

LUCIANA BALEM CERQUEIRA

AVALIAÇÃO GENÔMICA FUNCIONAL DO
IMPACTO DAS DIFERENÇAS
GENÉTICAS ENTRE HOSPEDEIROS NA
INFECÇÃO POR *Leishmania amazonensis*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do grau de mestre

Orientador: Dr. Marco Aurélio Krieger

CURITIBA

2004

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **LUCIANA BALEM CERQUEIRA** defendeu sua Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular intitulada: "AVALIAÇÃO GENÔMICA FUNCIONAL DO IMPACTO DAS DIFERENÇAS GENÉTICAS ENTRE HOSPEDEIROS NA INFECÇÃO POR *Leishmania amazonensis*", com a Banca Examinadora: Dr. Marco Aurélio Krieger (como Presidente e Orientador do IBMP), Dr^a. Patrícia Sampaio Tavares Veras (FOC-Bahia) e Dr^a. Dorly de Freitas Buchi (UFPR), na qual foi **APROVADA**, segundo avaliação da Banca Examinadora, no dia 27 de agosto de 2004, no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 27 de agosto de 2004.



Prof^a. Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
Biologia Celular e Molecular

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos, em primeiro lugar, à minha família, que sempre me apoiou, incentivou, ajudou e nunca me deixou desistir, mesmo quando os desafios pareciam ser maiores do que eu poderia suportar. Vocês são, sem dúvida nenhuma, os pilares que sustentam a minha vida.

Ao Dr. Marco Aurélio Krieger, meu orientador, pela oportunidade de ter desenvolvido este trabalho e pela confiança depositada em mim.

Ao amigo Christian M. Probst, especialmente pela amizade, mas também pelas idéias, discussões, explicações, broncas e brincadeiras. Você foi uma pessoa fundamental para que este trabalho ganhasse corpo, em muitos aspectos.

À amiga Daniela P. Pavoni, que me ajudou nos primeiros passos pelo caminho da biologia molecular muito tempo atrás, pela leitura crítica deste trabalho, pelas discussões, questionamentos, pelo carinho e amizade.

Aos diretores e colegas do IBMP com quem convivi durante esses anos de trabalho e que colaboraram para a minha formação tanto científica quanto pessoal.

À Dra. Patrícia S. T. Veras e à Ivana N. Gomes, do CPqGM/FIOCRUZ, pelo auxílio na realização dos experimentos, assim como à equipe do Dr. Gregory Buck, da Virginia Commonwealth University, que nos permitiram a utilização dos equipamentos para os experimentos de microarranjos.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

E, finalmente, a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. GENÔMICA FUNCIONAL E MICROARRANJOS DE DNA.....	1
1.2. INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO.....	6
1.3. MODELO ANIMAL	8
1.4. MACRÓFAGOS E RESPOSTA IMUNE.....	10
1.5. LEISHMANIA E LEISHMANIOSE	16
2. OBJETIVOS	20
3. METODOLOGIA	21
3.1. SOLUÇÕES	21
3.1.1. Solução de Fragmentação 5X.....	21
3.1.2. Solução Estoque MES 12X	21
3.1.3. Tampão de Hibridação 2X.....	21
3.1.4. SSPE 20X	22
3.1.5. Tampão de Lavagem Não-Estringente (Tampão A).....	22
3.1.6. Tampão de Lavagem Estringente (Tampão B).....	22
3.1.7. Tampão de Coloração 2X.....	22
3.1.8. Tampão SAPE.....	23
3.1.9. Solução de Anticorpo	23

3.2. CAMUNDONGOS	23
3.3. PARASITAS.....	23
3.4. CULTIVO DE MACRÓFAGOS.....	24
3.5. INFECÇÃO DOS MACRÓFAGOS.....	24
3.6. EXTRAÇÃO DE RNA.....	24
3.7. SÍNTESE DE DNAc	25
3.8. PURIFICAÇÃO DE DNAc	26
3.9. SÍNTESE DE RNAc BIOTINILADO.....	26
3.10. FRAGMENTAÇÃO DE RNAc	27
3.11. HIBRIDAÇÃO COM O GeneChip®.....	27
3.12. LAVAGEM E COLORAÇÃO DO GeneChip®	28
3.13. LEITURA ÓPTICA DO GeneChip®	29
3.14. NORMALIZAÇÃO DOS DADOS.....	29
3.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL	30
3.16. AGRUPAMENTOS DOS DADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1. HIBRIDAÇÃO COM O GeneChip®.....	33
4.2. NORMALIZAÇÃO	33
4.3. SELEÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	39
4.4. AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS DEG SELECIONADOS	42
4.5. AGRUPAMENTOS.....	42
5. DISCUSSÃO	47
5.1. COMPARAÇÃO ENTRE HOSPEDEIROS.....	48
5.1.1. Sinalização Celular.....	49
5.1.2. Resposta Imune	51

5.1.3. Metabolismo	55
5.1.4. Ciclo Celular	56
5.1.5. Citoesqueleto e adesão celular	57
5.1.6. Síntese e metabolismo de proteínas	58
5.1.7. Outras funções	58
5.2. COMPARAÇÃO ENTRE MΦ INFECTADOS E NÃO-INFECTADOS..	59
5.2.1. Padrões gerais de seleção de DEG	59
5.2.2. DEG selecionados em ambas as linhagens	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de um arranjo de sondas GeneChip® (Affymetrix).....	4
Figura 2. Representação esquemática do processo fotolitográfico de fabricação dos arranjos de sondas GeneChip®.....	5
Figura 3. Conjuntos de sondas.....	5
Figura 4. O macrófago.....	11
Figura 5. Modelo de diferenciação T_H1/T_H2	15
Figura 6. <i>Leishmania</i> sp.....	18
Figura 7. Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> sp.....	19
Figura 8. Representação esquemática do arranjo de sondas GeneChip®.....	27
Figura 9. <i>BoxPlot</i> das 24 hibridações realizadas.....	34
Figura 10. <i>BoxPlot</i> da normalização das 24 hibridações realizadas.....	35
Figura 11. Histograma da distribuição de densidade das intensidades das sondas nas 24 hibridações realizadas.....	37
Figura 12. Matriz de correlação entre as hibridações.....	38
Figura 13. Gráfico SAM da comparação entre macrófagos não-infectados de CBA/J e C57BL/6.....	40
Figura 14. Gráfico SAM da comparação entre macrófagos de CBA/J infectados por <i>L. amazonensis</i> e macrófagos de CBA/J não-infectados.....	41
Figura 15. Gráfico SAM da comparação entre macrófagos de C57BL/6 infectados por <i>L. amazonensis</i> e macrófagos de C57BL/6 não-infectados.....	41
Figura 16. Representatividade de grupos funcionais nas comparações feitas.....	43
Figura 17. Agrupamento dos DEG selecionados da comparação entre macrófagos não-infectados de CBA/J e C57BL/6.....	44
Figura 18. Agrupamento dos DEG selecionados da comparação entre macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e macrófagos não-infectados de CBA/J.....	45
Figura 19. Agrupamento dos DEG selecionados da comparação entre macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e macrófagos não-infectados de CBA/J.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema para síntese da primeira fita de DNAC.....	25
Tabela 2. Esquema para síntese da segunda fita de DNAC.....	25
Tabela 3. Mistura de reação para hibridação.....	28
Tabela 4. DEG selecionados da comparação entre PEC MΦ não-infectados de CBA/J e C57BL/6.....	85
Tabela 5. DEG selecionados da comparação entre PEC MΦ infectados e não-infectados de CBA/J.....	89
Tabela 6. DEG selecionados da comparação entre PEC MΦ infectados e não-infectados de C57BL/6.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	seroalbumina bovina
CAA	células apresentadoras de antígeno
CCL	<i>chemokine (C-C motif) ligand</i>
CCR	<i>chemokine (C-C motif) receptor</i>
DEG	genes diferencialmente expressos
DEPC	dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNAC	DNA complementar
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FDR	<i>false discovery rate</i> (razão entre falsos positivos e DEG selecionados)
GPCR	receptor acoplado à proteína G
HEPES	ácido <i>N</i> -2-hidroxietilperazina- <i>N'</i> -2-etanesulfônico
IFN	interferon
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase, isoforma indutível
JAK	Janus quinase
LIT	infusão de fígado e triptose
LPG	lipofosfoglicano
LPS	lipopolissacarídeo
MAC	<i>membrane attack complex</i> (complexo de ataque à membrana)
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MES	ácido 2-(<i>N</i> -Morpholino)-etanesulfônico
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NF- κ B	Fator nuclear <i>kappa</i> B
NK	linfócito T <i>natural killer</i>
NO	óxido nítrico
q.s.p.	quantidade suficiente para
RANTES	<i>regulated on activation normal T-cell expressed and secreted</i>

RNA	ácido ribonucléico
RNA _c	RNA complementar
RNA _m	RNA mensageiro
SAPE	streptavidina-ficoeritrina
SFB	soro fetal bovino
STAT	transdutor de sinal e ativador de transcrição
TCR	receptor de célula T
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	fator de necrose tumoral
UI	unidade internacional

RESUMO

O estudo genômico funcional da interação patógeno-hospedeiro é de grande importância para a compreensão dos mecanismos moleculares que regem o desencadeamento das doenças infecciosas, sendo os eventos iniciais da interação entre patógenos e seus hospedeiros passos potencialmente decisivos para a definição do curso da doença subsequente. Além de fatores diretamente ligados ao patógeno como patogenicidade e virulência, fatores concernentes ao hospedeiro, tais como seu estado geral de saúde e constituição genética, são extremamente importantes para a determinação do tipo e/ou severidade da doença. Isso é especialmente válido para infecções por parasitas do gênero *Leishmania*, cuja principal célula hospedeira é o macrófago. As várias espécies desses parasitas têm a capacidade de desencadear diversos quadros clínicos da leishmaniose em um hospedeiro, assim como a infecção por uma única espécie pode ocasionar respostas bastante distintas em diferentes hospedeiros. Com o objetivo de descrever as diferenças genéticas entre macrófagos de duas linhagens diferentes de camundongos isogênicos, uma suscetível (CBA/J) e outra resistente (C57BL/6) à infecção por *L. amazonensis*, e de avaliar o possível impacto dessas diferenças na seqüência da infecção e no fenótipo de resistência ou suscetibilidade a esse parasita, foi utilizada a tecnologia GeneChip® (Affymetrix). Essa tecnologia consiste em uma plataforma de microarranjos de sondas oligonucleotídicas para varredura em larga escala dos transcritos produzidos por uma célula, sendo avaliados os perfis de expressão de mais de 12000 genes murinos simultaneamente. Os macrófagos das duas linhagens foram comparados entre si e dessa comparação foram selecionados 202 genes diferencialmente expressos. Desses genes, vários já foram descritos como tendo algum papel na resposta imune, tanto na ativação quanto na inibição das funções dos macrófagos e outras células de defesa, e podem apontar caminhos para futuras investigações sobre seus papéis na resistência ou suscetibilidade das células à infecção. Entre eles estão os genes que codificam receptores de quimiocinas e citocinas como CCR5 e IL-10R, quimiocinas como CCL3 e CCL4, fator C1q do complemento, receptores de prostaglandinas, várias proteínas da família p200 de proteínas induzidas por IFN- γ , além de proteínas relacionadas ao citoesqueleto, adesão celular e fagocitose, entre outras. Também foram comparados macrófagos infectados dessas duas linhagens com controles não-infectados. Nesse caso, vimos padrões bastante complexos de mudanças na expressão gênica das células infectadas, especialmente na linhagem CBA/J onde não foi possível selecionar genes com expressão diminuída na infecção com significância estatística. Esse trabalho mostra uma visão preliminar das diferenças genéticas entre duas linhagens de camundongo e das mudanças na expressão gênica dos macrófagos quando infectados por *L. amazonensis*. Novos estudos devem ser realizados para confirmação desses resultados e para elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos nos fenótipos de resistência e suscetibilidade a esse parasita.

ABSTRACT

The study of the functional genomics of host-pathogen interactions is of great importance for the comprehension of the molecular mechanisms controlling the onset of infectious diseases, being the early events of the interaction between pathogens and their hosts decisive steps for the outcome of the subsequent disease. Besides factors directly linked to the pathogen itself, such as pathogenicity and virulence, factors related to the host, such as general state of health and genetic background, are extremely important for the determination of the type and/or severity of the disease. This is especially true when we talk about infection with parasites of the genus *Leishmania*, whose main host cell is the macrophage. The various species of these parasites have the characteristic of producing many different clinical manifestations of leishmaniasis when infecting a host, just as the infection by a single species may elicit very diverse responses in different hosts. With the objective of describing the genetic differences between macrophages of two different strains of inbred mice, one of which is susceptible (CBA/J) and the other resistant (C57BL/6) to infection with *L. amazonensis*, and of evaluating the possible impact of these differences on the course of the infection and on the phenotype of resistance or susceptibility to this infection, the Affymetrix GeneChip® technology was used. This technology consists of a platform of oligonucleotide probe microarrays to scan a large portion of the transcripts produced by a cell at a specific moment. More than 12000 murine genes had their expression profiles evaluated in this study. Macrophages from the two strains were compared and 202 differentially expressed genes were selected from this comparison. Many of these genes have already been described as playing some part in the immune response, be it activating or inhibiting macrophage functions as well as those of other defense cells and can open new windows for future investigations on their roles in the resistance or susceptibility of cells to infection. Among them, genes coding chemokine and cytokine receptors such as CCR5 e IL-10R can be found, as well as those encoding chemokines like CCL3 e CCL4, complement factor C1q, prostaglandin receptors, and various proteins of the p200 family of IFN- γ induced proteins. Also, genes encoding proteins related to the cytoskeleton, cellular adhesion and phagocytosis, among others, were selected. We also compared infected macrophages of both strains with non-infected controls. In this case, we observed very complex patterns of changes in gene expression of the infected cells, especially of the CBA/J strain, where it was not possible to select genes with a statistically significant decrease in expression during the infection. This work shows a preliminary view of the genetic differences between two mouse strains and of the changes in macrophage gene expression when infected with *L. amazonensis*. More studies must be done in order to confirm these results and to elucidate the molecular mechanisms involved in the resistance and susceptibility to this parasite.

1. INTRODUÇÃO

O estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na interação entre patógenos e seus hospedeiros desperta grande interesse, uma vez que esses mecanismos são de suma importância para o entendimento da patogênese das doenças infecciosas. Com o avanço dos projetos de seqüenciamento de genomas, a facilidade na busca e comparação de seqüências nucleotídicas e o desenvolvimento de novas técnicas de análise global de expressão gênica, ferramentas de genômica funcional são cada vez mais utilizadas na busca da elucidação desse complexo sistema de interação.

Um aspecto bastante interessante da pesquisa em interação patógeno-hospedeiro é o impacto que as diferenças entre hospedeiros podem ter nesse processo. No caso da interação de *Leishmania* com sua célula hospedeira, o macrófago, muitos trabalhos têm focado os mecanismos do parasita para escapar do sistema imune e sobreviver no ambiente hostil que esta célula apresenta, pouco abordando as mudanças que ocorrem nos macrófagos.

Este trabalho se propõe a estudar, utilizando uma abordagem de genômica funcional, as diferenças entre duas linhagens de camundongo durante a infecção com uma espécie de *Leishmania*, diferenças essas que podem estar relacionadas com a progressão da infecção pelo parasita.

1.1. GENÔMICA FUNCIONAL E MICROARRANJOS DE DNA

Para se entender o funcionamento de uma célula é importante conhecer a função de um grande número de genes contidos em seu genoma bem como o programa de expressão deste genoma em diferentes situações biológicas. O seqüenciamento completo de genomas disponibilizou uma quantidade imensa de informações para o desenvolvimento de abordagens globais para que isso seja possível (HIETER, 1999).

A genômica funcional é o estudo da função dos genes através da medição paralela da expressão de genomas, muito comumente utilizando a metodologia de microarranjos de DNA, e cujo objetivo final é associar a função de cada gene de um determinado organismo com sua expressão em diferentes condições (BUTTE, 2002; SKIPPER, 2002).

Inicialmente descritos em 1995 por Schena *et al.*, microarranjos de DNA de alta densidade têm sido de grande impacto em muitas áreas como fisiologia celular (SCHENA *et al.*, 1996; DeRISI *et al.*, 1997; TAO *et al.*, 1999), biologia do câncer (PEROU *et al.*, 1999; GOLUB *et al.*, 1999; ALIZAADEH *et al.*, 2000) e farmacologia (MARTON *et al.*, 1998; SCHERF *et al.*, 2000), assim como fenotipagem molecular (análise de perfis de expressão), farmacogenômica, biologia do desenvolvimento, seqüenciamento de DNA e análise de mutações (SALAMON *et al.*, 2000; GREENBERG, 2001).

O princípio chave de todos os experimentos de microarranjo é baseado na hibridação altamente específica e sensível de uma solução de moléculas marcadas de ácido nucléico com moléculas de seqüência complementar immobilizadas em um substrato sólido. De forma geral, microarranjos de DNA são arranjos ordenados de milhares de moléculas de DNA de seqüência conhecida immobilizados sobre um substrato sólido, como uma lâmina de vidro (CUMMINGS & RELMAN, 2000). Simplificadamente, um dos objetivos de um experimento de microarranjo é identificar os transcritos que são alterados entre amostras de RNA de diferentes tipos celulares, ou mesmo de um único tipo celular ou tecido em diferentes situações, e determinar a magnitude das diferenças observadas (YUEN *et al.*, 2002). Existe uma gama de diferentes plataformas e cada uma utiliza diferentes métodos de detecção e análise dos dados (para uma revisão mais completa sobre a tecnologia de microarranjos de DNA, veja SCHENA, 2003).

No caso de microarranjos de DNAC (DNA complementar a um RNAm – RNA mensageiro) aplicados na lâmina, pode-se medir os níveis de expressão gênica numa amostra biológica isolando seu RNAm, sintetizando DNAC marcado com fluoróforos e o hibridando com o arranjo. As moléculas de DNA immobilizadas capturam as moléculas de DNAC marcadas que lhes sejam complementares e a intensidade da fluorescência em cada ponto de aplicação reflete o nível de expressão relativo daquele gene na amostra original (DIEHN & RELMAN, 2001). Para uma revisão mais detalhada sobre microarranjos de DNAC, veja Cheung e colaboradores (1999).

Já no caso de microarranjos de sondas oligonucleotídicas, estas podem ser tanto aplicadas na lâmina como sintetizadas sobre o substrato. A síntese *in situ* dos oligonucleotídeos é baseada em um processo que revolucionou a

indústria microeletrônica: a fotolitografia, onde a luz é usada para dirigir espacialmente a formação simultânea de muitos circuitos elétricos. Fodor e colaboradores (1991) descrevem como esse processo pode ser utilizado para a síntese simultânea de diversos compostos químicos, inclusive ácidos nucleicos.

Cada arranjo é hibridado com RNA derivado de uma única amostra e o uso de hibridação padronizada por protocolos de normalização permite a comparação dos resultados obtidos em diferentes experimentos, diferentemente dos arranjos de DNAC onde usualmente se emprega a técnica de hibridação competitiva – o DNAC de duas amostras, cada um marcado com um fluoróforo diferente, é hibridado simultaneamente em uma única lâmina – que permite a comparação da expressão gênica relativa nas duas amostras em um experimento único, além da comparação entre experimentos. Ambas as tecnologias de microarranjos são igualmente sensíveis, específicas e eficientes na identificação de genes regulados ou não (YUEN *et al.*, 2002).

Especificamente, os arranjos de sonda GeneChip[®] (Affymetrix) (LOCKHART *et al.*, 1996) são fabricados utilizando uma tecnologia que combina fotolitografia e química combinatorial. Centenas de milhares de sondas oligonucleotídicas diferentes são sintetizadas em cada arranjo. Cada oligonucleotídeo está localizado em uma área específica do arranjo chamada de célula de sonda. Cada célula de sonda contém milhões de cópias de um determinado oligonucleotídeo ou sonda (figura 1).

Os arranjos de sonda são fabricados em uma série de ciclos. Inicialmente, um substrato de vidro é coberto com ligantes contendo grupos protetores fotolábeis. Sobre esse substrato é aplicada uma máscara que expõe certas porções do arranjo à luz ultravioleta. A iluminação remove os grupos protetores fotolábeis permitindo a adição seletiva de nucleosídeos fosfoamidados apenas nos locais previamente expostos à luz. Em seguida, uma máscara diferente é aplicada e o ciclo de iluminação e ligação química é repetido. Com a repetição desse ciclo, um conjunto específico de sondas é sintetizado tendo-se cada tipo de sonda em uma posição conhecida dentro do arranjo (figura 2). Os arranjos de sonda completos são montados em cassetes.

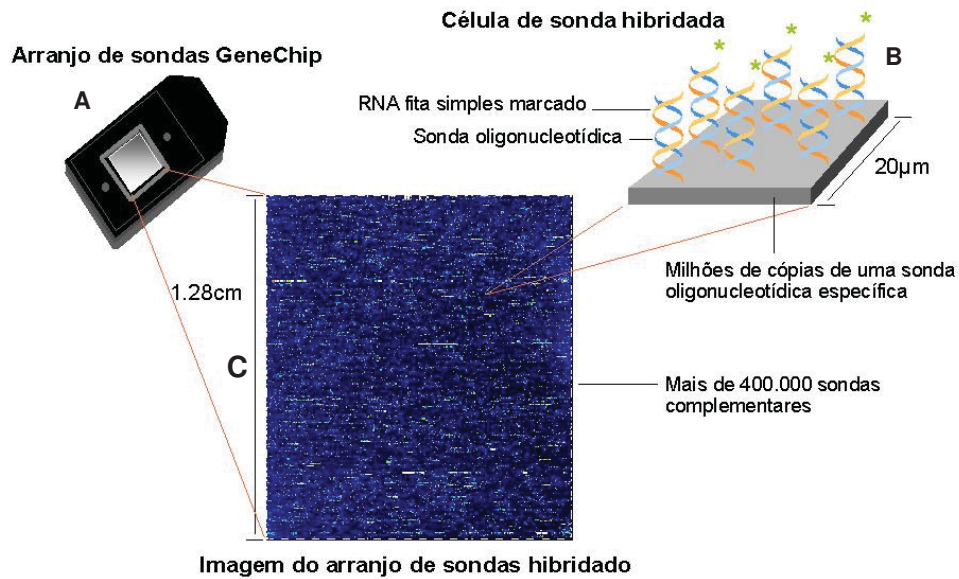


Figura 1. Representação esquemática de um arranjo de sondas GeneChip® (Affymetrix) mostrando (A) um cassete contendo o arranjo, (B) uma célula de sonda e (C) uma imagem real de um arranjo após hibridação.

Durante o processo laboratorial dos experimentos, fragmentos de RNA marcados com biotina, chamados “alvo”, são hibridados com o arranjo. O arranjo de sondas hibridado é, então, corado com um conjugado streptavidina-ficoeritrina e lido por um leitor GeneArray® em um comprimento de onda de excitação de 488 nm. A quantidade de luz emitida em 570 nm é proporcional à quantidade de moléculas-alvo ligadas a cada local no arranjo das sondas.

Cada gene é representado por dois conjuntos de até 20 sondas oligonucleotídicas, cada sonda correspondendo a um fragmento do gene. Um dos conjuntos contém oligonucleotídeos com seqüência idêntica à do gene e complementar ao RNAm; essas sondas são chamadas *Perfect Match* (PM). Já o outro conjunto contém oligonucleotídeos contendo uma única mutação em relação à seqüência do gene; são chamados *Mismatch* (MM). A relação entre a intensidade de sinal das sondas PM e MM indica se um gene está sendo expresso (“ligado”) ou não (“desligado”) na célula ou tecido em uma determinada situação experimental (figura 3). Este sinal tende a ser proporcional à abundância do RNA na amostra, até uma certa concentração de transcritos (CHUDIN *et al.*, 2001).

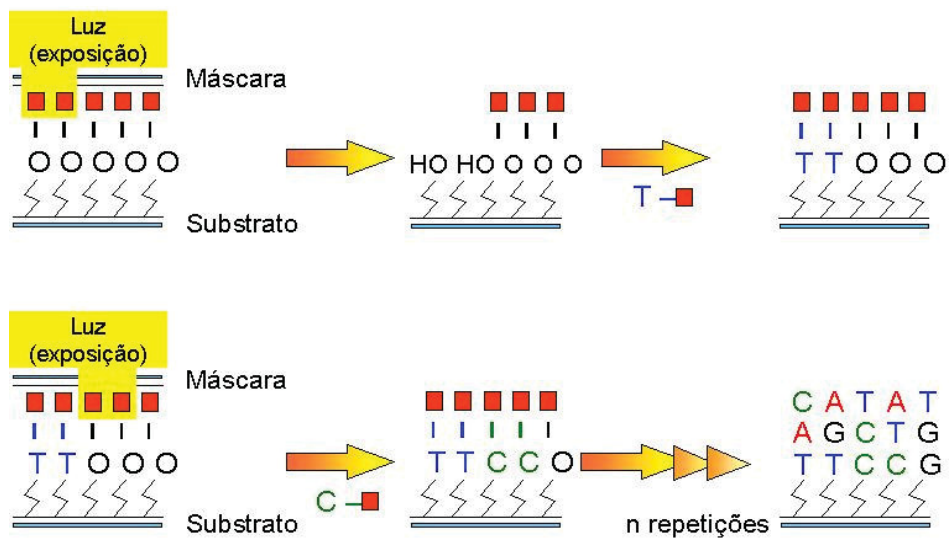


Figura 2. Representação esquemática do processo fotolitográfico de fabricação dos arranjos de sondas GeneChip®.

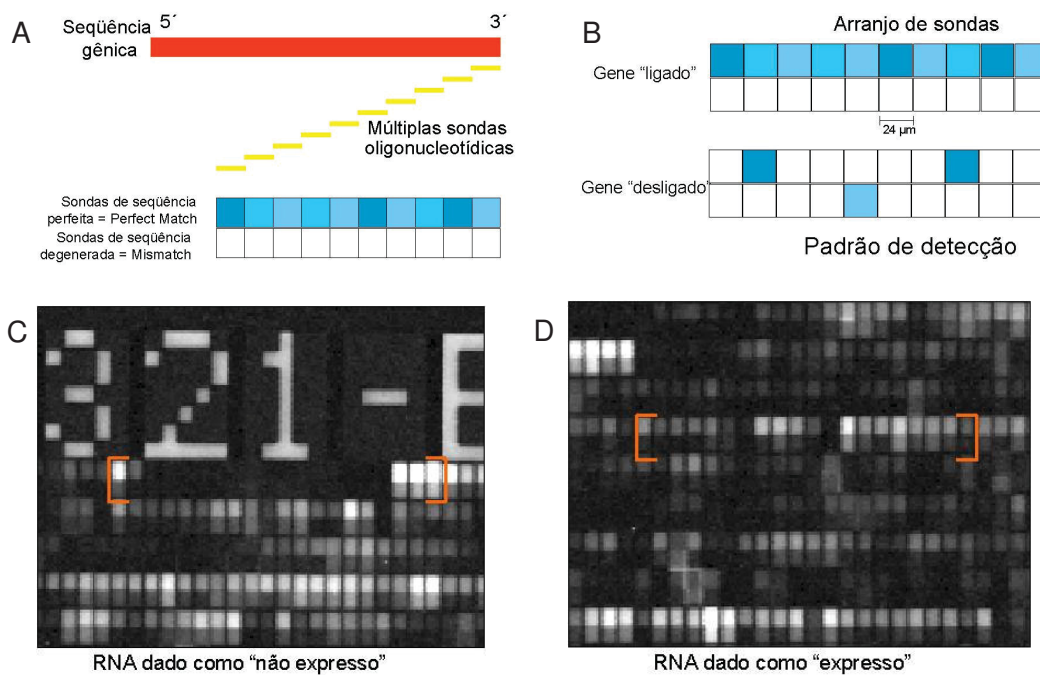


Figura 3. Conjuntos de sondas. (A) Representação esquemática da cobertura de um gene pelas sondas PM e MM e sua disposição no arranjo. (B) Representação esquemática do padrão de detecção de sinal quando um gene é expresso (ligado) ou não (desligado). (C) Imagem real de uma hibridação. As células entre os colchetes vermelhos representam todas as sondas correspondentes a um gene que, neste caso, não está sendo expresso. (D) Idem a C, porém, neste caso, o gene é expresso.

Os passos principais que delineiam a análise de expressão gênica pela metodologia GeneChip[®] são:

- a) Preparação dos alvos: para amostras eucarióticas, DNAc dupla-fita é sintetizado a partir de RNA total ou RNAm purificado isolado de tecidos ou células. Uma reação de transcrição *in vitro* é feita para produzir RNAc biotilado a partir do DNAc. O RNAc é fragmentado antes da hibridação.
- b) Hibridação dos alvos: uma mistura de hibridação é preparada, incluindo os alvos fragmentados, controles para o arranjo de sondas, BSA (soroalbumina bovina) e DNA de esperma de arenque. Essa mistura é então incubada com o arranjo de sondas por 16 horas.
- c) Lavagem e coloração do arranjo: imediatamente após a hibridação, o arranjo de sondas é lavado e corado por um processo automático em uma estação fluídica.
- d) Leitura do arranjo: uma vez que o arranjo foi hibridado, lavado e corado, ele é lido, sempre em duplicata. Um *software* calcula uma média das duas imagens, define as células de sonda e computa uma intensidade para cada célula. A leitura em duplicata melhora a sensibilidade do método e reduz a interferência do *background*.
- e) Análise dos dados: os dados são analisados utilizando-se programas computacionais que analisam a intensidade luminosa para cada sonda e relacionam estes dados com a intensidade de expressão gênica (GeneChip[®] Expression Analysis – Technical Manual).

Utilizando-se esta aplicação conceitualmente simples, é possível medir a expressão de milhares de genes de maneira simultânea e robusta, tornando possível um melhor entendimento da complexidade de genes que interagem coordenadamente (DIEHN & RELMAN, 2001; GREENBERG, 2001).

