingold KR, Shigenaga JK, Kazemi MR, McDonald CM, Patzek SM, Cross AS, et al. Mechanisms of triglyceride accumulation in activated macrophages. J Leukoc Biol. 2012;92(4):829–39.

85. He P-P, Jiang T, OuYang X-P, Liang Y-Q, Zou J-Q, Wang Y, et al. Lipoprotein lipase: Biosynthesis, regulatory factors, and its role in atherosclerosis and other diseases. Clin Chim Acta. 2018 May;480(September 2017):126–37.

86. Grabner GF, Zimmermann R, Schicho R, Taschler U. Monoglyceride lipase as a drug target: At the crossroads of arachidonic acid metabolism and endocannabinoid signaling. Pharmacol Ther. 2017 Jul;175:35–46.

87. Castrillo A, Tontonoz P. Nuclear receptors in macrophage biology: At the Crossroads of Lipid Metabolism and Inflammation. Annu Rev Cell Dev Biol. 2004 Nov;20(1):455–80.

88. Ito A, Hong C, Rong X, Zhu X, Tarling EJ, Hedde PN, et al. LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. Elife. 2015 Jul 14;4(July 2015):1–23.

89. Chawla A. Control of macrophage activation and function by PPARs. Circ Res. 2010 May 28;106(10):1559–69.

90. Shimano H, Sato R. SREBP-regulated lipid metabolism: Convergent physiology-divergent pathophysiology. Nat Rev Endocrinol. 2017;13(12):710–30.

91. Hubler MJ, Kennedy AJ. Role of lipids in the metabolism and activation of immune cells. J Nutr Biochem. 2016 Aug;34:1–7.

92. Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J. Dual RNA-seq of pathogen and host. Nat Rev Microbiol. 2012;10(9):618–30.

93. Veras PST, Ramos PIP, de Menezes JPB. In Search of Biomarkers for Pathogenesis and Control of Leishmaniasis by Global Analyses of Leishmania-Infected Macrophages. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8(September):1–18.

94. Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T. Transcriptomics technologies. PLoS Comput Biol. 2017;13(5):1–23.

95. Levy SE, Myers RM. Advancements in Next-Generation Sequencing. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2016;17(1):95–115.

96. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. Nat Rev Genet. 2009 Jan 1;10(1):57–63.

97. Bumgarner R. Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. Curr Protoc Mol Biol. 2013 Jan;Chapter 22(206):Unit 22.1.

98. Rabhi I, Rabhi S, Ben-Othman R, Rasche A, Consortium S, Daskalaki A, et al. Transcriptomic Signature of Leishmania Infected Mice Macrophages: A Metabolic Point of View. Traub-Csekö YM, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2012 Aug 21;6(8):e1763.

99. Osorio y Fortea J, de La Llave E, Regnault B, Coppee J-Y, Milon G, Lang T, et al. Transcriptional signatures of BALB/c mouse macrophages housing multiplying *Leishmania amazonensis* amastigotes. BMC Genomics. 2009;10(1):119.

100. Ramírez C, Díaz-Toro Y, Tellez J, Castilho TM, Rojas R, Ettinger NA, et al. Human Macrophage Response to *L. (Viannia) panamensis*: Microarray Evidence for an Early Inflammatory Response. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(10).

101. Sousa R, Andrade VM, Bair T, Ettinger NA, Guimarães L, Andrade L, et al. Early Suppression of Macrophage Gene Expression by *Leishmania braziliensis*. Front Microbiol. 2018 Oct 15;9(October):1–16.

102. Ovalle-Bracho C, Franco-Muñoz C, Londoño-Barbosa D, Restrepo-Montoya D, Clavijo-Ramírez C. Changes in Macrophage Gene Expression Associated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection. PLoS One. 2015;10(6):e0128934.

103. Gardinassi LG, Garcia GR, Costa CHN, Costa Silva V, de Miranda Santos IKF. Blood Transcriptional Profiling Reveals Immunological Signatures of Distinct States of Infection of Humans with *Leishmania infantum*. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(11):1–24.

104. Kukurba KR, Montgomery SB. RNA Sequencing and Analysis. Cold Spring Harb Protoc. 2015 Apr 13;2015(11):951–69.

105. Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. Genome Biol. 2016 Dec 26;17(1):13.

106. Liu Y, Zhou J, White KP. RNA-seq differential expression studies: More sequence or more replication? Bioinformatics. 2014;30(3):301–4.

107. Wang Y, Ghaffari N, Johnson CD, Braga-Neto UM, Wang H, Chen R, et al. Evaluation of the coverage and depth of transcriptome by RNA-Seq in chickens. BMC Bioinformatics. 2011;12(SUPPL. 10):0–6.

108. Westermann AJ, Förstner KU, Amman F, Barquist L, Chao Y, Schulte LN, et al. Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host-pathogen interactions. Nature. 2016;529(7587):496–501.

109. Westermann AJ, Barquist L, Vogel J. Resolving host–pathogen interactions by dual RNA-seq. PLoS Pathog. 2017;13(2):1–19.

110. Inbar E, Hughitt VK, Dillon LAL, Ghosh K, El-Sayed NM, Sacks DL. The transcriptome of *Leishmania major* developmental stages in their natural sand fly vector. MBio. 2017;8(2):1–18.

111. Dillon LAL, Suresh R, Okrah K, Corrada Bravo H, Mosser DM, El-Sayed NM. Simultaneous transcriptional profiling of *Leishmania major* and its murine macrophage host cell reveals insights into host-pathogen interactions. BMC Genomics. 2015 Dec 29;16(1):1108.

112. Fernandes MC, Dillon LAL, Belew AT, Bravo HC, Mosser DM, El-Sayed NM. Dual Transcriptome Profiling of Leishmania-Infected Human Macrophages Reveals Distinct Reprogramming Signatures. MBio. 2016 Jul 6;7(3):1–16.

113. Christensen SM, Dillon LAL, Carvalho LP, Passos S, Novais FO, Hughitt VK, et al. Meta-transcriptome Profiling of the Human-*Leishmania braziliensis* Cutaneous Lesion. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(9):1–17.

114. Han Y, Gao S, Muegge K, Zhang W, Zhou B. Advanced Applications of RNA Sequencing and Challenges. Bioinform Biol Insights. 2015;9(Suppl 1):29–46.

115. Ballouz S, Verleyen W, Gillis J. Guidance for RNA-seq co-expression network construction and analysis: safety in numbers. Bioinformatics. 2015 Jul 1;31(13):2123–30.

116. Oliver S. Guilt-by-association goes global. Nature. 2000 Feb 10;403(6770):601–3.

117. van Dam S, Võsa U, van der Graaf A, Franke L, de Magalhães JP. Gene co-expression analysis for functional classification and gene-disease predictions. Brief Bioinform. 2018;19(4):575–92.

118. Zhang B, Horvath S. A General Framework for Weighted Gene Co-Expression Network Analysis. Stat Appl Genet Mol Biol. 2005;4(1).

119. Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. BMC Bioinformatics. 2008;9(1):559.

120. Tseng GC, Sibille E, Gaiteri C, Ding Y, French B. Beyond modules and hubs: the potential of gene coexpression networks for investigating molecular mechanisms of complex brain disorders. Genes, Brain Behav. 2013;13(1):13–24.

121. Ruzzo A, Cacciamani T, Principato G, Righetti A, Piva F, Giulietti M, et al. Emerging Biomarkers in Bladder Cancer Identified by Network Analysis of Transcriptomic Data. Front Oncol. 2018;8(October):1–8.

122. Chen L, Yuan L, Wang Y, Wang G, Zhu Y, Cao R, et al. Co-expression network analysis identified FCER1G in association with progression and prognosis in human clear cell renal cell carcinoma. Int J Biol Sci. 2017;13(11):1361–72.

123. Maschietto M, Tahira AC, Puga R, Lima L, Mariani D, Da Silveira Paulsen B, et al. Co-expression network of neural-differentiation genes shows specific pattern in schizophrenia Bioinformatic and algorithmical studies. BMC Med Genomics. 2015;8(1):1–15.

124. Voigt EA, Grill DE, Zimmermann MT, Simon WL, Ovsyannikova IG, Kennedy RB, et al. Transcriptomic signatures of cellular and humoral immune responses in older adults after seasonal influenza vaccination identified by data-driven clustering. Sci Rep. 2018;8(1):739.

125. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). Int J Cancer. 1980;26(2):171–6.

126. Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, et al. Ensembl 2018. Nucleic Acids Res. 2018 Jan 4;46(D1):D754–61.

127. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. Nucleic Acids Res. 2015;43(7):e47.

128. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles G V., et al. Enrichr: Interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. BMC Bioinformatics. 2013;14.

129. Kuleshov M V., Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. Nucleic Acids Res. 2016 Jul 8;44(W1):W90–7.

130. Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Nucleic Acids Res. 1999 Jan 1;27(1):29–34.

131. Diehn M, Sherlock G, Binkley G, Jin H, Matese JC, Hernandez-Boussard T, et al. SOURCE: A unified genomic resource of functional annotations, ontologies, and gene expression data. Nucleic Acids Res. 2003;31(1):219–23.

132. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses. Curr Protoc Bioinforma. 2016;2016(6):1.30.1-1.30.33.

133. Organização Pan-Americana Saúde. Leishmanioses: Informe epidemiológico das américas, feveirero 2018. World Health Organ. 2018;7.

134. Ghalib HW, Whittle JA, Kubin M, Hashim FA, El-Hassan AM, Grabstein KH, et al. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. J Immunol. 1995;154(9):4623–9.

135. Holaday BJ, Pompeu MMDL, Jeronimo S, Texeira MJ, De Queiroz Sousa A, Vasconcelos AW, et al. Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala azar. J Clin Invest. 1993;92(6):2626–32.

136. Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva LDA, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, et al. Immune response in human visceral leishmaniasis: Analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. Scand J Immunol. 2005;62(5):487–95.

137. Alexander J, Russell DG. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. Adv Parasitol. 1992;31(C):175–254.

138. Chang KP, Nacy CA, Pearson RD. Intracellular Parasitism of Macrophages in Leishmaniasis: In Vitro Systems and Their Applications. Methods Enzymol. 1986;132(C):603–26.

139. Ogunkolade BW, Colomb-Valet I, Monjour L, Rhodes-Feuillette A, Abita JP, Frommel D. Interactions between the human monocytic leukaemia THP-1 cell line and Old and New World species of *Leishmania*. Acta Trop. 1990;47(3):171–6.

140. Siqueira-Neto JL, Moon S, Jang J, Yang G, Lee C, Moon HK, et al. An image-based high-content screening assay for compounds targeting intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in human macrophages. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(6).

141. Seifert K, Escobar P, Croft SL. In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. J Antimicrob Chemother. 2010;65(3):508–11.

142. Ozsolak F, Milos PM. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. Nat Rev Genet. 2011 Feb;12(2):87–98.

143. Iniesta V, Carcelen J, Molano I, Peixoto PM V., Redondo E, Parra P, et al. Arginase I Induction during *Leishmania major* Infection Mediates the Development of Disease. Infect Immun. 2005 Sep 1;73(9):6085–90.

144. Goto H, Gomes CM, Corbett CE, Monteiro HP, Gidlund M. Insulin-like growth factor I is a growth-promoting factor for Leishmania promastigotes and amastigotes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(22):13211–6.

145. Vendrame CMV, Carvalho MDT, Tempone AG, Goto H. Insulin-like growth factor-I induces arginase activity in *Leishmania amazonensis* amastigote-infected macrophages through a cytokine-independent mechanism. Mediators Inflamm. 2014;2014:475919.

146. Courret N, Frehel C, Gouhier N, Pouchelet M, Prina E, Roux P, et al. Biogenesis of Leishmania-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. J Cell Sci. 2002;115(Pt 11):2303–16.

147. Katholnig K, Linke M, Pham H, Hengstschläger M, Weichhart T. Immune responses of macrophages and dendritic cells regulated by mTOR signalling. Biochem Soc Trans. 2013 Aug 1;41(4):927–33.

148. Walmsley S, Harris A, Thompson AAR, Whyte MKB. HIF-mediated innate immune responses: cell signaling and therapeutic implications. Hypoxia. 2014 May;47.

149. De Craene JO, Bertazzi DL, Bär S, Friant S. Phosphoinositides, major actors in membrane trafficking and lipid signaling pathways. Int J Mol Sci. 2017;18(3).

150. Podinovskaia M, Descoteaux A. Leishmania and the macrophage : a multifaceted interaction. Future Microbiol. 2015;10(1):111–29.

151. Prives C, Hall PA. The P53 pathway. J Pathol. 1999;187(1):112–26.

152. Weichhart T. MTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. Gerontology. 2018;64(2):127–34.

153. Kip AE, Balasegaram M, Beijnen JH, Schellens JHM, De Vries PJ, Dorloa TPC. Systematic review of biomarkers to monitor therapeutic response in leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(1):1–14.

154. MacLennan NK, Dong J, Aten JE, Horvath S, Rahib L, Ornelas L, et al. Weighted gene co-expression network analysis identifies biomarkers in glycerol kinase deficient mice. Mol Genet Metab. 2009;98(1–2):203–14.

155. Rosado IV, Dez C, Lebaron S, Caizergues-Ferrer M, Henry Y, de la Cruz J. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Npa2p (Urb2p) Reveals a Low-Molecular-Mass Complex Containing Dbp6p, Npa1p (Urb1p), Nop8p, and Rsa3p Involved in Early Steps of 60S Ribosomal Subunit Biogenesis. Mol Cell Biol. 2007;27(4):1207–21.

156. Kaser A, Bogengruber E, Hallegger M, Doppler E, Lepperdinger G, Jantsch M, et al. Brix from *Xenopus laevis* and Brx1p from yeast define a new family of proteins involved in the biogenesis of large ribosomal subunits. Biol Chem. 2001;382(12):1637–47.

157. de Vries H, Rüegsegger U, Hübner W, Friedlein A, Langen H, Keller W. Human pre-mRNA cleavage factor II(m) contains homologs of yeast proteins and bridges two other cleavage factors. EMBO J. 2000;19(21):5895–904.

158. Brzezicha B, Schmidt M, Makałowska I, Jarmołowski A, Pieńkowska J, Szweykowska-Kulińska Z. Identification of human tRNA: m5C methyltransferase catalysing intron-dependent m5C formation in the first position of the anticodon of the pre-tRNA(CAA)Leu. Nucleic Acids Res. 2006;34(20):6034–43.

159. Contreras I, Gómez MA, Nguyen O, Shio MT, McMaster RW, Olivier M. Leishmania-induced inactivation of the macrophage transcription Factor AP-1 Is Mediated by the Parasite Metalloprotease GP63. PLoS Pathog. 2010;6(10).

160. Jaramillo M, Gomez MA, Larsson O, Shio MT, Topisirovic I, Contreras I, et al. Leishmania repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. Cell Host Microbe. 2011;9(4):331–41.

161. Beyenbach KW. The V-type H+ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. J Exp Biol. 2006;209(4):577–89.

162. Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, Rubinstein M. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. Immunity. 1999 Jan 12;10(1):127–36.

163. Ontoria E, Hernández-Santana YE, González-García AC, López MC, Valladares B, Carmelo E. Transcriptional Profiling of Immune-Related Genes in *Leishmania infantum*-Infected Mice: Identification of Potential Biomarkers of Infection and Progression of Disease. Front Cell Infect Microbiol. 2018 Jun 26;8(June):1–16.

164. Gumienny TL, Brugnera E, Tosello-Trampont AC, Kinchen JM, Haney LB, Nishiwaki K, et al. CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. Cell. 2001 Oct 5;107(1):27–41.

165. Das S, Sarkar A, Choudhury SS, Owen KA, Castillo V, Fox S, et al. ELMO1 has an essential role in the internalization of *Salmonella typhimurium* into enteric macrophages that impacts disease outcome. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2015 Apr 1;1(3):311–24.

166. Sarkar A, Tindle C, Pranadinata RF, Reed S, Eckmann L, Stappenbeck TS, et al. ELMO1 Regulates Autophagy Induction and Bacterial Clearance During Enteric Infection. J Infect Dis. 2017 Dec 19;216(12):1655–66.

167. Dauphinee SM, Clayton A, Hussainkhel A, Yang C, Park Y-J, Fuller ME, et al. SASH1 Is a Scaffold Molecule in Endothelial TLR4 Signaling. J Immunol. 2013;191(2):892–901.

168. Kennedy AE, Ozbek U, Dorak MT. What has GWAS done for HLA and disease associations? Int J Immunogenet. 2017 Oct;44(5):195–211.

169. Fakiola M, Strange A, Cordell HJ, Miller EN, Pirinen M, Su Z, et al. Common variants in the HLA-DRB1-HLA-DQA1 HLA class II region are associated with susceptibility to visceral leishmaniasis. Nat Genet. 2013;45(2):208–13.

170. Vernet C, Ribouchon MT, Chimini G, Jouanolle AM, Sidibé I, Pontarotti P. A novel coding sequence belonging to a new multicopy gene family mapping within the human MHC class I region. Immunogenetics. 1993;38(1):47–53.

171. Liu Y, Helms C, Liao W, Zaba LC, Duan S, Gardner J, et al. A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. PLoS Genet. 2008;4(4).

172. Lange CM, Bibert S, Dufour JF, Cellerai C, Cerny A, Heim MH, et al. Comparative genetic analyses point to HCP5 as susceptibility locus for HCV-associated hepatocellular carcinoma. J Hepatol. 2013;59(3):504–9.

173. Chaplin DD. Overview of the immune response. J Allergy Clin Immunol. 2010;125(2 SUPPL. 2):S3–23.

174. Duque GA, Descoteaux A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. Front Immunol. 2014;5(OCT):1–12.

175. Nakao M, Nomiyama H, Shimada K. Structures of human genes coding for cytokine LD78 and their expression. Mol Cell Biol. 1990;10(7):3646–58.

176. Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. Cytokine Growth Factor Rev. 2002 Dec;13(6):455–81.