1.2. INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO

As complexas interações entre um patógeno e seu hospedeiro são diversas, coreografadas e reguladas, constituindo a base que delinea o curso de uma doença infecciosa. A maioria dos patógenos desenvolveu mecanismos

muito bem adaptados para interromper e alterar funções celulares e cada qual desenvolveu estratégias particulares para a manipulação do hospedeiro e otimização de sua sobrevivência e transmissão (CUMMINGS & RELMAN, 2000; MANGER & RELMAN, 2000; DIEHN & RELMAN, 2001).

A infecção de um hospedeiro por microorganismos patogênicos envolve mudanças drásticas na fisiologia tanto dos microrganismos invasores quanto das células hospedeiras. Essas mudanças fisiológicas são transmitidas por sistemas de transdução de sinal e espelhadas por mudanças na expressão gênica do patógeno e do hospedeiro (DIEHN & RELMAN, 2001).

A tecnologia de microarranjos de DNA pode acelerar o entendimento da interação patógeno-hospedeiro, pois uma grande fração do genoma pode ser analisada simultaneamente e o agrupamento dos dados pode identificar grupos de genes que implicam na ativação ou repressão de diversas vias reguladoras. Também permite a análise da seqüência temporal da indução e repressão da transcrição, um pré-requisito para a determinação da ordem dos eventos que seguem à interação entre o patógeno e a célula hospedeira (CUMMINGS & RELMAN, 2000; KATO-MAEDA *et al.*, 2001).

Com o uso de varredura em larga escala das mudanças no RNAm de células infectadas, é possível definir mudanças na expressão gênica que estão por trás da resposta do hospedeiro ao patógeno e adquirir conhecimentos específicos da natureza molecular das vias que governam a patogênese em questão no hospedeiro (O'FARREL *et al.*, 2002). Seguindo o padrão da expressão gênica do hospedeiro em diferentes momentos, é possível elucidar quais genes hospedeiros são estimulados ou reprimidos durante o curso da infecção. Essa informação é extremamente valiosa no desenvolvimento de vacinas e métodos diagnósticos e terapêuticos seguros e eficientes (KATO-MAEDA *et al.*, 2001).

A primeira aplicação de métodos de análise global da expressão gênica na patogênese consistiu na utilização de arranjos de oligonucleotídeos por Zhu e colaboradores, em 1998, para o monitoramento de fibroblastos humanos primários infectados por citomegalovírus. Esses pesquisadores relataram uma diferença de pelo menos quatro vezes na abundância da expressão de 258 entre aproximadamente 6600 genes quando células infectadas e não-infectadas foram comparadas, tanto 8 quanto 24 horas após a infecção, sendo

algumas dessas diferenças consistentes com a indução de respostas imunes celulares (ZHU *et al.*, 1998).

A partir daí e com o avanço tecnológico dos métodos de análise de expressão gênica em larga escala, os microarranjos de DNA foram utilizados para investigar a interação entre diversos hospedeiros e patógenos como outros vírus (BIGGER *et al.*, 2001; JOHNSTON *et al.*, 2001; POGGIOLI *et al.*, 2002), bactérias (ICHIKAWA *et al.*, 2000; ROSENBERGER *et al.*, 2000) e protozoários (BLADER *et al.*, 2001; CHAUSSABEL *et al.*, 2003) e mesmo para detecção e genotipagem de patógenos em culturas de células e em amostras clínicas (SALAMA *et al.*, 2000; KATO-MAEDA *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2002).

Apesar da análise da expressão gênica de tecidos infectados por patógenos ser factível, a heterogeneidade celular pode trazer grandes complicações para a análise da resposta hospedeira. O exame dessa resposta em culturas de células infectadas utilizando-se os tipos celulares mais prováveis de serem infectados pelo patógeno pode diminuir a complexidade do sistema em estudo. Resultados obtidos de sistemas de cultivo celular serão um instrumental para a interpretação dos perfis de expressão gênica de tipos celulares específicos quando dados de tecidos completos forem analisados (CUMMINGS & RELMAN, 2000).

Nosso grupo está envolvido em uma grande linha de pesquisa em interação patógeno-hospedeiro onde as interações entre *Trypanosoma cruzi*, vírus da dengue e *Toxoplasma gondii* e suas células hospedeiras já são objeto de estudo. Dentro dessa mesma linha, estão sendo estudadas as diferenças causadas por diferentes espécies de *Leishmania* em macrófagos de uma mesma linhagem de camundongo tanto do ponto de vista imunológico e histopatológico (SOUZA *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2003) quanto de genômica funcional (dados ainda não publicados). Este trabalho se propõe a estudar o impacto das diferenças genéticas entre linhagens no curso da infecção por uma única espécie do parasita.

1.3. MODELO ANIMAL

Camundongos são susceptíveis a um espectro de infecções similar aos humanos. Diferenças entre linhagens de camundongos no que concerne às

suas respostas a patógenos podem ser exploradas para analisar as bases genéticas das infecções e das interações entre patógenos e hospedeiros. Além disso, as ferramentas genéticas disponíveis em camundongos de laboratório e novas técnicas de monitoramento da expressão gênica *in vivo*, tanto dos patógenos quanto dos hospedeiros, fazem do camundongo o principal modelo animal para o estudo de mecanismos de infecção e imunidade (BUER & BALLING, 2003).

A linhagem CBA foi desenvolvida por Strong em 1920 a partir do cruzamento de uma fêmea Bagg albina com um macho DBA, sendo selecionada pela baixa incidência de tumor mamário, diferentemente da linhagem C3H que foi selecionada pela alta incidência desse tumor. Atualmente, a linhagem CBA é largamente distribuída e utilizada para fins gerais em laboratório. A sub-linhagem CBA/J, passada por Strong para Andervont em 1947 e deste para o Jackson Laboratory em 1948, carrega um gene para degeneração da retina (*rd*) (FESTING, 1998). Os camundongos dessa linhagem apresentam alta taxa de mutação espontânea (SCHLAGER & DICKIE, 1967). São resistentes à infecção por *Leishmania major*, mas suscetíveis a *L. amazonensis*, desenvolvendo lesões progressivas com ulceração e necrose (LASKAY *et al.*, 1995; SOUZA *et al.*, 2000). Acredita-se que a resistência desses camundongos a *L. major* esteja relacionada a uma resposta de células T tipo 1 (T_H1) que induzem imunidade celular contra os parasitas pela produção de IFN- γ , IL-12 e ativação de macrófagos, e que a suscetibilidade a *L. amazonensis* esteja relacionada a uma resposta de células T tipo 2 (T_H2) que induzem produção de IL-4, IL-10 e TGF- β (SOUZA *et al.*, 2000).

A linhagem C57BL foi criada por Little em 1921 pelo cruzamento de uma fêmea 57 com um macho 58 do estoque de Abbie Lathrop, sendo que este mesmo cruzamento deu origem às linhagens C57L e C57BR e o cruzamento desse mesmo macho 58 com uma fêmea 58 deu origem à linhagem C58. Atualmente, é a mais utilizada entre as linhagens isogênicas, sendo a sub-linhagem C57BL/6 (separada da C57BL/10 antes de 1937 e mantida pelo Jackson Laboratory) utilizada em mais de 14% das pesquisas com linhagens isogênicas (FESTING, 1998). A sub-linhagem C57BL/6 é resistente à infecção por *L. major* (LASKAY *et al.*, 1995) e suscetível a *L. amazonensis*, mas,

diferentemente da linhagem CBA, as lesões não são progressivas e não é observada disseminação dos parasitas, mantendo uma infecção crônica, mas contida (CHAMPSI & McMAHON-PRATT, 1988). Neste caso, a resistência a *L. major* é associada a uma eficiente resposta T_H1 , mas os mecanismos de suscetibilidade a *L. amazonensis* ainda não são claros, podendo estar associados a uma resposta T_H1 insuficiente ou desbalanceada ou à ativação de outras sub-populações de células T. O que se sabe é que essa suscetibilidade não está relacionada à resposta T_H2 (SOONG *et al.*, 1997).

1.4. MACRÓFAGOS E RESPOSTA IMUNE

A fagocitose, processo pelo qual as células internalizam material particulado estranho, está envolvida na aquisição de nutrientes por organismos unicelulares, assim como na remoção de células apoptóticas durante o desenvolvimento e na remodelação de tecidos nos organismos pluricelulares (DESJARDINS, 2003). É considerada o mecanismo de defesa primordial de todos os organismos metazoários, sendo sugerida como representante de um mecanismo de defesa inata rudimentar nos organismos eucarióticos mais primitivos, os protozoários.

A célula fagocitária mais importante no organismo vertebrado é o macrófago (figura 4), sendo que células relacionadas ao macrófago vertebrado estão presentes em virtualmente todos os metazoários, atestando para a importância da fagocitose na defesa do organismo. Em muitos casos, são os macrófagos (ou células de linhagens relacionadas, como as células dendríticas) que atuam como a primeira linha de defesa mediada por células contra patógenos.

As principais funções dos macrófagos na defesa do organismo são limitar a disseminação inicial ou crescimento de agentes infecciosos e modular as reações imunológicas subseqüentes, tendo função tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa (ABBAS *et al.*, 2000; STAFFORD *et al.*, 2002).

O contato entre a célula fagocitária e o micróbio é acompanhado por sinais intracelulares que disparam processos celulares tão diversos quanto o rearranjo do citoesqueleto, alterações no tráfego de membrana, ativação de

mecanismos microbicidas, produção de citocinas e quimiocinas pró e antiinflamatórias, ativação da apoptose e produção de moléculas necessárias para a apresentação eficiente de antígenos para o sistema imune adaptativo (UNDERHILL & OZINSKY, 2002). Além disso, mecanismos de reconhecimento não-próprio estão intimamente ligados à fagocitose e são críticos para a indução dos mecanismos imunes mediados por macrófagos (STAFFORD *et al.*, 2002).

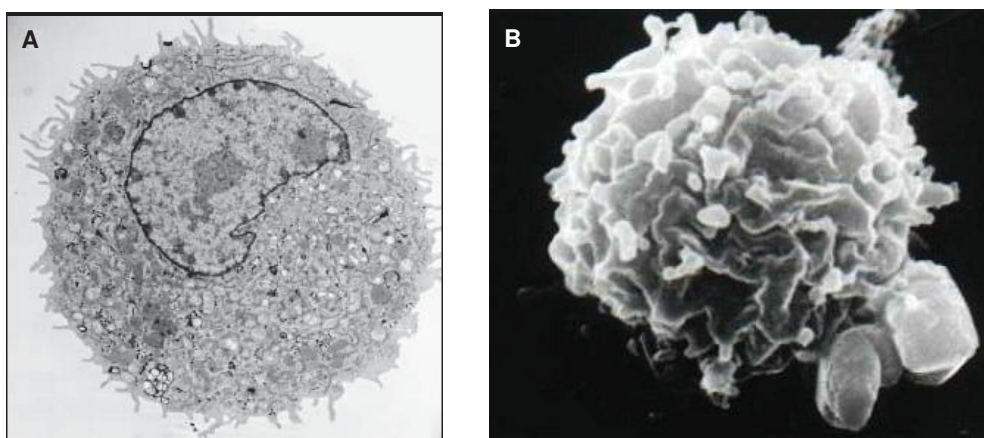


Figura 4. O macrófago. (A) Micrografia eletrônica de transmissão de um macrófago (DESJARDINS, 2003). (B) Micrografia eletrônica de varredura mostrando bactérias aderidas a um macrófago (FONTE: www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE/).

Essas células utilizam diversas moléculas de grande importância no reconhecimento de antígenos não-próprios e patógenos:

- a) Receptores $Fc\gamma$ ($Fc\gamma R$): receptores de superfície específicos para a região carboxi-terminal constante de moléculas de IgG. Tanto macrófagos como neutrófilos expressam diferentes combinações de $Fc\gamma R$. Assim, o reconhecimento de partículas opsonizadas por IgG ocorre simultaneamente por vários receptores e dispara a internalização por meio da polimerização de actina e recrutamento de membrana.
- b) Receptores de complemento (CR): o sistema complemento consiste de uma cascata proteolítica que é ativada direta ou indiretamente pelo reconhecimento de moléculas não-próprias ao organismo. A ativação de complemento por microorganismos pode ter três efeitos biológicos principais: (i) fixação dos componentes finais da cascata à

membrana do microrganismo, resultando em lise pela formação de um complexo de ataque à membrana (MAC); (ii) fixação de C3, levando a opsonização do microrganismo e fagocitose por macrófagos; e (iii) elaboração de anafilatoxinas C3a e C5a, levando ao recrutamento de células imunes e início da resposta inflamatória. Dos receptores de complemento relacionados à fagocitose, CR3 é o mais bem caracterizado em macrófagos e a fagocitose mediada por este receptor é estimulada por citocinas inflamatórias (TNF- α), produtos microbianos (LPS e LPG) e adesão por fibronectina. Alguns patógenos, como *Leishmania* spp. podem explorar a fixação de complemento à sua superfície para aumentar sua internalização em macrófagos hospedeiros pelo receptor CR3.

- c) *Scavenger receptors* (SR): reconhecem tanto ligantes derivados de patógenos como do próprio hospedeiro utilizando um padrão de reconhecimento que não induz a ativação dos macrófagos. Participam do reconhecimento e internalização de patógenos e células apoptóticas, adesão celular, retirada de produtos bacterianos da circulação e cicatrização de feridas. Os receptores mais estudados desta família são SR-A e MARCO (receptor de macrófago com estrutura colagenosa).
- d) Receptor de manose: encontrado em células apresentadoras de antígenos (como macrófagos e células dendríticas) e liga diretamente domínios glicídicos na superfície de patógenos, levando à fagocitose. Também medeia a internalização de antígenos solúveis por endocitose. Outras lectinas do tipo C, como esse receptor, também estão envolvidas na ligação e reconhecimento de carboidratos tanto próprios como estranhos.
- e) Proteína Ligadora de Manose (MBP): proteína plasmática de fase aguda sintetizada no fígado e que atua tanto como opsonina, estimulando a fagocitose, como ativadora da cascata de complemento. No caso de patógenos protozoários, MBP reconhece especificamente glucanas, lipofosfoglicanos e glicoinositol-fosfolípídeos de superfície e essa ligação freqüentemente resulta na

morte do patógeno pela ativação de complemento e subsequente lise pela formação do MAC.

- f) Receptores *toll-like* (TLR): receptores de reconhecimento de padrões exógenos do sistema imune inato, importantes não só no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) como também na iniciação da transdução de sinais indutores de mecanismos imunes inatos dos macrófagos. A ativação de TLRs por ligantes microbianos ativa eventos de sinalização intracelulares que levam à ativação das cascatas do NF- κ B e da MAPK. O efeito resultante induz mecanismos imunes inatos como a secreção de citocinas e quimiocinas, produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio e diferenciação celular (STAFFORD *et al.*, 2002; UNDERHILL & OZINSKY, 2002).

Além da fagocitose de agentes infecciosos e sua subsequente destruição por enzimas lisossomais, os macrófagos podem ser estimulados a destruir ativamente microorganismos fagocitados capazes de resistir à ação dessas enzimas, como o *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. O reconhecimento de moléculas microbianas em conjunto com a estimulação por citocinas resulta na indução de uma variedade de mecanismos efetores citotóxicos pelo macrófago. Entre esses mecanismos podemos citar:

- a) Explosão respiratória: ou produção de intermediários reativos de oxigênio, onde o NADPH é oxidado e atua como uma fonte de poder redutor para converter oxigênio molecular em superóxido (O_2^-). A produção de superóxido resulta na produção espontânea ou catalisada por enzimas de uma gama de produtos reativos como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($HO\bullet$), ácido hipocloroso (OCl^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (STAFFORD *et al.*, 2002; UNDERHILL & OZINSKY, 2002).
- b) Produção de óxido nítrico (NO): relacionado com aumento da citotoxicidade contra tumores e patógenos, é produzido pela atividade da óxido nítrico sintase (NOS), particularmente sua isoforma indutível (iNOS ou NOS2), expressa por células imunes ativadas. Embora seja importante para o controle de infecções parasitárias, altas concentrações de NO podem contribuir para a

destruição de tecidos e aumento do processo inflamatório (GIORGIO *et al.*, 1998; STAFFORD *et al.*, 2002).

- c) Indução de mecanismos privacionais: processos que diminuem a disponibilidade de elementos essenciais para os parasitas, especialmente ferro, outros cátions divalentes e triptofano (STAFFORD *et al.*, 2002).

Estudos desde 1960 mostram que a ativação clássica dos macrófagos depende de produtos tanto de linfócitos T auxiliares tipo 1 (T_H1) como de células NK (*natural killer*) especificamente ativadas – particularmente $IFN-\gamma$ – e uma rede de citocinas envolvendo IL-12 e IL-18, que são produzidas por células apresentadoras de antígeno (CAA). Menos bem definida é a ativação alternativa dos macrófagos por IL-4 e IL-13, citocinas que são produzidas geralmente em respostas tipo T_H2 , particularmente em respostas alérgicas, celulares ou humorais a parasitas e patógenos extracelulares (revisado por GORDON, 2003).

A via de diferenciação de linfócitos auxiliares T_H1 promove a resposta a patógenos que infectam ou ativam macrófagos e àqueles que ativam células NK. É, portanto, importante para a imunidade mediada por células (figura 5A). A principal citocina efetora das células T_H1 é o $IFN-\gamma$. Essa citocina promove a produção por células B de isotipos de imunoglobulinas, como IgG2a em camundongos, que fixam complemento e promovem a fagocitose de micróbios opsonizados pela ligação a receptores $Fc\gamma$. Além disso, $IFN-\gamma$ ativa o fator de transcrição STAT1, assim como funções microbidas dos macrófagos. A diferenciação é disparada principalmente por IL-12, produzida durante a resposta imune inata, quando esta se liga a receptores em células T $CD4^+$ estimuladas por antígeno ativando, assim, STAT1 e STAT4, que regulam positivamente a transcrição de $IFN-\gamma$, IL-2 e TNF.

Já a via de diferenciação T_H2 ocorre, classicamente, em resposta a helmintos e alérgenos, o que causa estimulação crônica de células T e, normalmente, pouca ativação de macrófagos, sendo importante na imunidade humoral (figura 5B). Células T_H2 produzem IL-4, que induz produção de isotipos de imunoglobulinas, como IgG1 em camundongos, que não fixam complemento nem se ligam a receptores $Fc\gamma$, e IL-5 que ativa eosinófilos. Além

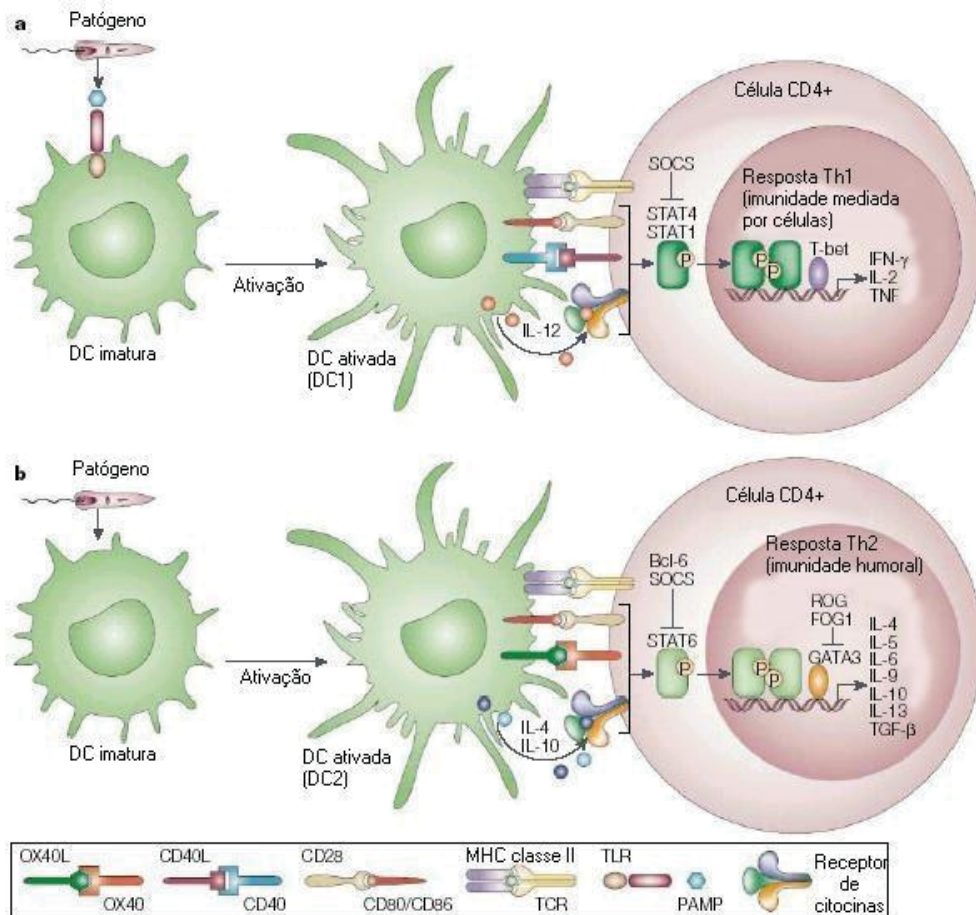


Figura 5. Modelo de diferenciação T_H1/T_H2 . Em ambas as vias de diferenciação, antígenos são apresentados a células T $CD4^+$ *naive* por CAA, por exemplo, células dendríticas (DC). A interação de moléculas co-estimuladoras com seus respectivos receptores (CD40-CD40L, OX40-OX40L e/ou CD80-CD28), aliada à interação com as citocinas no ambiente local, promove a diferenciação de células T *naive* em células T_H1 secretoras de IFN- γ ou em células T_H2 secretoras de IL-4. (A) No desenvolvimento T_H1 , certos PAMPs induzem células apresentadoras de antígenos, por meio de TLRs, a secretarem IL-12 que promove a diferenciação de células T *naive* em células T_H1 secretoras de IFN- γ . STAT1 e STAT4 são ativados. T-bet, um fator de transcrição tipo T-box, é específico da linhagem T_H1 . (B) No desenvolvimento T_H2 , a incapacidade do antígeno de induzir DCs a produzir IL-12 resulta numa via padrão de diferenciação de células T *naive* em células T_H2 secretoras de IL-4. Além disso, antígenos e/ou ambientes teciduais específicos podem induzir DCs a produzir IL-4 ou IL-10, que vão direcionar o desenvolvimento T_H2 . STAT6 é ativado especificamente pela ligação do receptor de IL-4 e o fator de transcrição GATA3, específico da linhagem T_H2 , é ativado. Bcl-6, ROG (repressor de GATA) e FOG1 (*friend of GATA1*) regulam negativamente a diferenciação T_H2 reprimindo a atividade de STAT6 e GATA3. Membros da família de supressores de sinalização por citocinas (SOCS) bloqueiam STAT (modificado de SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

disso, IL-4 ativa STAT6, que induz a transcrição de IL-13 e IL-10, entre outros produtos (ABBAS *et al.*, 2000; ROGERS *et al.*, 2002; SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002; GORDON, 2003).

Muitos estudos agrupam IL-4, IL-10 e IL-13 e as classificam como sendo inibidoras dos macrófagos. Entretanto, foi observado que IL-4 e IL-13 têm efeitos distintos daqueles induzidos por IFN- γ (ativação clássica) e IL-10 (real inativação da explosão respiratória e da produção de citocinas inflamatórias, particularmente TNF, pelos macrófagos). Na verdade, elas aumentam a expressão de receptores de manose e moléculas MHC de classe II pelos macrófagos, o que estimula a endocitose e a apresentação de antígenos, e induzem a expressão de citocinas específicas e enzimas intracelulares que estão implicadas no recrutamento celular e formação de granuloma. Sendo assim, funcionam também no balanço entre as respostas T_H1 e T_H2 (revisado por GORDON, 2003).

1.5. LEISHMANIA E LEISHMANIOSE

Atualmente, as leishmanioses ameaçam cerca de 350 milhões de pessoas em 88 países. Estima-se que existam 12 milhões de casos no mundo, com 1,5-2 milhões de novos casos ocorrendo anualmente (WHO/OMS, 2004).

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, que é dividido em dois subgêneros: *L. (Leishmania)* spp. e *L. (Viannia)* spp. (MELBY, 2002). Este gênero faz parte da família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastida), que divergiu cedo na evolução dos eucariotos, próxima à base da árvore evolucionária, antes da emergência de diversas linhagens de protozoários e muito antes da separação das linhagens metazoárias que englobam plantas, animais e fungos. A família Trypanosomatidae compreende numerosos gêneros de protozoários, nenhum dos quais de vida livre. Pelo menos três vezes durante a evolução, tripanossomatídeos independentemente colonizaram hospedeiros mamíferos, dando origem a ancestrais do tripanossoma sul-americano *Trypanosoma cruzi*, dos tripanossomas africanos como o *T. brucei* e das leishmanias (BEVERLEY, 2003).

As manifestações clínicas e a severidade da leishmaniose dependem não somente da espécie de parasita que está infectando o hospedeiro como também da saúde geral e constituição genética do indivíduo (CUNNINGHAM, 2002; ROGERS *et al.*, 2002). Infelizmente, a natureza das diferenças entre hospedeiros sensíveis e resistentes e como essas diferenças são exploradas pelos parasitas são questões ainda indefinidas (DOSREIS, 2000).

A Organização Mundial de Saúde (WHO/OMS, 2004) descreve quatro formas clínicas principais da leishmaniose:

- a) Leishmaniose cutânea: produz úlceras cutâneas crônicas no local da picada do inseto vetor que podem levar meses para cicatrizar (HANDMAN, 2000). Embora esta forma seja freqüentemente autolimitada, ela pode criar sérias incapacitações e cicatrizes permanentes. Após recuperação e/ou tratamento bem-sucedido, a leishmaniose cutânea induz imunidade contra re-infecção pela mesma espécie de leishmania que causou a doença.
- b) Leishmaniose cutânea difusa: é muito difícil de ser tratada devido às lesões disseminadas que lembram a lepra e não curam espontaneamente. Esta forma está especialmente relacionada a um sistema imune deficiente e é freqüentemente caracterizada por recidivas após o tratamento.
- c) Leishmaniose mucocutânea: popularmente conhecida no Brasil como úlcera de Bauru ou ferida brava, inicialmente causa úlceras na pele similares àquelas da leishmaniose cutânea que cicatrizam para depois reaparecerem como lesões desfigurantes na face; destróem as membranas mucosas do nariz, boca e garganta (HANDMAN, 2000).
- d) Leishmaniose visceral: também conhecida como 'calazar' ou 'kala azar', é caracterizada por febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia. É a forma mais severa da leishmaniose e usualmente é fatal se não tratada. O período de incubação pode ser de meses ou anos e, diferentemente das formas cutâneas, afeta os órgãos internos. Após tratamento e recuperação, os pacientes podem desenvolver leishmaniose cutânea crônica que requer tratamento longo e caro.

L. (L.) tropica e *L. (L.) major* são exemplos de causadores da leishmaniose cutânea e mucocutânea no norte da África, Oriente Médio, Índia e na Europa mediterrânea. Nas Américas, podemos citar *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, sendo as três últimas as mais importantes no Brasil. A *L. (V.) braziliensis* também é a causadora da leishmaniose mucocutânea nessas regiões. Já a leishmaniose visceral é causada principalmente pela *L. (L.) donovani*, mas também pela *L. (L.) infantum*, no Velho Mundo, e pela *L. (L.) chagasi* na América do Sul, particularmente no Brasil (GRIMALDI *et al.*, 1989; FUNASA, 2002; CUNNINGHAM, 2002; MELBY, 2002).

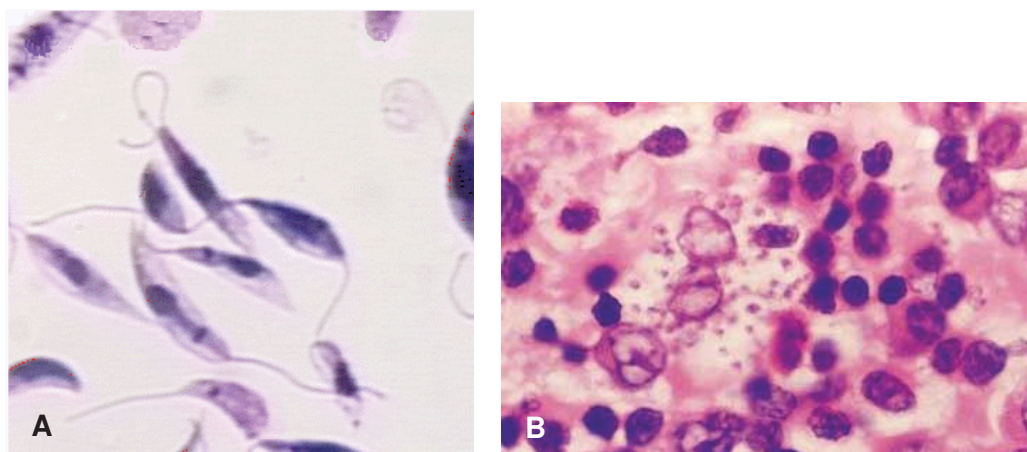


Figura 6. *Leishmania* sp. (A) promastigotas e (B) amastigotas (FONTE: www.bioport.ro/Bioport/Leishmania.html)

Os parasitas do gênero *Leishmania* se apresentam como promastigotas flagelados no inseto vetor (gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo) e como amastigotas aflagelados no interior de fagócitos mononucleares do hospedeiro vertebrado (figura 6) (ALEXANDER *et al.*, 1999; MELBY, 2002; ROGERS *et al.*, 2002). É interessante notar que esses parasitas não possuem nenhum mecanismo que os possibilite penetrar ativamente nas células hospedeiras e, portanto, dependem do potencial fagocitário da célula a ser infectada (ZAMBRANO-VILLA *et al.*, 2002).

Como esquematizado na figura 7, o parasita é transmitido ao hospedeiro vertebrado pela picada de fêmeas do inseto vetor infectadas, que injetam um pequeno número de promastigotas metacíclicos (formas infecciosas) na pele. Essas formas são eficientemente opsonizadas por componentes do plasma

que sinalizam a ativação de complemento e a deposição de C3 na superfície dos parasitas, o que induz a fagocitose por macrófagos. No interior dos fagolisossomos, os promastigotas se diferenciam em amastigotas (formas replicativas) que proliferam, eventualmente rompendo o macrófago infectado, e são liberados para infectar macrófagos vizinhos. Macrófagos infectados podem ser ingeridos pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo e são lisados no intestino médio deste, liberando parasitas que se diferenciam em promastigotas procíclicos (formas não-infecciosas que se replicam rapidamente). Essas formas passam por um processo de adesão à parede do intestino, liberação e migração anterior que é acompanhado por sua diferenciação em promastigotas metacíclicos não-replicativos que podem ser transmitidos quando o vetor fizer um novo repasto sanguíneo (CUNNINGHAM, 2002; SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002; DOMINGUEZ *et al.*, 2003).

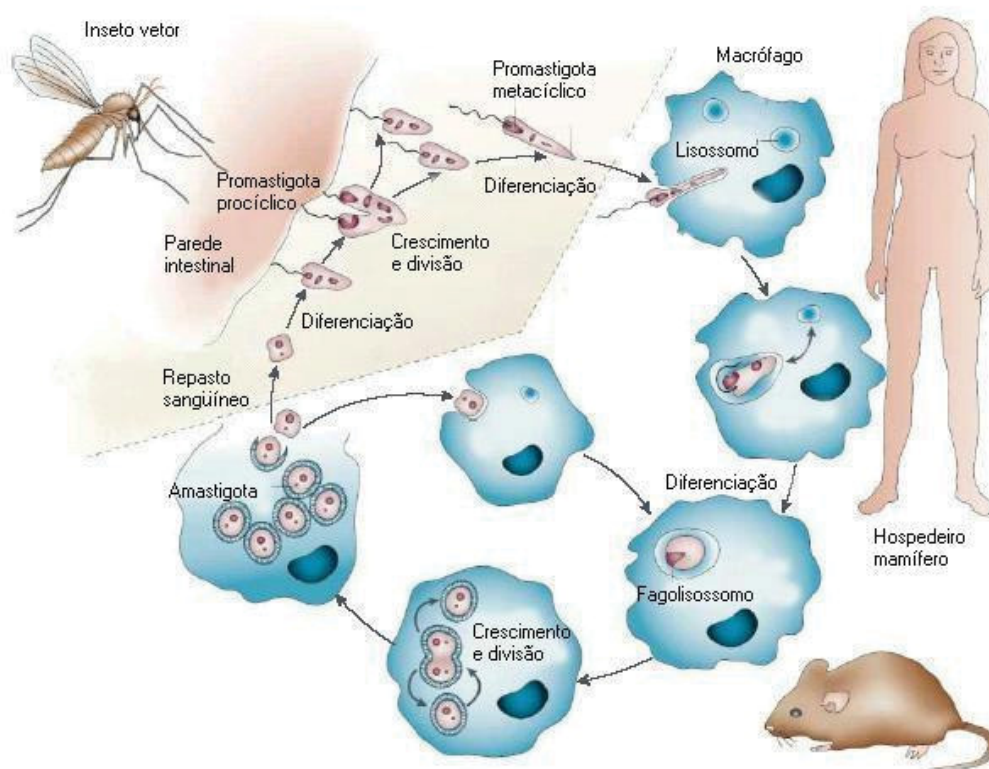


Figura 7. Ciclo de vida da *Leishmania* sp (Modificado de SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo a descrição do transcrito diferencial de macrófagos murinos de duas linhagens isogênicas diferentes assim como das mudanças que ocorrem no programa de expressão gênica dessas células quando infectadas por *Leishmania amazonensis*.

3. METODOLOGIA

3.1. SOLUÇÕES

3.1.1. Solução de Fragmentação 5X

Reagente	Concentração final	Quantidade
Tris-acetato, pH 8,1	200 mM	4,0 ml de Tris 1 M, pH 8,1
KOAc	500 mM	0,98 g
MgOAc	150 mM	0,64 g
Água tratada com DEPC	-	q.s.p. 20 ml

A solução foi homogeneizada, filtrada em filtro de poro de 0,2 μm de diâmetro, alíquotada e armazenada a temperatura ambiente.

3.1.2. Solução Estoque MES 12X

Reagente	Concentração final	Quantidade
MES ácido monohidratado livre (Sigma)	1,22 M MES	70,4 g
MES sal sódico (Sigma)	0,89 M $[\text{Na}^+]$	193,3 g
Água ultra-pura	-	q.s.p. 1000 ml

O pH foi ajustado entre 6,5 e 6,7, a solução foi filtrada em filtro de poro de 0,2 μm de diâmetro e armazenada a 4°C ao abrigo da luz.

3.1.3. Tampão de Hibridação 2X

Reagente	Concentração final (1X)	Quantidade
Solução Estoque MES 12X (item 3.1.2)	100 mM MES	8,3 ml
NaCl 5 M	1 M $[\text{Na}^+]$	17,7 ml
EDTA 0,5 M	20 mM	4,0 ml
Tween 20 10%	0,01%	0,1 ml
Água ultra-pura	-	q.s.p. 50 ml

A solução foi armazenada a 4°C ao abrigo da luz.

3.1.4. SSPE 20X

Reagente	Concentração final	Quantidade
NaCl 5 M	3 M	300 ml
NaH ₂ PO ₄ 1 M	0,2 M	100 ml
EDTA 0,5 M	0,02 M	20 ml
Água ultra-pura	-	q.s.p. 500 ml

3.1.5. Tampão de Lavagem Não-Estringente (Tampão A)

Reagente	Concentração final	Quantidade
SSPE 20X (item 3.1.4)	6X	300 ml
Tween 20 10%	0,01%	1,0 ml
Água ultra-pura	-	q.s.p. 1000 ml

A solução foi filtrada em filtro de poro de 0,2 µm de diâmetro.

3.1.6. Tampão de Lavagem Estringente (Tampão B)

Reagente	Concentração final	Quantidade
Solução Estoque MES 12X (item 3.1.2)	100 mM MES	83,3 ml
NaCl 5 M	0,1 M [Na ⁺]	5,2 ml
Tween 20 10%	0,01%	1,0 ml
Água ultra-pura	-	q.s.p. 1000 ml

A solução foi filtrada em filtro de poro de 0,2 µm de diâmetro e armazenada a 4 °C ao abrigo da luz.

3.1.7. Tampão de Coloração 2X

Reagente	Concentração final (1X)	Quantidade
Solução Estoque MES 12X (item 3.1.2)	100 mM MES	41,7 ml
NaCl 5 M	1 M [Na ⁺]	92,5 ml
Tween 20 10%	0,05%	2,5 ml
Água ultra-pura	-	q.s.p. 250 ml

A solução foi filtrada em filtro de poro de 0,2 µm de diâmetro e armazenada a 4 °C ao abrigo da luz.

3.1.8. Tampão SAPE

Reagente	Concentração final	Quantidade
Tampão de coloração 2X (item 3.1.7)	1X	600 µl
BSA acetilada 50 mg/ml (Invitrogen)	2 mg/ml	48,0 µl
SAPE 1mg/ml (Molecular Probes)	10 µg/ml	12,0 µl
Água ultra-pura	-	q.s.p. 1200 µl

A solução foi preparada no momento do uso.

3.1.9. Solução de Anticorpo

Reagente	Concentração final	Quantidade
Tampão de coloração 2X (item 3.1.7)	1X	300 µl
BSA acetilada 50 mg/ml (Invitrogen)	2 mg/ml	24,0 µl
IgG de cabra normal 10 mg/ml (Sigma)	0,1 mg/ml	6,0 µl
Anticorpo biotinizado 0,5 mg/ml (Vector)	3 µg/ml	3,6 µl
Água ultra-pura	-	q.s.p. 600 µl

3.2. CAMUNDONGOS

Camundongos CBA/J e C57BL/6, machos e fêmeas entre 6 e 12 semanas de idade, foram adquiridos do biotério central do IOC/FIOCRUZ (Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, RJ) e do biotério do CPqGM/FIOCRUZ (Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Salvador, BA). Estes animais foram criados em condições livres de patógenos específicos e alimentados com ração comercial e água à vontade.

3.3. PARASITAS

Foram utilizados promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* (MHOM/Br88/Ba-125) cedidos pela Dra. Aldina Barral do Laboratório de Imunopatologia do CPqGM/FIOCRUZ. Promastigotas frescos de *L. amazonensis* foram derivados de amastigotas isolados de linfonodos de camundongos C57BL/6 resistentes à infecção, ressuspensos em ágar sangue Novy-Nicolle-MacNeal e transferidos para meio LIT (CAMARGO, 1964) adicionado de 10% de SFB (Cultilab) por um máximo de seis passagens.

Para os experimentos, os promastigotas foram expandidos por 3 a 5 dias até atingirem a fase estacionária e, então, lavados com solução salina.

3.4. CULTIVO DE MACRÓFAGOS

Macrófagos de exudato peritoneal induzido por tioglicolato (PEC MΦ) foram preparados a partir da cavidade peritoneal de camundongos CBA/J e C57BL/6 4 dias após injeção intraperitoneal de 2,5 ml de meio tioglicolato 3% (Sigma). PEC MΦ foram obtidos por lavagem da cavidade peritoneal duas vezes com 10 ml de salina gelada adicionada de heparina (20 UI/ml) e centrifugação a 300 x g por 10 minutos. As células foram ressuspensas em DMEM suplementado com 25 mM HEPES pH 7,4, 2 mM de glutamina, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de streptomina, 2 g/L de bicarbonato de sódio e 10% de SFB (Gibco) (meio completo).

PEC MΦ em meio completo (10^7 por ml) foram plaqueados em placas de cultivo de 24 poços (Costar) contendo ou não lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro (Glasstécnica) a 37°C em 5%CO₂/95%ar úmido. Após 4 horas, células não aderidas foram lavadas 3 vezes com RPMI-1640 (Cultilab) suplementado com 25 mM de HEPES. Os macrófagos foram incubados com meio fresco para os experimentos.

3.5. INFECÇÃO DOS MACRÓFAGOS

PEC MΦ foram infectados com promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* e numa proporção de 10:1 (10 parasitas por célula). Após 6 ou 24 horas, as células foram lavadas e coletadas para extração de RNA.

3.6. EXTRAÇÃO DE RNA

Foi utilizado o kit de extração RNeasy (Qiagen) seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante para extração de RNA total de 1×10^6 células de cada amostra, assim como de macrófagos não-infectados. A concentração do RNA foi medida pela densidade óptica da solução de ácido nucléico em 260 nm.

3.7. SÍNTESE DE DNAC

Para a síntese da primeira fita de DNAC, foi seguido o esquema representado na tabela 1 utilizando-se o oligonucleotídeo iniciador T7-(dT)₂₄ (5' – GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)₂₄ – 3') e reagentes da Invitrogen.

Tabela 1. Esquema para síntese da primeira fita de DNAC

	Reagentes	Volume	Concentração final
1. <i>Hibridação com iniciador</i> Incubar a 70°C por 10 minutos Centrifugação rápida e banho de gelo	Água tratada com DEPC T7-(dT) ₂₄ (100 pmol/μl) RNA	q.s.p. 20 μl 1 μl q.s.p. 5 μg	- 100 pmol 5 μg
2. <i>Ajuste de Temperatura</i> Adicionar e misturar bem Incubar a 42°C por 2 minutos	Tampão para primeira fita 5X DTT 0,1 M 10 mM de cada dNTP	4 μl 2 μl 1 μl	1X 10 mM 500 μM/cada
3. <i>Síntese da primeira fita</i> Adicionar e misturar bem Incubar a 42°C por 1 hora	SuperScript II RT (200 U/μl)	1 μl	200 U
Volume total		20 μl	

Após a última incubação, os tubos contendo a mistura de reação acima foram centrifugados brevemente e colocados em gelo.

Tabela 2. Esquema para síntese da segunda fita de DNAC

Reagentes	Volume	Concentração final
Água tratada com DEPC	91 μl	-
Mistura de reação da primeira fita	20 μl	-
Tampão para segunda fita 5X	30 μl	1X
10 mM de cada dNTP	3 μl	200 μM de cada
DNA ligase de <i>E.coli</i> (10 U/μl)	1 μl	10 U
DNA polimerase I de <i>E.coli</i> (10 U/μl)	4 μl	40 U
Rnase H de <i>E. coli</i> (2 U/μl)	1 μl	2 U
Volume total	150 μl	

Para a síntese da segunda fita do DNAc, seguiu-se o esquema representado na tabela 2 utilizando-se reagentes da Invitrogen, que foram misturados e incubados a 16°C por 2 horas.

Após essa incubação, foram adicionados 2 µl (10 U) de T4 DNA polimerase e os tubos foram incubados a 16°C por 5 minutos. Por fim, foram adicionados 10 µl de EDTA 0,5 M.

3.8. PURIFICAÇÃO DE DNAc

A totalidade do volume final da reação de síntese de DNAc (162 µl) foi purificada com a utilização do sistema GeneChip® Sample Cleanup Module (Affymetrix) seguindo rigorosamente as instruções do fabricante.

3.9. SÍNTESE DE RNAc BIOTINILADO

O volume total do DNAc purificado foi utilizado para a síntese de RNAc biotilado numa reação de transcrição *in vitro*. Foi utilizado o kit BioArray™ High Yield™ RNA Transcript Labeling Kit (Enzo Diagnostics) seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

O produto da reação foi purificado com o GeneChip® Sample Cleanup Module (Affymetrix), seguindo rigorosamente as instruções do fabricante, e a concentração foi medida pela densidade óptica da solução de ácido nucléico em 260 nm.

Uma vez que foi utilizado RNA total para a síntese do DNAc, foi necessário corrigir o valor da quantidade de RNAc antes de utilizá-lo para os experimentos de hibridação para refletir a presença de RNA não marcado. A correção foi feita subtraindo-se a quantidade de RNA total utilizada no início do processo da quantidade de RNAc medida após a purificação, segundo recomendação da Affymetrix (GeneChip® Expression Analysis – Technical Manual).

3.10. FRAGMENTAÇÃO DE RNAc

Foi fragmentada quantidade suficiente de RNAc de cada amostra para ser utilizada na hibridação, sendo que foi utilizado o valor de quantidade corrigido.

Foram adicionados 2 μ l de tampão de fragmentação 5X (item 3.1.1) para cada 8 μ l de RNAc mais água. Este tampão é otimizado para fragmentar moléculas de RNAc completas em fragmentos de 35 a 200 bases por hidrólise induzida por metal.

A reação foi incubada a 94 °C por 35 minutos e imediatamente colocada em banho e gelo. As amostras foram estocadas a -20 °C até serem utilizadas para os experimentos de hibridação.

3.11. HIBRIDAÇÃO COM O GeneChip®

Foram utilizados arranjos tipo MG74Av2 que contêm 395.986 sondas, organizadas em 12422 conjuntos, compreendendo aproximadamente 12000 genes murinos distintos. Os arranjos previamente equilibrados a temperatura ambiente foram umedecidos com 250 μ l de tampão de hibridação 1X, introduzidos por um dos septos do cartucho (figura 8), deixando-se o outro para saída de ar, e incubados a 45 °C por 10 minutos com rotação.

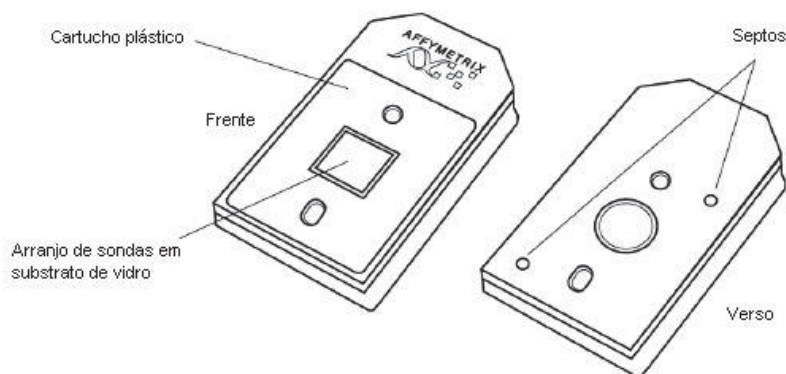


Figura 8. Representação esquemática do arranjo de sondas GeneChip®.

Foi preparada uma mistura de reação para cada amostra segundo a tabela 3, tomando-se o cuidado de aquecer previamente a solução estoque de controles de hibridação eucarióticos 20X a 65°C por 5 minutos para a completa ressuspensão do RNAc.

Tabela 3. Mistura de reação para hibridação

Reagentes	Volume	Concentração final
Água ultra pura	q.s.p 300 µl	-
RNAc fragmentado	15 µg	0,05 µg/µl
Oligonucleotídeo B2 Controle (3 nM) (Affymetrix)	5 µl	50 pM
Controles de hibridação eucarióticos 20X (<i>bioB</i> , <i>bioC</i> , <i>bioD</i> , <i>cre</i>) (Affymetrix)	15 µl	1,5, 5, 25 e 100 pM respectivamente
DNA de esperma de arenque (10mg/ml)	3 µl	0,1 mg/ml
BSA acetilada (50 mg/ml)	3 µl	0,5 mg/ml
Tampão de hibridação 2X (item 3.1.3)	150 µl	1X
Volume total	300 µl	

A mistura de reação foi aquecida a 99°C por 5 minutos e logo em seguida resfriada a 45°C por 5 minutos.

Os tubos contendo as misturas de reação foram centrifugados por 5 minutos na velocidade máxima da centrífuga para remover qualquer material insolúvel. A solução tampão foi removida dos cartuchos e substituída pela mistura de reação clarificada. Os cartuchos foram acondicionados em caixas *rotisserie* em forno de hibridação a 45°C e hibridados por 16 horas com rotação de 60 rpm.

3.12. LAVAGEM E COLORAÇÃO DO GeneChip®

Todo o processo de lavagem e coloração foi feito na estação fluídica GeneChip® Fluidics Station 400 de acordo com a seguinte programação: 10 ciclos de 2 *mixes*/ciclo com tampão A (item 3.1.5) a 25°C, 4 ciclos de 15 *mixes*/ciclo com tampão B (item 3.1.6) a 50°C, tampão SAPE (item 3.1.8) por 10 minutos a 25°C, 10 ciclos de 4 *mixes*/ciclo com tampão A a 25°C, solução de anticorpo (item 3.1.9) por 10 minutos a 25°C, tampão SAPE por 10 minutos

a 25°C e 15 ciclos de 4 *mixes*/ciclo com tampão A a 30°C. A temperatura de espera foi de 25°C.

3.13. LEITURA ÓPTICA DO GeneChip®

Os arranjos de sonda foram lidos em um *scanner* GeneArray® Scanner (Affymetrix), equipado com laser de íon argônio, programado segundo as instruções do fabricante, atribuindo-se 3 µm para o valor de píxel e comprimento de onda de 570 nm. A captura das imagens e análise inicial das hibridações foram feitas com o *software* MicroArray Suite 5.0 – MAS (Affymetrix) e os arquivos gerados foram salvos em formato (.cel).

3.14. NORMALIZAÇÃO DOS DADOS

Os arquivos em formato (.cel), contendo valores referentes à intensidade de sinal capturado pelo *scanner* para cada uma das cerca de 400.000 sondas, foram analisados pelo método RMA (*Robust Multi-Array Analysis*; IRIZARRY *et al.*, 2003). Este método faz parte da biblioteca de funções analíticas “Affy”, do pacote de *softwares* de análise de microarranjos denominado Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>; DUDOIT *et al.*, 2003).

O método de análise RMA consiste de quatro etapas (IRIZARRY *et al.*, 2003):

- a) Eliminação da fluorescência basal: o substrato no qual o microarranjo é construído emite fluorescência. Sondas sem seqüência complementar no alvo hibridado não deveriam apresentar sinal, mas sempre há emissão de uma certa fluorescência basal. Este passo serve para eliminar essa fluorescência independente do fenômeno de hibridação.
- b) Normalização: a complexidade dos procedimentos técnicos de um experimento de microarranjo se caracteriza pela presença de diferentes fontes de erro sistemático, os quais contribuem para a modificação dos valores de intensidade das sondas. A eliminação desse erro numérico é necessária para que os valores finais obtidos

sejam altamente correlacionados com os níveis de RNAm de cada gene analisado. A etapa de normalização visa a atenuação desses erros sistemáticos e consiste, no método RMA, na equiparação da distribuição dos valores de intensidade das sondas das diversas hibridações realizadas (método de normalização por *quantiles*).

- c) Eliminação da hibridação inespecífica: a complexidade da composição qualitativa de uma amostra de RNAm é muito grande, e uma determinada sonda de 25 nucleotídeos pode hibridar com outros alvos, diferentes daquele perfeitamente complementar. Para diminuir esse componente de erro, o GeneChip® contém as sondas MM, conforme descrito na introdução, as quais podem ser utilizadas para quantificar a hibridação inespecífica. No entanto, o método RMA não utiliza as sondas MM, pois o tratamento matemático da informação destas sondas ainda não está bem estabelecido, incorporando erros no processo de análise.
- d) Transformação dos dados: na arquitetura do GeneChip®, cada gene é avaliado por um conjunto de aproximadamente 16 sondas, as quais apresentam distintas constantes de afinidade pelo alvo e, conseqüentemente, diferentes níveis de intensidade do sinal. Para que a medida final de intensidade represente uma quantificação do nível de RNAm presente na amostra hibridada, é necessário a transformação dos valores de intensidade, referentes às 16 sondas, em um único valor de intensidade final. No método RMA, isso é obtido através da técnica de alisamento por medianas (*median polish*).

Ao final do processo do método RMA, é obtido um valor numérico relativo à concentração do RNAm na amostra alvo, para cada um dos genes avaliados pelo GeneChip®.

3.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL

A identificação dos genes diferencialmente expressos (DEG) é feita pelo método SAM (*Significance Analysis of Microarrays*; TUSHER *et al.*, 2001).

Este método consiste em três etapas, basicamente:

- a) Cálculo de uma estatística de expressão diferencial: esta estatística é uma modificação do teste t de Student e é baseada na razão entre a mudança na expressão gênica entre duas condições e o erro padrão das medições. Ela é calculada pela seguinte fórmula:

$$d(i) = \frac{\bar{x}_A(i) - \bar{x}_B(i)}{s(i) + s_0}$$

na qual $\bar{x}_A(i)$ e $\bar{x}_B(i)$ são definidos como os níveis médios de expressão para o gene (i) nas amostras alvo A e B, respectivamente. A dispersão gene-específica $s(i)$ é o erro padrão de medidas de expressão repetidas:

$$s(i) = \sqrt{a \left\{ \sum_m [x_m(i) - \bar{x}_A(i)]^2 + \sum_n [x_n(i) - \bar{x}_B(i)]^2 \right\}}$$

onde \sum_m e \sum_n são a somatória das medidas de expressão gênica nas amostras alvo A e B, respectivamente, $a = (1/n_1 + 1/n_2)/(n_1+n_2-2)$ e n_1 e n_2 são a quantidade de repetições das hibridações das amostras A e B. Para comparar valores de $d(i)$ entre todos genes, é necessário que a variância de $d(i)$ seja independente da expressão gênica. Para isso, a constante s_0 foi adicionada ao denominador, a qual é calculada através de uma função de minimização do coeficiente de variação da estatística $d(i)$.

- b) Cálculo da distribuição nula da estatística $d(i)$: para avaliar a probabilidade estatística de expressão diferencial, o método SAM computa uma distribuição nula da estatística $d(i)$, através da permuta das diferentes hibridações entre os dois grupos analisados, A e B. Isso é necessário, pois a distribuição da estatística $d(i)$ não segue uma distribuição estatística usual.

- c) Correção para múltiplos testes: um dos principais problemas da análise estatística de dados de genômica funcional está relacionado à questão de múltiplos testes. A correção utilizada pelo método SAM se baseia no conceito de FDR (*False Discovery Rate*), o qual representa uma alternativa interessante aos outros métodos usuais de correção, como o de Bonferroni, para estudos de genômica funcional (STOREY & TIBSHIRANI, 2003).

Ao final do procedimento do SAM, obtemos os genes que apresentam uma estatística absoluta de expressão diferencial ($|d(i)|$) acima do limiar estabelecido, de acordo com a razão desejada entre genes falso-positivos e diferencialmente expressos. Esta razão é o FDR.

3.16. AGRUPAMENTOS DOS DADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA

Os dados dos genes selecionados no passo anterior foram submetidos ao método SOM (*Self Organizing Maps*; TAMAYO *et al.*, 1999), visando agrupar os genes de acordo com seu padrão de expressão gênica. O *software* utilizado nessa etapa foi o EXPANDER (*Expression Analyzer and Displayer*; SHARAN *et al.*, 2003).

4. RESULTADOS

4.1. HIBRIDAÇÃO COM O GeneChip®

RNAc biotilado e fragmentado de PEC MΦ não-infectados e infectados após 6h ou 24h de ambas as linhagens de camundongos foi hibridado em triplicata num total de 24 hibridações, sendo esses experimentos denominados:

- CBA_MF06a, CBA_MF06b e CBA_MF06c para PEC MΦ de camundongos CBA/J não-infectados após 6h de incubação;
- CBA_MF24a, CBA_MF24b e CBA_MF24c para PEC MΦ de camundongos CBA/J não-infectados após 24h de incubação;
- CBA_LA06a, CBA_LA06b e CBA_LA06c para PEC MΦ de camundongos CBA/J infectados por *L. amazonensis* após 6h de infecção;
- CBA_LA24a, CBA_LA24b e CBA_LA24c para PEC MΦ de camundongos CBA/J infectados por *L. amazonensis* após 24h de infecção;
- C57_MF06a, C57_MF06b e C57_MF06c para PEC MΦ de camundongos C57BL/6 não-infectados após 6h de incubação;
- C57_MF24a, C57_MF24b e C57_MF24c para PEC MΦ de camundongos C57BL/6 não-infectados após 24h de incubação;
- C57_LA06a, C57_LA06b e C57_LA06c para PEC MΦ de camundongos C57BL/6 infectados por *L. amazonensis* após 6h de infecção;
- C57_LA24a, C57_LA24b e C57_LA24c para PEC MΦ de camundongos C57BL/6 infectados por *L. amazonensis* após 24h de infecção.

As imagens referentes a essas hibridações podem ser vistas no anexo 1 deste trabalho.

4.2. NORMALIZAÇÃO

O resultado da normalização realizada pelo método RMA pode ser visualizado de duas formas: como um gráfico de *BoxPlot* ou como um histograma de distribuição de intensidades.

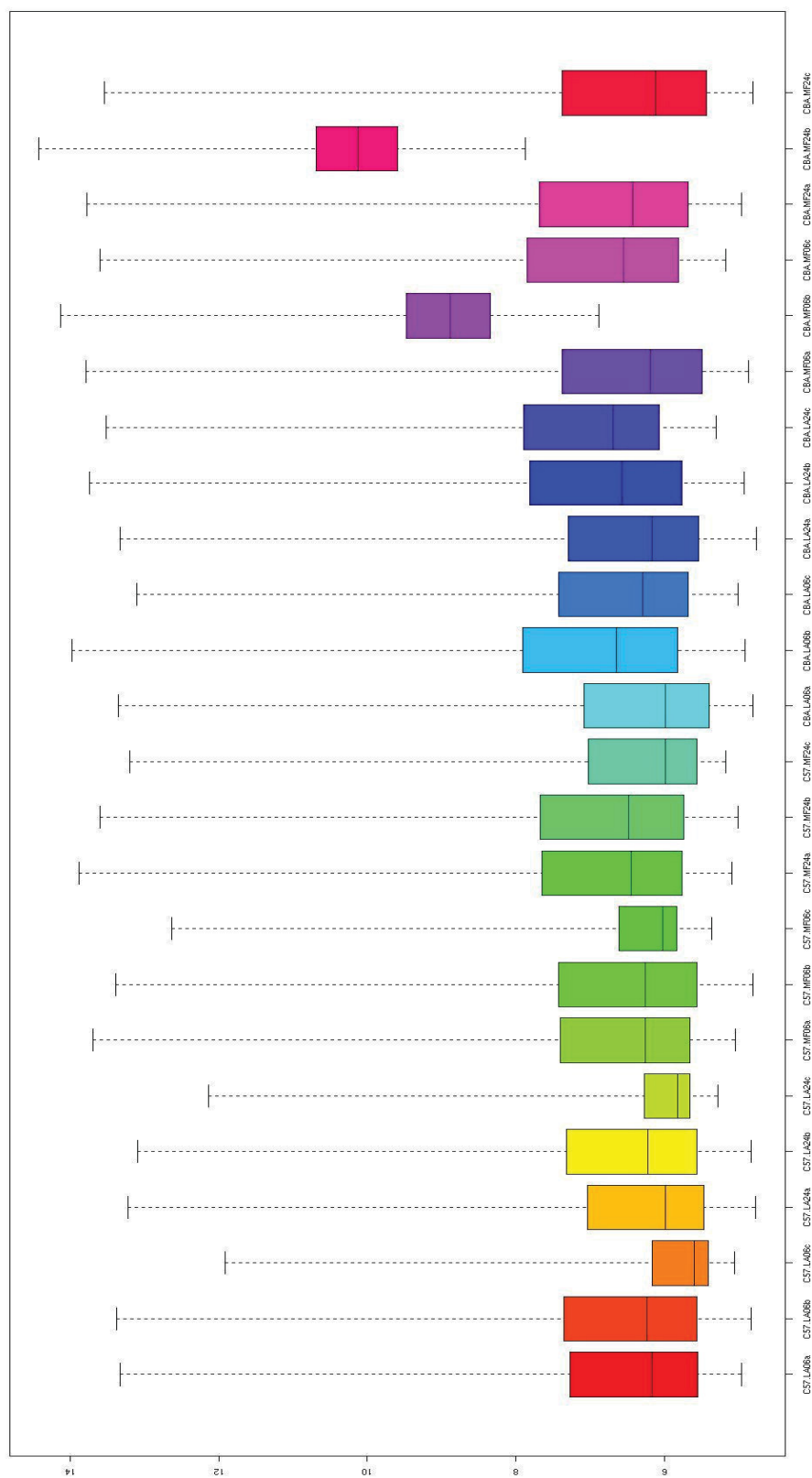


Figura 9. BoxPlot das 24 hibridações realizadas.