177. Menten P, Struyf S, Schutyser E, Wuyts A, De Clercq E, Schols D, et al. The LD78β isoform of MIP-1α is the most potent CCR5 agonist and HIV-1–inhibiting chemokine. J Clin Invest. 1999 Aug 15;104(4):R1–5.

178. Aquaro S, Menten P, Struyf S, Proost P, Van Damme J, De Clercq E, et al. The LD78beta isoform of MIP-1alpha is the most potent CC-chemokine in inhibiting CCR5-dependent human immunodeficiency virus type 1 replication in human macrophages. J Virol. 2001;75(9):4402–6.

179. Dasgupta B, Roychoudhury K, Ganguly S, Akbar MA, Das P, Roy S. Infection of human mononuclear phagocytes and macrophage-like THP1 cells with *Leishmania donovani* results in modulation of expression of a subset of chemokines and a chemokine receptor. Scand J Immunol. 2003;57(4):366–74.

180. Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barral-Netto M, Barral A. Chemokines in host–parasite interactions in leishmaniasis. Trends Parasitol. 2006 Jan;22(1):32–40.

181. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. Cell. 1990 Jun;61(7):1303–13.

182. Puré E, Cuff CA. A crucial role for CD44 in inflammation. Trends Mol Med. 2001 May;7(5):213–21.

183. Oliferenko S, Paiha K, Harder T, Gerke V, Schwärzler C, Schwarz H, et al. Analysis of Cd44-Containing Lipid Rafts. J Cell Biol. 1999 Aug 23;146(4):843–54.

184. Leemans JC, Florquin S, Heikens M, Pals ST, Neut R van der, van der Poll T. CD44 is a macrophage binding site for *Mycobacterium tuberculosis* that mediates macrophage recruitment and protective immunity against tuberculosis. J Clin Invest. 2003 Mar 1;111(5):681–9.

185. Amash A, Wang L, Wang Y, Bhakta V, Fairn GD, Hou M, et al. CD44 Antibody Inhibition of Macrophage Phagocytosis Targets Fcγ Receptor– and Complement Receptor 3–Dependent Mechanisms. J Immunol. 2016;196(8):3331–40.

186. Rodriguez NE, Gaur U, Wilson ME. Role of caveolae in *Leishmania chagasi* phagocytosis and intracellular survival in macrophages. Cell Microbiol. 2006 Jul;8(7):1106–20.

187. Telerman A, Amson R, Zakut-Houri R, Givol D. Identification of the human pim-1 gene product as a 33-kilodalton cytoplasmic protein with tyrosine kinase activity. Mol Cell Biol. 1988;8(4):1498–503.

188. Bachmann M, Möröy T. The serine/threonine kinase Pim-1. Int J Biochem Cell Biol. 2005;37(4):726–30.

189. Peltola KJ. Pim-1 kinase inhibits STAT5-dependent transcription via its interactions with SOCS1 and SOCS3. Blood. 2004 May 15;103(10):3744–50.

190. Bertholet S, Dickensheets HL, Sheikh F, Gam AA, Donnelly RP, Kenney RT. *Leishmania donovan*i-Induced Expression of Suppressor of Cytokine Signaling 3 in Human Macrophages: a Novel Mechanism for Intracellular Parasite Suppression of Activation. Infect Immun. 2003 Apr 1;71(4):2095–101.

191. Soares-Silva M, Diniz FF, Gomes GN, Bahia D. The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by Trypanosomatids. Front Microbiol. 2016 Feb 24;7(FEB).

192. Huang G, Shi LZ, Chi H. Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination. Cytokine. 2009;48(3):161–9.

193. ZARUBIN T, HAN J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. Cell Res. 2005 Jan 1;15(1):11–8.

194. Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, et al. Characterization of the Structure and Function of the Fourth Member of p38 Group Mitogen-activated Protein Kinases, p38δ. J Biol Chem. 1997 Nov 28;272(48):30122–8.

195. Hale KK, Trollinger D, Rihanek M, Manthey CL. Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. J Immunol. 1999 Apr 1;162(7):4246–52.

196. Greenlee-Wacker MC, Galvan MD, Bohlson SS. CD93: recent advances and implications in disease. Curr Drug Targets. 2012 Mar;13(3):411–20.

197. Bohlson SS, Silva R, Fonseca MI, Tenner AJ. CD93 Is Rapidly Shed from the Surface of Human Myeloid Cells and the Soluble Form Is Detected in Human Plasma. J Immunol. 2005 Jul 15;175(2):1239–47.

198. Sigari N, Jalili A, Mahdawi L, Ghaderi E, Shilan M. Soluble CD93 as a Novel Biomarker in Asthma Exacerbation. Allergy Asthma Immunol Res. 2016;8(5):461.

199. Park HJ, Han H, Lee SC, Son YW, Sim DW, Park KH, et al. Soluble CD93 in Serum as a Marker of Allergic Inflammation. Yonsei Med J. 2017;58(3):598.

200. Youn J-C, Yu HT, Jeon J-W, Lee HS, Jang Y, Park YW, et al. Soluble CD93 Levels in Patients with Acute Myocardial Infarction and Its Implication on Clinical Outcome. Guo Y, editor. PLoS One. 2014 May 6;9(5):e96538.

201. Greenlee MC, Sullivan SA, Bohlson SS. Detection and characterization of soluble CD93 released during inflammation. Inflamm Res. 2009 Dec 15;58(12):909–19.

202. Jeon J-W, Jung J-G, Shin E-C, Choi HI, Kim HY, Cho M-L, et al. Soluble CD93 Induces Differentiation of Monocytes and Enhances TLR Responses. J Immunol. 2010;185(8):4921–7.

203. Elkington PTG, O'Kane CM, Friedland JS. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. Clin Exp Immunol. 2005 Oct;142(1):12–20.

204. Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression. Biochim Biophys Acta - Rev Cancer [Internet]. 2012;1825(1):29–36.

205. Webster NL, Crowe SM. Matrix metalloproteinases, their production by monocytes and macrophages and their potential role in HIV-related diseases. J Leukoc Biol. 2006 Nov;80(5):1052–66.

206. Stearns ME, Wang M, Hu Y, Garcia FU, Rhim J. Interleukin 10 blocks matrix metalloproteinase-2 and membrane type 1-matrix metalloproteinase synthesis in primary human prostate tumor lines. Clin Cancer Res. 2003 Mar;9(3):1191–9.

207. Maretti-Mira AC, De Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, De Oliveira MP, Craft N, Pirmez C. Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. Clin Exp Immunol. 2011;163(2):207–14.

208. Campos TM, Passos ST, Novais FO, Beiting DP, Costa RS, Queiroz A, et al. Matrix Metalloproteinase 9 Production by Monocytes is Enhanced by TNF and Participates in the Pathology of Human Cutaneous Leishmaniasis. McDowell MA, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Nov 13;8(11):e3282.

209. Melo GD, Goyard S, Fiette L, Boissonnas A, Combadiere C, Machado GF, et al. Unveiling Cerebral Leishmaniasis: parasites and brain inflammation in *Leishmania donovani* infected mice. Sci Rep. 2017 Dec 16;7(1):8454.

210. Stearns ME, Kim G, Garcia F, Wang M. Interleukin-10 induced activating transcription factor 3 transcriptional suppression of matrix metalloproteinase-2 gene expression in human prostate CPTX-1532 Cells. Mol Cancer Res. 2004 Jul;2(7):403–16.

211. Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ. Leukotrienes: Underappreciated Mediators of Innate Immune Responses. J Immunol. 2005;174(2):589–94.

212. Di Gennaro A, Haeggström JZ. The leukotrienes: immune-modulating lipid mediators of disease. Adv Immunol. 2012;116:51–92.

213. Morato CI, da Silva IA, Borges AF, Dorta ML, Oliveira MAP, Jancar S, et al. Essential role of leukotriene B4 on *Leishmania (Viannia) braziliensis* killing by human macrophages. Microbes Infect. 2014 Nov;16(11):945–53.

214. Chaves MM, Marques-da-Silva C, Monteiro APT, Canetti C, Coutinho-Silva R. Leukotriene B4 Modulates P2X7 Receptor-Mediated *Leishmania amazonensis* Elimination in Murine Macrophages. J Immunol. 2014 May 15;192(10):4765–73.

215. Sacramento LA, Cunha FQ, de Almeida RP, da Silva JS, Carregaro V. Protective Role of 5-Lipoxigenase during *Leishmania infantum* Infection Is Associated with Th17 Subset. Biomed Res Int. 2014;2014:1–12.

216. Panis C, Longo T, Zortéa C, Costa F, Jacob V, Lúcia V, et al. Experimental Parasitology *Trypanosoma cruzi* : Effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO) -derived leukotrienes on levels of cytokines , nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. Exp Parasitol. 2011;127(1):58–65.

217. Pan G, Bauer JH, Haridas V, Wang S, Liu D, Yu G, et al. Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. FEBS Lett. 1998 Jul 24;431(3):351–6.

218. Liu J, Na S, Glasebrook A, Fox N, Solenberg PJ, Zhang Q, et al. Enhanced CD4+ T Cell Proliferation and Th2 Cytokine Production in DR6-Deficient Mice. Immunity. 2001 Jul;15(1):23–34.

219. Than TT, Tran GVQ, Son K, Park E, Kim S, Lim Y, et al. Ankyrin Repeat Domain 1 is Up-regulated During Hepatitis C Virus Infection and Regulates Hepatitis C Virus Entry. Sci Rep. 2016 Aug 10;6(1):20819.

220. Luong TTD, Tran GVQ, Shin D, Lim Y, Hwang SB. Hepatitis C Virus Exploits Death Receptor 6-mediated Signaling Pathway to Facilitate Viral Propagation. Sci Rep. 2017 Dec 25;7(1):6445.

221. Yang X, Shi B, Li L, Xu Z, Ge Y, Shi J, et al. Death receptor 6 (DR6) is required for mouse B16 tumor angiogenesis via the NF-κB, P38 MAPK and STAT3 pathways. Oncogenesis. 2016 Mar 7;5(3):e206–e206.

222. Bhardwaj S, Srivastava N, Sudan R, Saha B. Leishmania Interferes with Host Cell Signaling to Devise a Survival Strategy. J Biomed Biotechnol. 2010;2010:1–13.

223. Shio MT, Hassani K, Isnard A, Ralph B, Contreras I, Gomez MA, et al. Host Cell Signalling and Leishmania Mechanisms of Evasion. J Trop Med. 2012;2012:1–14.

224. Kazi JU, Kabir NN, Rönnstrand L. Role of SRC-like adaptor protein (SLAP) in immune and malignant cell signaling. Cell Mol Life Sci. 2015 Jul 13;72(13):2535–44.

225. Dragone LL, Shaw LA, Myers MD, Weiss A. SLAP, a regulator of immunoreceptor ubiquitination, signaling, and trafficking. Immunol Rev. 2009;232(1):218–28.

226. Sosinowski T. Src-like Adaptor Protein (SLAP) Is a Negative Regulator of T Cell Receptor Signaling. J Exp Med. 2000 Feb 7;191(3):463–74.

227. Holland S, Liao X, Mendenhall M, Zhou X, Pardo J, Chu P, et al. Functional cloning of Src-like adapter protein-2 (SLAP-2), a novel inhibitor of antigen receptor signaling. J Exp Med. 2001;194(9):1263–76.

228. Giotis ES, Rothwell L, Scott A, Hu T, Talbot R, Todd D, et al. Transcriptomic Profiling of Virus-Host Cell Interactions following Chicken Anaemia Virus (CAV) Infection in an In Vivo Model. Zhou H, editor. PLoS One. 2015 Aug 5;10(8):e0134866.

229. Ghosh J, Bose M, Roy S, Bhattacharyya SN. *Leishmania donovani* Targets Dicer1 to Downregulate miR-122, Lower Serum Cholesterol, and Facilitate Murine Liver Infection. Cell Host Microbe. 2013 Mar;13(3):277–88.

230. Shibata N, Glass CK. Regulation of macrophage function in inflammation and atherosclerosis. J Lipid Res. 2009 Apr;50 Suppl(Supplement):S277-81.

231. Rőszer T, Menéndez-Gutiérrez MP, Cedenilla M, Ricote M. Retinoid X receptors in macrophage biology. Trends Endocrinol Metab. 2013 Sep;24(9):460–8.

232. Vallochi AL, Teixeira L, Oliveira K da S, Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Lipid Droplet, a Key Player in Host-Parasite Interactions. Front Immunol. 2018 May 23;9(MAY).

233. Melo RCN, Dvorak AM. Lipid Body–Phagosome Interaction in Macrophages during Infectious Diseases: Host Defense or Pathogen Survival Strategy? Chitnis CE, editor. PLoS Pathog. 2012 Jul 5;8(7):e1002729.

234. Rodríguez NE, Lockard RD, Turcotte EA, Araújo-Santos T, Bozza PT, Borges VM, et al. Lipid bodies accumulation in *Leishmania infantum*-infected C57BL/6 macrophages. Parasite Immunol. 2017;39(8):e12443.

235. Lecoeur H, Giraud E, Prévost M-C, Milon G, Lang T. Reprogramming Neutral Lipid Metabolism in Mouse Dendritic Leucocytes Hosting Live *Leishmania amazonensis* Amastigotes. McDowell MA, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2013 Jun 13;7(6):e2276.

236. Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. Nat Rev Immunol. 2005;5(7):546–59.

237. Iwamoto D V., Calderwood DA. Regulation of integrin-mediated adhesions. Curr Opin Cell Biol. 2015 Oct;36:41–7.

238. Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Grönholm M. Regulation of integrin activity and signalling. Biochim Biophys Acta - Gen Subj. 2009 Jun;1790(6):431–44.

239. Antonov AS, Kolodgie FD, Munn DH, Gerrity RG. Regulation of Macrophage Foam Cell Formation by αVβ3 Integrin. Am J Pathol. 2004 Jul;165(1):247–58.

240. Antonov AS, Antonova GN, Munn DH, Mivechi N, Lucas R, Catravas JD, et al. αVβ3 integrin regulates macrophage inflammatory responses via PI3 kinase/Akt-dependent NF-κB activation. J Cell Physiol. 2011 Feb;226(2):469–76.

241. Fujimoto K, Shen M, Noshiro M, Matsubara K, Shingu S, Honda K, et al. Molecular Cloning and Characterization of DEC2, a New Member of Basic Helix-Loop-Helix Proteins. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Jan;280(1):164–71.

242. Cho Y, Noshiro M, Choi M, Morita K, Kawamoto T, Fujimoto K, et al. The Basic Helix-Loop-Helix Proteins Differentiated Embryo Chondrocyte (DEC) 1 and DEC2 Function as Corepressors of Retinoid X Receptors. Mol Pharmacol. 2009 Dec 1;76(6):1360–9.

243. Choi SM, Cho HJ, Cho H, Kim KH, Kim JB, Park H. Stra13/DEC1 and DEC2 inhibit sterol regulatory element binding protein-1c in a hypoxia-inducible factor-dependent mechanism. Nucleic Acids Res. 2008;36(20):6372–85.

244. Stulnig TM, Steffensen KR, Gao H, Reimers M, Dahlman-Wright K, Schuster GU, et al. Novel roles of liver X receptors exposed by gene expression profiling in liver and adipose tissue. Mol Pharmacol. 2002 Dec;62(6):1299–305.

245. Degenhardt T, Väisänen S, Rakhshandehroo M, Kersten S, Carlberg C. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha controls hepatic heme biosynthesis through ALAS1. J Mol Biol. 2009 May 1;388(2):225–38.

246. Furuyama K, Kaneko K, Vargas PD. Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis. Tohoku J Exp Med. 2007 Sep;213(1):1–16.

247. Tripodi KEJ, Menendez Bravo SM, Cricco JA. Role of heme and heme-proteins in trypanosomatid essential metabolic pathways. Enzyme Res. 2011;2011(1):873230.

248. Kořený L, Oborník M, Lukeš J. Make It, Take It, or Leave It: Heme Metabolism of Parasites. Knoll LJ, editor. PLoS Pathog. 2013 Jan 17;9(1):e1003088.

249. Prabhu A V., Luu W, Li D, Sharpe LJ, Brown AJ. DHCR7: A vital enzyme switch between cholesterol and vitamin D production. Prog Lipid Res. 2016;64:138–51.

250. Tontonoz P. Transcriptional and Posttranscriptional Control of Cholesterol Homeostasis by Liver X Receptors. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2011 Jan 1;76:129–37.

ANEXO A – ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL DOS MÓDULOS CORRELACIONADOS ÀS AMOSTRAS DOS GRUPOS 6 H E 10 H

Anexo A – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos correlacionados às amostras dos grupos 6 h e 10 h.

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
C06	*Brown*	*Amyotrophic lateral sclerosis*	0,0002795	*MAPK11; PPP3CA; PPP3R1; TOMM40; BAX; RAC1*
		Glucagon signaling pathway	0,0021949	*PPP3CA; PRKAB2; PRKAA1; PPP3R1; SMEK2; PDE3B; CREB5*
		Morphine addiction	0,0057192	*GRK4; PDE3B; PDE4B; ARRB1; ARRB2; PDE7A*
		Shigellosis	0,0059937	*MAPK11; ELMO2; RAC1; VCL; PFN2*
		p53 signaling pathway	0,0077002	*CASP8; RRM2B; MDM2; BAX; MDM4*
		B cell receptor signaling pathway	0,0097184	*PPP3CA; IFITM1; PPP3R1; PTPN6; RAC1*
		VEGF signaling pathway	0,0232682	*MAPK11; PPP3CA; PPP3R1; RAC1*
		Regulation of autophagy	0,0318738	*BECN1; GABARAPL1; PRKAA1*
		Protein processing in endoplasmic reticulum	0,0319359	*TRAM1; BAG2; HSPA4L; BAX; HSPA2; RNF185; SVIP*
		Wnt signaling pathway	0,0417750	*PPP3CA; PPP3R1; CSNK1A1; FZD8; CACYBP; RAC1*
		Endocytosis	0,0429651	*SNX2; GRK4; KIT; MDM2; CHMP3; ARRB1; HSPA2; ARRB2; STAM2*
C06	*Salmon*	*Ribosome*	0,0047570	*RPL30; RPS29; RPL35A; FAU; RPL26; RPS10; RPL7*

Contiuna

Anexo A – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos correlacionados às amostras dos grupos 6 h e 10 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	*Genes*
C06	*Salmon*	*RNA polymerase*	0,0121260	*POLR2B; POLR3F; POLR3H*
		Purine metabolism	0,0174360	*NT5C3B; POLD4; ATIC; POLR2B; POLR3F; POLR3H; GART*
		Pyrimidine metabolism	0,0213020	*NT5C3B; POLD4; POLR2B; POLR3F; POLR3H*
		Oxytocin signaling pathway	0,0325950	*CACNB1; NRAS; PPP3CB; CD38; PRKAG2; MAP2K5*
		One carbon pool by folate	0,0358850	*ATIC; GART*
I06	*Black*	*Transcriptional misregulation in cancer*	0,0002279	*PTCRA; CEBPB; FLT1; DOT1L; ASPSCR1; TRAF1; FOXO1; PBX1; ETV5; AFF1; ZEB1; DDIT3; IL2RB; ITGB7; CD14; BCL2L1*
		Pertussis	0,0006355	*MAPK9; JUN; C5; CFL2; NOD1; CD14; TICAM1; RHOA; MAPK13*
		Focal adhesion	0,0008173	*JUN; FLT1; SRC; CAV1; ITGB3; PARVB; RHOA; ARHGAP35; MAPK9; PAK1; CCND1; PARVG; RAC2; SPP1; COL6A3; ITGB7*
		Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	0,0011327	*DAXX; GPX1; PPP3CC; CAT; TNFRSF1B; MAPK13; BCL2L1*
		FoxO signaling pathway	0,0011771	*PLK3; MAPK9; STK11; BCL2L11; CCND1; CAT; HOMER3; IRS2; FBXO32; SGK1; FOXO1; MAPK13*
		Epithelial cell signaling in H, pylori infection	0,0014342	*LYN; MAPK9; JUN; PAK1; SRC; PLCG2; NOD1; MAPK13*

Continua

Anexo A – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos correlacionados às amostras dos grupos 6 h e 10 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
I06	*Black*	*Neurotrophin signaling pathway*	0,0016382	*MAPK9; JUN; MAPK7; RIPK2; SORT1; MAPKAPK2; MATK; PSEN2; PLCG2; RHOA; MAPK13*
		Platelet activation	0,0018706	*LYN; ADCY9; TBXA2R; SRC; ITGB3; GNAS; PLCG2; ADCY8; ARHGAP35; RHOA; MAPK13*
		GnRH signaling pathway	0,0025274	*MAPK9; JUN; ADCY9; MAPK7; SRC; GNAS; ADCY8; MAP3K4; MAPK13*
		Osteoclast differentiation	0,0034692	*MAPK9; JUN; PPP3CC; CSF1; IFNGR1; ITGB3; NCF4; PLCG2; CYBB; TREM2; MAPK13*
		Shigellosis	0,0046403	*MAPK9; CTTN; RIPK2; SRC; NOD1; WASL; MAPK13*
		Tuberculosis	0,0048838	*PLK3; CEBPB; RIPK2; IFNGR1; SRC; IL10RA; CORO1A; RHOA; MAPK13; CYP27B1; MAPK9; PPP3CC; CD14*
		DNA replication	0,0054785	*POLA1; PRIM2; PRIM1; MCM6; DNA2*
		Salmonella infection	0,0062481	*MAPK9; JUN; IFNGR1; CCL4L1; CCL3L3; WASL; CD14; MAPK13*
		PPAR signaling pathway	0,0064479	*FADS2; MMP1; EHHADH; ACSL5; LPL; CPT1B; PPARD*
		Toll-like receptor signaling pathway	0,0069591	*MAPK9; JUN; CCL4L1; CCL3L3; SPP1; TLR7; CD14; TICAM1; MAPK13*
		Chemokine signaling pathway	0,0073225	*LYN; CCL4L1; SRC; CCL3L3; WASL; ADCY8; GNG12; RHOA; CXCL16; FGR; PAK1; ADCY9; RAC2*
		Rap1 signaling pathway	0,0081939	*FLT1; CSF1; SRC; ITGB3; FPR1; PARD6G; ADCY8; RHOA; RAP1GAP; FYB; MAPK13; ADCY9; RAC2; GNAS*

Continua

Anexo A – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos correlacionados às amostras dos grupos 6 h e 10 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
I06	*Black*	*NF-kappa B signaling pathway*	0,0098873	*LYN; TNFSF14; CCL4L1; PLCG2; TRAF1; CD14; TICAM1; BCL2L1*
		Oxytocin signaling pathway	0,0128931	*JUN; ADCY9; EEF2K; PPP3CC; MAPK7; CCND1; NPR1; SRC; GNAS; ADCY8; RHOA*
		VEGF signaling pathway	0,0131240	*PPP3CC; SRC; MAPKAPK2; PLCG2; RAC2; MAPK13*
		Colorectal cancer	0,0141490	*MSH6; MAPK9; JUN; CCND1; RAC2; RHOA*
		AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	0,0157502	*MAPK9; JUN; CCND1; PIM1; PLCG2; CYBB; FOXO1; MAPK13*
		Longevity regulating pathway - multiple species	0,0163635	*RPTOR; ADCY9; CAT; IRS2; ADCY8; FOXO1*
		Fatty acid metabolism	0,0182117	*FADS2; FASN; EHHADH; ACSL5; CPT1B*
		Other glycan degradation	0,0185977	*FUCA1; MAN2C1; HEXDC*
		Endocytosis	0,0200596	*FLT1; SRC; CAV1; PARD6G; AGAP1; AP2A1; ASAP1; STAM; VPS37B; WASL; RHOA; RABEP1; IL2RB; PSD3; VPS45*
		Regulation of actin cytoskeleton	0,0206580	*CYFIP1; SRC; ITGB3; WASL; GNG12; RHOA; ARHGAP35; PAK1; CFL2; RAC2; NCKAP1L; ITGB7; CD14*

Continua

Anexo A – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos correlacionados às amostras dos grupos 6 h e 10 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
I06	*Black*	*Adipocytokine signaling pathway*	0,0244139	*MAPK9; STK11; ACSL5; IRS2; TNFRSF1B; CPT1B*
		Purine metabolism	0,0264257	*ADCY10; POLA1; PRIM2; ADCY9; NPR1; PRIM1; GMPS; AK4; ADCY8; PAICS; AK9*
		cAMP signaling pathway	0,0268385	*ADCY10; MAPK9; JUN; PAK1; ADCY9; NPR1; RAC2; GNAS; ATP2B2; ADCY8; SSTR2; RHOA*
		Fc gamma R-mediated phagocytosis	0,0295877	*LYN; PAK1; CFL2; PLCG2; RAC2; ASAP1; WASL*
		Glutamatergic synapse	0,0300739	*ADCY9; PPP3CC; GNAS; SLC1A3; HOMER3; ADCY8; GNG12; SHANK3*
		Adherens junction	0,0310412	*FER; YES1; SRC; RAC2; WASL; RHOA*
		Longevity regulating pathway - mammal	0,0311224	*RPTOR; STK11; ADCY9; CAT; IRS2; ADCY8; FOXO1*
		Glycerophospholipid metabolism	0,0327096	*PLA2G12A; PTDSS1; AGPAT9; DGKQ; PLD4; MBOAT2; AGPAT3*
		Regulation of lipolysis in adipocytes	0,0330609	*ADCY9; NPR1; GNAS; IRS2; ADCY8*
		Pancreatic secretion	0,0343499	*PLA2G12A; ADCY9; KCNMA1; GNAS; ATP2B2; ADCY8; RHOA*
		Thyroid hormone signaling pathway	0,0358578	*NCOA2; CCND1; SRC; RCAN2; NCOA3; ITGB3; PLCG2; FOXO1*

Continua

Anexo A – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos correlacionados às amostras dos grupos 6 h e 10 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
I06	*Black*	*Apoptosis*	0,0362088	*ERN1; MAPK9; DAXX; JUN; BCL2L11; CTSL; DDIT3; TRAF1; BCL2L1*
		Inflammatory mediator regulation of TRP channels	0,0377922	*MAPK9; ADCY9; SRC; GNAS; PLCG2; ADCY8; MAPK13*
		Glycerolipid metabolism	0,0401257	*AGPAT9; DGKQ; MBOAT2; LPL; AGPAT3*
		cGMP-PKG signaling pathway	0,0426293	*MEF2A; ADCY9; PPP3CC; NPR1; ADORA3; KCNMA1; IRS2; ATP2B2; ADCY8; RHOA*
		Porphyrin and chlorophyll metabolism	0,0445852	*MMAB; COX15; BLVRB; COX10*
		AMPK signaling pathway	0,0458683	*RPTOR; STK11; EEF2K; CCND1; FASN; IRS2; CPT1B; FOXO1*
		Cytokine-cytokine receptor interaction	0,0466321	*FLT1; TNFSF14; CSF1; IFNGR1; IL11RA; CCL4L1; IL10RA; TNFRSF9; CCL3L3; TNFRSF1B; CXCL16; INHBE; IL2RB; IL21R*
		Chagas disease	0,0494485	*MAPK9; JUN; IFNGR1; CCL3L3; GNAS; TICAM1; MAPK13*
		T cell receptor signaling pathway	0,0494485	*MAPK9; CD4; PAK1; JUN; PPP3CC; RHOA; MAPK13*
I06	*Blue*	*HIF-1 signaling pathway*	0,0058717	*EGLN3; PFKFB3; PRKCB; NOS3; RPS6; PRKCA; ENO2; MTOR; TF; RPS6KB1; MKNK1; ERBB2; HMOX1; TCEB1; TIMP1*

Continua

Anexo A – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos correlacionados às amostras dos grupos 6 h e 10 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
I06	*Blue*	*mTOR signaling pathway*	0,0089669	*RPS6KB1; CAB39L; PRKCB; RPS6KA2; RPS6; PTEN; TSC2; ULK2; PRKCA; MTOR*
		Lysine degradation	0,0100797	*SUV420H2; GCDH; TMLHE; KMT2A; ALDH1B1; SETDB2; SETD7; EHMT1; WHSC1L1*
		Aldosterone synthesis and secretion	0,0271495	*CYB5R2; GMPPB; NANP; CMAS; PGM2; RENBP; FUK; GNE*
		N-Glycan biosynthesis	0,0207575	*CREB3; NR4A1; STAR; CREB3L4; PRKCB; ITPR3; PRKCA; CAMK1; ADCY1; PLCB1; ATF4*
		Glutathione metabolism	0,0287732	*GSTM3; GSTM1; GSTA4; IDH1; GSTP1; SMS; TXNDC12; PGD*
		Inflammatory mediator regulation of TRP channels	0,0438251	*MAPK10; NTRK1; IL1R1; PRKCB; HTR2B; PRKCA; ITPR3; ADCY1; TRPM8; PLA2G6; PLCB1; ASIC1*
		Insulin resistance	0,0442825	*PTPN1; SREBF1; PRKCB; NOS3; PTEN; NR1H3; PPP1R3A; MTOR; MAPK10; CREB3; RPS6KB1; CREB3L4; RPS6KA2*
C10	*Tan*	*Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)*	0,0002795	*MAPK11; PPP3CA; PPP3R1; TOMM40; BAX; RAC1*
		Glucagon signaling pathway	0,0021949	*PPP3CA; PRKAB2; PRKAA1; PPP3R1; SMEK2; PDE3B; CREB5*
		Morphine addiction	0,0057192	*GRK4; PDE3B; PDE4B; ARRB1; ARRB2; PDE7A*
		Shigellosis	0,0059937	*MAPK11; ELMO2; RAC1; VCL; PFN2*

Continua

Anexo A – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos correlacionados às amostras dos grupos 6 h e 10 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
C10	*Tan*	*p53 signaling pathway*	0,0077002	*CASP8; RRM2B; MDM2; BAX; MDM4*
		B cell receptor signaling pathway	0,0097184	*PPP3CA; IFITM1; PPP3R1; PTPN6; RAC1*
		VEGF signaling pathway	0,0232682	*MAPK11; PPP3CA; PPP3R1; RAC1*
		Regulation of autophagy	0,0318738	*BECN1; GABARAPL1; PRKAA1*
		Protein processing in endoplasmic reticulum	0,0319359	*TRAM1; BAG2; HSPA4L; BAX; HSPA2; RNF185; SVIP*
		Wnt signaling pathway	0,0417750	*PPP3CA; PPP3R1; CSNK1A1; FZD8; CACYBP; RAC1*
		Endocytosis	0,0429651	*SNX2; GRK4; KIT; MDM2; CHMP3; ARRB1; HSPA2; ARRB2; STAM2*
C10	*Lightyellow*	*Dilated cardiomyopathy*	0,0287297	*TGFB1; DMD; ADCY6*
		Inflammatory mediator regulation of TRP channels	0,0356663	*P2RY2; BDKRB2; ADCY6*
		Endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption	0,0467703	*BDKRB2; ADCY6*
I10	*Magenta*	*Chagas disease (American trypanosomiasis)*	0,0413834	*TGFB1; GNAL; BDKRB2*
		Phosphatidylinositol signaling system	0,0112603	*TMEM55B; PPIP5K2; IMPAD1; PI4KA; INPP5K; PIK3R2; MTMR7*

C = Controle; I = Infectado.

Conclusão

Anexo B – GENES MARCADORES SELECIONADOS NOS MÓDULOS ASSOCIADOS ÀS AMOSTRAS DOS GRUPOS 6 H E 10 H

Anexo B – Genes marcadores selecionados nos módulos associados às amostras dos grupos 6 h e 10 h

Amostra	**Módulo**	**Gene**	***Gene Significance***	***Module Membership***
C06	*Brown*	*WDR3*	0.79972	0.98583
		SEC24D	0.76209	0.97884
		SLC7A5	0.74720	0.97748
		MCOLN3	-0.81427	-0.97085
		SLC35E1	0.77104	0.96900
		SASH1	0.77952	0.96852
		TAPT1	0.80584	0.96614
		BRIX1	0.76395	0.96067
		EZR	-0.86530	-0.95939
		URB1	0.71014	0.95898
		ARHGEF40	-0.71763	-0.95464
		HEATR1	0.71305	0.95320
		GUCY1A2	-0.88857	-0.94897
		CRIP1	-0.75031	-0.94634
		NSUN2	0.77581	0.94601
		GNL3	0.80889	0.94515
		DIRAS1	-0.72026	-0.94513
		TNFRSF10B	0.78841	0.94491
		ALDH1L2	0.79718	0.94404
		RP11-284F21.7	0.79407	0.94299
C06	*Salmon*	*RP11-864N7.2*	-0.73645	0.97338
		RPS15AP17	-0.74274	0.93421
		RPL13AP5	-0.734965	0.92632
		PRKAR1B	0.75107	-0.89496
		RP11-407G23.2	-0.79374	0.89233

Continua

Anexo B – Genes marcadores selecionados nos módulos associados às amostras dos grupos 6 h e 10 h. Continuação

Amostra	**Módulo**	**Gene**	***Gene Significance***	***Module Membership***
C06	*Salmon*	*PRKAR2A*	-0.71445	0.87886
		EIF2B1	0.74078	-0.86627
		ELMO1	0.83964	-0.83014
		IL6R	-0.87143	0.82263
		DAP3	0.78836	-0.80304
		ZNF350	-0.73724	0.79741
		ATP6V0D2	-0.74397	0.765124
		WDYHV1	0.75272	-0.73452
		MAF	-0.83626	0.72482
I06	*Black*	*NUMB*	0.78420	0.99421
		SYNJ2	0.76158	0.99157
		RGCC	0.82688	0.99147
		LRCH1	0.79967	0.99087
		ITGB3	0.78621	0.98980
		PIM1	0.81865	0.98971
		RP11-350G8.5	0.84360	0.98748
		CYBB	-0.77947	-0.98724
		MAN2C1	-0.78209	-0.98655
		NEDD9	0.79371	0.98554
		PAK1	-0.79631	-0.98514
		JARID2	0.82336	0.98399
		SPSB1	0.84568	0.98388
		TNFRSF1B	0.81698	0.98282
		IL1RN	0.73339	0.98260
		EGR2	0.72795	0.98240
		RND3	0.80166	0.98113
		CCL3L3	0.78537	0.98059
		CSF1	0.81425	0.97858
		KLF6	0.80590	0.97815
I06	*Blue*	*NR1H3*	0.72837	-0.97948
		GALNT1	-0.79175	0.97644
		DHCR7	-0.79997	0.97481

Continua

Anexo B – Genes marcadores selecionados nos módulos associados às amostras dos grupos 6 h e 10 h. Continuação

Amostra	Módulo	Gene	*Gene Significance*	*Module Membership*
I06	*Blue*	*PALLD*	0.83800	-0.97078
		CD44	0.85799	-0.97042
		RALA	0.80406	-0.96695
		ATP6V1H	0.87117	-0.96464
		NUP133	-0.81461	0.96313
		ATF3	0.86734	-0.96272
		MSANTD3	0.82893	-0.96019
		CLIP2	0.83580	-0.95860
		RTN4RL2	0.74068	-0.95609
		BHLHE41	0.68875	-0.95545
		KLHL6	0.84305	-0.95372
		MGLL	0.74648	-0.95315
		QSOX1	-0.74997	0.95161
		PPIE	-0.84026	0.94967
		SNX33	0.77937	-0.94872
		PCYOX1L	-0.85626	0.94655
		ZNF248	-0.78348	0.94622
C10	*Lightyellow*	*ZDHHC1*	-0.84443	0.94399
		COQ2	0.72141	-0.93132
		GAR1	-0.70567	0.93028
		PLEKHB1	-0.81271	0.92350
		C8orf58	-0.71970	0.920446
		CHODL	-0.74535	0.91570
		RNMTL1	-0.76392	0.91469
		FAM84B	-0.72633	0.90296
		TGFB1	-0.80852	0.89653
		GOLGA8B	0.80052	-0.87178
		RAMP1	-0.83177	0.87148
		PCF11	0.81489	-0.86292
		VWA1	0.77419	-0.85144
		TMEM115	-0.75176	0.84199
		RP11-162J8.3	-0.84285	0.84110
		N4BP2L2	0.75556	-0.83133

Continua

Anexo B – Genes marcadores selecionados nos módulos associados às amostras dos grupos 6 h e 10 h. Continuação

Amostra	Módulo	Gene	*Gene Significance*	*Module Membership*
C10	*Lightyellow*	*FRAT2*	-0.71294	0.83090
		PLB1	0.76466	-0.81877
		NOTCH2NL	-0.76177	0.81427
		HCP5	0.72116	-0.80945
C10	*Tan*	*GPATCH2L*	0.74788	0.89908
		ARRB2	-0.77680	-0.88992
		PRKAA1	0.68089	0.88982
		ERGIC2	0.70862	0.88859
		CTSO	0.83742	0.88337
		TRIAP1	-0.72095	-0.86468
		EMC9	-0.79958	-0.85689
		CHCHD2P2	-0.73889	-0.83905
		ZYG11B	0.70879	0.82594
I10	*Magenta*	*PHF20L1*	-0.78248	-0.93369
		CTD-2162K18.4	0.73752	0.92028
		SNRPA	0.71427	0.91244
		ACSL4	-0.82205	-0.91039
		CECR6	0.81926	0.90563
		LGALS9	0.82019	0.90501
		CCDC69	0.80331	0.89692
		CKS2	0.75070	0.88721
		KATNB1	0.76566	0.88214
		ENSA	0.79264	0.87217
		CHCHD10	0.78995	0.86797
		RASA2	-0.76478	-0.84834
		DOLPP1	0.72256	0.84221
		CFL1	0.82800	0.84170

C = Controle; I = Infectado. Conclusão

ANEXO C – EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES MARCADORES SELECIONADOS NOS MÓDULOS ASSOCIADOS ÀS AMOSTRAS DOS GRUPOS 6 H E 10 H

A expressão diferencial dos genes foi calculada utilizando os valores de expressão em log2, comparando-se as amostras Controle e Infectado, e a análise estatística foi realizada utilizando-se o teste *t* de *Student* do software *GraphPad Prism 7*. As diferenças na expressão foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ e estão apontadas nos gráficos com o símbolo asterisco (*).