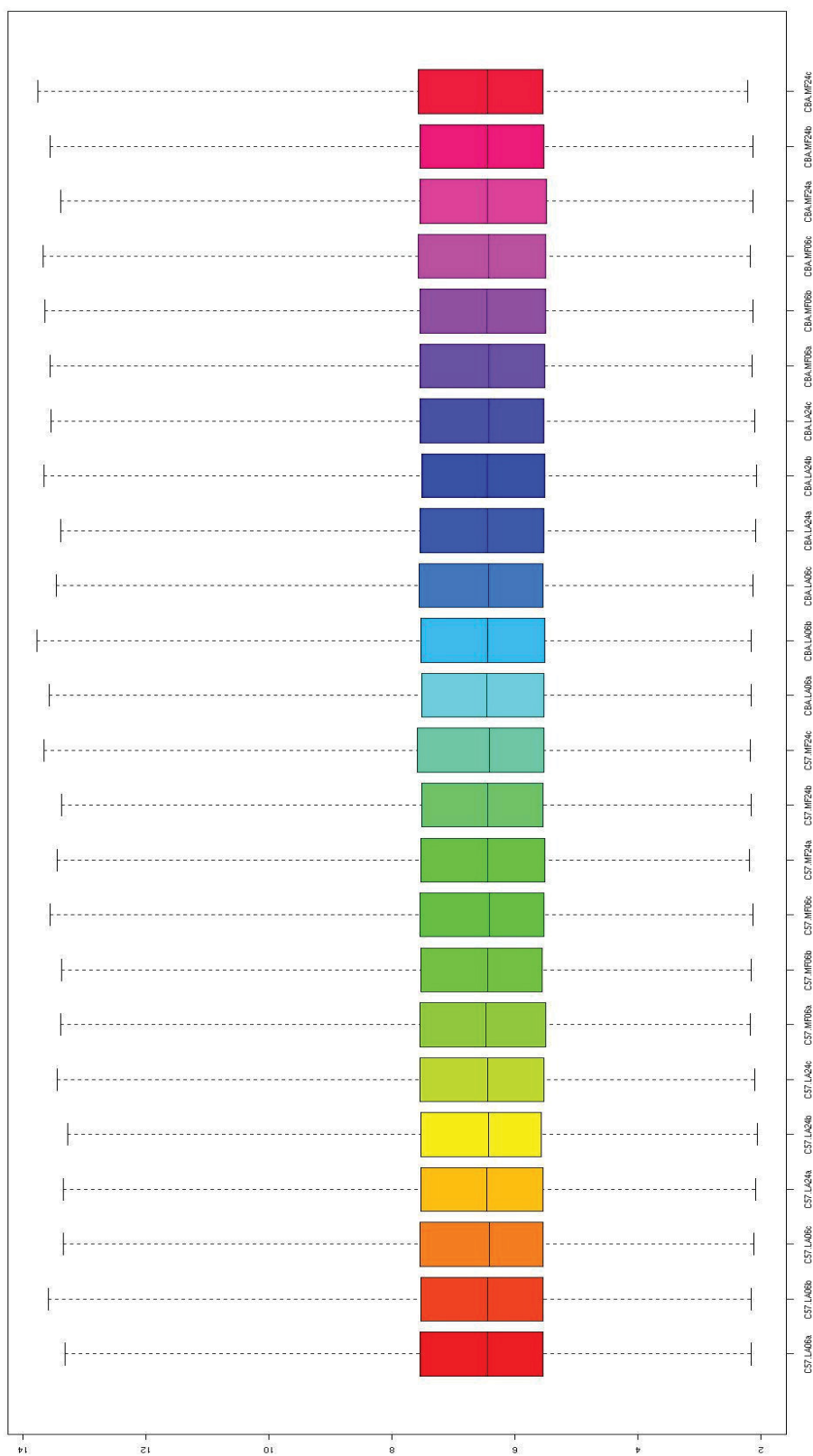


Figura 10. BoxPlot da normalização das 24 hibridações realizadas.

As figuras 9 e 10 mostram gráficos de *BoxPlot* para todas as 24 hibridações analisadas neste trabalho. A caixa colorida delimita os valores de intensidade das sondas (no eixo Y) que representam o primeiro e o terceiro quartil. Essas quantidades se referem a posições importantes da distribuição dos valores de intensidade das sondas. Por exemplo, a extremidade inferior da caixa se refere ao primeiro quartil e seu ponto correspondente no eixo Y representa a intensidade da sonda que tem 25% das sondas com intensidade mais fraca e 75% com intensidade mais forte que ela; a extremidade superior representa o terceiro quartil e a intensidade correspondente no eixo Y identifica a intensidade da sonda que tem 25% das sondas com intensidade mais forte e 75% com intensidade mais fraca que ela. O traço geralmente próximo ao meio da caixa representa a mediana, isto é, a intensidade que divide as sondas em 50% mais fracas e 50% mais fortes. Finalmente, as linhas verticais representam os extremos das distribuições.

Observando a figura 9, é possível identificar que algumas hibridações são bastante diferentes das demais, particularmente a terceira replicata dos experimentos com C57BL/6, exceto C57_MF24c, onde se observa que a distribuição de intensidades é menor, isto é, as sondas entre o primeiro e o terceiro quartil têm intensidades parecidas, mas menores que nas outras replicatas; e a segunda replicata (replicata “b”) dos controles de macrófagos não-infectados de CBA/J, cuja intensidade geral é muito maior que a dos outros experimentos. Essas diferenças nos dados brutos tornam a comparação e a seleção de genes diferencialmente expressos entre as hibridações praticamente impossíveis, pois qualquer diferença não seria estatisticamente significativa uma vez que o erro é muito grande. Para a confecção dessa figura foram utilizados os valores de intensidade brutos, antes mesmo da subtração do *background* para que se tenha a real dimensão das diferenças entre as hibridações.

A figura 10 mostra as distribuições de intensidades de todas as hibridações já normalizadas e reduzidas a uma distribuição comum, permitindo, assim, uma comparação mais correta e não-tendenciosa. Nesse caso, os cálculos para a correção e subtração do *background* foram feitos anteriormente à normalização em si.

Já a figura 11 mostra as diferenças entre os dados das hibridações, já com o *background* corrigido, em forma de histograma. A linha preta representa a distribuição normalizada entre todas as hibridações. No eixo X estão representados os logaritmos na base 2 (\log_2) das intensidades e no eixo Y a densidade de sondas que apresentam uma dada intensidade. Neste caso, fica bem evidenciada a diferença que existe entre as hibridações CBA_MF06b e CBA_MF24b (linhas roxa e grená respectivamente), que apresentam grande densidade de sondas com valores mais altos de intensidade que as demais hibridações e têm, portanto, suas curvas deslocadas para a direita do gráfico.

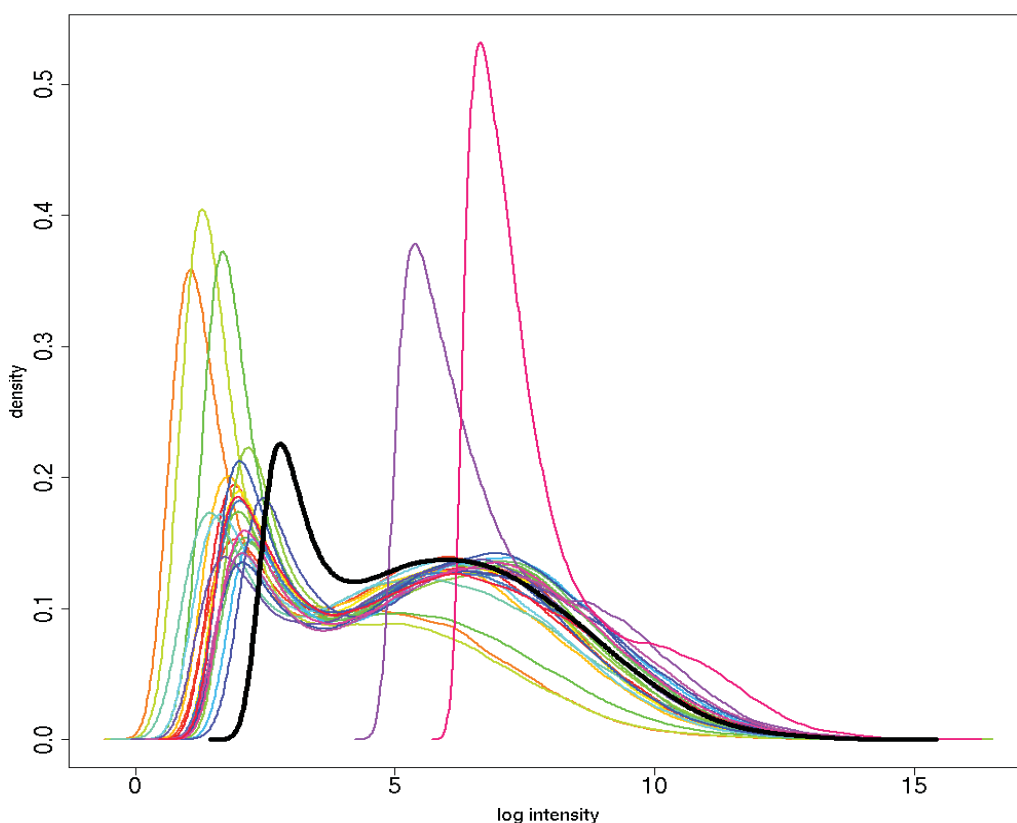


Figura 11. Histograma da distribuição de densidade das intensidades das sondas nas 24 hibridações realizadas.

Uma forma de se tentar evidenciar hibridações realmente ruins, que afetam o processo posterior de seleção de genes diferencialmente expressos, é avaliar a correlação que existe entre os 12422 conjuntos de sonda de cada par de hibridações. Um coeficiente de correlação igual a 1 significa que as duas

	C57_LA06a	C57_LA06b	C57_LA06c	C57_LA24a	C57_LA24b	C57_LA24c	C57_MF06a	C57_MF06b	C57_MF06c	C57_MF24a	C57_MF24b	C57_MF24c	CBA_LA06a	CBA_LA06b	CBA_LA06c	CBA_LA24a	CBA_LA24b	CBA_LA24c	CBA_MF06a	CBA_MF06b	CBA_MF06c	CBA_MF24a	CBA_MF24b	CBA_MF24c
C57_LA06b	0,978																							
C57_LA06c	0,973	0,940																						
C57_LA24a	0,989	0,972	0,966																					
C57_LA24b	0,979	0,989	0,944	0,978																				
C57_LA24c	0,966	0,933	0,986	0,964	0,941																			
C57_MF06a	0,991	0,969	0,967	0,981	0,976	0,963																		
C57_MF06b	0,983	0,981	0,953	0,973	0,987	0,948	0,988																	
C57_MF06c	0,963	0,924	0,985	0,956	0,936	0,986	0,967	0,950																
C57_MF24a	0,984	0,964	0,966	0,983	0,977	0,968	0,991	0,982	0,969															
C57_MF24b	0,983	0,975	0,960	0,978	0,988	0,958	0,989	0,992	0,961	0,990														
C57_MF24c	0,980	0,914	0,983	0,954	0,928	0,985	0,965	0,944	0,990	0,970	0,957													
CBA_LA06a	0,986	0,978	0,953	0,982	0,976	0,946	0,972	0,970	0,938	0,964	0,968	0,931												
CBA_LA06b	0,987	0,984	0,963	0,978	0,983	0,959	0,982	0,983	0,955	0,979	0,984	0,948	0,982											
CBA_LA06c	0,966	0,933	0,980	0,950	0,938	0,975	0,967	0,954	0,981	0,964	0,960	0,978	0,947	0,966										
CBA_LA24a	0,985	0,979	0,958	0,987	0,987	0,956	0,981	0,980	0,952	0,984	0,985	0,947	0,983	0,988	0,955									
CBA_LA24b	0,982	0,982	0,960	0,981	0,988	0,958	0,978	0,981	0,952	0,982	0,986	0,947	0,979	0,993	0,959	0,993								
CBA_LA24c	0,967	0,935	0,975	0,959	0,949	0,976	0,973	0,980	0,983	0,977	0,972	0,983	0,947	0,971	0,985	0,965	0,969							
CBA_MF06a	0,983	0,957	0,988	0,970	0,966	0,964	0,991	0,982	0,971	0,986	0,984	0,970	0,967	0,983	0,977	0,978	0,977	0,983						
CBA_MF06b	0,954	0,958	0,920	0,949	0,963	0,913	0,955	0,964	0,913	0,950	0,961	0,904	0,955	0,961	0,924	0,961	0,960	0,930	0,953					
CBA_MF06c	0,985	0,928	0,973	0,951	0,938	0,971	0,973	0,980	0,981	0,971	0,966	0,982	0,942	0,985	0,989	0,955	0,958	0,992	0,986	0,924				
CBA_MF24a	0,982	0,959	0,989	0,979	0,972	0,970	0,987	0,978	0,973	0,992	0,987	0,972	0,967	0,983	0,973	0,988	0,985	0,986	0,992	0,951	0,980			
CBA_MF24b	0,902	0,923	0,862	0,909	0,930	0,857	0,897	0,913	0,851	0,897	0,912	0,838	0,914	0,912	0,857	0,922	0,920	0,868	0,888	0,972	0,853	0,897		
CBA_MF24c	0,984	0,927	0,974	0,955	0,941	0,975	0,971	0,956	0,983	0,975	0,968	0,985	0,942	0,985	0,984	0,960	0,962	0,994	0,982	0,923	0,993	0,984	0,858	

Correlação entre 0.90 e 1.00
Correlação menor que 0.90

Figura 12. Matriz de correlação entre as hibridações.

hibridações comparadas são idênticas. Um coeficiente de correlação igual a 0 (zero) significa que as duas hibridações não apresentam nenhuma correspondência entre si.

No caso dos dados de GeneChip®, o coeficiente de correlação entre duas hibridações quaisquer, após a normalização e resumo das intensidades das 16-20 sondas referentes a cada gene em único número, é muito grande. Geralmente ele é superior a 0,90 o que diminui sua potencialidade como indicador de qualidade da hibridação. No entanto, é um dos poucos índices gerais sugeridos pela Affymetrix para que se possa avaliar tal qualidade.

A figura 12 mostra a matriz de correlação para as 24 hibridações realizadas neste trabalho, comparando todas elas duas a duas. Uma linha ou uma coluna que tenha muitas células de cores diferentes, neste caso a linha correspondente à hibridação CBA_MF24b, representa uma possível hibridação com qualidade pior. Com efeito, esta hibridação é uma daquelas com intensidade mais forte do que as outras. Ainda assim, apenas quando comparamos essa hibridação com CBA_MF24c a correlação foi menor que 0,85.

4.3. SELEÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

A seleção de DEG nas comparações entre os controles não-infectados das duas linhagens e entre os controles e as amostras infectadas por *L. amazonensis* de cada linhagem foi feita utilizando-se o método e o programa SAM – *Significance Analysis of Microarrays* (TUSHER *et al.*, 2001). Para cada gene foi atribuída uma medida de significância própria, o valor q , que é a medida de significância em termos de FDR, isto é, da proporção de genes selecionados erroneamente dentro da população selecionada como DEG (STOREY & TIBSHIRANI, 2003).

Para as análises deste trabalho, os experimentos de 06h e 24h foram considerados replicatas de um mesmo experimento para aumentar a confiabilidade estatística na seleção de DEG. Assim, somente foram selecionados genes que apresentaram mudanças consistentes na sua expressão ao longo do tempo.

A figura 13 mostra o gráfico gerado a partir da análise SAM comparando os macrófagos não-infectados das duas linhagens de camundongo utilizadas nesse estudo. Para esta análise foi utilizado *Fold Change* de 1,25 e FDR de 5%, isto é, só foram selecionados como DEG aqueles genes cuja diferença das médias das suas intensidades nas 6 replicatas (3 replicatas de 06h e 3 de 24h) entre as duas populações (CBA/J e C57BL/6) fosse maior que 25% (*Fold Change* ou razão entre as médias de 1,25) e que tivessem FDR menor ou igual a 5%.

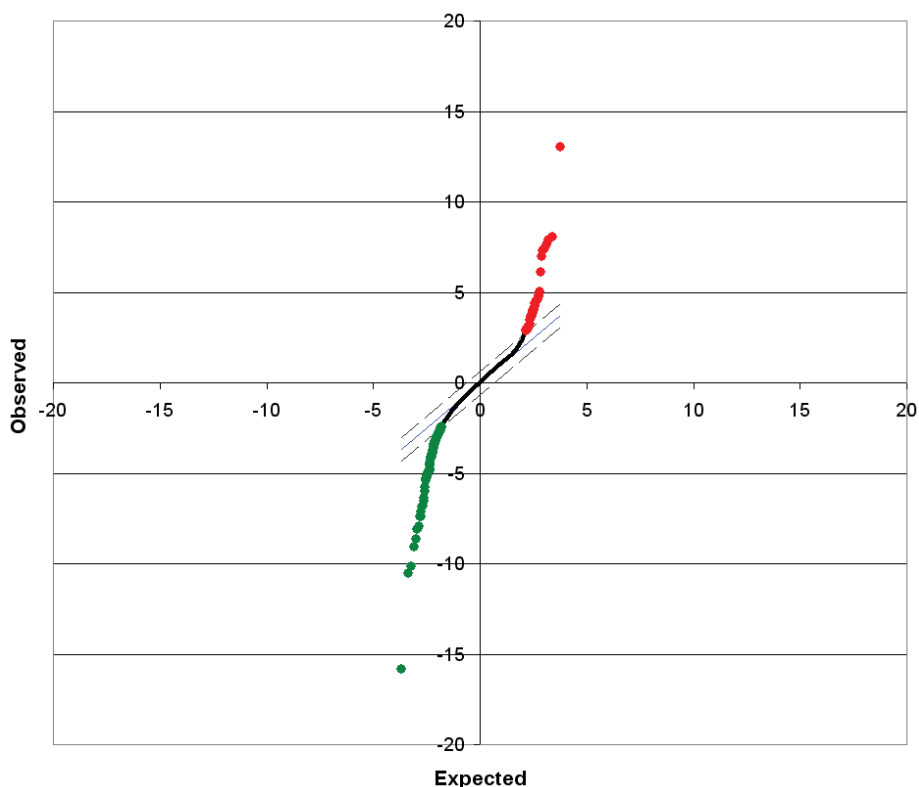


Figura 13. Gráfico SAM da comparação entre macrófagos não-infectados de CBA/J e C57BL/6. Em vermelho, DEG com expressão aumentada nos macrófagos de CBA/J e, em verde, DEG com expressão aumentada nos macrófagos de C57BL/6.

O eixo X representa os valores esperados da estatística e o eixo Y os valores observados para cada gene. Cada ponto representa um dos 12422 conjuntos de sondas presentes no GeneChip®. A linha azul representa a forma do gráfico se não houvesse nenhuma diferença entre as amostras e os dados observados fossem idênticos aos esperados, isto é, se não houvesse nenhum desvio. As linhas tracejadas representam os limites superior e inferior de seleção para que o FDR seja 5%.

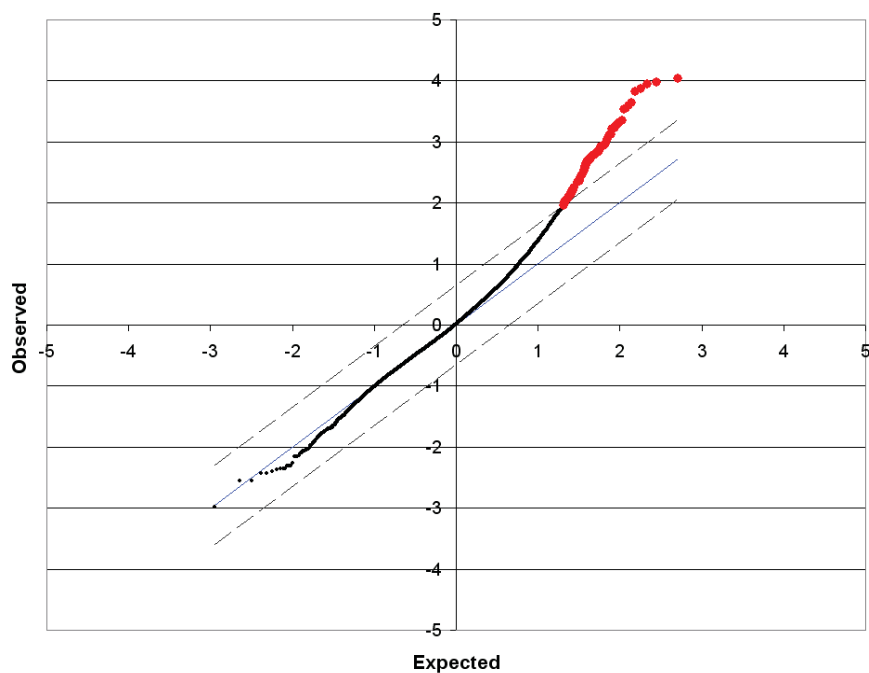


Figura 14. Gráfico SAM da comparação entre macrófagos de CBA/J infectados por *L. amazonensis* e macrófagos de CBA/J não-infectados. Em vermelho, DEG com expressão aumentada na infecção.

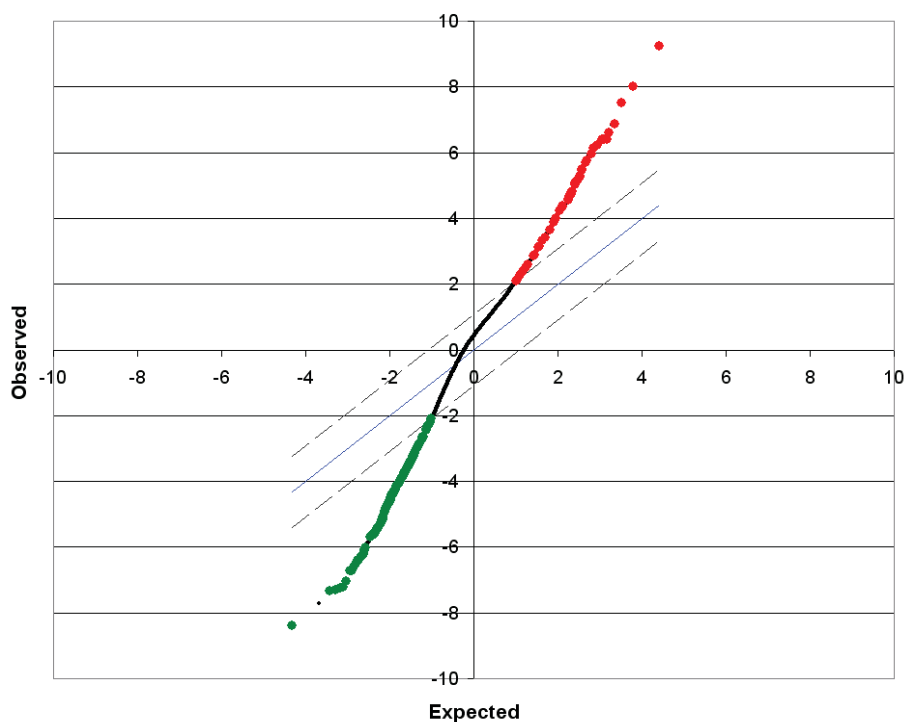


Figura 15. Gráfico SAM da comparação entre macrófagos de C57BL/6 infectados por *L. amazonensis* e macrófagos de C57BL/6 não-infectados. Em vermelho, DEG com expressão aumentada e, em verde, DEG com expressão diminuída na infecção.

No total, foram selecionados 202 DEG, sendo 54 aumentados em CBA/J e 148 aumentados em C57BL/6. A lista com a descrição desses genes pode ser vista no anexo 2.

Da mesma forma, as figuras 14 e 15 mostram os gráficos SAM comparando os macrófagos infectados com seus controles não-infectados nas duas linhagens de camundongo. Foi considerado *Fold Change* de 1,5 e FDR de 5%.

No caso da infecção em CBA/J foram selecionados 85 DEG, todos eles aumentados na infecção, cujas descrições se encontram no anexo 3. Já na infecção em C57BL/6, foram selecionados 50 genes aumentados e 148 diminuídos na infecção, num total de 198 DEG. O anexo 4 traz as descrições desses genes.

4.4. AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS DEG SELECIONADOS

A partir de dados da literatura e de anotações do Gene Ontology Consortium (<http://www.geneontology.org>), pudemos classificar os DEG selecionados dentro de alguns grupos funcionais. Essa classificação foi feita principalmente para efeito de visualização, devendo-se ter em mente que vários genes podem ter mais de uma função na célula. Os anexos 2, 3 e 4 mostram essa classificação para cada gene e a figura 16 mostra a representatividade de cada grupo funcional nas 3 comparações feitas: (i) PEC MΦ não-infectados de CBA/J e C57BL/6 (figura 16A e B), (ii) PEC MΦ de CBA/J infectados e não-infectados (figura 16E) e (iii) PEC MΦ de C57BL/6 infectados e não-infectados (figura 16C e D).

4.5. AGRUPAMENTOS

Foram feitos agrupamentos para separar os DEG selecionados em grupos com padrão de expressão semelhante utilizando o método de SOM (TAMAYO *et al.*, 1999) através do programa EXPANDER (SHARAN *et al.*, 2003). A escolha do número de grupos formados foi arbitrária, dependendo do tipo de análise que se pretendia fazer. Neste caso, os agrupamentos foram

utilizados como uma ferramenta gráfica com o objetivo de facilitar a visualização não só de padrões de destaque, mas também do padrão geral de expressão gênica nos experimentos realizados.

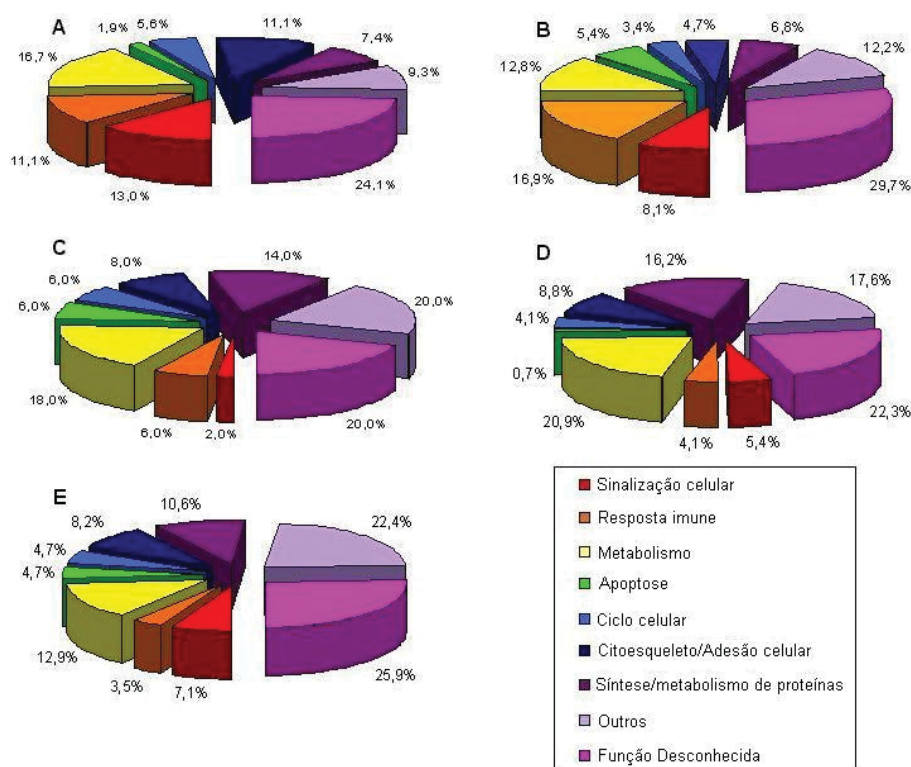


Figura 16. Representatividade de grupos funcionais nas comparações realizadas. (A) DEG com expressão aumentada em PEC MΦ não-infectados de C57BL/6 em relação a CBA/J. (B) DEG com expressão aumentada em PEC MΦ não-infectados de CBA/J em relação a C57BL/6. (C) DEG com expressão aumentada durante a infecção de PEC MΦ de C57BL/6. (D) DEG com expressão diminuída durante a infecção de PEC MΦ de C57BL/6. (E) DEG com expressão aumentada durante a infecção de PEC MΦ de CBA/J.

Na figura 17 vemos o agrupamento feito a partir dos DEG selecionados da comparação entre os macrófagos não-infectados de CBA/J e C57BL/6. Esse agrupamento gerou 4 grupos distintos: um grupo de genes com intensidade mais forte em CBA/J (figura 17A), um grupo de genes com intensidade mais forte em C57BL/6 (figura 17B) e dois grupos com intensidades intermediárias, sendo um deles com intensidade maior em CBA/J (figura 17C) e outro em C57BL/6 (figura 17D).

Vemos que 5% dos DEG selecionados entre os macrófagos dessas duas linhagens estão fortemente aumentados em CBA/J, ao passo que 15%

deles apresentam aumento bastante acentuado em C57BL/6. Outros 23% apresentam aumento moderado em CBA/J, enquanto que a maior parte deles, 57%, tem padrão moderado de aumento em C57BL/6.

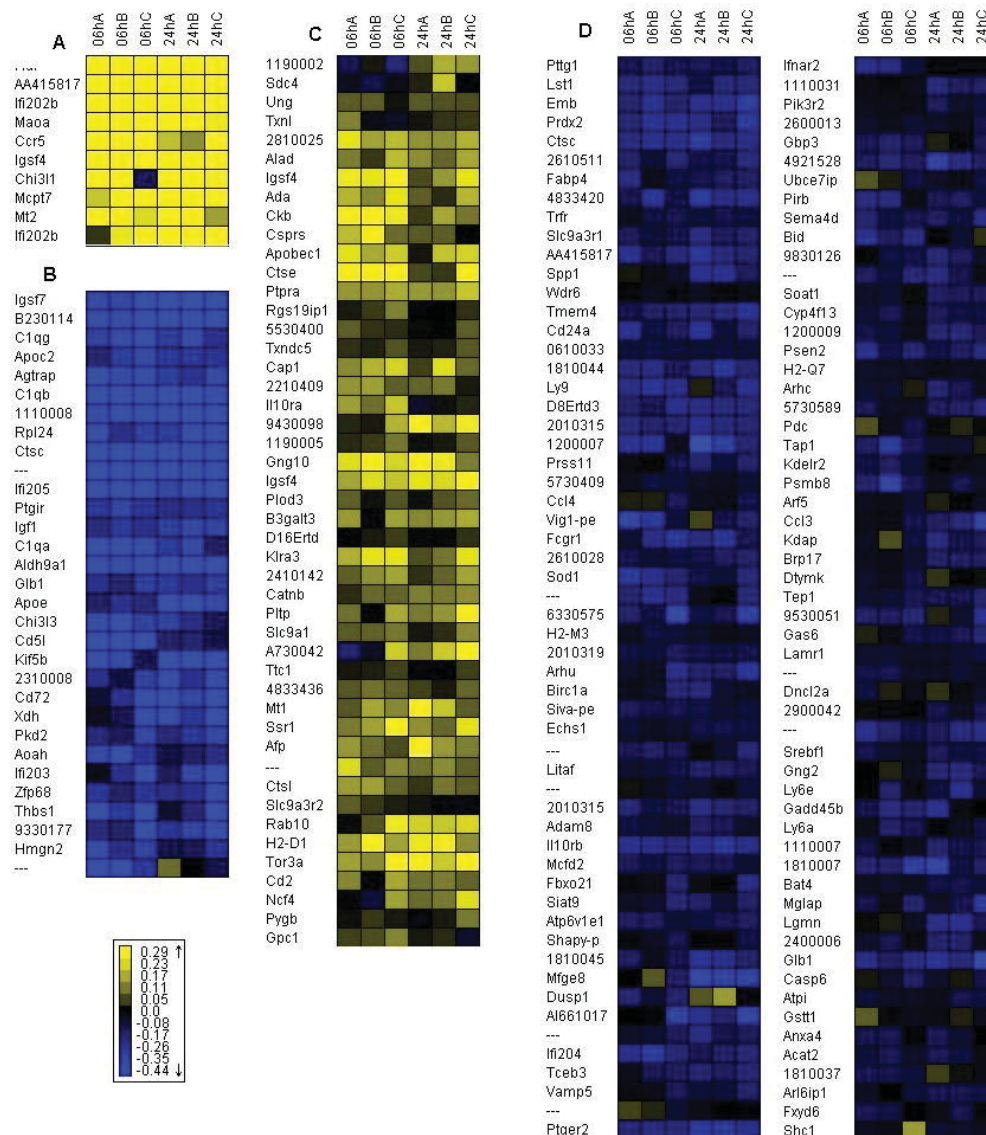


Figura 17. Agrupamento dos DEG selecionados da comparação entre macrófagos não-infectados de CBA/J e C57BL/6. Os tons de amarelo representam conjuntos de sondas com maior intensidade em CBA/J, o preto representa valores iguais de intensidade entre as duas linhagens e os tons de azul representam conjuntos de sondas com maior intensidade em C57BL/6. A escala representa os \log_2 da razão entre as intensidades normalizadas dos conjuntos de sondas em CBA/J e C57BL/6.

As figuras 18 e 19 mostram os agrupamentos feitos com os DEG selecionados da comparação entre macrófagos infectados e não-infectados de CBA/J e C57BL/6, respectivamente, e a comparação dos padrões de

expressão encontrados para esses genes com os seus padrões na outra linhagem. Nesses casos foram criados mais grupos (16 para CBA/J e 15 para C57BL/6) para que estes tivessem consistência interna maior.

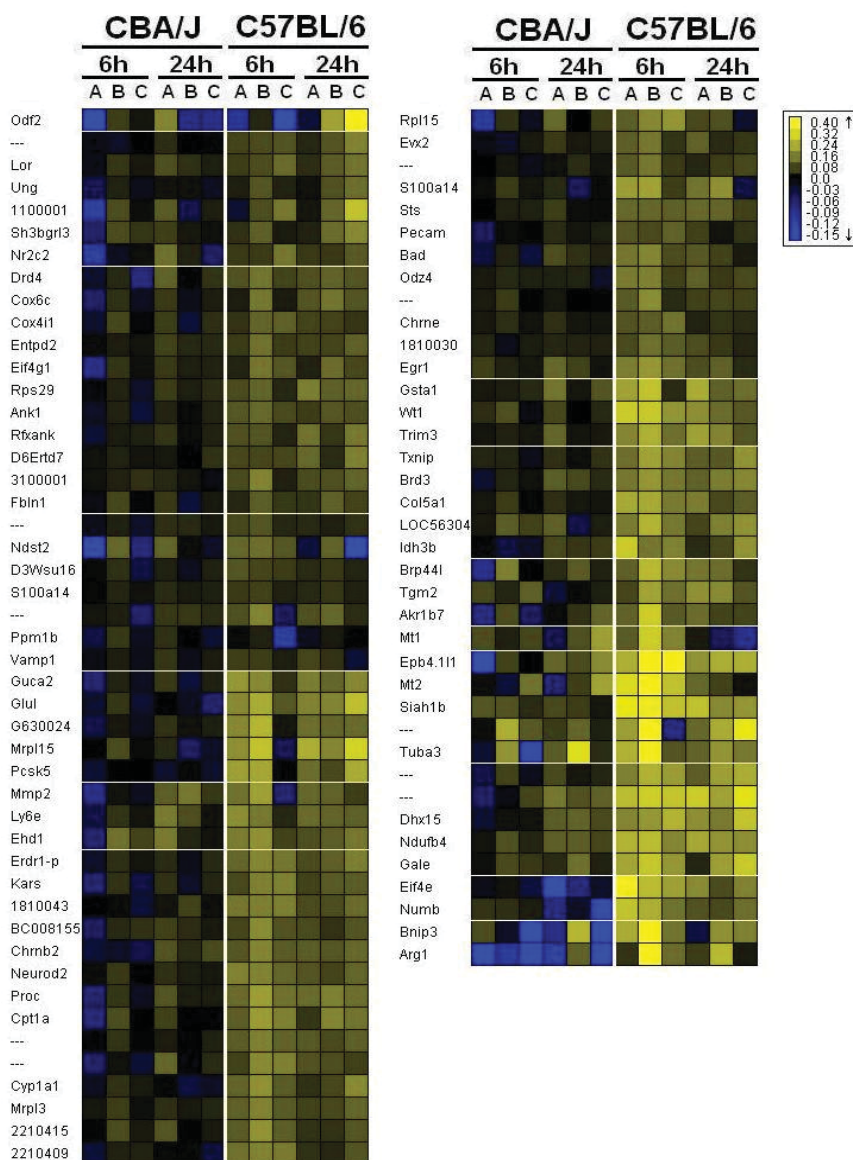


Figura 18. Agrupamento dos DEG selecionados da comparação entre macrófagos infectados com *L. amazonensis* e macrófagos não-infectados de CBA/J. Esse agrupamento está mostrado nos painéis da esquerda. À direita vemos o padrão dos mesmos genes em C57BL/6, mesmo que esses não tenham sido selecionados nessa linhagem. Os tons de amarelo representam conjuntos de sondas com maior intensidade durante a infecção, o preto representa valores iguais de intensidade entre as duas situações e os tons de azul representam conjuntos de sondas com maior intensidade nos controles não-infectados. A escala representa os log₂ da razão entre as intensidades normalizadas dos conjuntos de sondas na infecção e nos controles.

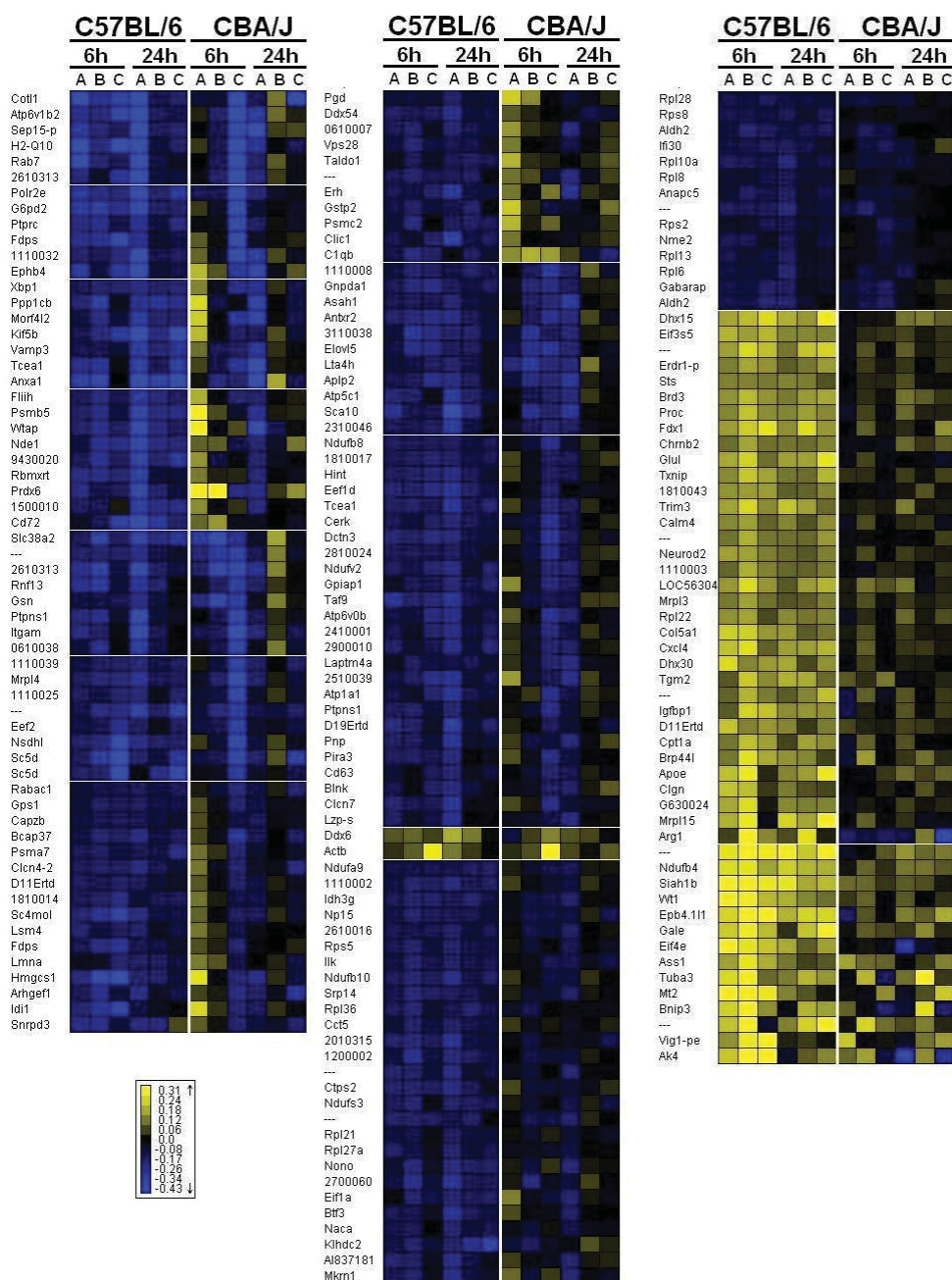


Figura 19. Agrupamento dos DEG selecionados da comparação entre macrófagos infectados com *L. amazonensis* e macrófagos não-infectados de C57BL/6. Esse agrupamento está mostrado nos painéis da esquerda. À direita vemos o padrão dos mesmos genes em CBA/J, mesmo que esses não tenham sido selecionados nessa linhagem. Os tons de amarelo representam conjuntos de sondas com maior intensidade durante a infecção, o preto representa valores iguais de intensidade entre as duas situações e os tons de azul representam conjuntos de sondas com maior intensidade nos controles não-infectados. A escala representa os \log_2 da razão entre as intensidades normalizadas dos conjuntos de sondas na infecção e nos controles.

5. DISCUSSÃO

O estudo da interação patógeno-hospedeiro, do ponto de vista da genômica funcional, é ainda uma área pouco explorada, mas que vem atraindo cada vez mais a atenção da comunidade científica. O avanço das técnicas de varredura em larga escala da expressão gênica coloca à disposição do pesquisador um conjunto de ferramentas valiosas no caminho da elucidação dos mecanismos de interação, patogênese e doença envolvidos nas relações entre patógenos e hospedeiros. Entretanto, deve-se sempre ter em mente que essas abordagens fornecem apenas “fotografias” de um único instante na vida de uma população de células, seja ela do hospedeiro ou do patógeno, e não são capazes de traduzir toda a complexidade do sistema biológico. São, não obstante, de grande importância nos passos iniciais do estudo, fornecendo pistas acerca do caminho a ser seguido.

A interação entre patógenos, mais especificamente diversas espécies de *Leishmania*, e macrófagos vem sendo estudada por diversos grupos, especialmente no que diz respeito aos mecanismos de evasão do sistema imune pelos parasitas (RITTIG & BOGDAN, 2000; KNODLER *et al.*, 2001; SACKS & SHER, 2002) e como modelos de parasitismo intracelular (ALEXANDER *et al.*, 1999) e virulência microbiana (CHANG *et al.*, 2003).

Como já dito anteriormente, nosso grupo tem se preocupado em estudar as mudanças que ocorrem na célula hospedeira, o macrófago, provocadas pela infecção com *Leishmania*, tanto do ponto de vista imunológico e histopatológico (SOUZA *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2003) quanto de genômica funcional (GOMES *et al.*, manuscrito em preparação). Este trabalho se enquadra dentro desta linha de pesquisa com o objetivo de descrever diferenças genéticas entre hospedeiros que possam vir a ter algum impacto no curso da infecção.

Para tanto, foi utilizada a tecnologia GeneChip® (Affymetrix) de microarranjos de sondas oligonucleotídicas para termos uma visão geral dos genes expressos pelas células hospedeiras de duas linhagens de camundongos expostas ou não ao parasita.

Como pode ser visto nas imagens do anexo 1, duas hibridações têm intensidade de sinal maior que as outras. Esse desvio foi corrigido pela normalização dos dados (figuras 9, 10 e 11) que tornou a distribuição das

intensidades de sinal semelhante em todas as hibridações. Esse passo é de extrema importância para que se possa fazer corretamente as comparações entre as hibridações, sem que se incorra no erro de uma seleção de genes tendenciosa pelo simples fato de um conjunto de dados ter intensidade mais forte que outro.

Após a normalização, ainda restam diferenças entre as hibridações. Ainda assim, elas são muito semelhantes entre si, como pode ser visto pela matriz de correlação na figura 12. Podemos ver que todas as hibridações são muito homogêneas entre si, com exceção da CBA_MF24b que conserva um erro que a torna mais diferente das outras. Ainda assim, é um erro pequeno e que potencialmente não compromete a análise.

5.1. COMPARAÇÃO ENTRE HOSPEDEIROS

Para termos uma visão geral dos genes expressos pelas células hospedeiras das duas linhagens de camundongo utilizadas nesse trabalho e suas diferenças entre si, comparamos hibridações com material de macrófagos não-infectados dessas duas linhagens.

As diferenças genéticas entre hospedeiros têm papel importante na definição do quadro patológico de uma infecção (CUNNINGHAM, 2002; ROGERS *et al.*, 2002). Infelizmente, a natureza das diferenças entre hospedeiros sensíveis e resistentes e como essas diferenças são exploradas pelos parasitas são questões ainda indefinidas (DOSREIS, 2000). Tendo isso em mente, comparamos os macrófagos não-infectados das duas linhagens entre si para termos idéia de quais seriam as diferenças existentes entre eles independentemente da infecção. Esses resultados podem ser vistos na figura 13 e no anexo 2 deste trabalho.

É importante salientar que o fato de um gene ter sido selecionado como mais expresso em uma linhagem ou outra não significa que esse gene tenha sua expressão aumentada nas células dessa linhagem. Não estamos avaliando um fenômeno, mas sim comparando características entre duas situações. Não há uma situação inicial que nos dê um nível basal de expressão e que permita dizer que determinado gene tem expressão aumentada em uma das linhagens ou diminuída na outra. O que temos são diferenças relativas, isto é, há uma

diferença entre a expressão de determinado gene entre as linhagens, mas não podemos saber se essa diferença se deve à diminuição da expressão do gene em uma linhagem ou ao seu aumento na outra.

O mesmo raciocínio deve ser aplicado aos grupos formados pelo agrupamento dos genes selecionados como DEG entre os macrófagos das duas linhagens (figura 17). Os grupos que mostram padrões mais fortes de aumento da intensidade de hibridação em uma linhagem ou na outra (figuras 17A e B) apenas exprimem uma idéia de grande diferença entre as intensidades de um determinado conjunto de sondas nas duas linhagens e, com essa abordagem, não podemos saber se um conjunto de sondas que tenha padrão fortemente aumentado em CBA/J, por exemplo, tem seus níveis de RNAm realmente aumentados em relação a uma situação inicial ou se o que ocorre é uma diminuição na quantidade de RNAm em C57BL/6. Senda assim, o que podemos ver é que a maioria dos genes selecionados como DEG entre os macrófagos das duas linhagens não apresentam diferenças muito grandes nos seus padrões de expressão. Entretanto, essas pequenas diferenças podem ser suficientes para que haja uma diferença significativa na resposta à infecção por *L. amazonensis* a ponto de uma linhagem ser bastante suscetível e a outra ser relativamente resistente a esse parasita.

A avaliação funcional referente à comparação entre os macrófagos das duas linhagens está mostrada na figura 16A e 16B e visa facilitar a visualização da representatividade de grupos de funções correlatas no conjunto dos genes diferencialmente expressos selecionados, podendo lançar pistas sobre os motivos dessas duas linhagens responderem diferentemente à infecção.

5.1.1. Sinalização Celular

A maioria dos genes classificados na categoria de sinalização celular selecionados em CBA/J faz parte da superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR), que transduzem sinais via proteína G heterotrimérica (YEAGLE & ALBERT, 2003) ou estão relacionados à sinalização através de membranas, segundo classificação do Gene Ontology Consortium.

Duas exceções interessantes são os genes que codificam a metalotioneína (MT)-1 e -2. Spahl e colaboradores demonstraram que essas

proteínas têm função de armazenamento de Zn^{2+} mas também estão implicadas num mecanismo de sinalização em condições inflamatórias baseado na produção de NO pela iNOS, o que regula o tráfego e a homeostase de Zn^{2+} intracelular (SPAHL *et al.*, 2003). Segundo esses autores, a produção de NO pela iNOS durante reações inflamatórias aumenta a expressão constitutiva do RNAm da MT-1 e MT-2 e induz a liberação do Zn^{2+} complexado a essas proteínas. Ao mesmo tempo, altas concentrações de Zn^{2+} livre são capazes de inibir a atividade e a expressão da iNOS por *feedback* negativo. Dessa forma, há uma modulação negativa da resposta inflamatória mediada por Zn^{2+} , o que pode ter influência na suscetibilidade dessas células à infecção por leishmanias.

Em C57BL/6 grande parte dos genes selecionados atua pelas vias de sinalização da proteína G e das *small* GTPases, segundo anotação do Gene Ontology Consortium. Entre eles estão os genes que codificam membros da família Ras – *Arhc* e *Arhu*. Este último é também chamado *Wrch-1* e codifica uma proteína homóloga à *Cdc42* que tem sua expressão regulada por *Wnt-1* independentemente de β -catenina. *Wrch-1* pode ativar vias que levam à formação de filopódios e fibras de *stress* do citoesqueleto (TAO *et al.*, 2001). Isso poderia contribuir para uma migração mais rápida dos macrófagos em direção aos parasitas, facilitando a fagocitose e internalização destes.

As prostaglandinas são derivados do ácido araquidônico e desempenham diversas funções durante a resposta inflamatória e imune (SMITH, 1992). A prostaglandina E_2 exerce um grande papel na regulação negativa da resposta imune em linfócitos murinos por inibir a proliferação antígeno-específica nessas células, sendo EP (E prostanóide) 2 o receptor dominante na mediação dessa ação inibidora. EP2, selecionado em C57BL/6, é um receptor do tipo GPCR e transduz sinais através da estimulação da adenilato ciclase e conseqüente aumento da concentração intracelular de AMPc (adenosina-monofosfato cíclica). Embora EP4 seja o maior responsável pela mediação da ação inibidora da prostaglandina E em macrófagos – inibição da secreção de citocinas e da apresentação de antígenos por moléculas MHC de classe II – EP2 também contribui com esses efeitos nessas células (IKEGAMI *et al.*, 2001; NATARAJ *et al.*, 2001).

Também selecionado em C57BL/6, o receptor IP da prostaglandina I, também chamada prostaciclina, assim como EP2 e EP4, é um GPCR que ativa adenilato ciclase, mas também pode ativar outros segundos mensageiros como a fosfolipase C, assim como a proteína G inibitória. Dessa forma, esse receptor medeia diferentes sinais dependendo da célula que está sendo estimulada (WISE, 2003). Em macrófagos e monócitos humanos estimulados por LPS e IFN- γ , o aumento do AMPc mediado por IP está relacionado ao aumento da indução da iNOS e, conseqüentemente, da produção de NO (PLUM *et al.*, 2002).

A serina-protease 11 (Prss11) faz parte da família HtrA de serina-proteases em mamíferos. Recentemente ela foi descrita como um novo inibidor da sinalização por membros da família do TGF- β , provavelmente por prevenir a ativação dos receptores dessas moléculas (OKA *et al.*, 2004).

No caso da linhagem C57BL/6, há um balanço entre uma tendência inflamatória e uma tendência de repouso dos macrófagos. Ainda assim, a tendência inflamatória parece ser maior, o que poderia acarretar uma ativação mais rápida das células no caso de uma infecção.

5.1.2. Resposta Imune

CD2, selecionado em CBA/J, é uma glicoproteína transmembrânica que medeia a adesão de células T a outras células que expressam seu ligante, LFA-3 (*lymphocyte function associated antigen-3*), e que transduz, tanto isoladamente quanto em conjunto com TCR, sinais que resultam na ativação desses linfócitos e na facilitação do reconhecimento de antígenos apresentados por CAA (MOINGEON *et al.*, 1989). Apesar de estimular a ativação e a diferenciação de células T CD4⁺, aumentar a resposta a IL-12 e a produção de IFN- γ , CD2 não tem a capacidade de favorecer a polarização dessas células para uma resposta T_H1, sendo a otimização do reconhecimento de antígenos sua provável principal função (SASADA *et al.*, 2002).

O fator citosólico 4 de neutrófilos (Ncf4), também denominado p40^{phox}, é um ativador da NADPH oxidase de células fagocíticas, enzima que produz superóxido e é crucial para os mecanismos de defesa empregados por essas células (KURIBAYASHI *et al.*, 2002).

O receptor de quimiocinas CCR5 faz parte da superfamília GPCR e é ativado pela ligação com RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-2 (*monocyte chemotactic protein*) e se liga ainda a MCP-3, um antagonista natural desse receptor (BLANPAIN *et al.*, 1999). Foi clonado em 1996 e, logo em seguida, descrito como necessário para a entrada de certas cepas de HIV-1 (vírus da imunodeficiência humana tipo 1) em células permissivas. Como resultado, esse receptor tem sido bastante estudado por muitos investigadores envolvidos tanto em estudos sobre HIV quanto sobre quimiocinas (revisado por MENTEN *et al.*, 2002).

Outros receptores com função na resposta imune selecionados em CBA/J são o receptor tipo lectina de células NK (Klra3, também chamado Ly49), que é um receptor inibitório específico para certas variantes alélicas de moléculas MHC de classe I (HELD & RAULET, 1997), e a cadeia alfa do receptor de IL-10 (IL10Ra), que é um receptor de superfície celular membro do subgrupo de receptores de citocinas de classe II – receptores do tipo receptores de IFN – através do qual a sinalização por IL-10 é mediada (HO *et al.*, 1993).

Dos genes selecionados em C57BL/6, vários estão relacionados com a ativação dos macrófagos e de suas funções imunes, embora alguns tenham ação antiinflamatória.

CD24a, também conhecido como HSA (*heat stable antigen*) tem papel importante como co-estimulador na ativação de células T *naive* por macrófagos. Durante a fagocitose, ocorre um aumento da expressão de HSA e outros co-estimuladores na superfície dos macrófagos, o que aumenta sua capacidade de ativar células T ao mesmo tempo em que apresentam antígenos (de BRUIJN *et al.*, 1996).

CCL3 e CCL4 (MIP-1 α e MIP-1 β , respectivamente) são proteínas altamente relacionadas e membros da subfamília CC de quimiocinas e podem ser induzidas na maioria das células hematopoiéticas maduras. São altamente quimiotáticas, especialmente para linfócitos, além de aumentarem a adesão de linfócitos T às células vasculares e modularem a produção de citocinas por células T auxiliares (T_H). CCL3 também tem a capacidade de atrair macrófagos para locais de injúria tecidual, onde essas células vão exercer papel importante no reparo do tecido, e de inibir reversivelmente a proliferação de algumas

células hematopoiéticas progenitoras em camundongos (revisado por MENTEN *et al.*, 2002). Além disso, essas moléculas são co-secretadas com IFN- γ , RANTES e linfotactina, e cooperam na regulação positiva de CD40, IL-12 e TNF- α . Dessa forma, estimulam uma resposta do tipo T_H1 em macrófagos aumentando sua capacidade de apresentar antígenos e produzir níveis microbicidas de intermediários de oxigênio e nitrogênio (DORNER *et al.*, 2002).

O fator de complemento C1q inicia a cascata de ativação do complemento pela via clássica. Esse fator também pode se ligar direta ou indiretamente a células apoptóticas e induzir sua fagocitose por macrófagos ou células dendríticas. A fagocitose de células apoptóticas induz uma diminuição na produção de citocinas por células fagocíticas profissionais, ao contrário do que ocorre com células necróticas, que estimulam respostas pró-inflamatórias (revisado por ROOS *et al.*, 2004). C1q e outros fatores da via clássica de ativação do sistema complemento também são importantes para a imunidade inata contra bactérias, pois opsonizam e induzem a fagocitose desses microrganismos (BROWN *et al.*, 2002).

Semaforinas foram originalmente descritas como fatores de controle do crescimento axonal, guiando os axônios até as células-alvo apropriadas para o estabelecimento de novas sinapses, e também estão associadas a organogênese, vascularização, angiogênese e progressão do câncer. Várias semaforinas, juntamente com seus receptores, são expressas também em células do sistema imune tendo papel crucial na regulação das respostas imunológicas. A semaforina 4D (Sema4D/CD100) é uma delas, sendo a melhor caracterizada. É uma proteína transmembrânica expressa na superfície celular como um homodímero. É expressa abundantemente em células T em repouso e apenas fracamente em células B e CAA profissionais em repouso sendo, porém, bastante induzida quando da ativação dessas células. Tem papel na ativação de células B e T e na maturação e ativação de CAA, tanto células dendríticas quanto monócitos e macrófagos (KIKUTANI & KUMANOGOH, 2003; KUMANOGOH & KIKUTANI, 2004).

O receptor utilizado pelas semaforinas para mediar suas funções no sistema imune é o CD72, uma proteína transmembrânica tipo II pertencente à família das lectinas tipo C, expresso tanto em células B quanto CAA. Esse receptor funciona como um regulador negativo de respostas por células B e

Sema4D é capaz de aumentar essas respostas por bloquear a sinalização negativa mediada por CD72, provavelmente por inibir sua associação física com o receptor de células B (BCR). Ainda não é claro se CD72 é o único responsável pelas funções de Sema4D no sistema imune (KIKUTANI & KUMANOGOH, 2003; KUMANOGOH & KIKUTANI, 2004). CD72 também foi ligado à regulação negativa da apoptose induzida por BCR em células B imaturas, provavelmente por sustentar a expressão de c-Myc através de mecanismos mediados pela via do NF- κ B (FUJIWARA *et al.*, 2004).

Ym1 é um membro da família da quitinases e apresenta características de lectina. É expressa principalmente durante a exposição peritoneal a nematóides e pode atuar na resolução de processos inflamatórios por mascarar sítios de ligação a lectinas e prevenir a entrada de novas células inflamatórias no local (CHANG *et al.*, 2001). Sua expressão é bastante acentuada na presença de IL-4 e IL-13, sendo dependente de STAT-6 (WELCH *et al.*, 2002).

A cadeia beta do receptor de IL-10 (IL10Rb) foi descrita, em humanos, em 1993 por Lutfalla e colaboradores como sendo um receptor órfão e com função desconhecida, da família dos receptores de citocinas de classe II, e recebeu o nome de CRFB4. Apenas mais tarde essa molécula foi reconhecida como um acessório essencial para o complexo do receptor de IL-10 ser capaz de iniciar os eventos de sinalização induzidos por essa citocina (KOTENKO *et al.*, 1997).

A MKP-1 é uma fosfatase de dupla especificidade (Dusp1) implicada na inativação de MAPKs pela defosforilação dos resíduos de tirosina e treonina de uma seqüência-assinatura TXY que são essenciais para sua atividade enzimática (CAMPS *et al.*, 2000). Essa fosfatase é um regulador negativo crítico na sinalização de macrófagos em resposta a estímulos inflamatórios, além de ser responsável pelo bloqueio da produção de citocinas proinflamatórias por essas células (CHEN *et al.*, 2002).