Grupo 6 h – Genes marcadores dos módulos associados à amostra C06

Módulo *Brown*

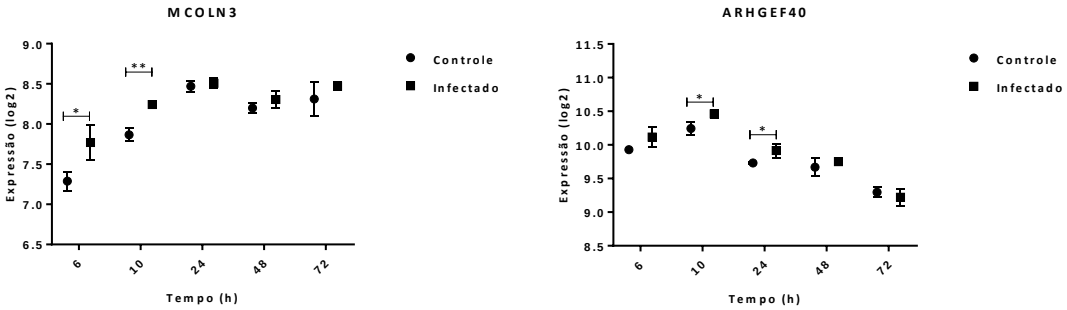

Figura 1 – Expressão diferencial dos genes *MCOLN3* e *ARHGEF40* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

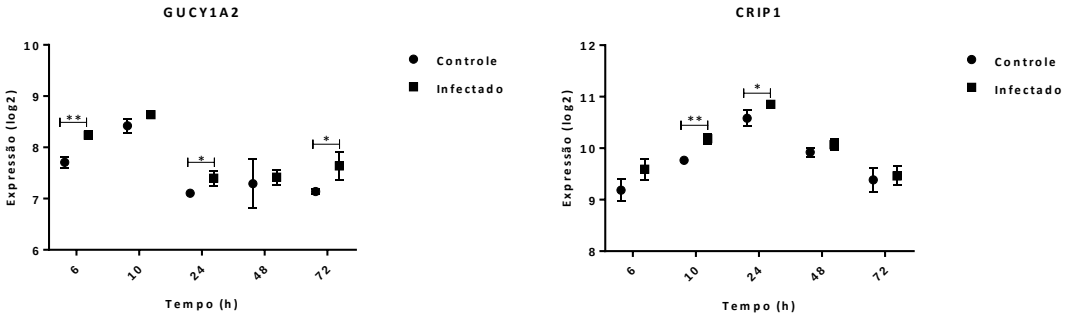

Figura 2 – Expressão diferencial dos genes *GUCYJA2* e *CRIP1* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

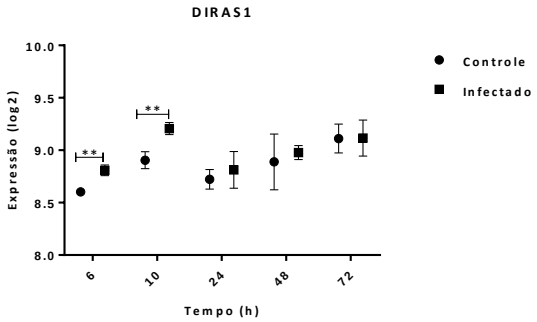

Figura 3 – Expressão diferencial do gene *DIRAS1* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

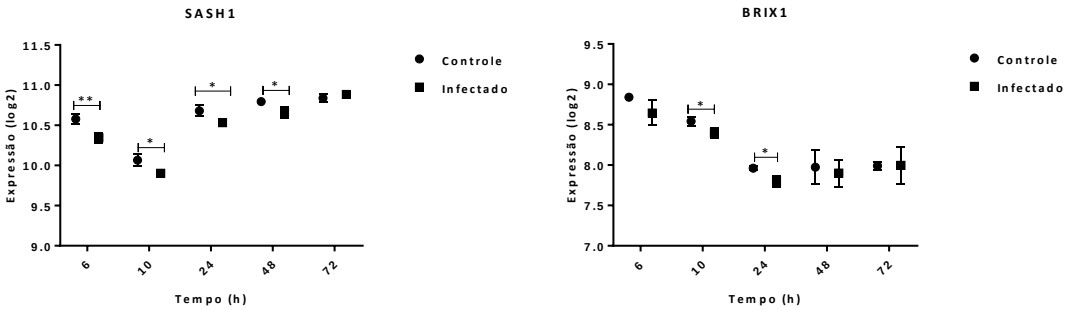

Figura 4 – Expressão diferencial dos genes *SAH1* e *BRIX1* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

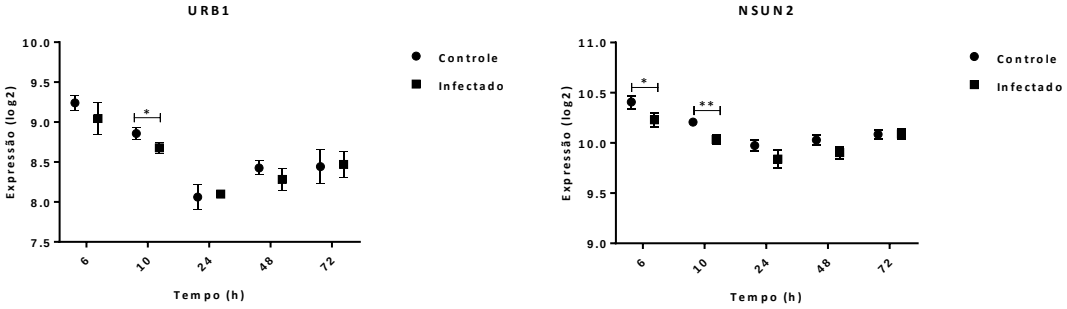

Figura 5 – Expressão diferencial dos genes *URB1* e *NSUN2* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

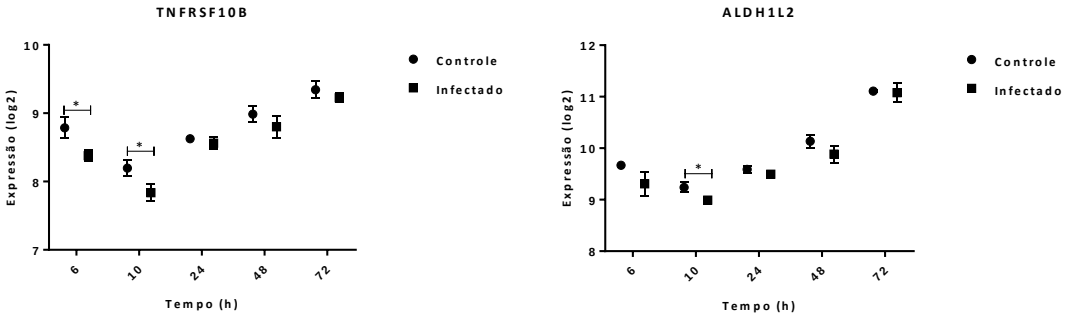

Figura 6 – Expressão diferencial dos genes *TNFRSF10B* e *ALDH1L2* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

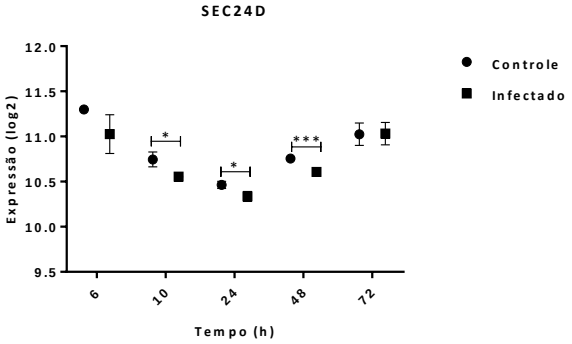

Figura 7 – Expressão diferencial do gene *SEC24D* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

Módulo *Salmon*

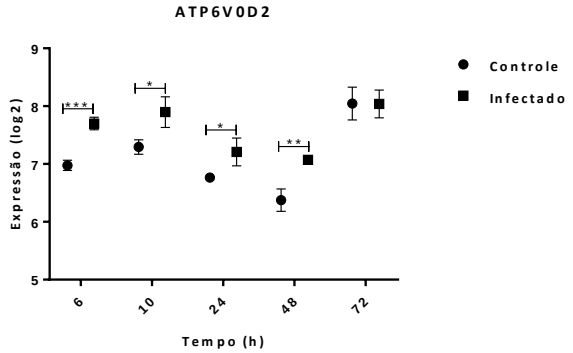

Figura 8 – Expressão diferencial do gene ATP6V0D2 entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

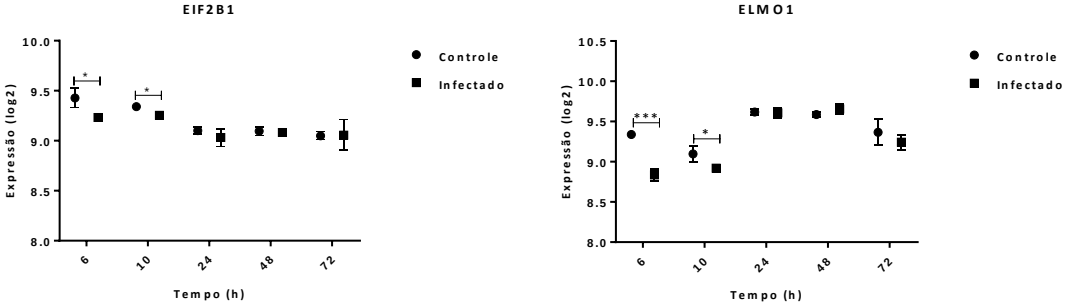

Figura 9 – Expressão diferencial dos genes *EIF2B1* e *ELMO1* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

Grupo 6 h – Genes marcadores dos módulos associados à amostra I06

Módulo *Black*

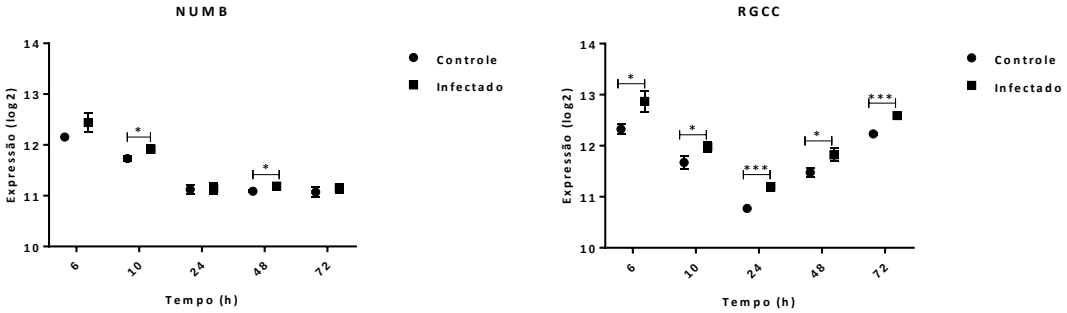

Figura 10 – Expressão diferencial dos genes *NUMB* e *RGCC* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

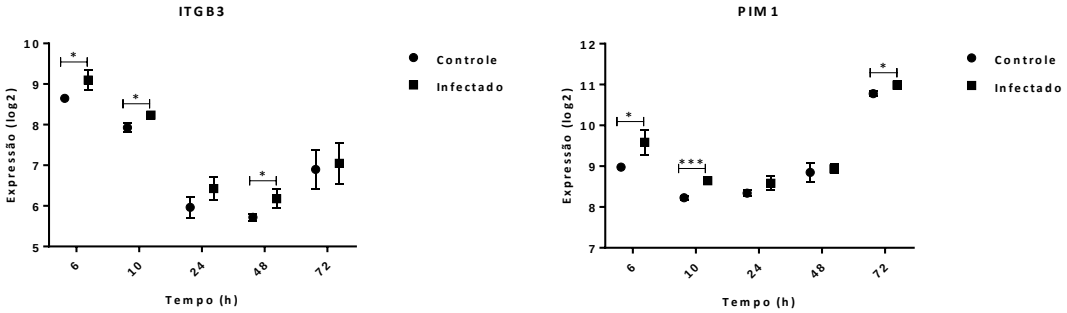

Figura 11 – Expressão diferencial dos genes *ITGB3* e *PIM1* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

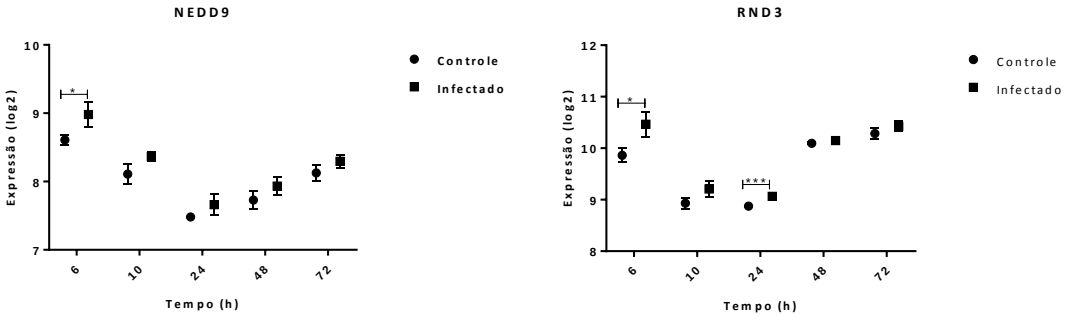

Figura 12 – Expressão diferencial dos genes *NEDD9* e *RND3* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

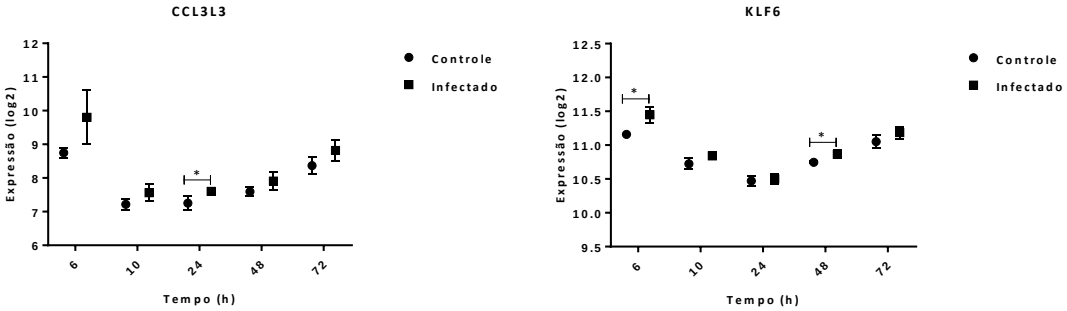

Figura 13 – Expressão diferencial dos genes *CCL3L3* e *KLF6* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

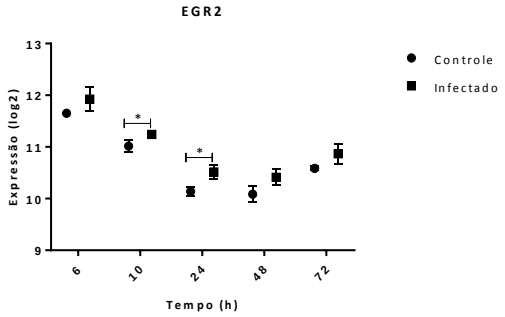

Figura 14 – Expressão diferencial do gene *EGR2* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

Módulo *Blue*

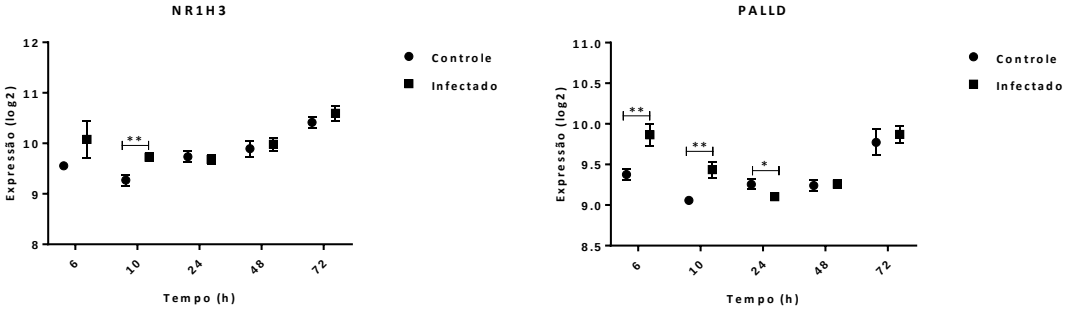

Figura 15 – Expressão diferencial dos genes *NR1H3* e *PALLD* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