Vemos que existe um certo balanço entre genes que ativam e reprimem uma possível resposta microbicida mais eficiente nas células dessas linhagens. São necessários estudos mais específicos e aprofundados para a elucidação do real papel desses genes na permissividade e na resposta das células contra *L. amazonensis*.

5.1.3. Metabolismo

Alguns genes ligados ao metabolismo de carboidratos e lipídeos selecionados em CBA/J mostram relação com funções imunes dos macrófagos. Um exemplo é o gene *Chi3l1* que codifica um membro da família das glicosil hidrolases, HC-gp39, que funciona como uma lectina ligante de quitina. Sua expressão é restrita a um pequeno número de tipos celulares – condrócitos, células sinoviais, neutrófilos e macrófagos – e mostra estreita correlação com a diferenciação tardia de macrófagos *in vitro*, sendo descrita como um marcador para essas células no estado maduro (REHLI *et al.*, 2003).

Outro é o gene que codifica adenosina desaminase (ADA), uma enzima importante do metabolismo de purinas. Sua deficiência causa uma imunodeficiência combinada severa provavelmente ligada à grande acumulação dos substratos dessa enzima: adenosina e 2'-desoxiadenosina. A adenosina é uma molécula sinalizadora extracelular que se liga a GPCR na superfície de células alvo para dar origem a inúmeros mecanismos celulares, inclusive apoptose de células T e B (BLACKBURN *et al.*, 1998; ALDRICH *et al.*, 2003). Já a 2'-desoxiadenosina é um metabólito citotóxico que pode matar as células por mecanismos que incluem distúrbios no metabolismo de desoxinucleotídeos e inibição de reações de transmetilação (referências contidas em BLACKBURN *et al.*, 1998). Como comentado anteriormente, não podemos saber, nesse momento, se essa enzima realmente está superexpressa nessa linhagem ou se está sub-expressa na outra. O que se pode inferir é que essa linhagem está menos suscetível a apresentar esse tipo de imunodeficiência combinada. Ainda assim, não podemos afirmar que isso a torne mais ou menos resistente à infecção.

Dos genes relacionados a funções metabólicas selecionados em C57BL/6, o gene que codifica a xantina desidrogenase (Xdh) tem sua expressão regulada por IFN- γ e sua função inibida por NO em macrófagos. Esse gene também codifica a xantina oxidase, sendo essas duas enzimas formas alternativas do mesmo produto gênico. Ambas estão relacionadas com o metabolismo de purinas e pirimidinas, assim como com a formação de espécies reativas de oxigênio e conseqüente injúria tecidual (RINALDO *et al.*,

1994; ICHIMORI *et al.*, 1999), podendo representar alguma vantagem na resposta contra parasitas intracelulares.

5.1.4. Ciclo Celular

Alguns genes envolvidos com o ciclo celular também podem ter algum papel na modulação da resposta imune, uma vez que ocorre interligação entre diversas vias controladoras desses processos.

Por exemplo, o gene 202b ativado por IFN (*Ifi202b*), selecionado em CBA/J, faz parte da família p200 de genes induzidos por IFN e é um produto de *splicing* alternativo da p202a e que conserva as mesmas funções desta (WANG *et al.*, 1999). Inibe o crescimento e a diferenciação celular pela ligação a diversos fatores de transcrição como c-Jun, c-Fos, c-Myc, NF- κ B, E2F-1, E2F-4, MyoD e miogenina, entre outros. Na maior parte dos casos, a ligação a esses fatores bloqueia a transativação por inibir a ligação destes a seqüências específicas no DNA. Deste modo, tem papel não somente na regulação negativa do ciclo celular como também da apoptose e da resposta imune pelo bloqueio dos fatores de transcrição relacionados a vias importantes para essas funções. (MA *et al.*, 2003; revisado por ASEFA *et al.*, 2004).

Entre os genes selecionados em C57BL/6, três fazem parte da família p200 de proteínas induzidas por IFN: *Ifi203*, *Ifi204* e *Ifi205*. Assim como a p202, as proteínas codificadas por esses genes estão envolvidas na regulação negativa do crescimento celular, primariamente por interações proteína-proteína com fatores reguladores do ciclo celular, e sua expressão é regulada durante a diferenciação de vários tecidos, sendo também implicados no controle da diferenciação celular (revisado por ASEFA *et al.*, 2004) e da resposta imune (Gene Ontology Consortium), provavelmente por mecanismos similares aos descritos para a p202. A p203 é expressa constitutivamente no timo, medula óssea e baço e é fracamente expressa em macrófagos peritoneais ativados sendo, porém, bastante induzida por IFN- α . Aparentemente, não tem nenhum efeito na proliferação celular por não possuir o domínio α presente em p202 e p204. Esta última é induzida em macrófagos peritoneais residentes por IFN- α , - β , - γ e LPS. Seu papel principal parece ser na promoção da diferenciação de células musculares pelo seqüestro de fatores

reguladores que bloqueiam o processo de diferenciação, podendo, do mesmo modo, ter papel no desenvolvimento de linfócitos. Assim como p202, medeia supressão do crescimento celular pela via reguladora do ciclo celular dependente de Rb (retinoblastoma). Por fim, p205 é induzida em macrófagos por IFN- α , - β e LPS e tem sua expressão diminuída nos estágios finais da diferenciação dessas células. Dessa forma, é possível especular que essa proteína tem sua expressão aumentada durante a diferenciação de progenitores mielóides e funciona como indutora de parada do crescimento e promotora da maturação dessas células. Além disso, pode estar envolvida também com a maturação de células linfóides (revisado por ASEFA *et al.*, 2004).

5.1.5. Citoesqueleto e adesão celular

Funções relacionadas ao citoesqueleto, adesão e migração celular também são importantes para a atividade dos macrófagos. Alguns genes que codificam moléculas ligadas a essas funções também foram selecionados em CBA/J. Uma dessas moléculas, o trocador de sódio/hidrogênio NHE1 da família dos carreadores de soluto 9 (*Slc9a1*) além de estar relacionado à adesão e migração celular, também atua na translocação de íons. Essa proteína é expressa ubiquamente na membrana plasmática e, em fibroblastos, se concentra nos lamelipódios onde ancora os filamentos de actina à membrana plasmática. Também controla o pH interno das células trocando Na⁺ extracelular por H⁺ intracelular. Esse transporte de íons é estimulado por receptores de membrana que respondem a estímulos migratórios. Além disso, NHE1 é necessário para a reorganização dinâmica do citoesqueleto de actina e formação de placas de adesão focal (DENKER & BARBER, 2002).

A proteína associada a ciclase 1 (CAP1) é expressa na maioria das células não-musculares de camundongos tanto adultos quanto em desenvolvimento. É uma proteína abundante que co-localiza com estruturas dinâmicas de actina nessas células. Promove rápida despolarização dos filamentos de actina induzida por cofilina e tem papel importante na morfogênese e motilidade celular, assim como na endocitose mediada por receptores (BERTLING *et al.*, 2004).

Essas duas proteínas podem ter papel na interação entre a célula e os parasitas, uma vez que, por suas funções na migração celular e endocitose, podem facilitar a interação e a internalização desses pelos macrófagos.

5.1.6. Síntese e metabolismo de proteínas

Genes relacionados à síntese e metabolismo protéicos podem estar implicados em processos paralelos às funções dos macrófagos. Seleccionados em CBA/J, catepsina L e catepsina E são exemplos de proteases com função auxiliar do sistema imune. A cisteína-protease catepsina L tem papel importante na maturação de moléculas MHC de classe II em CAA, na seleção de células T CD4⁺ no timo (NAKAGAWA *et al.*, 1998; HONEY *et al.*, 2002a) e para o desenvolvimento de células NK (HONEY *et al.*, 2002b). Já a aspartil-protease catepsina E foi relacionada com o processamento de antígenos protéicos exógenos em cultivos primários de micróglia murina (NISHIOKU *et al.*, 2002).

Em C57BL/6 podemos citar a catepsina C (ou dipeptidil peptidase I – DPPI), uma cisteína-protease caracterizada em camundongos em 1997 e que é altamente conservada entre camundongos, ratos e humanos (McGUIRE *et al.*, 1997). Essa protease é necessária para a ativação de serina-proteases contidas nos grânulos de mastócitos e neutrófilos durante processos infecciosos e inflamatórios (WOLTERS *et al.*, 2001; ADKISON *et al.*, 2002).

5.1.7. Outras funções

Dos genes classificados como pertencentes a outros grupos funcionais em C57BL/6, alguns estão fortemente relacionados ao controle redox na célula. Um deles é o gene que codifica a superóxido dismutase 1 (*Sod1*). As superóxido dismutases catalisam a conversão de superóxido (O₂⁻) em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e oxigênio molecular (O₂). SOD1 é a mais abundante nas células, cerca de 90%, e requer Cu²⁺ e Zn²⁺ para sua atividade. Essa enzima já foi relacionada a diversas doenças, entre elas doenças neuro-degenerativas, leucemias, tumores de mama e outros tumores viscerais, doenças associadas ao vírus da dengue, doenças vasculares e, em crianças, diabetes e síndrome nefrótica (revisado por NOOR *et al.*, 2002). Além disso, sua atividade também

está relacionada à sobrevivência de parasitas intracelulares, como as leishmanias, por detoxificar o ambiente celular liberando-o dos intermediários reativos de oxigênio, que têm ação microbicida (GHOSH *et al.*, 2003).

Todos os genes citados acima são apenas potencialmente associados ao comportamento distinto que os macrófagos das duas linhagens de camundongos venham a ter quando expostos à *L. amazonensis* e nenhuma conclusão pode ser formulada quanto a eles neste estágio do trabalho. Outros genes pertencentes a estas classes funcionais citadas, ou mesmo a outras, e que ainda não foram implicadas nos mecanismos de interação patógeno-hospedeiro também podem estar contribuindo para as diferenças na resposta à infecção. São necessários diversos outros experimentos para a confirmação desta que é apenas uma análise preliminar das diferenças genéticas entre dois modelos biológicos que podem ou não levar a um fenótipo de resistência ou suscetibilidade à infecção.

5.2. COMPARAÇÃO ENTRE MΦ INFECTADOS E NÃO-INFECTADOS

Também comparamos as células infectadas de cada linhagem com seus respectivos controles para avaliarmos as mudanças causadas pela infecção separadamente em cada uma das linhagens. Esses resultados podem ser vistos nas figuras 14 e 15 e nos anexos 3 e 4 deste trabalho.

5.2.1. Padrões gerais de seleção de DEG

O padrão da seleção de DEG nos experimentos com C57BL/6, onde há um maior número de genes com expressão diminuída na infecção em relação aos macrófagos não-infectados, está de acordo com o encontrado em outros trabalhos sobre interação de macrófagos com *Leishmania* sp. (BUATES & MATLASHEWSKI, 2001; RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Ambos os trabalhos reportam uma diminuição geral nos níveis de expressão gênica dos macrófagos infectados em comparação com os controles.

Já a comparação entre a infecção em CBA/J e os controles não-infectados teve resultado bastante distinto, sendo selecionados apenas genes

com expressão aumentada durante a infecção. Nosso grupo já realizou mais de 60 hibridações com material dessa linhagem infectado por mais de uma espécie de leishmania e temos observado que o padrão de expressão durante a infecção é sempre muito complexo e não reprodutível, diferente do que ocorreu com o padrão da linhagem C57BL/6 (dados não publicados). Assim, esbarramos em uma questão estatística onde não foi possível selecionar nenhum gene que tivesse sua expressão significativamente diminuída durante a infecção em CBA/J.

Pelos agrupamentos mostrados nas figuras 18 e 19 podemos ver que o padrão de expressão das células infectadas de CBA/J em relação aos controles não-infectados é bastante complexo e muito mais caótico que a mesma comparação feita com C57BL/6, sendo os grupos formados com os DEG selecionados na infecção desta última linhagem muito mais consistentes internamente que aqueles formados pelos DEG selecionados na infecção da primeira. Ainda assim, vemos que o aumento na expressão dos genes selecionados em CBA/J, mesmo sendo relativamente fraco, é acompanhado pelo aumento na expressão desses mesmos genes em C57BL/6, mesmo que esses não tenham sido selecionados como DEG por não terem diferença estatisticamente significativa (figura 18). Esse padrão se repete na figura 19, quando observamos os grupos de genes aumentados na infecção de C57BL/6 em relação aos controles. Já nos grupos de genes diminuídos na infecção de C57BL/6, o padrão em CBA/J se torna bastante caótico, mas ainda com uma tendência à diminuição em relação aos controles.

Essas observações dão uma idéia de que as mudanças provocadas nas células dessas duas linhagens pela infecção com *L. amazonensis* são muito pequenas e diluídas entre as diferenças entre as células. Isso nos faz supor que esse parasita tem uma certa linha de ação relativamente comum e afeta as células de diferentes hospedeiros de uma forma semelhante. Sendo assim, a célula hospedeira – seu *background* genético e seu estado metabólico e/ou funcional – teria um papel extremamente importante e decisivo no resultado da infecção, tanto do ponto de vista de respostas locais no momento da interação do parasita com as células do hospedeiro, quanto de comprometimento do organismo como um todo, quando considerados outros fatores como o estado de saúde geral do indivíduo.

Rodriguez e colaboradores (2004) estudaram as diferenças na expressão gênica de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c quando infectados por *L. chagasi* utilizando a tecnologia GeneChip® e sugeriram que a infecção por *Leishmania* sp. pode levar a um padrão de ativação atípico dos macrófagos após a fagocitose dos parasitas, o que possibilita que estes sobrevivam no ambiente celular hostil que essas células apresentam. Isso está de acordo com o que foi visto anteriormente por Ji e colaboradores (2002 e 2003) quando demonstraram, por meio da quantificação da produção de citocinas e quimiocinas, que a resposta de camundongos BALB/c e C57BL/6 à *L. amazonensis* não tinha perfil T_H2, mas também não havia predominância do perfil T_H1. Já Souza e colaboradores (2000), também por meio de quantificação de citocinas e estudos histopatológicos, demonstraram que *L. amazonensis*, induz resposta tipo T_H2 em camundongos CBA/J.

Com base nos nossos dados, podemos dizer que as mudanças no padrão de expressão gênica de macrófagos murinos em resposta à infecção por *L. amazonensis* são bastante complexas e não foi observada nenhuma tendência quanto à diferenciação da resposta imune para um perfil T_H1 ou T_H2. Isso pode estar relacionado ao período de tempo dos experimentos, uma vez que já foi observado que as maiores diferenças na expressão de genes relacionados à resposta imune na infecção de macrófagos de camundongos CBA/J por *L. amazonensis* são observadas após 24 horas de infecção (GOMES *et al.*, manuscrito em preparação). Também já foi reportado um atraso na expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias nos estágios iniciais da infecção de camundongos C57BL/6 por essa espécie de leishmania (JI *et al.*, 2003).

5.2.2. DEG selecionados em ambas as linhagens

Dos genes como expressão aumentada nas células infectadas, alguns foram selecionados igualmente nos macrófagos de CBA/J e C57BL/6. Entre eles está o gene que codifica a metalotioneína 2, já comentado anteriormente, e que pode estar envolvido na modulação negativa da resposta inflamatória, permitindo a sobrevivência dos parasitas no interior das células.

O gene que codifica a arginase 1, também selecionado nas duas infecções, já foi descrito anteriormente como tendo papel importante na sobrevivência de *L. major* no interior de macrófagos. Foi demonstrado que macrófagos murinos expressam arginase 1 em resposta a citocinas do tipo T_H2 (IL-4, IL-10 e TGF- β) e que a indução dessa enzima, um competidor da iNOS, é característica da via de ativação alternativa dos macrófagos (INIESTA *et al.*, 2002). Essa enzima catalisa a hidrólise de L-arginina para a formação de L-ornitina, que é o substrato para a síntese de poliaminas, compostos essenciais para o crescimento e a proliferação de parasitas do gênero *Leishmania*, assim como para a síntese de tripanotona por esses parasitas, o equivalente da glutatona em mamíferos (ROBERTS *et al.*, 2004). A sua expressão aumentada durante a infecção de ambas as linhagens de camundongo sugere um papel também relacionado à sobrevivência de *L. amazonensis* no interior de macrófagos.

É sabido que *L. donovani* inibe a via de sinalização que induz a apoptose das células hospedeiras, prolongando assim sua própria sobrevivência (MOORE & MATLASHEWSKI, 1994). *L. amazonensis*, entretanto, simula a sua própria apoptose por meio da exposição de fosfatidilserina em sua superfície para aumentar a sua internalização por fagocitose e inibir a ativação dos macrófagos infectados, uma vez que o reconhecimento dessa molécula induz a secreção de TGF- β e IL-10 e inibe a produção de NO (de FREITAS BALANCO *et al.*, 2001). Em ambas as infecções realizadas neste trabalho observou-se o aumento da expressão de BNIP3 e TGM2, duas moléculas ligadas ao controle da apoptose.

A primeira, BNIP3, é uma proteína mitocondrial pró-apoptótica que foi classificada como membro da família Bcl-2 por conter o domínio BH-3. Embora a maioria das proteínas contendo esse domínio induza apoptose rapidamente, BNIP3 exibe atividade pró-apoptótica retardada (YASUDA *et al.*, 1998). Mais tarde foi demonstrado que, em hepatócitos, a expressão dessa proteína é inibida por NO (ZAMORA *et al.*, 2001). Já a segunda, TGM2, é uma acil-transferase com atividade também na sinalização pela proteína G. Essa proteína já foi associada a diversos processos celulares como sinalização e transdução de sinal, adesão celular, cicatrização e mineralização de tecidos, além da apoptose. Sua deficiência afeta tanto a morte quanto a remoção de

células apoptóticas, resultado de uma dificuldade na ativação de TGF- β (SZONDY *et al.*, 2003 e referências ali contidas). Nesse caso, contrariando o que foi visto em infecções por *L. major*, há uma tendência para que ocorra apoptose nas células infectadas com *L. amazonensis*. Devemos lembrar que as espécies de leishmania têm grandes diferenças entre si e que as células hospedeiras apresentam respostas bastante diversas contra elas (SOUZA, *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2003). Ainda assim, essa diferença na tendência à apoptose deverá ser investigada com mais profundidade.

Outra observação interessante diz respeito aos genes com expressão diminuída em macrófagos de C57BL/6 quando comparados aos controles não-infectados. Diversos genes da cadeia respiratória, especialmente do complexo da ubiquinona e outras relacionadas à síntese e ao metabolismo de ATP (adenosina trifosfato), se encontram nesse grupo, assim como diversos fatores de regulação da transcrição, proteínas ribossomais e canais iônicos. Isso sugere que essas células possam estar metabolicamente menos ativas durante a infecção, o que deve ser explorado em maiores detalhes no futuro.

Como já dito anteriormente, os dados apresentados neste trabalho são ainda bastante preliminares, dando apenas algumas indicações e apontando alguns caminhos a serem seguidos para a elucidação e o entendimento dos processos que regem as complexas interações entre *Leishmania amazonensis* e suas células hospedeiras, os macrófagos. Nenhum experimento confirmatório foi feito até o momento, mas os dados descritos neste trabalho serão utilizados para iniciarmos uma série de experimentos visando à sua confirmação e a de seu papel no modelo biológico estudado. Ferramentas de genética reversa como utilização de camundongos *knockout* e a metodologia de RNA de interferência podem ser bastante úteis no seguimento desse estudo. Da mesma forma, ferramentas de biologia celular como o uso de anticorpos monoclonais, imunocitoquímica e quantificação de produtos de genes de interesse podem ser importantes para a confirmação dos resultados obtidos com o microarranjo e para inferências sobre o papel dos genes selecionados no processo de interação de *Leishmania amazonensis* com sua célula hospedeira, o macrófago.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS AK, LICHTMAN AH, POBER JS (2000) **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 4 ed., 553pp.

ADKISON AM, RAPTIS SZ, KELLEY DG, PHAM CT (2002) Dipeptidyl peptidase I activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis. **J. Clin. Invest**, 109:363-371.

ALDRICH MB, CHEN W, BLACKBURN MR, MARTINEZ-VALDEZ H, DATTA SK, KELLEMS RE (2003) Impaired germinal center maturation in adenosine deaminase deficiency. **J Immunol**, 171:5562-5570.

ALEXANDER J, SATOSKAR AR, RUSSELL DG (1999) *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **J Cell Sci**, 112:2993-3002.

ALIZADEH AA, EISEN MB, DAVIES RE, MA C, LOSSOS IS, ROSENWALD A, BOLDRICK JC, SABET H, TRAN T, YU X, POWELL JI, YANG L, MARTI GE, MOORE T, HUDSON J, LU L, LEWIS DB, TIBSHIRANI R, SHERLOCK G, CHAN WC, GREINER TC, WEISENBURGER DD, ARMITAGE JO, WARNKE R, LEVY R, WILSON W, GREVER MR, BYRD JC, BOTSTEIN D, BROWN PO, STAUDT LM (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. **Nature**, 403:503-511.

ASEFA B, KLARMANN KD, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA, KELLER JR (2004) The interferon-inducible p200 family of proteins: a perspective on their roles in cell cycle regulation and differentiation. **Blood Cells Mol Dis**, 32:155-167.

BERTLING E, HOTULAINEN P, MATTILA PK, MATILAINEN T, SALMINEN M, LAPPALAINEN P (2004) Cyclase-associated protein 1 (CAP1) promotes cofilin-induced actin dynamics in mammalian nonmuscle cells. **Mol Biol Cell**, 15:2324-2334.

BEVERLEY SM (2003) Protozoomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age. **Nat Rev Genet**, 4:11-19.

BIGGER CB, BRASKY KM, LANFORD RE (2001) DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. **J Virol**, 75:7059-7066.

BLACKBURN MR, DATTA SK, KELLEMS RE (1998) Adenosine deaminase-deficient mice generated using a two-stage genetic engineering strategy exhibit a combined immunodeficiency. **J Biol Chem**, 273:5093-5100.

BLADER IJ, MANGERS ID, BOOTHROYD JC (2001) Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. **J Biol Chem**, 267:24223-24231.

BLANPAIN C, MIGEOTTE I, LEE B, VAKILI J, DORANZ BJ, GOVAERTS C, VASSART G, DOMS RW, PARMENTIER M (1999) CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. **Blood**, 94:1899-1905.

BROWN JS, HUSSELL T, GILLILAND SM, HOLDEN DW, PATON JC, EHRENSTEIN MR, WALPORT MJ, BOTTO M (2002) The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. **PNAS**, 99:16969-16974.

BUER J, BALLING R (2003) Mice, microbes and models of infection. **Nat Rev Genet**, 4:195-205.

BUTTE A (2002) The use and analysis of microarray data. **Nat Rev Drug Disc**, 1:951-960.

CAMARGO EP (1964) Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* – origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 6:93-100.

CAMPS M, NICHOLS A, ARKINSTALL S (2000) Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. **FASEB J**, 14:6-16.

CHAMPSI J, McMAHON-PRATT D (1988) Membrane glycoprotein M-2 protects against *Leishmania amazonensis* infection. **Infect Immun**, 56:3272-3279.

CHANG KP, REED SG, McGWIRE BS, SOONG L (2003) *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. **Acta Trop**, 85:375-390.

CHANG NC, HUNG SI, HWA KY, KATO I, CHEN JE, LIU CH, CHANG AC (2001) A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin. **J Biol Chem**, 276:17497-17506.

CHAUSSABEL D, SEMNANI RT, McDOWELL MA, SACKS D, SHER A, NUTMAN TB (2003) Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. **Blood**, 102:672-681.

CHEN P, LI J, BARNES J, KOKKONEN GC, LEE JC, LIU Y (2002) Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **J Immunol**, 169:6408-6416.

CHEUNG VC, MORLEY M, AGUILAR F, MASSIMI A, KUCHERLAPATI R, CHLDS G (1999) Making and reading microarrays. **Nat Genet**, 21:15-19.

CHUDIN E, WALKER R, KOSAKA A, WU SX, RABERT D, CHANG TK, KREDER DE (2001) Assessment of the relationship between signal intensities and transcript concentration for Affymetrix GeneChip arrays. **Genome Biol**, 3:research0005.1-0005.10.

CUMMINGS CA, RELMAN DA (2000) Using DNA microarrays to study host-microbe interactions. **Emerg Infect Dis**, 6:513-525.

CUNNINGHAM AC (2002) Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp Mol Pathol**, 72:132-141.

de BRUIJN ML, PETERSON PA, JACKSON MR (1996) Induction of heat-stable antigen expression by phagocytosis is involved in in vitro activation of unprimed CTL by macrophages. **J Immunol**, 156:2686-2692.

de FREITAS BALANCO JM, MOREIRA ME, BONOMO A, BOZZA PT, AMARANTE-MENDES G, PIRMEZ C, BARCINSKI MA (2001) Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Curr Biol**, 11:1870-1873.

DENKER SP, BARBER DL (2002) Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1. **J Cell Biol**, 159:1087-1096.

DeRISI JL, IYER VR, BROWN PO (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. **Science**, 278:680-686.

DESJARDINS M (2003) ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. **Nat Rev Immunol**, 3:280-291.

DIEHN M, RELMAN DA (2001) Comparing functional genomic datasets: lessons from DNA microarray analyses of host-pathogen interactions. **Curr Opin Microbiol**, 4:95-101.

DOMINGUEZ M, MORENO I, AIZPURUA C, TORAÑO A (2003) Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. **Microbes Infect**, 5:507-513.

DORNER BG, SCHEFFOLD A, ROLPH MS, HÜSER MB, KAUFMANN SHE, RADBRUCH A, FLESCHE IEA, KROCZEK RA (2002) MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN- γ as type 1 cytokines. **PNAS**, 99:6181-6186.

DOSREIS GA (2000) Susceptible hosts: a resort for parasites right in the eye of the immune response. **An Acad Bras Ci**, 72:79-82.

DUDOIT, S, GENTLEMAN, RC, QUACKENBUSH, J (2003) Open source software for the analysis of microarray data. **Biotechniques**, Suppl:45-51.

FESTING MFW (1998) **Inbred strains of mice**. Disponível em <<http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/STRAINS.shtml>>. Acesso em 20 mar. 2004.

FODOR SPA, READ JL, PIRRUNG MC, STRYER L, LU AT, SOLAS D (1991) Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. **Science**, 251:767-773.

FUJIWARA N, FUSAKI N, HOZUMI N (2004) CD72 stimulation modulates anti-IgM induced apoptotic signaling through the pathway of NF- κ B, c-Myc and p27^{Kip1}. **Microbiol Immunol**, 48:59-66.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde (2002) **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: FUNASA, 5 ed.

GeneBank. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>>.

GeneChip® Expression Analysis – Technical Manual. Disponível em <http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expression_manual.affx>. Acesso em 21 fev. 2003.

Gene Ontology Consortium. Disponível em <<http://www.geneontology.org>>. Acesso em junho 2004.

GHOSH S, GOSWAMI S, ADHYA S (2003) Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. **J Biochem**, 369:447-452.

GIORGIO S, LINARES E, ISCHIROPOULOS H, VON ZUBEN FJ, YAMADA A, AUGUSTO O (1998) In vivo formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and of nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. **Infect Immun**, 66:807-814.

GOLUB TR, SLONIM DK, TAMAYO P, HUARD C, GAASENBEEK M, MESIROV JP, COLLIER H, LOH ML, DOWNING JR, CALIGIURI MA, BLOOMFIELD CD, LANDER ES (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. **Science**, 286:531-537.

GOMES IN, CALABRICH AFC, TAVARES RS, WIETZERBIN J, de FREITAS LAR, VERAS PST (2003) Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. **Microbes Infect**, 5:251-260.

GORDON S (2003) Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, 3:23-35.

GRIMALDI G Jr, TESH SB, McMAHON-PRATT D (1989) A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. **Am J Trop Med Hyg**, 41:687-725.

GREENBERG SA (2001) DNA microarray gene expression analysis technology and its applications to neurological disorders. **Neurology**, 57:755-761.

HANDMAN E (2000) Cell biology of *Leishmania*. **Adv Parasitol**, 44:1-39.

HATO-MAEDA M, GAO Q, SMALL PM (2001) Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. **Cell Microbiol**, 3:713-719.

HELD W, RAULET DH (1997) Ly49A transgenic mice provide evidence for a major histocompatibility complex-dependent education process in natural killer cell development. **J Exp Med**, 185:2079-2088.

HIETER P (1999) What do yeast proteins do? **Nature**, 402:362-363.

HO AS, LIU Y, KHAN TA, HSU DH, BAZAN JF, MOORE KW (1993) A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. **PNAS**, 90:11267-11271.

HONEY K, NAKAGAWA T, PETERS C, RUDENSKY A (2002a) Cathepsin L regulates CD4+ T cell selection independently of its effect on invariant chain: a role in the generation of positively selecting peptide ligands. **J Exp Med**, 195:1349-1358.

HONEY K, BENLAGHA K, BEERS C, FORBUSH K, TEYTON L, KLEIJMEER MJ, RUDENSKY AY, BENDELAC A (2002b) Thymocyte expression of cathepsin L is essential for NKT cell development. **Nat Immunol**, 3:1069-1074.

ICHIKAWA JK, NORRIS A, BANGERA MG, GEISS GK, WOUT AB, BUMGARNER RE, LORY S (2000) Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with epithelial cells: identification of differentially regulated genes by expression microarray analysis of human cDNA. **PNAS**, 97:9659-9664.

ICHIMORI K, FUKAHORI M, NAKAZAWA H, OKAMOTO K, NISHINO T (1999) Inhibition of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase by nitric oxide: nitric oxide converts reduced xanthine-oxidizing enzymes into the desulfo-type inactive form. **J. Biol. Chem**, 274:7763-7768.

IKEGAMI R, SUGIMOTO Y, SEGI E, KATSUYAMA M, KARAHASHI H, AMANO F, MARUYAMA T, YAMANE H, TSUCHIYA S, ICHIKAWA A (2001) The expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and their different regulation by lipopolysaccharide in C3H/HeN peritoneal macrophages. **J Immunol**, 166:4689-4696.