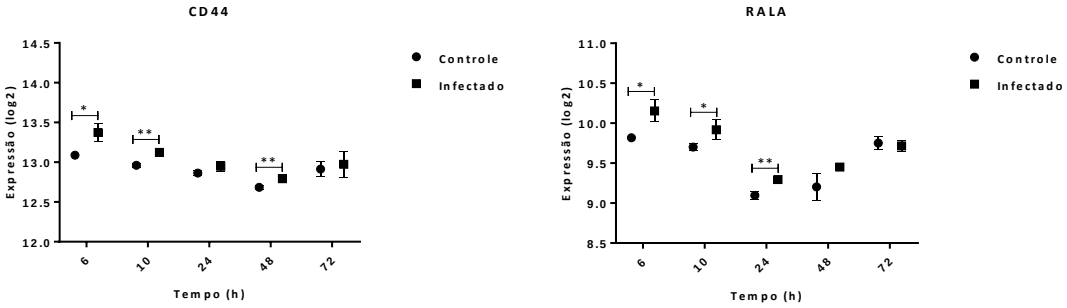

Figura 16 – Expressão diferencial dos genes *CD44* e *RALA* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

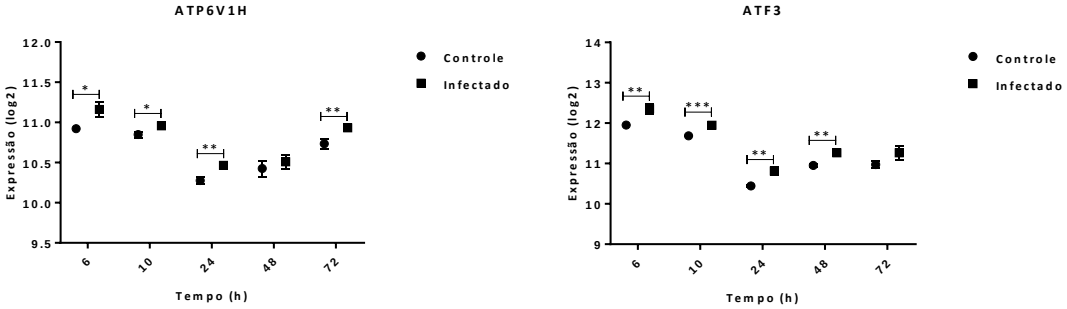

Figura 17 – Expressão diferencial dos genes *ATP6V1H* e *ATF3* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

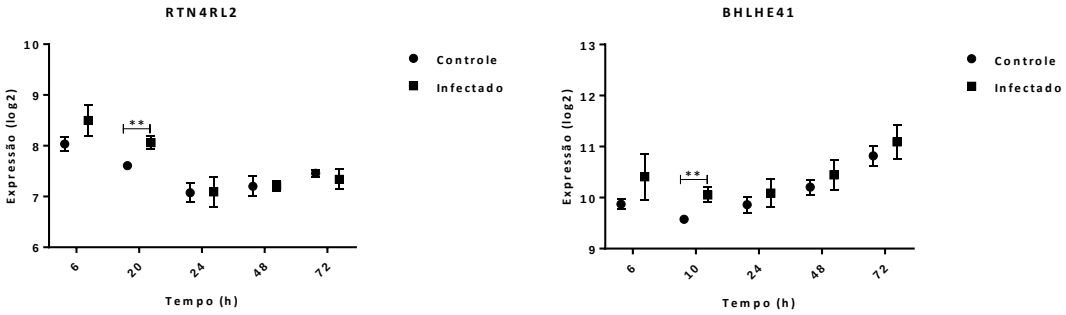

Figura 18 – Expressão diferencial dos genes *RTN4RL2* e *BHlHE41* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

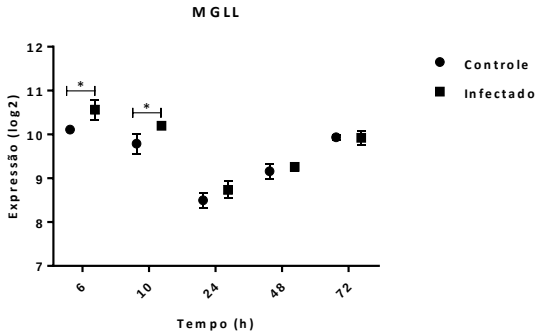

Figura 19 – Expressão diferencial dos genes *MGLL* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

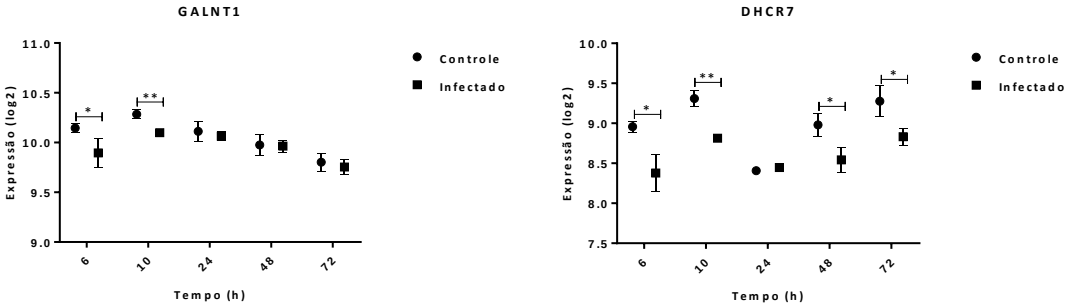

Figura 20 – Expressão diferencial dos genes *GALNT1* e *DHCR7* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

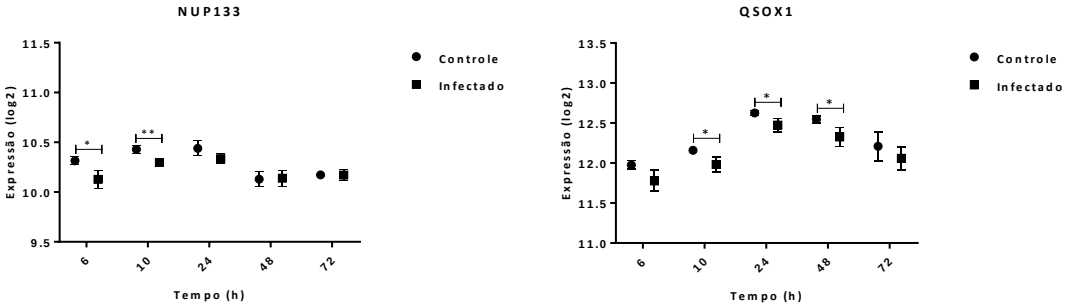

Figura 21 – Expressão diferencial dos genes *NUP133* e *QSOX1* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

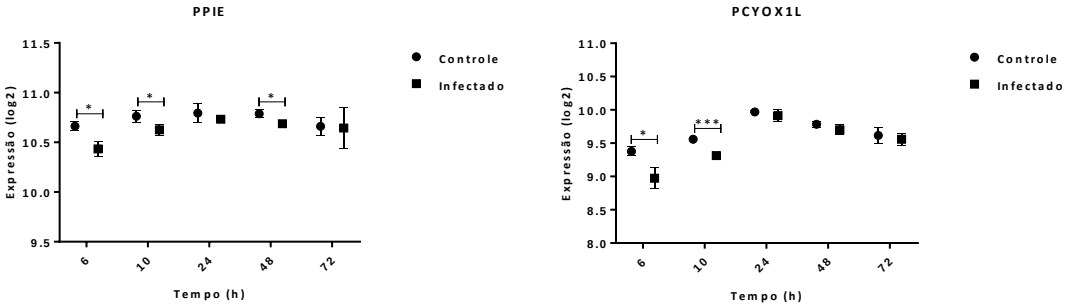

Figura 22 – Expressão diferencial dos genes *PPIE* e PCYOX1L entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

Grupo 10 h – Genes marcadores dos módulos associados à amostra C10

Módulo *Lightyellow*

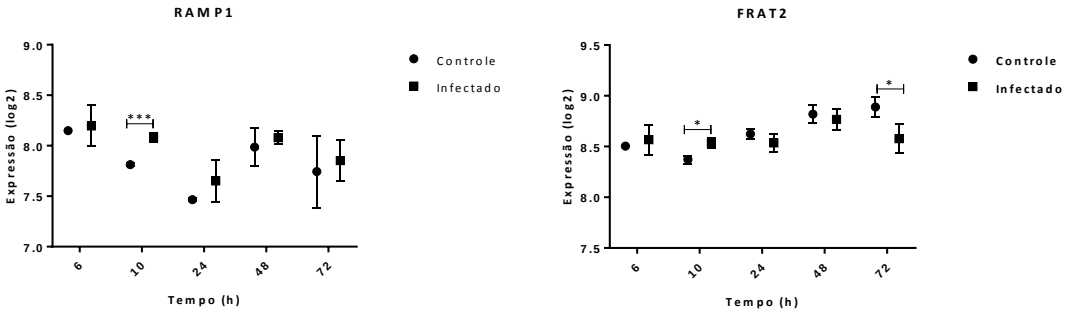

Figura 23 – Expressão diferencial dos genes *RAMP1* e *FRAT2* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

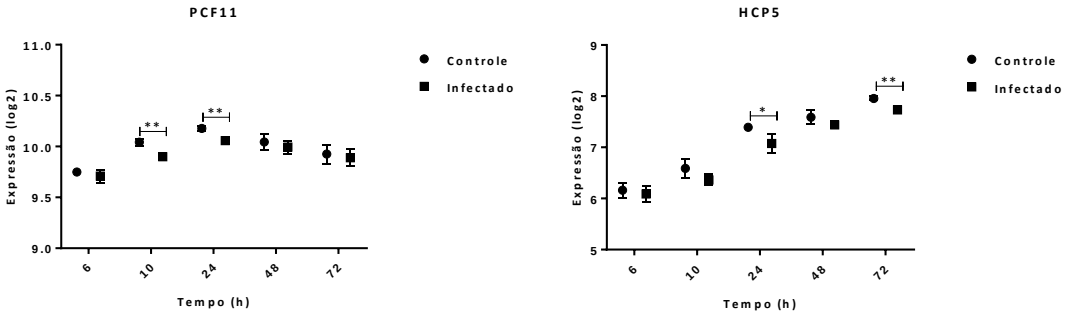

Figura 24 – Expressão diferencial dos genes *PCF11* e *HCP5* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

Grupo 10 h – Genes marcadores dos módulos associados à amostra I10

Módulo *Magenta*

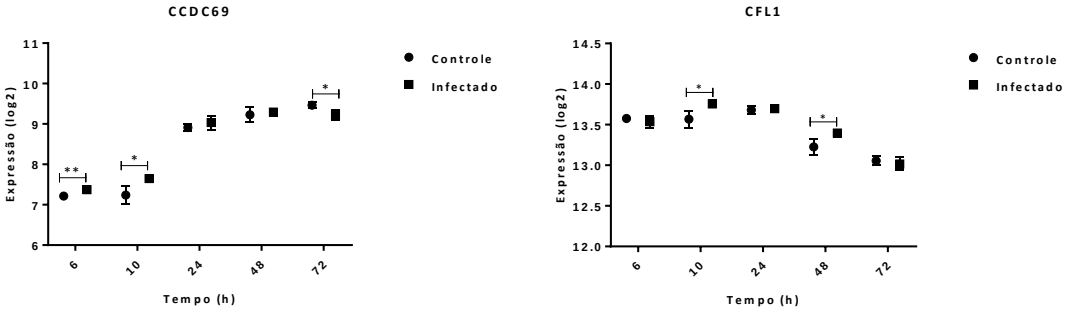

Figura 25 – Expressão diferencial dos genes *CCD69* e *CFL1* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

ANEXO D - ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL DOS MÓDULOS CORRELACIONADOS ÀS AMOSTRAS DOS GRUPOS 24 H, 48 H E 72 H

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
C24	*Red*	*Cell cycle*	0,0042446	*CCNB3; CDKN2D; ORC3; MDM2; ABL1; ANAPC4; ANAPC5; E2F4; YWHAG; SMC1B*
		Viral carcinogenesis	0,0092840	*STAT3; UBR4; PIK3CD; GTF2H1; RBPJ; HLA-G; DLG1; CREB3L1; MAPKAPK2; MDM2; PMAIP1; HIST3H2BB; YWHAG*
		Pyruvate metabolism	0,0314107	*FH; GLO1; ACYP2; ACSS1*
		Sulfur metabolism	0,0345738	*MPST; CYCS*
		Sulfur relay system	0,0345738	*MPST; CTU1*
		Insulin resistance	0,0462034	*PPP1CC; PYGB; CREB3L1; STAT3; PIK3CD; PPARGC1A; OGT*
		Spliceosome	0,0494029	*EFTUD2; PPIL1; DHX8; THOC1; HNRNPU; CDC5L; CWC15; SNRPF*
I24	*Brown*	*Antigen processing and presentation*	0,0003508	*HSPA8; HLA-DRB5; HSPA1L; HSPA4; NFYC; HLA-B; RFXANK; HSPA2; HLA-A; HLA-F; CTSS; HLA-E; CD4; HLA-DMA; RFX5; B2M; HLA-DRB1; CTSB*
		Apoptosis	0,0009718	*ITPR1; ITPR3; CTSV; CTSS; LMNB1; TUBA1C; AKT2; LMNA; CASP2; CTSH; CTSF; HRAS; CTSC; MAP3K5; CTSB; MAPK3; DAXX; PARP3; CHUK; PDPK1; FOS; TUBA4A; TNFRSF10D; IL3RA; MAP3K14; BIRC3*

Continua

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
I24	*Brown*	*Epstein-Barr virus infection*	0,0011270	*YWHAE; HDAC2; HSPB1; SPN; POLR2A; AKT2; POLR2G; PLCG1; POLR2H; JAK1; YWHAH; POLR2L; NUP214; IL10; HSPA8; HLA-DRB5; USP7; HSPA1L; SYK; CHUK; POLR3GL; SHFM1; HLA-B; HLA-A; HSPA2; HLA-F; HLA-E; CCNA1; PSMC5; POLR3A; TRAF6; PTMA; MAP3K14; HLA-DRB1*
		DNA replication	0,0017984	*RNASEH2C; FEN1; RFC4; RNASEH2A; LIG1; POLE3; RPA1; MCM3; RPA2; POLE*
		Protein processing in endoplasmic reticulum	0,0036970	*TRAM1; SEC23A; ATF6B; SEL1L; UBE2D1; RNF5; HSP90B1; MAN1A1; FBXO6; SEC61B; UBQLN4; SEC31B; MAP3K5; UBQLN2; HSPA8; HSPA1L; AMFR; UBE2E3; EDEM2; UBE2E1; YOD1; UBE4B; HSPA2; PDIA4; DNAJC3; NSFL1C; RNF185; NFE2L2*
		Lysosome	0,0037155	*ABCA2; ASAH1; SLC11A1; GAA; HEXB; HEXA; CTSV; LITAF; CTSS; GGA2; PLA2G15; AP3M1; LAMP3; PSAP; PPT1; SLC17A5; AP1S1; CTSH; AP3S2; CTSF; CTSC; CTSB*
		Mismatch repair	0,0049911	*MSH6; RFC4; LIG1; EXO1; RPA1; RPA2; MLH1*
		RNA transport	0,0089164	*EIF4A2; NUP107; RBM8A; GEMIN2; POP4; RGPD5; FXR1; NXF1; XPO5; NUP214; EIF2B5; UPF2; PRMT5; ALYREF; UPF3B; RANGAP1; NUP93; CLNS1A; EIF3I; GEMIN4; TACC3; ACIN1; RNPS1; EIF4G3; EIF3D; KPNB1; EIF3B*
		Vibrio cholerae infection	0,0089815	*TJP1; ARF1; KCNQ1; ADCY3; KDELR2; PRKCA; SEC61B; PLCG1; ATP6V1E2; ATP6V1D; PDIA4*

Continua

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
I24	*Brown*	*Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate / dermatan sulfate*	0,0099411	*CSGALNACT1; CHPF2; DSE; XYLT1; CHSY3; CHST3*
		Base excision repair	0,0121419	*PARP3; FEN1; LIG1; OGG1; POLE3; APEX2; POLE; MUTYH*
		HTLV-I infection	0,0179387	*ADCY3; GPS2; WNT6; HLA-DMA; ZFP36; CCND2; PTTG1; CHEK2; AKT2; CDC27; DVL3; MYBL2; MYBL1; HRAS; POLE; JAK1; APC2; PDGFRA; HLA-DRB5; CDKN2C; MAP3K1; WNT5B; CHUK; FZD7; HLA-B; HLA-A; FOS; HLA-F; TGFBR1; HLA-E; TGFBR2; POLE3; MAP3K14; HLA-DRB1; MAD2L1; SLC25A6*
		Endocytosis	0,0189418	*VPS29; ARF1; SH3KBP1; WIPF3; PARD6G; NEDD4L; ARRB2; SNX3; ADRBK2; KIF5C; ADRBK1; HRAS; RAB11FIP4; GIT1; AP2M1; SH3GLB2; PDGFRA; ARFGEF2; HSPA8; HSPA1L; HLA-B; ARAP3; HLA-A; HSPA2; HLA-F; TGFBR1; DNM1; HLA-E; TGFBR2; ACAP2; ZFYVE16; ACAP1; ARPC2; TRAF6; SMAP1; ARF5*
		Allograft rejection	0,0277189	*IL10; HLA-DRB5; HLA-DMA; HLA-B; HLA-A; HLA-F; HLA-DRB1; HLA-E*
		Fanconi anemia pathway	0,0303123	*MUS81; POLN; C19ORF40; RPA1; REV3L; RPA2; POLI; STRA13; MLH1; PALB2*

Continua

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
I24	*Brown*	*Fructose and mannose metabolism*	0,0316728	*PFKFB2; PFKFB3; GMDS; ALDOA; PFKM; PFKP; HK1*
		cGMP-PKG signaling pathway	0,0345113	*ATF6B; CALML6; PDE3B; ITPR1; ATP2B4; ADCY3; IRS2; ITPR3; ATP2B2; ATP2A1; ATP1A1; ADRA2B; PPP1CA; MYLK; GNA13; CREB3; EDNRB; AKT2; PDE3A; BDKRB2; MYL9; PLCB2; SLC25A6; MAPK3*
		Carbon metabolism	0,0468788	*SDS; IDH3G; IDH1; PGAM1; RPE; MTHFR; SDHA; ACAT2; HK1; ALDH6A1; PKM; ME1; IDH3B; ACO2; ALDOA; PFKM; PFKP*
I24	*Magenta*	*Legionellosis*	0,0127110	*ITGAM; CASP1; CXCL3; TLR4; NFKB2*
		Glycosphingolipid biosynthesis - globo series	0,0478921	*B3GALNT1; ST8SIA1*
C48	*Tan*	*Spliceosome*	0,0195304	*SF3B2; SF3A1; PRPF6; SNRPD2; CCDC12; SRSF7*
		p53 signaling pathway	0,0234501	*CDK6; ZMAT3; CASP3; TP73*
		Pantothenate and CoA biosynthesis	0,0320419	*DPYS; DPYD*
		Arginine biosynthesis	0,0389822	*GOT1; NOS3*
		Valine, leucine and isoleucine degradation	0,0397781	*AUH; DBT; AACS*

Continua

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
C72	*Turquoise*	*Cell cycle*	1,82E-11	*MCM7; YWHAB; BUB1B; CDC14B; CDC20; CDC23; CCND1; YWHAQ; MYC; CHEK1; SKP2; YWHAZ; CDC25A; CDC25B; CCNA2; RBL2; RBL1; TFDP2; ESPL1; CCNE2; CCNE1; MCM4; MCM5; MCM6; MAD1L1; ANAPC1; MCM2; ANAPC2; PCNA; PRKDC; TTK; PKMYT1; ORC5; CCNB2; CCNB1; ORC6; CDC45; ORC1; RAD21; ORC2; E2F1; E2F2; BUB3; BUB1; CREBBP; SMAD3; GADD45B; TGFB3; GADD45A; PLK1; CDC7; CDC6; MAD2L2; STAG1; WEE1; CDC16; CDK2; CDK1; ATM*
		Fanconi anemia pathway	0,0000038	*BLM; WDR48; BRCA1; BRCA2; BRIP1; EME1; EME2; USP1; ATRIP; POLH; FANCI; FANCM; RMI1; FANCL; FANCA; FANCC; FANCB; FANCG; RAD51C; APITD1; RAD51; FANCD2; ERCC4; UBE2T; RPA3; TELO2*
		Propanoate metabolism	0,0000105	*ACSS3; ECHS1; ACSS2; BCKDHB; ABAT; ACACB; ACACA; HADHA; LDHB; MCEE; LDHA; SUCLA2; PCCA; PCCB; SUCLG1; ACADM; DLD; LDHAL6B*
		Progesterone-mediated oocyte maturation	0,0000117	*HSP90AB1; ADCY4; GNAI3; PIK3R3; ADCY1; PIK3R1; ADCY8; PKMYT1; GNAI1; PIK3CG; PIK3R5; CCNB2; MAPK9; RPS6KA3; CCNB1; CDC23; AKT3; BUB1; HSP90AA1; PLK1; SPDYE6; MAPK14; CDC25A; MAPK12; CDC25B; MAPK10; MAD2L2; CCNA2; CPEB1; ADCY9; CDC16; CDK2; CDK1; PGR; KRAS; RAF1; MAD1L1; ANAPC1; ANAPC2*

Continua

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
C72	*Turquoise*	*DNA replication*	0,0000206	*RFC5; PRIM2; RFC3; RNASEH2B; PCNA; MCM7; PRIM1; POLD3; POLA1; RNASEH1; RPA3; POLE2; POLD2; MCM4; MCM5; MCM6; DNA2; SSBP1; MCM2*
		Valine, leucine and isoleucine degradation	0,0000792	*MCCC2; ECHS1; ACAA2; HMGCS1; BCKDHB; MCCC1; ABAT; ACADSB; ACSF3; HSD17B10; ALDH3A2; HADHB; HADHA; MCEE; PCCA; ALDH2; OXCT1; PCCB; ACADM; HADH; ALDH7A1; DLD*
		Alzheimer's disease	0,0010703	*APP; COX7B; COX4I1; IDE; ATP5G3; ATP5G2; ATP5G1; PPP3CA; CASP7; APAF1; NDUFC2; SDHC; NDUFC1; ATP5F1; ERN1; BACE1; COX7A2L; ADAM17; PLCB4; NDUFS5; UQCRC1; NDUFS3; NDUFS1; GAPDH; LRP1; NDUFB6; NDUFB5; NDUFB4; ATP5A1; LPL; NDUFB1; CACNA1D; COX7A2; PSEN1; ATP5H; COX5B; COX5A; HSD17B10; ATP5B; APOE; CYC1; NDUFV1; NDUFA8; NDUFA5; NDUFA4; NDUFA2; EIF2AK3; COX6C; UQCRQ; FAS; CALM1; CDK5R1*
		Hepatitis B	0,0013433	*PCNA; YWHAB; SRC; PIK3R3; PIK3R1; PIK3CG; PIK3R5; IKBKB; MAPK9; NRAS; CCND1; YWHAQ; CREB3L4; MYC; AKT3; E2F1; E2F2; STAT5A; STAT5B; CREBBP; JUN; SMAD3; EGR3; APAF1; TGFB3; PRKCB; TICAM1; MMP9; YWHAZ; NFKB1; DDB2; MAPK10; CCNA2; IRF3; CCNE2; CCNE1; CDK2; VDAC3; FAS; BAX; BIRC5; GRB2; KRAS; RAF1; IFNAR1; LAMTOR5*

Continua

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
C72	*Turquoise*	*Acute myeloid leukemia*	0,0014576	*STAT5A; STAT5B; CEBPA; LEF1; PIK3R3; PIK3R1; NFKB1; PIK3CG; RUNX1; PIK3R5; IKBKB; NRAS; CCND1; MYC; AKT3; KIT; RPS6KB2; RARA; GRB2; KRAS; SOS1; RAF1*
		Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	0,00159	*CEBPA; COX7B; NDUFB6; NDUFB5; NDUFB4; COX4I1; PIK3R3; NDUFB1; COX7A2; PIK3R1; COX5B; ADIPOR2; COX5A; PIK3CG; PIK3R5; IKBKB; SOCS3; MAPK9; CASP7; BCL2L11; AKT3; LEPR; CYC1; NDUFV1; NDUFA8; JUN; NDUFA5; NDUFA4; NDUFA2; EIF2AK3; NDUFC2; SDHC; TRAF2; NDUFC1; COX6C; NFKB1; ERN1; MAPK10; COX7A2L; UQCRQ; NDUFS5; UQCRC1; NDUFS3; FAS; BAX; NDUFS1; PPARA*
		Colorectal cancer	0,0021279	*JUN; SMAD3; TGFB3; LEF1; AXIN1; PIK3R3; PIK3R1; RHOA; PIK3CG; PIK3R5; MAPK10; MAPK9; MSH2; CCND1; MYC; AKT3; RAC2; BAX; BIRC5; KRAS; RAF1; RALGDS; APPL1*
		Renal cell carcinoma	0,0023507	*EGLN1; JUN; CREBBP; EGLN2; TGFB3; EPAS1; HGF; PDGFB; PIK3R3; PTPN11; PIK3R1; PIK3CG; PIK3R5; FLCN; NRAS; RAP1A; AKT3; RAPGEF1; PAK6; GRB2; KRAS; SOS1; RAF1; CRK*

Continua

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
C72	*Turquoise*	*Parkinson's disease*	0,0024196	*COX7B; NDUFB6; NDUFB5; NDUFB4; LRRK2; COX4I1; ATP5A1; GNAI3; NDUFB1; COX7A2; PARK7; ATP5H; ATP5G3; ATP5G2; COX5B; COX5A; ATP5G1; PARK2; GNAI1; UBE2J1; ATP5B; CYC1; NDUFV1; NDUFA8; APAF1; NDUFA5; NDUFA4; NDUFA2; NDUFC2; SDHC; NDUFC1; ATP5F1; COX6C; SNCAIP; PINK1; COX7A2L; UQCRQ; NDUFS5; UQCRC1; PPIF; NDUFS3; VDAC3; NDUFS1; SLC25A5*
		Epstein-Barr virus infection	0,0039533	*YWHAB; AKAP8L; PIK3CG; ICAM1; IKBKB; XPO1; PSMD4; YWHAQ; MYC; PSMD2; AKT3; PSMD3; PSMD1; SKP2; MAP2K3; HLA-C; TRAF2; TYK2; YWHAZ; NCOR2; CCNA2; IRF3; TRAF5; HLA-DQB1; HDAC4; PSMD12; PSMD13; PIK3R3; PIK3R1; RELB; PIK3R5; MAPK9; IRAK1; POLR2B; POLR2D; CD58; POLR2J; MAP2K6; CREBBP; JUN; POLR2J2; EIF2AK3; EIF2AK4; MAPK14; MAPK12; NFKB1; MAPK10; PSMC6; PSMC3; POLR3D; PSMC2; POLR3E; CDK2; POLR3F; CDK1; HLA-DRA; VIM; RAN*
		p53 signaling pathway	0,0045645	*RRM2; APAF1; CD82; GADD45B; GADD45A; PPM1D; DDB2; PIDD1; CCNB2; CCNB1; CCND1; CCNE2; SESN3; CCNE1; CCNG2; PERP; SESN1; CDK2; CHEK1; CDK1; FAS; BAX; ATM; GTSE1*

Continua

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
C72	*Turquoise*	*Purine metabolism*	0,005401	*GUCY1B3; NUDT2; NUDT5; HDDC3; PNP; ATIC; ZNRD1; PDE4A; PGM2; ENPP4; PGM1; ADSL; ENTPD4; AMPD2; AMPD3; APRT; ADCY9; NME6; POLR1A; ADSSL1; HPRT1; ADPRM; PDE9A; PRPS2; PRIM2; CANT1; NPR2; PRIM1; ADCY4; ADCY1; NTPCR; ADCY8; AK6; FHIT; AK8; PAPSS1; CECR1; POLD3; POLR2B; POLR2D; POLD2; POLR2J; RRM1; POLR2J2; RRM2; PAICS; POLA1; POLR3D; POLE2; POLR3E; POLR3F*
		Lysine degradation	0,0060457	*GCDH; KMT2D; ECHS1; KMT2A; KMT2C; DOT1L; KMT2B; PLOD3; PIPOX; SETMAR; PLOD2; ASH1L; ALDH3A2; HADHA; TMLHE; ALDH2; HADH; ALDH7A1; COLGALT1*
		Pyrimidine metabolism	0,006221	*CDA; PRIM2; DTYMK; CANT1; PRIM1; NUDT2; TYMS; POLD3; PNP; ZNRD1; POLR2B; POLR2D; POLD2; POLR2J; DUT; RRM1; POLR2J2; RRM2; TXNRD3; ENTPD4; CTPS2; CTPS1; POLA1; UCK2; UCK1; NME6; POLR1A; POLR3D; POLE2; POLR3E; POLR3F; UMPS; DCTPP1*
		Small cell lung cancer	0,006606	*PIK3R3; LAMC1; PIK3R1; PTGS2; FHIT; PIK3CG; PIK3R5; RXRB; IKBKB; CCND1; MYC; AKT3; E2F1; E2F2; SKP2; APAF1; LAMB2; ITGA2; TRAF2; NFKB1; COL4A2; CCNE2; COL4A1; CCNE1; CDK2; TRAF5; CKS2; BIRC2*
		N-Glycan biosynthesis	0,006977	*B4GALT2; B4GALT3; ALG8; ST6GAL1; B4GALT1; RPN1; ALG5; ALG14; ALG11; ALG1; DPM1; FUT8; MAN2A2; DOLPP1; MGAT5; STT3A; MGAT3; MGAT1*

Continua

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
C72	*Turquoise*	*Fatty acid elongation*	0,007184	*HADHB; ELOVL1; HADHA; MECR; ACOT7; ECHS1; ACAA2; ACOT1; PTPLB; HADH; PTPLA*
		Platelet activation	0,007471	*GUCY1B3; ROCK1; SRC; ADCY4; GNAI3; PIK3R3; ADCY1; PIK3R1; ADCY8; PRKCZ; ARHGAP35; ACTB; MYL12A; GNAI1; PIK3CG; MYL12B; ACTG1; PIK3R5; MYLK4; RAP1A; TBXA2R; AKT3; P2RY1; VASP; PRKCI; PTGIR; ARHGEF12; ITGA2; PLA2G4C; MAPK14; MAPK12; RHOA; ADCY9; PLCB4; ORAI1; LCP2; FERMT3*
		Oocyte meiosis	0,008601	*YWHAB; CAMK2A; ADCY4; ADCY1; ADCY8; PKMYT1; FBXO43; AURKA; CDC20; CCNB2; PPP3CA; RPS6KA3; CCNB1; CDC23; SGOL1; YWHAQ; BUB1; PLK1; PPP2R5D; SPDYE6; YWHAZ; MAPK12; REC8; MAD2L2; CPEB1; ADCY9; STAG3; ESPL1; CCNE2; CCNE1; CDC16; CDK2; CDK1; PGR; CALM1; ANAPC1; ANAPC2*
		Homologous recombination	0,009066	*RAD52; POLD3; RAD50; BLM; RAD51C; RAD51; EME1; RPA3; POLD2; RAD54L; SSBP1; BRCA2*
		Neurotrophin signaling pathway	0,009887	*MAGED1; CAMK2A; PIK3R3; PIK3R1; PSEN1; PIK3CG; PIK3R5; IKBKB; MAPK9; RPS6KA3; NRAS; RAP1A; IRAK1; IRAK2; AKT3; ARHGDIB; SH2B3; JUN; MATK; PTPN11; IRAK3; IRAK4; MAPK14; MAPK12; NFKB1; RHOA; MAPK10; CAMK4; RAPGEF1; BAX; GRB2; KRAS; CALM1; RAF1; SOS1; CRK*

Continua

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
C72	*Turquoise*	*Chronic myeloid leukemia*	0,009984	*STAT5A; STAT5B; SMAD3; TGFB3; PIK3R3; PTPN11; GAB2; PIK3R1; NFKB1; PIK3CG; RUNX1; PIK3R5; IKBKB; NRAS; CCND1; MYC; AKT3; E2F1; E2F2; GRB2; KRAS; SOS1; RAF1; CRK*
		Pyruvate metabolism	0,0107170	*ACSS2; MDH1; HAGHL; ACYP1; ACACB; ACACA; ALDH3A2; LDHB; LDHA; ALDH2; ME3; HAGH; ALDH7A1; DLD; LDHAL6B*
		Fc gamma R-mediated phagocytosis	0,0110928	*PIK3R3; ASAP1; ASAP2; PIK3R1; PIK3CG; PIK3R5; SCIN; AKT3; CFL1; RAC2; PIP5K1A; PIP5K1B; WASF1; VASP; MARCKSL1; GSN; MYO10; PRKCB; PRKCE; LIMK1; GAB2; ARPC5; VAV2; PTPRC; ARPC3; BIN1; RPS6KB2; RAF1; CRK*
		Pancreatic cancer	0,0111829	*RALB; SMAD3; TGFB3; PIK3R3; PIK3R1; BRCA2; NFKB1; PIK3CG; PIK3R5; MAPK10; IKBKB; MAPK9; RAD51; CCND1; AKT3; E2F1; RAC2; E2F2; KRAS; RAF1; RALGDS; ARHGEF6*
		AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	0,0112851	*FIGF; PIK3R3; PIK3R1; PRKCZ; PIK3CG; ICAM1; PIK3R5; MAPK9; NRAS; CCND1; AKT3; PLCE1; STAT5A; STAT5B; EGR1; JUN; SMAD3; TGFB3; PRKCB; PRKCE; VEGFB; MAPK14; F3; MAPK12; NFKB1; MAPK10; PLCB4; COL4A2; COL4A1; BAX; KRAS*

Controle

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
C72	*Turquoise*	*Lysosome*	0,0147546	*CD63; CLTC; AP4E1; ABCB9; LIPA; SGSH; MFSD8; AP4M1; GGA1; LAPTM4B; CLN3; AP1G2; GM2A; CTSL; AP1G1; CLTCL1; NEU1; IDS; CTSG; AP4S1; CTSE; GUSB; CTSD; CTSA; MANBA; ENTPD4; AP3B1; AP4B1; AP3B2; IGF2R; NPC2; GLB1; TPP1; MAN2B1; GLA; LGMN*
		HTLV-I infection	0,0161074	*ATF1; NRP1; CRTC3; WNT2B; CRTC1; BUB1B; PIK3CG; ICAM1; CDC20; IKBKB; PPP3CA; CDC23; XPO1; CCND1; MYC; CHEK1; AKT3; IL15RA; IL1R1; HLA-C; KAT2B; ADCY9; CANX; VDAC3; SLC25A5; ANAPC1; HLA-DQB1; ANAPC2; VAC14; PCNA; SRF; ADCY4; PDGFB; PIK3R3; ADCY1; PIK3R1; ADCY8; RELB; PIK3R5; POLD3; CCNB2; NRAS; HLA-DMB; DVL1; POLD2; E2F1; E2F2; BUB3; STAT5A; STAT5B; EGR1; RANBP1; FDPS; CREBBP; JUN; SMAD3; FZD4; TGFB3; NFKB1; FOSL1; POLE2; CDC16; BAX; HLA-DRA; ATM; KRAS; LTBR; RAN*
		Sphingolipid signaling pathway	0,0169112	*ROCK1; GNAI3; PIK3R3; SGMS2; PIK3R1; PRKCZ; GNAI1; PIK3CG; PIK3R5; MAPK9; NRAS; AKT3; GNA12; RAC2; S1PR2; CTSD; CERS4; ABCC1; PRKCB; PRKCE; TRAF2; PPP2R5D; GAB2; MAPK14; MAPK12; NFKB1; RHOA; SGPP1; MAPK10; ACER2; PLCB4; BAX; KRAS; DEGS2; RAF1*
		Nucleotide excision repair	0,0229373	*RFC5; RFC3; PCNA; CETN2; XPA; RAD23A; XPC; GTF2H2; DDB2; POLD3; ERCC3; ERCC4; RPA3; POLE2; POLD2; CUL4B*