INIESTA V, GOMEZ-NIETO LC, MOLANO I, MOHEDANO A, CARCELEN J, MIRON C, ALONSO C, CORRALIZA I (2002) Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. **Parasite Immunol**, 24:113-118.

IRIZARRY RA, HOBBS B, COLLIN F, BEAZER-BARCLAY YD, ANTONELLIS KJ, SCHERF U, SPEED TP (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density array probe level data. **Biostatistics**, 4:249-264.

JI J, SUN J, QI H, SOONG L (2002) Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. **Am J Trop Med Hyg**, 66:338-345.

JI J, SUN J, SOONG L (2003) Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. **Infect Immun**, 71:4278-4288.

JOHNSTON C, JIANG W, CHU T, LEVINE B (2001) Identification of genes involved in the host response to neurovirulent alphavirus infection. **J Virol**, 75:10431-10445.

KIKUTANI H, KUMANOGOH A (2003) Semaphorins in interactions between T cells and antigen-presenting cells. **Nat Rev Immunol**, 3:159-167.

KNODLER LA, CELLI J, FINLAY BB (2001) Pathogenic trickery: deception of host cell processes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2:578-588.

KOTENKO SV, KRAUSE CD, IZOTOVA LS, POLLACK BP, WU W, PESTKA S (1997) Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. **EMBO J**, 16:5894-5903.

KUMANOGOH A, KIKUTANI H (2004) Biological functions and signaling of a transmembrane semaphoring, CD100/Sema4D. **Cell Mol Life Sci**, 61:292-300.

KURIBAYASHI F, NUNOI H, WAKAMATSU K, TSUNAWAKI S, SATO K, ITO T, SUMIMOTO H (2002) The adaptor protein p40^{phox} as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. **EMBO J**, 21:6312-6320.

LASKAY T, DIEFENBACH A, ROLLINGHOFF M, SOLBACH V (1995) Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. **Eur J Immunol**, 25:2220-2227.

LOCKHART DJ, DONG H, BYRNE MC FOLLETTIE MT, GALLO MV, CHEE MS, MITTMANN M, WANG C, KOBAYASHI M, HORTON H, BROWN EL (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. **Nat Biotech**, 14:1675-1680.

LUTFALLA G, GARDINER K, UZÉ G (1993) A new member of the cytokine receptor gene family maps on chromosome 21 at less than 35 kb from IFNAR. **Genomics**, 16:366-373.

MA XY, WANG H, DING B, ZHONG H, GHOSH S, LENGYEL P (2003) The interferon-inducible p202a protein modulates NF-kappaB activity by inhibiting the binding to DNA of p50/p65 heterodimers and p65 homodimers while enhancing the binding of p50 homodimers. **J Biol Chem**, 278:23008-23019.

MANGER ID, RELMAN DA (2000) How the host 'sees' pathogens: global gene expression responses to infection. **Curr Opin Immunol**, 12:215-218.

MARTON MJ, DeRISI JL, BENNETT HA, IYER VR, MEYER MR, ROBERTS CJ, STOUGHTON R, BURCHARD J, SLADE D, DAI H, BASSETT DE, HARTWELL LH, BROWN PO, FRIEND SH (1998) Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. **Nat Med**, 4:1293-1301.

McGUIRE MJ, LIPSKY PE, THIELE DL (1997) Cloning and characterization of the cDNA encoding mouse dipeptidyl peptidase I (cathepsin C). **Biochim Biophys Acta**, 1351:267-273.

MELBY PC (2002) Recent developments in leishmaniasis. **Curr Opin Infect Dis**, 15:485-490.

MENTEN P, WUYTS A, VAN DAMME J (2002) Macrophage inflammatory protein-1. **Cytokine Growth Factor Rev**, 13:455-481.

MGI – Mouse Genome Informatics. Disponível em <<http://www.informatics.jax.org>>.

MOINGEON P, CHANG HC, WALLNER BP, STEBBINS C, FREY AZ, REINHERZ EL (1989) CD2-mediated adhesion facilitates T lymphocyte antigen recognition function. **Nature**, 339:312-314.

MOORE KJ, MATLASHEWSKI G (1994) Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. **J Immunol**, 152:2930-2937.

NAKAGAWA T, ROTH W, WONG P, NELSON A, FARR A, DEUSSING J, VILLADANGOS JA, PLOEGH H, PETERS C, RUDENSKY AY (1998) Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus. **Science**, 280:450-453.

NATARAJ C, THOMAS DW, TILLEY SL, NGUYEN MT, MANNON R, KOLLER BH, COFFMAN TM (2001) Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse. **J Clin Invest**, 108:1229-1235.

NISHIOKU T, HASHIMOTO K, YAMASHITA K, LIOU SY, KAGAMIISHI Y, MAEGAWA H, KATSUBE N, PETERS C, VON FIGURA K, SAFTIG P, KATUNUMA N, YAMAMOTO K, NAKANISHI H (2002) Involvement of cathepsin E in exogenous antigen processing in primary cultured murine microglia. **J Biol Chem**, 277:4816-22.

NOOR R, MITTAL S, IQBAL J (2002) Superoxide dismutase – applications and relevance to human diseases. **Med Sci Monit**, 8:RA210-215.

O'FARRELL C, VAGHEFI N, CANTONNET M, BUTEAU B, BOUDINOT P, BANMANSOUR A (2002) Survey of transcript expression in rainbow trout leukocytes reveals a major contribution of interferon-responsive genes in the early response to a rhabdovirus infection. **J Virol**, 76:8040-8049.

OKA C, TSUJIMOTO R, KAJIKAWA M, KOSHIBA-TAKEUCHI K, INA J, YANO M, TSUCHIYA A, UETA Y, SOMA A, KANDA H, MATSUMOTO M, KAWAICHI M (2004) HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgf β family proteins. **Development**, 131:1041-1053.

PEROU CM, JEFFREY SS, VAN DE RIJN M, REES CA, EISEN MB, ROSS DT, PERGAMENSCHIKOV A, WILLIAMS CF, ZHU SX, LEE JCF, LASHKARI D, SHALON D, BROWN PO, BOTSTEIN D (1999) Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. **PNAS**, 96:9212-9217.

PLUM J, HUANG C, GRABENSEE B, SCHROR K, MEYER-KIRCHRATH J (2002) Prostacyclin enhances the expression of LPS/INF-gamma-induced nitric oxide synthase in human monocytes. **Nephron**, 91:391-398.

POGGIOLI GJ, DeBIASI RL, BICKEL R, JOTTE R, SPALDING A, JOHNSON GL, TYLER K (2002) Reovirus-induced alterations in gene expression related to cell cycle regulation. **J Virol**, 76:2585-2594.

REHLI M, NILLER HH, AMMON C, LANGMANN S, SCHWARZFISCHER L, ANDREESEN S, KRAUSE SW (2003) Transcriptional regulation of *CHI3L1*, a marker gene for late stages of macrophage differentiation. **J Biol Chem**, 278:44058–44067.

RINALDO JE, CLARK M, PARINELLO J, SHEPHERD VL (1994) Nitric oxide inactivates xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in interferon- γ -stimulated macrophages. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 11:625-30.

RITTIG MG, BOGDAN C (2000) *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitol Today**, 16:292-297.

ROBERTS SC, TANCER MJ, POLINSKY MR, GIBSON KM, HEBY O, ULLMAN B (2004) Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. **J Biol Chem**, 279:23668-23678.

RODRIGUEZ NE, CHANG, HK, WILSON ME (2004) Novel program of macrophage gene expression induced by phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **Infect Immun**, 72:2111-2122.

ROGERS KA, DeKREY GK, MBOW ML, GILLESPIE RD, BRODSKYN CI, TITUS RG (2002) Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiol Lett**. 209:1-7.

ROOS A, XU W, CASTELLANO G, NAUTA AJ, GARRED P, DAHA MR, van KOOTEN C (2004): A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. **Eur J Immunol**, 34:921-929.

ROSENBERGER CM, SCOTT MG, GOLD MR, HANCOCK REW, FINLAY BB (2000) *Salmonella typhimurium* infection and lipopolysaccharide stimulation induce similar changes in macrophage gene expression. **J Immunol**, 164:5894-5904.

SACKS D, NOBEN-TRAUTH N (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol**, 2:845-858.

SACKS D, SHER A (2002) Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat Immunol**, 3:1041-1047.

SALAMA N, GUILLEMIN K, McDANIEL TK, SHERLOCK G, TOMPKINS L, FALKOW S (2000) A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. **PNAS**, 97:14668-14673.

SALAMON H, KATO-MAEDA M, SMALL PM, DRENKOW J, GINGERAS TR (2000) Detection of deleted genomic DNA using a semiautomated computational analysis of GeneChip data. **Genome Res**, 10:2044-2054.

SASADA T, YANG H, REINHERZ EL (2002) CD2 facilitates differentiation of CD4 Th cells without affecting Th1/Th2 polarization. **J Immunol**, 168:1113-1122.

SCHLAGER G, DICKIE MM (1967) Spontaneous mutations and mutation rates in the house mouse. **Genetics**, 57:319-330.

SCHENA M, SHALON D, DAVIS RW, BROWN PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, 270:467-470.

SCHENA M, SHALON D, HELLER R, CHAI A, BROWN PO, DAVIS RW (1996) Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. **PNAS**, 93:10614-10619.

SCHENA M (2003) **Microarray analysis**. Hoboken: Wiley-Liss, 630pp.

SCHERF U, ROSS DT, WALTHAM M, SMITH LH, LEE JK, TANABE L, KOHN KW, REINHOLD WC, MYERS TG, ANDREWS DT, SCUDIERO DA, EISEN MB, SAUSVILLE EA, POMMIER Y, BOTSTEIN D, BROWN PO, WEINSTEIN JN (2000) A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. **Nat Genet**, 24:236-244.

SHARAN R, MARON-KATZ A, SHAMIR R (2003) CLICK and EXPANDER: A system for clustering and visualizing gene expression data. **Bioinformatics**, 19:1787-1799.

SKIPPER M (2002) Fully functional. **Nat Rev Gen**, 3:645.

SMITH WL (1992) Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. **Am J Physiol**, 263:F181-191.

SOONG L, CHANG CH, SUN J, LONGLEY BJJ, RUDDLE NH, FLAVELL RA, McMAHON-PRATT D. (1997) Role of CD4⁺ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. **J Immunol**, 158:5374-5383.

SOUZA VL, SOUZA JA, SILVA TMC, VERAS PST, de FREITAS LAR (2000) Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes Infect**, 2:1807-1815.

SPAHL DU, BEREBDJI-GRÜN D, SUSCHEK CV, KOLB-BACHOFEN V, KRÖNCKE KD (2003) Regulation of zinc homeostasis by inducible NO synthase-derived NO: nuclear metallothionein translocation and intranuclear Zn²⁺ release. **PNAS**, 100:13952-13957.

STAFFORD JL, NEUMANN NF, BELOSEVIC M (2002) Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. **Crit Rev Microbiol**, 28:187-248.

STOREY JD, TIBSHIRANI R (2003) Statistical significance for genomewide studies. **PNAS**, 100:9440-9445.

SZONDY Z, SARANG Z, MOLNAR P, NEMETH T, PIACENTINI M, MASTROBERARDINO PG, FALASCA L, AESCHLIMANN D, KOVACS J, KISS I, SZEGEZDI E, LAKOS G, RAJNAVOLGYI E, BIRCKBICHLER PJ, MELINO G, FESUS L (2003) Transglutaminase 2^{-/-} mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells. **PNAS**, 100:7812-7817.

TAMAYO P, SLONIM D, MESIROV J, ZHU Q, KITAREEWAN S, DMITROVSKY E, LANDER ES, GOLUB TR (1999) Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. **PNAS**, 96:2907-2912.

TAO H, BAUSCH C, RICHMOND C, BLATTNER FR, CONWAY T (1999) Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. **J Bacteriol**, 181:6425-6440.

TAO W, PENNICA D, XU L, KALEJTA RF, LEVINE AJ (2001) *Wrch-1*, a novel member of the Rho gene family that is regulated by Wnt-1. **Gen Dev**, 15:1796-1807.

TUSHER VG, TIBSHIRANI R, CHU G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. **PNAS**, 98:5116-5121.

UNDERHILL DM, OZINSKY A (2002) Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annu Rev Immunol**, 20:825-852.

WANG D, COSCOY L, ZYLBERBERG M, AVILA PC, BOUSHEY HA, GANEM D, DeRISI JL (2002) Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. **PNAS**, 99:15687-15692.

WANG H, CHATTERJEE G, MEYER JJ, LIU CJ, MANJUNATH NA, BRAY-WARD P, LENGYEL P (1999) Characteristics of three homologous 202 genes (*lfi202a*, *lfi202b*, and *lfi202c*) from the murine interferon-activatable gene 200 cluster. **Genomics**, 60:281-294.

WELCH JS, ESCOUBET-LOZACH L, SYKES DB, LIDDIARD K, GREAVES DR, GLASS CK (2002) TH2 cytokines and allergic challenge induce Ym1 expression in macrophages by a STAT6-dependent mechanism. **J Biol Chem**, 277:42821-42829.

WHO – World Health Organization. Disponível em <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>>. Acesso em 06 jan. 2004.

WISE H (2003) Multiple signalling options for prostacyclin. **Acta Pharmacol Sin**, 24:625-630.

WOLTERS PJ, PHAM CT, MUILENBURG DJ, LEY TJ, CAUGHEY GH (2001) Dipeptidyl peptidase I is essential for activation of mast cell chymases, but not tryptases, in mice. **J Biol Chem**, 276:18551-18556.

YASUDA M, THEODORAKIS P, SUBRAMANIAN T, CHINNADURAI G (1998) Adenovirus E1B-19K/BCL-2 interacting protein BNIP3 contains a BH-3 domain and a mitochondrial targeting sequence. **J Biol Chem**, 273:12415-12421.

YEAGLE PL, ALBERT AD (2003) A conformational trigger for activation of a G protein by a G protein-coupled receptor. **Biochemistry**, 42:1365-1368.

YUEN T, WURMBACK E, PFEFFER RL, EBERSOLE BJ, SEALFON SC (2002) Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. **Nucleic Acids Res**, 30:e48.

ZAMBRANO-VILLA S, ROSALES-BORJAS D, CARRERO JC, ORTIZ-ORTIZ L (2002) How protozoan parasites evade the immune response. **Trends Parasitol**, 18:272-278.

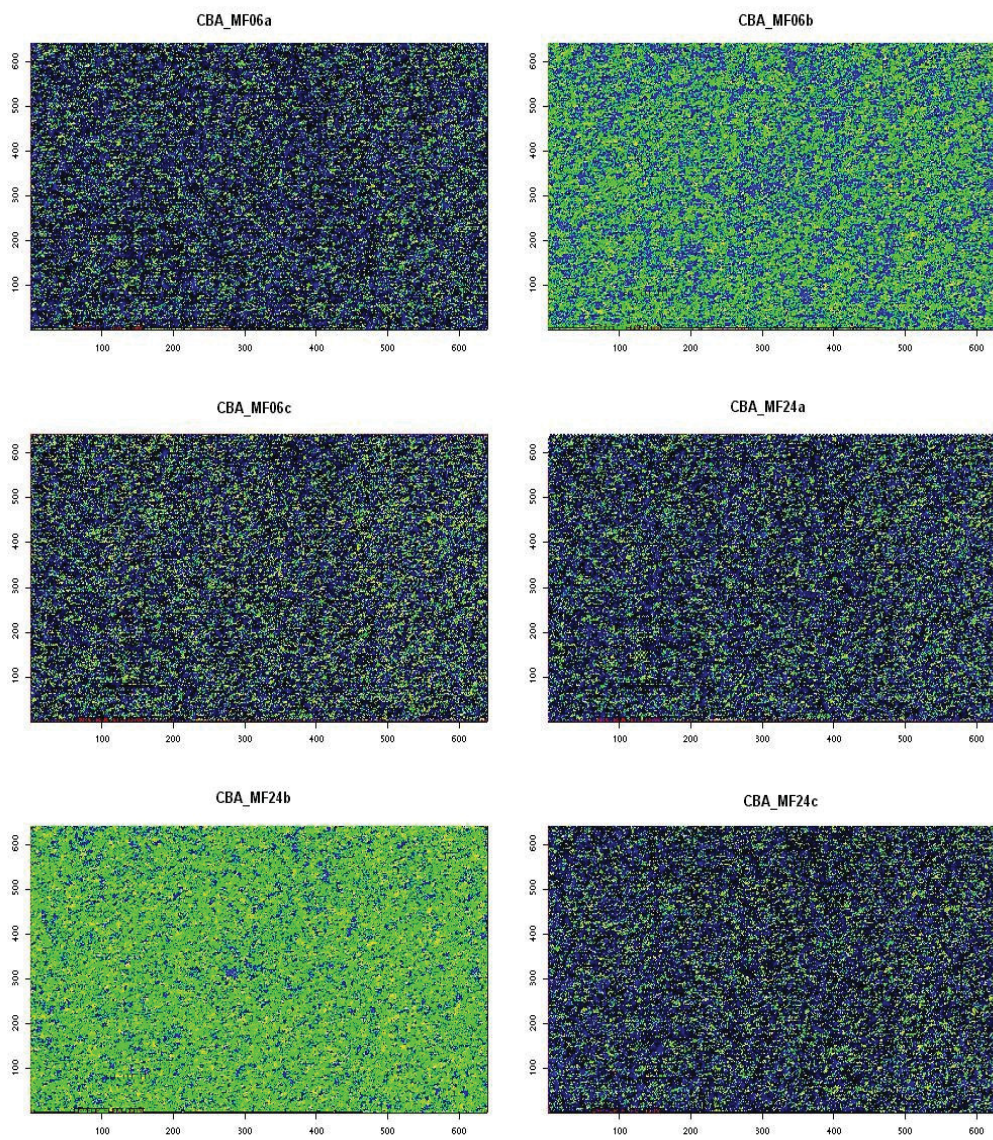
ZAMORA R, ALARCON L, VODOVOTZ Y, BETTEN B, KIM PK, GIBSON KF, BILLIAR TR (2001) Nitric oxide suppresses the expression of Bcl-2 binding protein BNIP3 in hepatocytes. **J Biol Chem**, 276:46887-46895.

ZHU H, CONG JP, MAMTORA G, GINGERAS T, SHENK T (1998) Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. **PNAS**, 95:14470-14475.

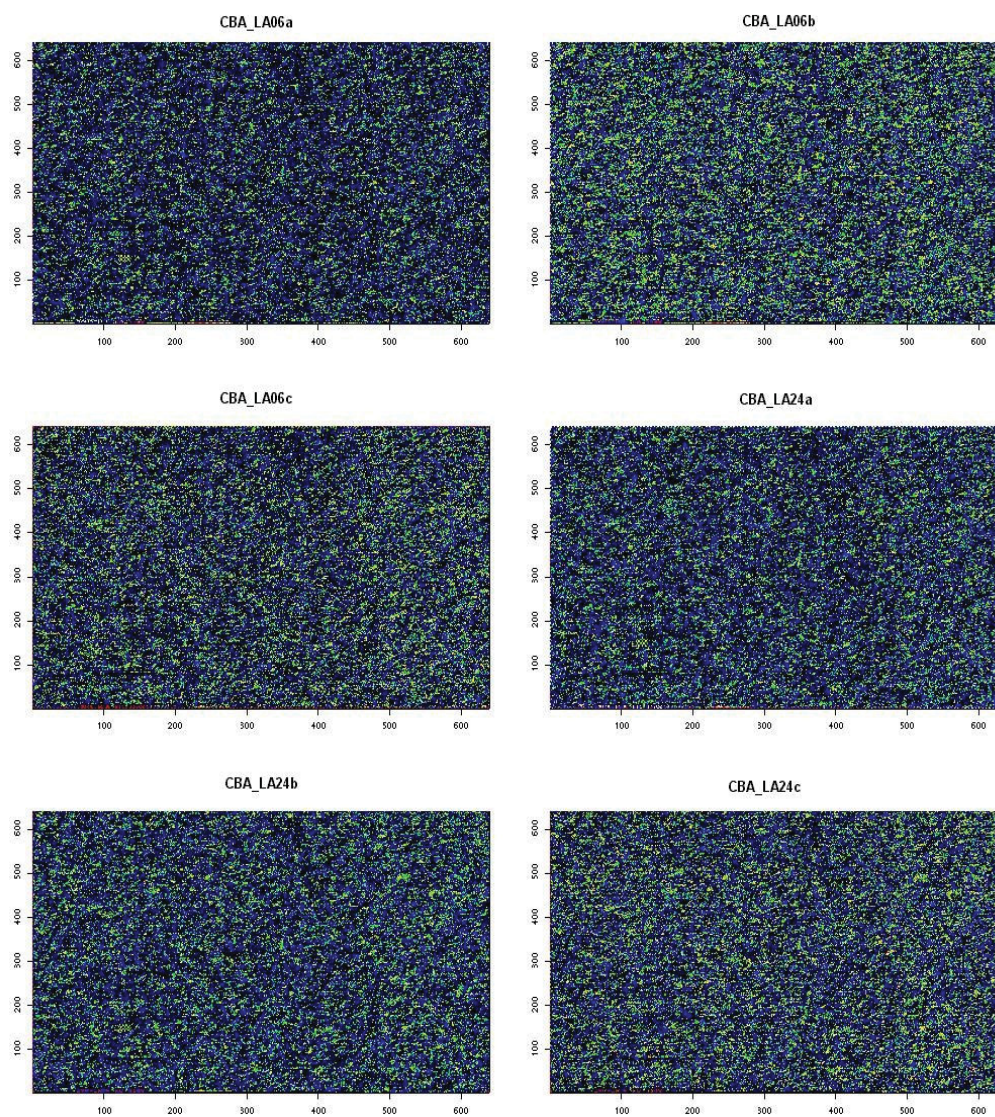
ANEXOS

ANEXO 1

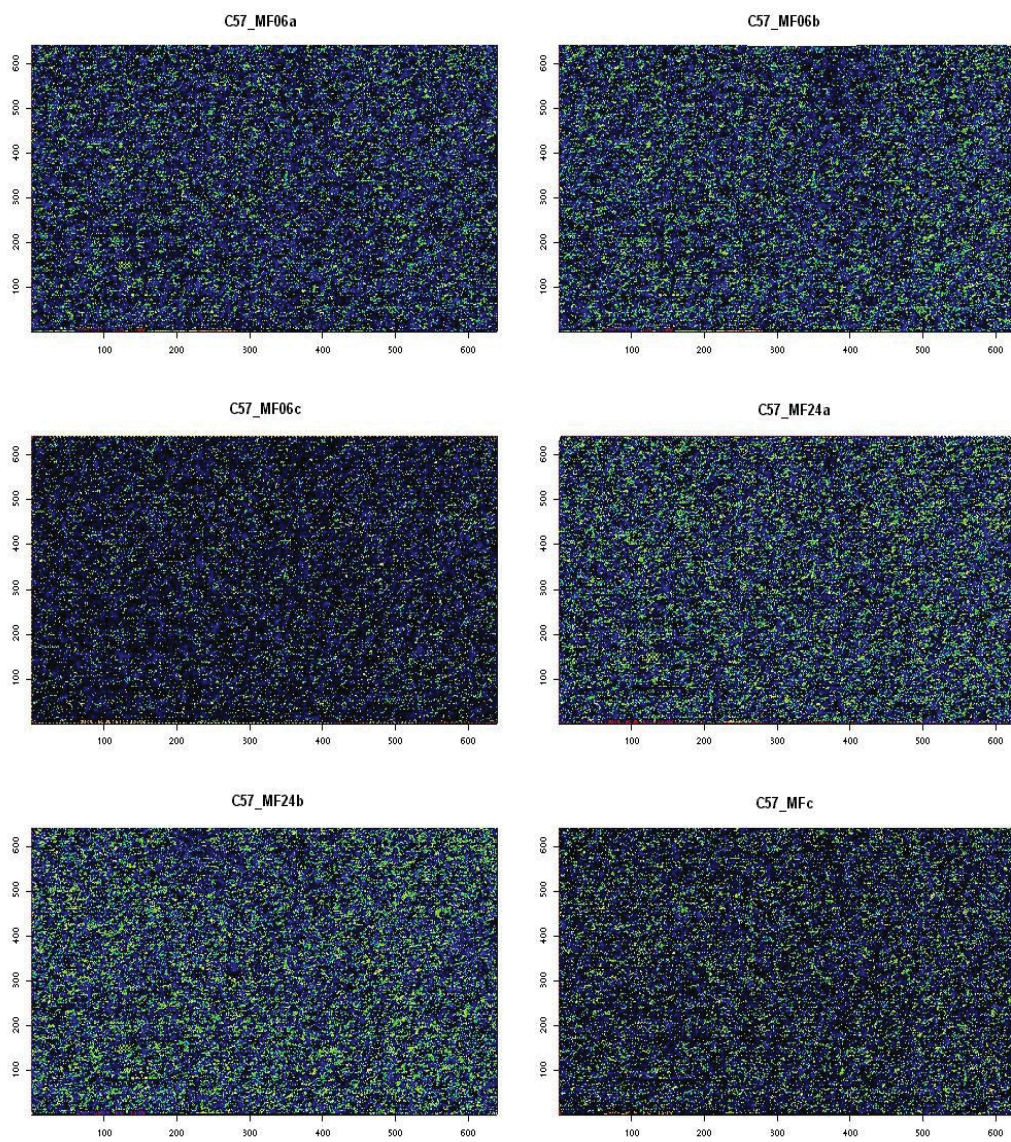
- Híbridos de PEC MΦ de CBA/J não-infectados



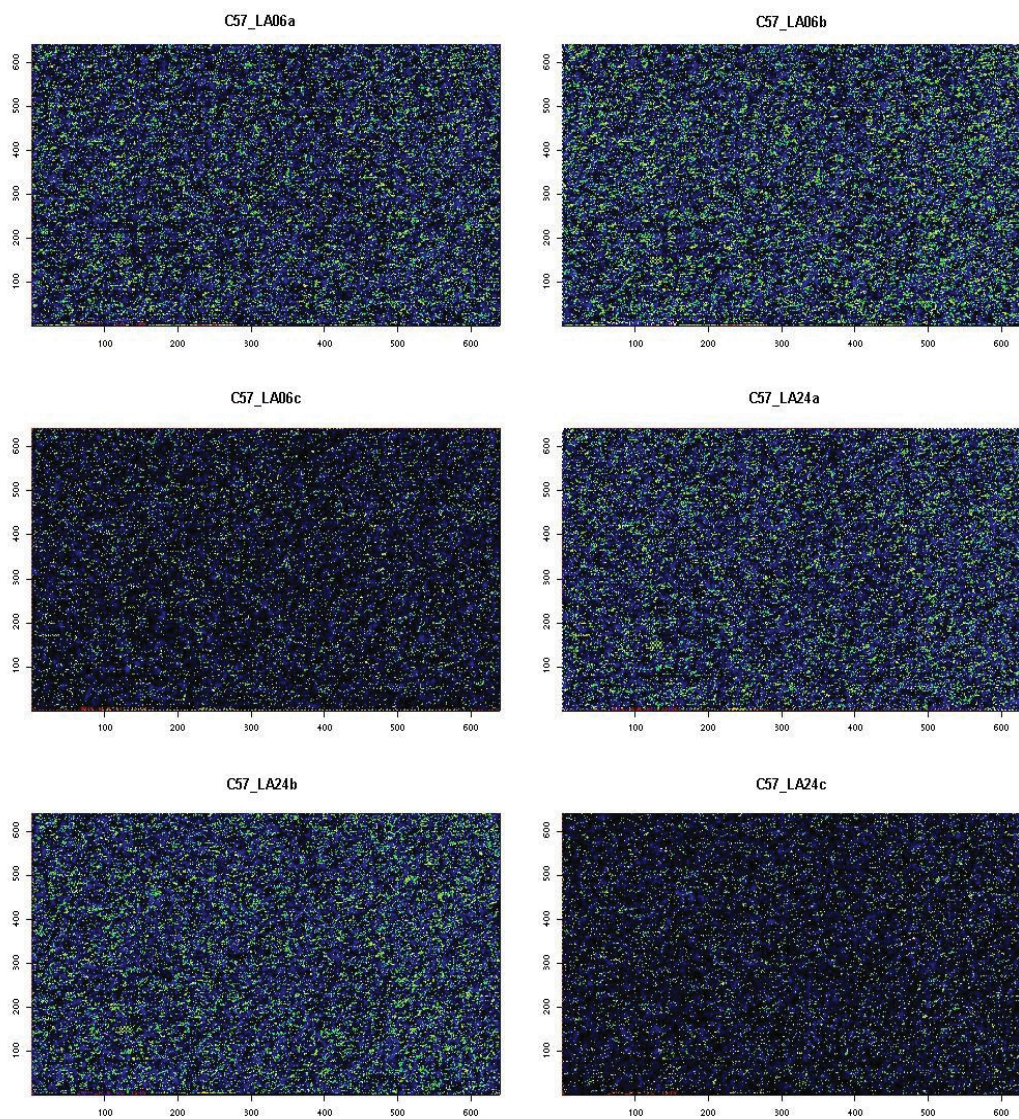
- Híbridos de PEC MΦ de CBA/J infectados por *L. amazonensis*



- Híbridações de PEC MΦ de C57BL/6 não-infectados



- Híbridos de PEC MΦ de C57BL/6 infectados por *L. amazonensis*



ANEXO 2

Tabela 4. DEG selecionados da comparação entre PEC MΦ não-infectados de CBA/J e C57BL/6