Continua

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
C72	*Turquoise*	*Thyroid cancer*	0,0248117	*RET; RXRB; NRAS; CCND1; TPM3; MYC; NCOA4; LEF1; TPR; CCDC6; KRAS*
		Pentose phosphate pathway	0,0248117	*PRPS2; TKTL1; GPI; G6PD; TALDO1; PGM2; PGD; TKT; RBKS; PGM1; DERA*
		Fatty acid metabolism	0,0279788	*PECR; ACADVL; MECR; ECHS1; ACAA2; PTPLB; ACADSB; MCAT; ACACA; PTPLA; HADHB; HADHA; FADS2; FASN; ACADM; HADH*
		Pathways in cancer	0,0286329	*CSF3R; CCND1; MYC; AKT3; SKP2; PRKCB; TPM3; HGF; RUNX1; ADCY9; COL4A2; MSH2; CCNE2; COL4A1; CCNE1; RAF1; EPAS1; PDGFB; PIK3R3; PIK3R1; RASGRP3; PIK3R5; STK36; TPR; DVL1; RALGDS; STAT5A; STAT5B; CREBBP; JUN; SMAD3; FZD4; TGFB3; PTCH2; GNG11; NFKB1; CDK2; GRB2; GNB5; FGFR1; RET; HSP90AB1; WNT2B; LAMC1; BRCA2; PIK3CG; IKBKB; RAC2; APPL1; HSP90AA1; ARHGEF12; MMP1; ITGA2; PLEKHG5; NCOA4; AXIN1; TRAF2; MMP9; RHOA; PLCB4; TRAF5; KIT; RARA; CKS2; BIRC5; SOS1; CRK; BIRC2; PTGER4; CEBPA; FIGF; RALB; ROCK1; PTGER2; LEF1; ADCY4; GNAI3; ADCY1; ADCY8; PTGS2; GNAI1; RXRB; MAPK9; NRAS; GNA12; E2F1; CTNNA1; E2F2; EGLN1; EGLN2; LAMB2; VEGFB; MAPK10; RAD51; CCDC6; BAX; FAS; KRAS*

Continua

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
C72	*Turquoise*	*Fc epsilon RI signaling pathway*	0,0308367	*MAP2K3; PLA2G4C; PIK3R3; GAB2; PIK3R1; MAPK14; MAPK12; PIK3CG; VAV2; PIK3R5; MAPK10; MAPK9; NRAS; AKT3; RAC2; LCP2; GRB2; KRAS; SOS1; RAF1; MAP2K6*
		Rap1 signaling pathway	0,0341185	*SIPA1L2; ACTB; PIK3CG; ACTG1; AKT3; RAC2; PLCE1; MAP2K3; PRKCI; PRKCB; HGF; RHOA; VAV2; ADCY9; PLCB4; PARD3; KIT; RAPGEF1; RAPGEF2; LCP2; RAF1; CRK; RAPGEF3; EPHA2; FIGF; RALB; SRC; ADCY4; PDGFB; GNAI3; PIK3R3; ADCY1; PIK3R1; ADCY8; PRKCZ; EFNA4; GNAI1; RASGRP3; PIK3R5; PARD6B; NRAS; RAP1A; P2RY1; RALGDS; MAP2K6; VASP; VEGFB; MAPK14; MAPK12; EFNA3; ID1; KRAS; CALM1; BCAR1; FGFR1*
		Non-homologous end-joining	0,0349110	*RAD50; XRCC4; XRCC5; PRKDC; POLM; LIG4*
		TNF signaling pathway	0,0370126	*PIK3R3; CXCL1; PIK3R1; PTGS2; CXCL2; PIK3CG; ICAM1; PIK3R5; IKBKB; SOCS3; MAPK9; CASP7; CREB3L4; AKT3; MAP3K8; DNM1L; MAP2K6; MAP2K3; JUN; RIPK3; DAB2IP; TRAF2; CFLAR; MAPK14; MMP9; MAPK12; NFKB1; MAPK10; TRAF5; FAS; BIRC2*
		Other types of O-glycan biosynthesis	0,0406552	*B4GALT2; LFNG; B4GALT3; ST6GAL1; POFUT2; B4GALT1; FUT7; GXYLT1; PLOD3; RFNG; COLGALT1*

Continua

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
C72	*Turquoise*	*Regulation of actin cytoskeleton*	0,0435027	*BRK1; ITGAE; ACTB; ARHGAP35; PIK3CG; ACTG1; MYLK4; CFL1; RAC2; ITGAX; ITGB8; ARHGEF12; ITGA2; ITGA1; RHOA; VAV2; ITGA7; ITGA5; ARHGEF7; RAF1; SOS1; CRK; ARHGEF6; ROCK1; SRC; PDGFB; PIK3R3; PIK3R1; IQGAP2; IQGAP3; MYL12A; FGD1; MYL12B; SLC9A1; PIK3R5; NRAS; SCIN; GNA12; PIP5K1A; PAK6; PIP5K1B; WASF1; MYH10; GSN; LIMK1; ARPC5; SSH2; SSH1; DIAPH3; ABI2; ARPC3; ITGA11; KRAS; BCAR1; FGFR1*
		ErbB signaling pathway	0,0459136	*SRC; CAMK2A; PIK3R3; PIK3R1; PIK3CG; PIK3R5; MAPK9; NRAS; MYC; AKT3; NCK2; PAK6; ABL2; STAT5A; STAT5B; JUN; PRKCB; MAPK10; RPS6KB2; GRB2; KRAS; SOS1; RAF1; CRK; HBEGF*
		FoxO signaling pathway	0,0460399	*PIK3R3; FOXO4; PIK3R1; PIK3CG; PIK3R5; IKBKB; CCNB2; MAPK9; NRAS; CCNB1; BCL2L11; CCND1; AKT3; SKP2; PLK4; CREBBP; GABARAPL1; SMAD3; GADD45B; TGFB3; GADD45A; PLK1; CSNK1E; MAPK14; MAPK12; MAPK10; RBL2; BCL6; CCNG2; CDK2; GRB2; ATM; KRAS; RAF1; IL7R; SOS1*
I72	*Blue*	*Tuberculosis*	0,0035329	*CAMK2B; CEBPB; CEBPG; LSP1; TCIRG1; TNF; PPP3R1; MAPK8; PPP3CC; CASP8; ATP6V1H; BID; HLA-DOB; PLK3; TGFB2; ATP6V0B; BAD; VDR; SPHK2; RIPK2; IFNGR1; IFNGR2; MAPK13; MAPK11; CREB1; IL23A; BCL2; ATP6V0D1; FCGR2B; RAB5A; ATP6V0D2; RAB7A*

Continua

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
I72	*Blue*	*Biosynthesis of amino acids*	0,0059218	*PRPS1; PYCRL; SHMT2; GPT2; PYCR1; MTR; SDSL; ASS1; RPIA; PFKL; PSAT1; CTH; PHGDH; ASL; BCAT1; GLUL*
		Selenocompound metabolism	0,0074470	*TXNRD1; CTH; MARS; CCBL1; MTR; SEPHS2*
		Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	0,0081086	*MAPK11; PPP3R1; PPP3CC; BAD; CAT; BCL2; BID; TNF; RAB5A; TOMM40L; MAPK13; BCL2L1*
		Rheumatoid arthritis	0,0085147	*TGFB2; ATP6V1G1; ATP6V0B; CXCL8; FLT1; CSF1; CCL20; TNFRSF11A; TCIRG1; TNF; VEGFA; IL23A; ACP5; ATP6V1H; ATP6V0D1; HLA-DOB; ATP6V0D2; ATP6V1F*
		Protein export	0,0096444	*SEC61A1; HSPA5; SRP72; SRPR; SRP54; SEC62; SEC63*
		Shigellosis	0,0100176	*ITGB1; CXCL8; RIPK2; ARPC1B; ARPC1A; ARPC4; U2AF1; WASL; MAPK13; MAPK11; MAPK8; ELMO1; ELMO2; PFN1*
		Endocytosis	0,0107227	*CSF1R; FLT1; ZFYVE9; ARPC1B; VPS4B; ARPC1A; CLTA; CXCR4; CBLB; WASL; AGAP3; IL2RG; PLD1; RAB11FIP1; CAPZB; PSD3; AP2S1; EPS15; TGFB2; HSPA6; ARPC4; VPS37B; ARFGAP3; ARFGAP2; RNF41; ACAP3; ITCH; DAB2; EHD4; RABEP1; IL2RB; CHMP3; VPS45; SMAP2; STAM2; RAB5A; FGFR3; HSPA1B; HSPA1A; RAB7A; SPG20*
		Aminoacyl-tRNA biosynthesis	0,0114611	*CARS; YARS; DARS; WARS; VARS; SARS; TARS; EPRS; YARS2; MARS; NARS2; GARS; CARS2; AARS*
		Sphingolipid metabolism	0,0114718	*UGCG; SMPD2; CERS5; SGPL1; SGMS1; CERK; SPHK2; ACER3; PPAP2A; GBA; KDSR*

Continua

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
I72	*Blue*	*Alanine, aspartate and glutamate metabolism*	0,0115143	*GLUD2; GPT2; PPAT; GFPT1; ASNS; ASL; GLUL; RIMKLB; ASS1*
		p53 signaling pathway	0,0167757	*STEAP3; CDKN1A; IGFBP3; SERPINE1; TSC2; TNFRSF10B; BBC3; CCND3; TP53I3; CASP8; CDK4; SESN2; MDM4; BID*
		Peroxisome	0,0177452	*ABCD4; GSTK1; ACOT8; MVK; PEX2; ACSL3; SOD2; PEX14; PEX5L; PXMP2; PMVK; CAT; PXMP4; PEX11G; ACAA1; DECR2*
		Sphingolipid signaling pathway	0,0211425	*CERS5; SGMS1; SPHK2; PIK3R2; PLD1; TNF; MAPK13; GNAI2; MAPK11; SMPD2; SGPL1; MAPK8; PPP2R1A; ADORA3; GNAQ; PPP2R2D; S1PR1; BCL2; RAC3; BID; NSMAF*
		Transcriptional misregulation in cancer	0,0228489	*CSF1R; CEBPB; CDKN1A; CCNT2; CXCL8; FLT1; BCL2A1; HDAC1; SIX1; FOXO1; AFF1; ARNT2; JUP; IGFBP3; H3F3A; PBX3; ETV4; PTK2; DUSP6; PER2; ZEB1; NCOR1; PAX8; SP1; ID2; DDIT3; IL2RB; PPARG; BCL2L1*
		Proteoglycans in cancer	0,0233304	*ITGB1; CAMK2B; CDKN1A; ITGB3; ITPR2; CBLB; PIK3R2; HIF1A; TNF; PAK1; PLCG2; DROSHA; FLNA; FZD1; FZD3; TGFB2; FZD6; RDX; FZD8; ANK2; BRAF; WNT9A; PTK2; MAPK13; VEGFA; MAPK11; MRAS; TFAP4; SMO; SDC1; ARHGEF1; PPP1R12B*
		Pancreatic cancer	0,0260490	*TGFB2; RALA; SMAD4; BAD; BRAF; PIK3R2; PLD1; VEGFA; MAPK8; CDK4; RAC3; E2F3; BCL2L1*

Continua

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
I72	*Blue*	*mTOR signaling pathway*	0,0284603	*CAB39L; RRAGD; AKT1S1; EIF4EBP1; MLST8; TSC2; BRAF; TSC1; PIK3R2; TNF; HIF1A; VEGFA*
		Protein processing in endoplasmic reticulum	0,0300587	*PPP1R15A; VCP; RPN2; ERLEC1; SEC61A1; MAPK8; BAK1; SEC62; SEC31A; SEC63; BCAP31; MBTPS1; SEC24B; SEC13; SEC24A; HSPA5; HSPA6; RAD23B; DNAJA1; DDIT3; DNAJA2; BCL2; SEC24D; HSPA1B; VIMP; HSPA1A; ATF4*
		Bladder cancer	0,0314223	*CDKN1A; RASSF1; CXCL8; CDK4; DAPK2; BRAF; E2F3; FGFR3; VEGFA*
		VEGF signaling pathway	0,0320064	*MAPK11; PPP3R1; PPP3CC; MAPKAPK3; BAD; SPHK2; PLCG2; RAC3; PIK3R2; PTK2; VEGFA; MAPK13*
		Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	0,0325665	*ATP6V1G1; ATP6V0B; CXCL8; TCIRG1; MAPK13; MAPK11; PAK1; MAPK8; PLCG2; ATP6V1H; ATP6V0D1; ATP6V0D2; ATP6V1F*
		Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	0,0336166	*CHIT1; CYB5R2; UGDH; TSTA3; CYB5R1; GFPT1; PGM3; UAP1; NANS; HK2*
		Biosynthesis of unsaturated fatty acids	0,0342647	*SCD; SCD5; TECR; ACOT2; PTPLAD2; ACAA1*
		TGF-beta signaling pathway	0,0395709	*TGIF1; TGFB2; SMAD4; ZFYVE9; INHBB; SMAD6; ACVR2B; TNF; INHBE; ACVR1C; PPP2R1A; SP1; ID2; ID3; E2F5*

Continua

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
I72	*Blue*	*Vibrio cholerae infection*	0,0486968	*SEC61A1; ATP6V1G1; ATP6V0B; PLCG2; ATP6V1H; KDELR3; TCIRG1; ATP6V0D1; ATP6V0D2; ATP6V1F*
		Phagosome	0,0499895	*ITGB1; ATP6V0B; ATP6V1G1; ITGB3; STX18; STX7; SFTPD; TCIRG1; FCAR; THBS3; SEC61A1; TUBA1B; TUBA1A; TUBB3; ATP6V1H; ATP6V0D1; FCGR2B; RAB7B; SEC22B; HLA-DOB; RAB5A; ATP6V0D2; ATP6V1F; RAB7A*
I72	*Black*	*B cell receptor signaling pathway*	0,0041311	*MAP2K2; INPP5D; BLNK; BTK; AKT1; NFATC1; PIK3CB*
		One carbon pool by folate	0,0171308	*MTHFD2; SHMT1; MTHFS*
		cAMP signaling pathway	0,0237421	*MAP2K2; AKT1; RRAS2; ATP2A2; NFATC1; PIK3CB; ATP2B1; PRKACA; MLLT4; ADCY6; GRIN2D*
		Endocytosis	0,0297324	*SH3GLB1; SMAD2; TGFB1; WAS; AGAP2; VPS37A; ARRB1; SNX4; PARD6A; PSD4; RAB11FIP2; CHMP6; CHMP7*
		Basal transcription factors	0,0358822	*GTF2B; TAF9; GTF2F1; GTF2F2*
		Pancreatic cancer	0,0364216	*CASP9; SMAD2; TGFB1; AKT1; PIK3CB*
		Collecting duct acid secretion	0,0381184	*ATP6V1A; ATP6V1E1; ATP6V1C1*
		Fc epsilon RI signaling pathway	0,0406401	*MAP2K2; INPP5D; BTK; AKT1; PIK3CB*

Continua

Anexo D – Enriquecimento funcional na base de dados KEGG dos módulos às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Continuação

Amostra	Módulo	Vias biológicas	Valor-p	Genes
I72	*Black*	*Protein processing in endoplasmic reticulum*	0,0469415	*SAR1A; SSR2; BAG1; UBQLN1; MAN1C1; PREB; STUB1; CAPN1; STT3B*
		Longevity regulating pathway - mammal	0,0471055	*AKT1; PIK3CB; PRKACA; ATG13; EIF4E; ADCY6*

C = Controle; I = Infectado.

Conclusão

ANEXO E - GENES MARCADORES SELECIONADOS NOS MÓDULOS ASSOCIADOS ÀS AMOSTRAS DOS GRUPOS 24 H E 72 H

Anexo E – Genes marcadores selecionados nos módulos associados às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h.