Identificação ¹	Símbolo do Gene	Nome do Gene	Grupo Funcional ²	Fold Change	Valor <i>q</i>
DEG com expressão aumentada em CBA/J					
MGI ID:96010	Hal	histidine ammonia lyase	Met	11,669	0,731
MGI ID:2146345	AA415817	expressed sequence AA415817	FD	4,604	0,731
MGI ID:1347083	Ifi202b	interferon activated gene 202B	CC	9,694	0,731
MGI ID:1917203	2810025M15Rik	RIKEN cDNA 2810025M15 gene	FD	2,115	0,731
MGI ID:96853	Alad	aminolevulinatase, delta-, dehydratase	Met	1,724	0,731
MGI ID:1889272	Igsf4	immunoglobulin superfamily, member 4	CA	2,334	0,731
MGI ID:96915	Maoa	monoamine oxidase A	Met	4,138	0,731
MGI ID:107182	Ccr5	chemokine (C-C motif) receptor 5	RI	3,147	0,731
MGI ID:87916	Ada	adenosine deaminase	Met	1,658	0,731
MGI ID:88407	Ckb	creatine kinase, brain	Met	2,737	0,731
MGI ID:1889272	Igsf4	immunoglobulin superfamily, member 4	CA	3,664	0,731
MGI ID:1891441	Csprs	component of Sp100-rs	SC	1,377	0,731
MGI ID:103298	Apobec1	apolipoprotein B editing complex 1	Met	2,248	0,731
MGI ID:107361	Ctse	cathepsin E	Prot	2,293	0,731
MGI ID:97808	Ptptra	protein tyrosine phosphatase, receptor type, A	SC	2,018	0,731
MGI ID:1926252	Rgs19ip1	regulator of G-protein signaling 19 interacting protein 1	SC	1,360	0,731
MGI ID:1925924	5530400K14Rik	RIKEN cDNA 5530400K14 gene	FD	1,334	0,731
MGI ID:2145316	Txndc5	thioredoxin domain containing 5	Outro	1,306	0,731
MGI ID:88262	Cap1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	CA	1,872	0,731
MGI ID:1340899	Chi3l1	chitinase 3-like 1	Met	5,498	0,731
MGI ID:1917424	2210409B22Rik	RIKEN cDNA 2210409B22 gene	FD	1,550	0,731
MGI ID:96538	Il10ra	interleukin 10 receptor, alpha	RI	1,357	0,731
MGI ID:1924340	9430098E02Rik	RIKEN cDNA 9430098E02 gene	FD	2,085	0,731
MGI ID:2445058	1190005L06Rik	RIKEN cDNA 1190005L06 gene	FD	1,314	0,731
MGI ID:1336169	Gng10	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 10	SC	2,681	0,731
MGI ID:1889272	Igsf4	immunoglobulin superfamily, member 4	CA	1,556	0,731
MGI ID:1347008	Plod3	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	Prot	1,408	0,731
MGI ID:96943	Mcpt7	mast cell protease 7	Prot	2,595	0,731
MGI ID:1349405	B3galt3	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 3	Met	1,569	0,731
MGI ID:98296	Shc1	src homology 2 domain-containing transforming protein C1	Apop	1,358	0,731
MGI ID:1261838	D16Ert502e	DNA segment, Chr 16, ERATO Doi 502, expressed	FD	1,251	0,731
MGI ID:101905	Klra3	killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 3	RI	1,468	0,731
MGI ID:1915217	2410142G14Rik	RIKEN cDNA 2410142G14 gene	FD	1,517	0,731
MGI ID:88276	Catnb	catenin beta	Outro	1,776	0,731
MGI ID:103151	Pltp	phospholipid transfer protein	Met	1,852	2,712
MGI ID:102462	Slc9a1	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 1	CA	1,345	2,712
MGI ID:2443003	A730042J05Rik	RIKEN cDNA A730042J05 gene	FD	1,460	2,712
MGI ID:1914077	Ttc1	tetratricopeptide repeat domain 1	FD	1,262	2,712
MGI ID:1923935	4833436O05	hypothetical protein 4833436O05	FD	1,527	2,712
MGI ID:97171	Mt1	metallothionein 1	SC	1,730	2,712
MGI ID:105082	Ssr1	signal sequence receptor, alpha	Outro	1,665	2,712
MGI ID:87951	Afp	alpha fetoprotein	CC	1,657	3,382
GB ID:M26005	---	---	FD	1,987	3,382
MGI ID:88564	Ctsl	cathepsin L	Prot	1,548	3,382
MGI ID:1890662	Slc9a3r2	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 3 regulator 2	Outro	1,286	4,670

MGI ID:97172	Mt2	metallothionein 2	SC	2,293	4,670
MGI ID:105066	Rab10	RAB10, member RAS oncogene family	SC	1,848	4,670
MGI ID:95896	H2-D1	histocompatibility 2, D region locus 1	RI	2,250	4,670
MGI ID:1353652	Tor3a	torsin family 3, member A	FD	2,620	4,670
MGI ID:1347083	Ifi202b	interferon activated gene 202B	CC	2,033	4,670
MGI ID:88320	Cd2	CD2 antigen	RI	1,475	4,670
MGI ID:109186	Ncf4	neutrophil cytosolic factor 4	RI	1,749	4,670
MGI ID:97828	Pygb	brain glycogen phosphorylase	Outro	1,372	4,670
MGI ID:1194891	Gpc1	glypican 1	CA	1,396	4,670
DEG com expressão aumentada em C57BL/6					
MGI ID:2153249	Igsf7	immunoglobulin superfamily, member 7	RI	8,593	0,731
MGI ID:1925225	B230114J08Rik	RIKEN cDNA B230114J08 gene	FD	4,588	0,731
MGI ID:88225	C1qg	complement component 1, q subcomponent, gamma polypeptide	RI	4,977	0,731
MGI ID:88054	Apoc2	apolipoprotein C-II	Met	2,566	0,731
MGI ID:1339977	Agtrap	angiotensin II, type I receptor-associated protein	Outro	3,119	0,731
MGI ID:88224	C1qb	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	Ri	10,016	0,731
MGI ID:1353578	Pttg1	pituitary tumor-transforming 1	CC	1,537	0,731
MGI ID:1921074	1110008H02Rik	RIKEN cDNA 1110008H02 gene	FD	3,818	0,731
MGI ID:1915443	Rpl24	ribosomal protein L24	Prot	2,600	0,731
MGI ID:109553	Ctsc	cathepsin C	Prot	5,334	0,731
MGI ID:1096324	Lst1	leukocyte specific transcript 1	RI	1,899	0,731
MGI ID:95321	Emb	embigin	CA	2,079	0,731
MGI ID:109486	Prdx2	peroxiredoxin 2	Outro	1,812	0,731
GB ID:A1849615	---	Mus musculus cDNA clone IMAGE:4500943, partial cds	FD	6,588	0,731
MGI ID:109553	Ctsc	cathepsin C	Prot	1,474	0,731
MGI ID:1914303	2610511E03Rik	RIKEN cDNA 2610511E03 gene	FD	1,565	0,731
MGI ID:88038	Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte	Met	1,949	0,731
MGI ID:101847	Ifi205	interferon activated gene 205	CC	4,373	0,731
MGI ID:1914642	4833420G17Rik	RIKEN cDNA 4833420G17 gene	FD	1,430	0,731
MGI ID:99535	Ptgir	prostaglandin I receptor (IP)	SC	1,682	0,731
MGI ID:96432	Igf1	insulin-like growth factor 1	SC	2,513	0,731
MGI ID:88223	C1qa	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	RI	3,137	0,731
MGI ID:98822	Trfr	transferrin receptor	Outro	1,631	0,731
MGI ID:1861622	Aldh9a1	aldehyde dehydrogenase 9, subfamily A1	Met	4,257	0,731
MGI ID:1349482	Slc9a3r1	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 3 regulator 1	SC	1,870	0,731
MGI ID:2146345	AA415817	expressed sequence AA415817	FD	1,592	0,731
MGI ID:98389	Spp1	secreted phosphoprotein 1	CA	2,083	0,731
MGI ID:1930140	Wdr6	WD repeat domain 6	Outro	1,272	0,731
MGI ID:1928477	Tmem4	transmembrane protein 4	FD	1,681	0,731
MGI ID:88323	Cd24a	CD24a antigen	RI	2,698	0,731
MGI ID:88151	Glb1	galactosidase, beta 1	Met	2,851	0,731
MGI ID:1913327	0610033H09Rik	RIKEN cDNA 0610033H09 gene	FD	1,347	0,731
MGI ID:88057	Apoe	apolipoprotein E	Met	3,770	0,731
MGI ID:1913677	1810044O22Rik	RIKEN cDNA 1810044O22 gene	FD	1,409	0,731
MGI ID:1330860	Chi3l3 / Ym1	chitinase 3-like 3	RI	2,688	0,731
MGI ID:96885	Ly9	lymphocyte antigen 9	RI	2,212	0,731
MGI ID:1196297	D8Erd354e	DNA segment, Chr 8, ERATO Doi 354, expressed	FD	2,140	0,731
MGI ID:1914273	2010315L10Rik	RIKEN cDNA 2010315L10 gene	FD	1,609	0,731
MGI ID:1914708	1200007D18Rik	RIKEN cDNA 1200007D18 gene	FD	1,730	0,731
MGI ID:1929076	Prss11	protease, serine, 11 (Igf binding)	SC	1,656	0,731
MGI ID:2147661	5730409F24Rik	RIKEN cDNA 5730409F24 gene	FD	1,424	0,731
MGI ID:98261	Ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4	RI	1,486	0,731
MGI ID:1929628	Vig1-pending	viral hemorrhagic septicemia virus(VHSV) induced gene 1	RI	1,854	0,731
MGI ID:95498	Fcgr1	Fc receptor, IgG, high affinity I	RI	1,803	0,731
MGI ID:1916482	2610028H07Rik	RIKEN cDNA 2610028H07 gene	FD	1,464	0,731

MGI ID:1334419	Cd5l	CD5 antigen-like	Apop	3,166	0,731
MGI ID:98351	Sod1	superoxide dismutase 1, soluble	Outro	2,135	0,731
GB ID:C85523	---	---	FD	2,535	0,731
MGI ID:2444479	6330575P11Rik	RIKEN cDNA 6330575P11 gene	FD	2,205	0,731
MGI ID:95915	H2-M3	histocompatibility 2, M region locus 3	RI	1,363	0,731
MGI ID:1919334	2010319C14Rik	RIKEN cDNA 2010319C14 gene	FD	1,428	0,731
MGI ID:1098268	Kif5b	kinesin family member 5B	CA	2,253	0,731
MGI ID:1916831	Arhu	ras homolog gene family, member U	SC	1,480	0,731
MGI ID:1298223	Birc1a	baculoviral IAP repeat-containing 1a	Apop	1,279	0,731
MGI ID:1353606	Siva-pending	Cd27 binding protein (Hindu God of destruction)	Apop	1,328	0,731
MGI ID:2136460	Echs1	enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial	Met	1,274	0,731
GB ID: B003305	---	---	FD	1,790	0,731
MGI ID:1929512	Litaf	LPS-induced TN factor	RI	1,636	0,731
GB ID:AI324061	---	---	FD	1,410	0,731
MGI ID:1913606	2310008H09Rik	RIKEN cDNA 2310008H09 gene	FD	2,286	0,731
MGI ID:1914273	2010315L10Rik	RIKEN cDNA 2010315L10 gene	FD	1,510	0,731
MGI ID:107825	Adam8	a disintegrin and metalloprotease domain 8	Prot	1,912	0,731
MGI ID:109380	Il10rb	interleukin 10 receptor, beta	RI	2,421	0,731
MGI ID:2183439	Mcfid2	multiple coagulation factor deficiency 2	Outro	1,847	0,731
MGI ID:1924223	Fbxo21	F-box only protein 21	Outro	1,422	0,731
MGI ID:88345	Cd72	CD72 antigen	RI	2,755	0,731
MGI ID:1339963	Siat9	sialyltransferase 9 (CMP-NeuAc:lactosylceramide alpha-2,3-sialyltransferase)	Met	1,462	0,731
MGI ID:894326	Atp6v1e1	ATPase, H+ transporting, V1 subunit E isoform 1	Met	1,608	0,731
MGI ID:98973	Xdh	xanthine dehydrogenase	Met	2,333	0,731
MGI ID:1923275	Shapy-pending	Ca ²⁺ -dependent endoplasmic reticulum nucleoside diphosphatase	Met	1,307	0,731
MGI ID:1915137	1810045K07Rik	RIKEN cDNA 1810045K07 gene	FD	1,975	0,731
MGI ID:102768	Mfge8	milk fat globule-EGF factor 8 protein	CA	2,728	0,731
MGI ID:105120	Dusp1	dual specificity phosphatase 1	RI	1,789	0,731
MGI ID:2146049	AI661017	expressed sequence AI661017	FD	1,774	0,731
GB ID:AW048053	---	---	FD	1,429	0,731
MGI ID:96429	Ifi204	interferon activated gene 204	CC	2,057	0,731
MGI ID:1351315	Tceb3	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3	Outro	1,501	0,731
MGI ID:1858622	Vamp5	vesicle-associated membrane protein 5	Outro	1,266	0,731
MGI ID:1099818	Pkd2	polycystic kidney disease 2	CC	1,810	0,731
MGI ID:1350928	Aoah	acyloxyacyl hydrolase	Met	1,712	0,731
GB ID:AW045665	---	Mus musculus cDNA clone MGC:67366 IMAGE:5683334, complete cds	FD	1,275	0,731
MGI ID:97794	Ptger2	prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2)	SC	1,480	1,245
MGI ID:1098243	Ifnar2	interferon (alpha and beta) receptor 2	RI	1,505	1,245
MGI ID:1915076	1110031B06Rik	RIKEN cDNA 1110031B06 gene	FD	1,347	1,245
MGI ID:1098772	Pik3r2	phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2	SC	1,278	1,245
MGI ID:1914292	2600013G09Rik	RIKEN cDNA 2600013G09 gene	FD	1,331	1,245
MGI ID:1926263	Gbp3	guanylate nucleotide binding protein 3	SC	1,328	1,245
MGI ID:2150302	4921528E07Rik	RIKEN cDNA 4921528E07 gene	FD	1,576	1,245
MGI ID:1344372	Ubce7ip3-pending	ubiquitin conjugating enzyme 7 interacting protein 3	Prot	1,416	1,245
MGI ID:96428	Ifi203	interferon activated gene 203	CC	1,633	1,245
MGI ID:894311	Pirb	paired-Ig-like receptor B	RI	1,456	1,245
MGI ID:109244	Sema4d	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4D	RI	1,586	1,245
MGI ID:1344427	Zfp68	Zinc finger protein 68	Outro	1,895	1,245
MGI ID:108093	Bid	BH3 interacting domain death agonist	Apop	1,397	1,245
MGI ID:2687281	9830126M18	hypothetical protein 9830126M18	FD	1,527	1,245
MGI ID:98737	Thbs1	thrombospondin 1	Outro	2,861	1,245
MGI ID:2144419	---	Mus musculus, clone IMAGE:1379624, mRNA, partial cds	FD	1,457	1,245
MGI ID:104665	Soat1	sterol O-acyltransferase 1	Met	1,401	1,245

MGI ID:2158641	Cyp4f13	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 13	Outro	1,348	1,245
MGI ID:1921080	1200009C21Rik	RIKEN cDNA 1200009C21 gene	FD	1,526	1,245
MGI ID:109284	Psen2	presenilin 2	Prot	2,161	1,245
MGI ID:95936	H2-Q7	histocompatibility 2, Q region locus 7	RI	1,253	2,712
MGI ID:106028	Arhc	ras homolog gene family, member C	SC	1,486	2,712
MGI ID:1915389	5730589K01Rik	RIKEN cDNA 5730589K01 gene	FD	1,485	2,712
MGI ID:1913464	1190002H23Rik	RIKEN cDNA 1190002H23 gene	FD	1,322	2,712
MGI ID:98090	Pdc	phosducin	SC	1,356	2,712
MGI ID:98483	Tap1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	RI	1,815	2,712
MGI ID:1914163	Kdelr2	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2	Outro	1,251	2,712
MGI ID:1346527	Psm8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional protease 7)	Prot	1,604	2,712
MGI ID:99434	Arf5	ADP-ribosylation factor 5	SC	1,275	2,712
MGI ID:98260	Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	RI	1,495	2,712
MGI ID:109365	Kdap	kidney-derived aspartic protease-like protein	Prot	1,655	2,712
MGI ID:2140335	9330177P20Rik	RIKEN cDNA 9330177P20 gene	FD	1,819	2,712
MGI ID:1930773	Brp17	brain protein 17	FD	1,332	2,712
MGI ID:108396	Dtymk	deoxythymidylate kinase	Met	1,302	3,382
MGI ID:109573	Tep1	telomerase associated protein 1	Outro	1,312	3,382
MGI ID:2443855	9530051K01Rik	RIKEN cDNA 9530051K01 gene	FD	1,500	3,382
MGI ID:95660	Gas6	growth arrest specific 6	Apop	1,293	3,382
MGI ID:105381	Lamr1	laminin receptor 1 (ribosomal protein SA)	Prot	1,313	3,382
MGI ID:2138302	---	Mus musculus transcribed sequence with weak similarity to protein pir:I54501 (H.sapiens) I54501 interferon gamma-induced protein IFI 16 - human	FD	1,601	3,382
MGI ID:1914318	Dncl2a	dynein, cytoplasmic, light chain 2A	CA	1,282	3,382
MGI ID:1920188	2900042B11Rik	RIKEN cDNA 2900042B11 gene	FD	1,369	3,382
GB ID:X90778	---	---	FD	1,264	3,382
MGI ID:96136	Hmgn2	high mobility group nucleosomal binding domain 2	Outro	1,718	3,382
MGI ID:107606	Sreb1	sterol regulatory element binding factor 1	Met	1,310	3,382
GB ID:AI504305	---	---	FD	1,938	3,382
MGI ID:102705	Gng2	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2 subunit	SC	1,383	3,382
MGI ID:106651	Ly6e	lymphocyte antigen 6 complex, locus E	RI	1,714	3,382
MGI ID:107776	Gadd45b	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	Apop	1,846	3,382
MGI ID:107527	Ly6a	lymphocyte antigen 6 complex, locus A	RI	1,322	3,382
MGI ID:1920974	1110007A04Rik	RIKEN cDNA 1110007A04 gene	FD	1,337	4,670
MGI ID:1914617	1810007M14Rik	RIKEN cDNA 1810007M14 gene	FD	1,601	4,670
MGI ID:2148975	Bat4	HLA-B associated transcript 4	RI	1,266	4,670
MGI ID:96976	Mglap	matrix gamma-carboxyglutamate (gla) protein	CA	1,264	4,670
MGI ID:1330838	Lgmn	legumain	Prot	1,663	4,670
MGI ID:1916974	2400006P09Rik	RIKEN cDNA 2400006P09 gene	FD	1,334	4,670
MGI ID:1349164	Sdc4	syndecan 4	CA	1,495	4,670
MGI ID:88151	Glb1	galactosidase, beta 1	Met	1,666	4,670
MGI ID:1312921	Casp6	caspase 6	Apop	1,305	4,670
MGI ID:1196457	Atpi	ATPase inhibitor	Met	1,314	4,670
MGI ID:107379	Gstt1	glutathione S-transferase, theta 1	Met	1,270	4,670
MGI ID:88030	Anxa4	annexin A4	Outro	1,366	4,670
MGI ID:109352	Ung	uracil-DNA glycosylase	Met	1,276	4,670
MGI ID:87871	Acat2	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	Met	1,398	4,670
MGI ID:1914954	1810037117Rik	RIKEN cDNA 1810037117 gene	FD	1,350	4,670
MGI ID:1858943	Arl6ip1	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 1	Apop	1,395	4,670
MGI ID:1860078	Txnl	thioredoxin-like	Outro	1,298	4,670
MGI ID:1890226	Fxyd6	FXYD domain-containing ion transport regulator 6	Outro	1,278	4,670

1. Número de acesso em banco de dados. MGI, Mouse Genome Informatics; GB, Genebank.

2. Grupos funcionais segundo a classificação da figura 15. SC, sinalização celular; RI, resposta imune; Met, metabolismo; Apop, apoptose; CC, ciclo celular; CA, citoesqueleto/adesão celular; Prot, síntese/metabolismo de proteínas; Outro, outros; FD, função desconhecida.

ANEXO 3

Tabela 5. DEG selecionados da comparação entre PEC MΦ infectados e não-infectados de CBA/J

Identificação ¹	Símbolo do Gene	Nome do Gene	Grupo Funcional ²	Fold Change	Valor <i>q</i>
MGI ID:103010	Epb4.111	erythrocyte protein band 4.1-like 1	CA	1,942	1,388
GB ID:U58105	---	---	FD	1,993	1,388
MGI ID:2384747	Erdr1-pending	erythroid differentiation regulator 1	CC	1,901	1,388
MGI ID:1889549	Txnip	thioredoxin interacting protein	Outro	1,645	1,388
GB ID:L24430	---	---	FD	2,156	1,388
MGI ID:1913730	Rpl15	ribosomal protein L15	Prot	1,897	1,388
MGI ID:97172	Mt2	metallothionein 2	SC	3,094	1,388
MGI ID:108063	Siah1b	seven in absentia 1B	Prot	3,993	1,388
MGI ID:94926	Drd4	dopamine receptor 4	SC	1,593	1,388
MGI ID:1099786	Dhx15	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15	Outro	1,721	1,388
MGI ID:1934754	Kars	lysyl-tRNA synthetase	Met	1,610	1,388
MGI ID:104614	Cox6c	cytochrome c oxidase, subunit VIc	Outro	1,537	1,388
MGI ID:88473	Cox4i1	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1	Outro	1,642	1,388
MGI ID:1915444	Ndufb4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 4	Met	2,071	1,388
MGI ID:1914632	Brd3	bromodomain containing 3	FD	1,788	1,388
MGI ID:98731	Col5a1	procollagen, type V, alpha 1	CA	1,881	1,388
MGI ID:1915240	Brp44l	brain protein 44-like	Apop	1,593	1,388
MGI ID:98731	Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	Apop	1,570	1,388
MGI ID:1095417	Gsta1	glutathione S-transferase, alpha 1 (Ya)	Met	1,715	1,388
MGI ID:102738	Guca2	guanylate cyclase activator 2 (guanylin 2, intestinal, heatstable)	SC	1,535	1,388
MGI ID:1196256	1810043O07Rik	RIKEN cDNA 1810043O07 gene	FD	1,774	1,388
MGI ID:95305	Eif4e	eukaryotic translation initiation factor 4E	Prot	1,755	1,388
MGI ID:1096863	Entpd2	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	SC	1,637	1,388
MGI ID:95739	Glul	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	Met	1,792	1,388
MGI ID:97009	Mmp2	matrix metalloproteinase 2	Prot	1,588	1,388
GB ID:AL078630	---	---	FD	1,550	1,388
MGI ID:95462	Evx2	even skipped homeotic gene 2 homolog	Outro	1,541	1,388
MGI ID:2384888	BC008155	cDNA sequence BC008155	FD	1,689	1,388
MGI ID:98968	Wt1	Wilms tumor homolog	Outro	2,662	1,388
GB ID:AV250661	---	---	FD	1,741	1,388
MGI ID:87891	Chrm2	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal)	Outro	1,616	1,388
MGI ID:1921496	Gale	galactose-4-epimerase, UDP	Met	1,527	1,388
MGI ID:107755	Neurod2	neurogenic differentiation 2	CC	1,709	1,388
GB ID:AV091761	---	---	FD	1,916	1,388
MGI ID:97771	Proc	protein C	Outro	1,917	1,388
MGI ID:2384784	Eif4g1	eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 1	Prot	1,714	1,388
MGI ID:1098296	Cpt1a	carnitine palmitoyltransferase 1, liver	Met	1,619	1,388
MGI ID:2139617	Lor	loricrin	Outro	1,807	1,388
MGI ID:101918	Akr1b7	aldo-keto reductase family 1, member B7	Met	1,536	1,388
MGI ID:1095406	Tuba3	tubulin, alpha 3	CA	2,798	1,388
MGI ID:107681	Rps29	ribosomal protein S29	Prot	1,804	1,388
MGI ID:1913416	S100a14	S100 calcium binding protein A14	Outro	1,673	1,388
MGI ID:98438	Sts	steroid sulfatase	Met	1,827	1,388
GB ID:AV147906	---	---	FD	1,506	1,388
MGI ID:88024	Ank1	ankyrin 1, erythroid	Outro	1,513	1,388
GB ID:AV084635	---	---	FD	1,624	1,388
GB ID:AA415014	---	Mus musculus transcribed sequence with weak similarity to protein pir:B44366 (H.sapiens) B44366 zinc finger protein ZNF126 - human (fragment)	FD	2,005	1,388

MGI ID:1860040	Trim3	tripartite motif protein 3	Outro	1,531	1,388
GB ID:U10410	LOC56304	recombinant antineuraminidase single chain Ig VH and VL domains	RI	1,632	1,388
MGI ID:97040	Ndst2	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminy) 2	CA	1,573	1,388
MGI ID:88588	Cyp1a1	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	Outro	1,673	1,388
MGI ID:2137204	Mrpl3	mitochondrial ribosomal protein L3	Prot	2,304	1,388
MGI ID:1333865	Rfxank	regulatory factor X-associated ankyrin-containing protein	RI	1,613	1,388
MGI ID:109352	Ung	uracil-DNA glycosylase	Met	1,689	1,388
MGI ID:1915686	1100001I22Rik	RIKEN cDNA 1100001I22 gene	FD	1,731	1,388
MGI ID:1289308	D6ErtD772e	DNA segment, Chr 6, ERATO Doi 772, expressed	FD	1,563	1,388
MGI ID:106651	Ly6e	lymphocyte antigen 6 complex, locus E	Ri	1,901	1,388
MGI ID:97537	Pecam	platelet/endothelial cell adhesion molecule	CA	1,590	1,388
MGI ID:1914365	3100001N19Rik	RIKEN cDNA 3100001N19 gene	FD	1,588	1,388
MGI ID:1920973	Sh3bgrl3	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein-like 3	Outro	1,738	1,388
MGI ID:107634	D3Wsu161e	DNA segment, Chr 3, Wayne State University 161, expressed	FD	1,550	1,388
MGI ID:2442050	G630024C07Rik	RIKEN cDNA G630024C07 gene	FD	1,545	1,388
MGI ID:1352466	Nr2c2	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2	Outro	1,535	1,388
MGI ID:1096330	Bad	Bcl-associated death promoter	Apop	1,634	2,302
MGI ID:2447063	Odz4	odd Oz/ten-m homolog 4 (Drosophila)	FD	1,562	2,302
MGI ID:1917413	2210415F13Rik	RIKEN cDNA 2210415F13 gene	FD	1,722	2,302
MGI:1351639	Mrpl15	mitochondrial ribosomal protein L15	Prot	1,675	2,302
GB ID:AV374719	---	---	FD	1,717	2,302
MGI ID:1917379	2210409B01Rik	RIKEN cDNA 2210409B01 gene	FD	1,603	2,302
MGI ID:2158650	ldh3b	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta	Met	1,627	2,302
MGI ID:97171	Mt1	metallothionein 1	SC	1,966	2,302
MGI ID:87894	Chrne	cholinergic receptor, nicotinic, epsilon polypeptide	Outro	1,595	2,302
MGI ID:97515	Pcsk5	proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	Prot	1,776	2,302
MGI ID:1916405	1810030O07Rik	RIKEN cDNA 1810030O07 gene	DS	1,572	2,302
MGI ID:95295	Egr1	early growth response 1	CC	1,719	2,302
MGI ID:1341878	Ehd1	EH-domain containing 1	Outro	1,549	2,302
MGI ID:95487	Fbln1	fibulin 1	CA	1,520	3,280
MGI ID:1098824	Odf2	outer dense fiber of sperm tails 2	CA	1,969	3,280
MGI ID:1913416	S100a14	S100 calcium binding protein A14	Outro	1,551	3,280
GB ID:AV374719	---	---	FD	1,535	3,280
MGI ID:109326	Bnip3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 1, NIP3	Apop	2,939	5,146
MGI ID:88070	Arg1	arginase 1, liver	Met	2,250	5,146
MGI ID:101841	Ppm1b	protein phosphatase 1B, magnesium dependent, beta isoform	SC	1,571	5,146
MGI ID:107423	Numb	numb gene homolog (Drosophila)	CC	1,678	5,146
MGI ID:1313276	Vamp1	vesicle-associated membrane protein 1	Outro	1,518	5,146

1. Número de acesso em banco de dados. MGI, Mouse Genome Informatics; GB, Genebank

2. Grupos funcionais segundo a classificação da figura 15. SC, sinalização celular; RI, resposta imune; Met, metabolismo; Apop, apoptose; CC, ciclo celular; CA, citoesqueleto/adesão celular; Prot, síntese/metabolismo de proteínas; Outro, outros; FD, função desconhecida.

ANEXO 4

Tabela 6. DEG selecionados da comparação entre PEC MΦ infectados e não-infectados de C57BL/6

Identificação ¹	Símbolo do Gene	Nome do Gene	Grupo Funcional ²	Fold Change	Valor <i>q</i>
DEG com expressão aumentada na infecção					
GB ID:L24430	---	---	FD	1,933	0,319
MGI ID:1915444	Ndufb4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 4	Met	2,024	0,319
MGI ID:1099786	Dhx15	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15	Outro	2,028	0,319
MGI ID:1913335	Eif3s5	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 (epsilon)	Prot	1,609	0,319
GB ID:U58105	---	---	FD	2,029	0,319
MGI ID:2384747	Erdr1-pending	erythroid differentiation regulator 1	CC	1,725	0,319
MGI ID:108063	Siah1b	seven in absentia 1B	Prot	2,593	0,319
MGI ID:98438	Sts	steroid sulfatase	Met	1,506	0,319
MGI ID:1914632	Brd3	bromodomain containing 3	FD	1,538	0,319
MGI ID:97771	Proc	protein C	Outro	1,745	0,319
MGI ID:103224	Fdx1	ferredoxin 1	Outro	1,828	0,319
MGI ID:87891	Chrb2	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal)	Outro	1,527	0,319
MGI ID:95739	Glul	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	Met	1,976	0,319
MGI ID:1889549	Txnip	thioredoxin interacting protein	Outro