Amostra	Módulo	Gene	*Gene Significance*	*Module Membership*
C24	*Red*	*ZNF638*	0.77131	-0.90667
		ACSS1	-0.70692	0.88366
		PTGES3	0.73942	-0.86216
		MARCKS	-0.76912	0.83052
		PPP1R12A	0.81028	-0.76194
		CD40	-0.74980	0.73921
		IL18BP	-0.72385	0.72935
		PTPRN2	-0.77513	0.70223
I24	*Brown*	*NEU3*	-0.72409	-0.94529
		SVIL-AS1	-0.70321	-0.93242
		HSPB1	0.73856	0.909854
		SCARF1	-0.71065	-0.89862
		GGA2	-0.77947	-0.88087
		CDC42EP4	0.73123	0.87489
		ACO2	0.74588	0.86786
		HLA-F	-0.70589	-0.86635
		USP34	-0.71730	-0.86405
		CCDC57	0.71312	0.86157
		TMEM107	0.70041	0.85516
		NFYC-AS1	-0.74991	-0.85056
		GLCE	-0.70045	-0.81087
		ZNF283	-0.70229	-0.810204
		SLITRK4	-0.70239	-0.80474
		ALAS1	0.74787	0.79154
		SLC9A3R1	0.74677	0.78637
I24	*Magenta*	*PIGR*	-0.702809	0.95389
		TLR4	-0.70990	0.93704
		THBD	-0.75744	0.92852
		PDE4B	-0.70971	0.92535

Continua

Anexo E – Genes marcadores selecionados nos módulos associados às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h. Continuação

Amostra	Módulo	Gene	*Gene Significance*	*Module Membership*
I24	*Magenta*	*CD93*	-0.77400	0.91824
		CNTROB	0.70004	-0.90640
		CPEB3	-0.72088	0.89553
		HOXA10	-0.71441	0.89254
		MR1	-0.72274	0.88546
		SP100	-0.76639	0.88290
		CADM2	-0.80369	0.87803
		MMP2	-0.71891	0.87630
		NCAM2	-0.82766	0.85152
		FBN2	-0.72634	0.84280
		C12orf76	-0.75742	0.83313
		SLC15A2	-0.74080	0.82027
		STAC2	0.70611	-0.78647
		ZNF549	-0.74190	0.76706
		IMPA2	0.73230	-0.73722
		ZAP70	0.71133	-0.736663
C72	*Turquoise*	*GLDN*	-0.70469	0.91408
		ZBED3	0.73343	-0.90328
		ABR	0.74210	-0.89507
		TOX2	0.71834	-0.89071
		LIMA1	-0.74461	0.88910
		LAPTM4B	-0.71199	0.88076
		GID4	0.72116	-0.87590
		SYVN1	0.71707	-0.86784
		TNIP1	0.72373	-0.86729
		DOPEY2	-0.70571	0.86230
		NPRL3	0.70127	-0.84997
		KIAA0895L	-0.75801	0.84777
		ZNF354A	0.78362	-0.84034
		SGIP1	-0.75114	0.83785
		JDP2	0.76071	-0.83605
		NEK11	-0.72063	0.82317
		RRP7B	0.72468	-0.82178

Continua

Anexo E – Genes marcadores selecionados nos módulos associados às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h. Continuação

Amostra	**Módulo**	**Gene**	***Gene Significance***	***Module Membership***
C72	*Turquoise*	*STX8*	0.74486	-0.81392
		QSER1	-0.76908	0.81194
		GLTSCR2	0.71589	-0.80831
I72	*Black*	*TBC1D15*	0.70779	-0.95654
		MXD4	-0.76070	0.91833
		DBNL	-0.71294	0.90408
		ESYT2	0.74988	-0.89076
		ATP6V1A	0.74682	-0.88871
		HECTD1	0.72192	-0.88826
		DOK2	-0.72795	0.88066
		TGIF2	-0.70222	0.87191
		GRPEL2	0.74883	-0.85337
		ENG	-0.71909	0.85331
		OTULIN	0.72200	-0.85099
		ZNF503	-0.79512	0.83340
		RP4-717I23.3	0.72967	-0.83053
		BMP2	-0.73014	0.81944
		UQCRC2	0.75308	-0.81746
		MAPK6	0.70099	-0.81706
		ANKRD28	0.70066	-0.80141
		APLP1	-0.73876	0.795880
		OAZ1	-0.70785	0.78434
I72	*Blue*	*LYST*	0.70697	0.97570
		FNDC3B	0.71361	0.96740
		RUSC1	-0.71870	-0.96407
		USP2	0.73386	0.96016
		SLA	-0.70129	-0.95582
		MAPK13	0.72651	0.95306
		LRG1	-0.76384	-0.94842
		SGTB	0.72425	0.944210
		MAPK8	0.74355	0.94345
		RGS2	-0.71321	-0.94241

Continua

Anexo E – Genes marcadores selecionados nos módulos associados às amostras dos grupos 24 h, 48 h e 72 h. Continuação

Amostra	**Módulo**	**Gene**	***Gene Significance***	***Module Membership***
I72	*Blue*	*TNFRSF21*	0.70770	0.93807
		CCM2	-0.75517	-0.93689
		SCD5	-0.77294	-0.93045
		NMD3	0.71765	0.92690
		ALOX5	-0.72881	-0.92241
		ZCCHC8	0.74091	0.92150
		UGDH	0.70691	0.92110
		FAM222A	-0.70945	-0.91817
		LINS	0.70254	0.91515

C = Controle; I = Infectado. Conclusão

ANEXO F – EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES MARCADORES SELECIONADOS NOS MÓDULOS ASSOCIADOS ÀS AMOSTRAS DOS GRUPOS 24 H E 72 H

A expressão diferencial dos genes foi calculada utilizando os valores de expressão em log2, comparando-se as amostras Controle e Infectado, e a análise estatística foi realizada utilizando-se o teste *t* de *Student* do software *GraphPad Prism 7*. As diferenças na expressão foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ e estão apontadas nos gráficos com o símbolo asterisco (*).

Grupo 24 h – Genes marcadores dos módulos associados à amostra C24

Módulo *Red*

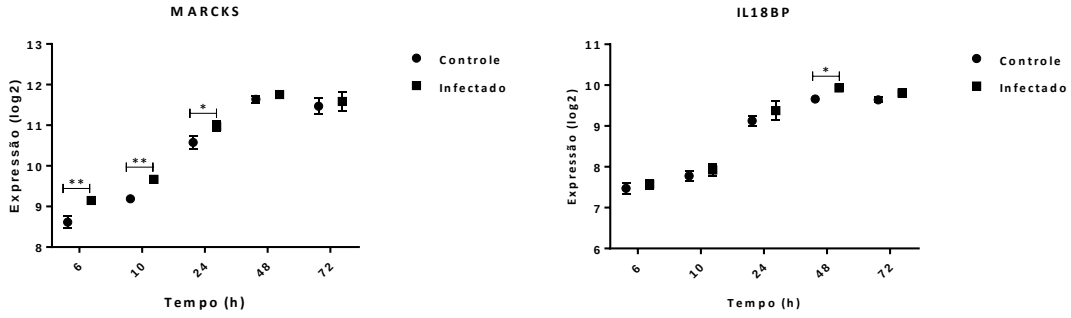

Figura 1 – Expressão diferencial dos genes *MARCKS* e *IL18BP* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

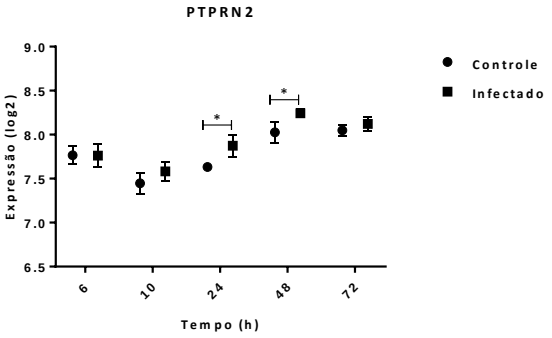

Figura 2 – Expressão diferencial do gene PTPRN2 entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

Grupo 24 h – Genes marcadores dos módulos associados à amostra I24

Módulo *Brown*

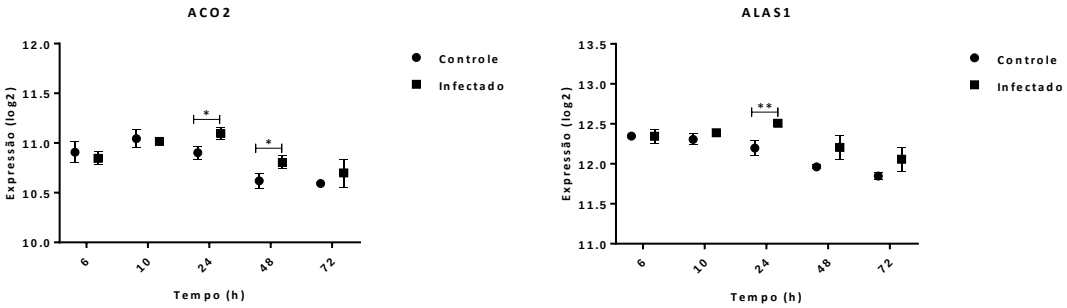

Figura 3 – Expressão diferencial dos genes A*CO2* e *ALAS1* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

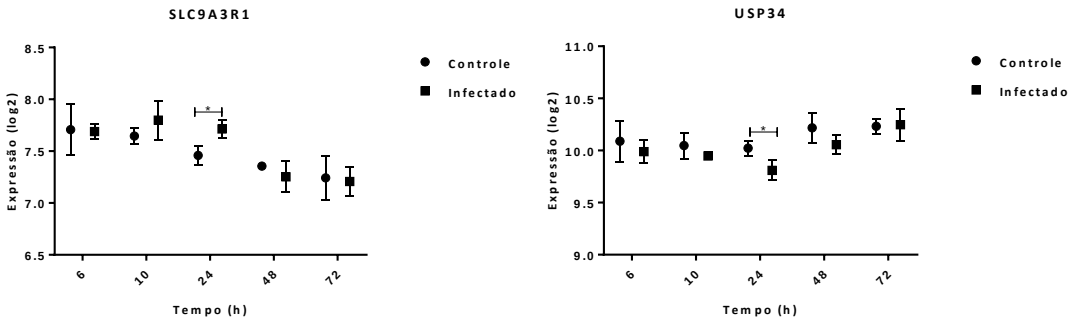

Figura 4 – Expressão diferencial dos genes *SLC9A3R1* e *USP34* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

Módulo *Magenta*

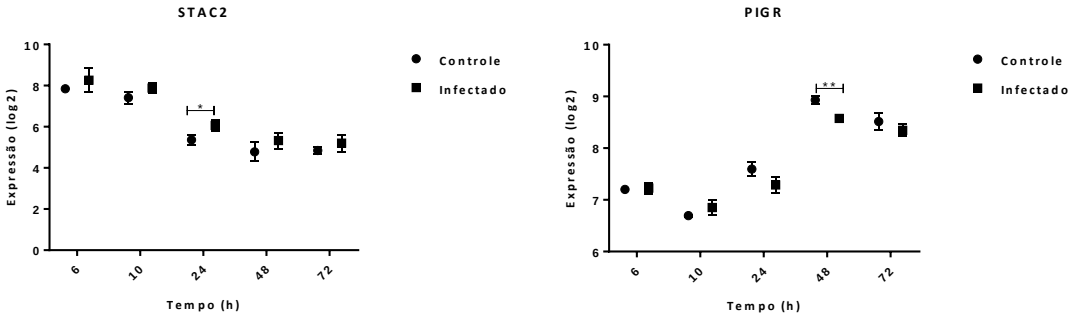

Figura 5 – Expressão diferencial dos genes *STAC2* e *PIGR* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

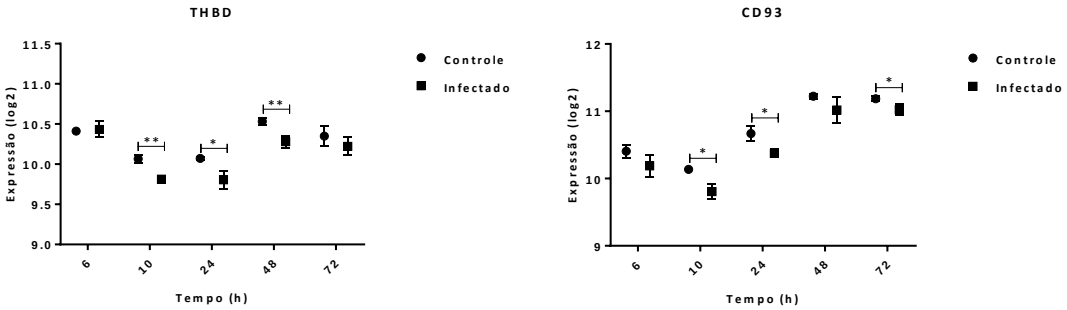

Figura 6 – Expressão diferencial dos genes *THBD* e *CD93* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

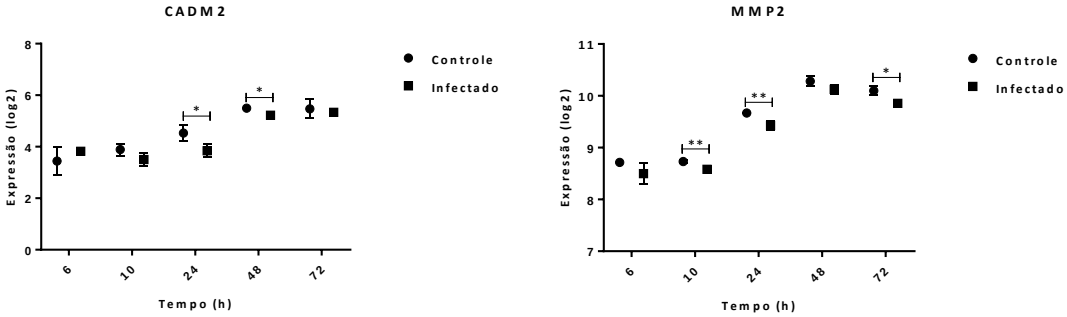

Figura 7 – Expressão diferencial dos genes *CADM2* e *MMP2* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

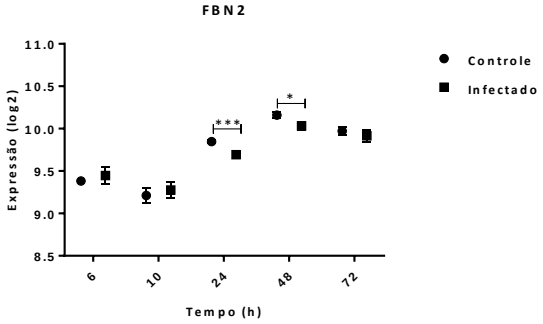

Figura 8 – Expressão diferencial do gene *FBN2* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

Grupo 72 h – Genes marcadores dos módulos associados à amostra I72

Módulo *Blue*

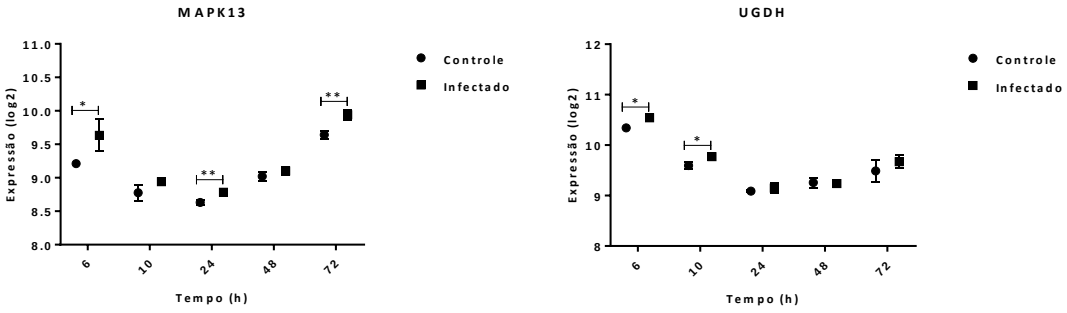

Figura 9 – Expressão diferencial dos genes *MAPK13* e *UGDH* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

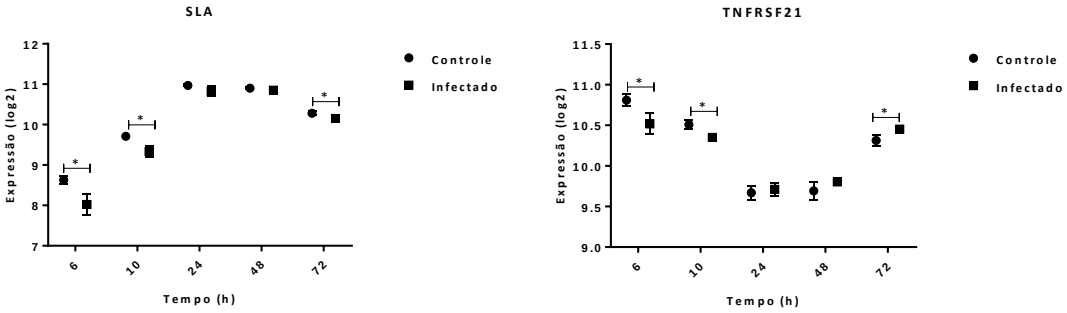

Figura 10 – Expressão diferencial dos genes *SLA* e *TNFRSF21* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

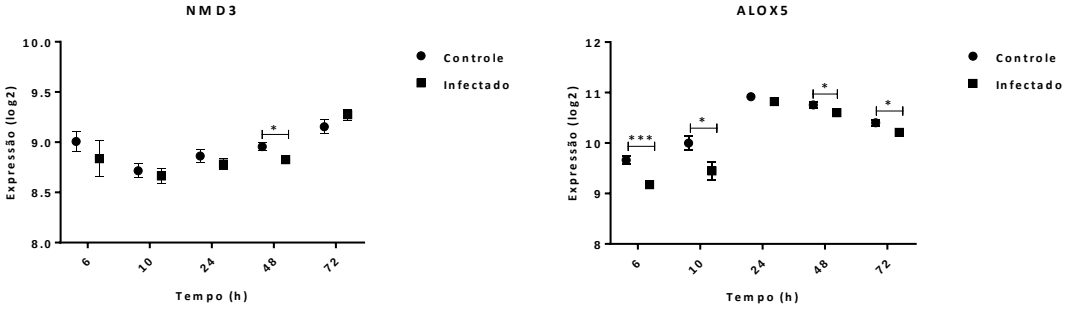

Figura 11 – Expressão diferencial dos genes *NMD3* e *ALOX5* entre as amostras Controle e Infectado nos diferentes tempos de infecção. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a análise estatística, sendo a diferença considerada significante quando $p < 0,05$.

ANEXO G – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132

São Paulo, 30 de Setembro de 2014

Ilmo(a)
Dr(a). Hiro Goto
(aos cuidados de Christiane Yumi Ozaki)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, analisou e **APROVOU**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT/000289A 'Efeito das lipoproteínas plasmáticas no parasitismo de célula monocítica humana infectada com Leishmania (L.) infantum: Análise global do perfil de expressão gênica'**, sob a sua responsabilidade.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei n 11.794, 8 de outubro de 2008).

Com relação à parte do projeto que envolve utilização de material humano, a CEP-IMT tomou ciência, sendo que o projeto deverá ser enviado ao Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da USP, para aprovação.
As seguintes espécies serão utilizadas no projeto:
Hamster (96 animais).

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP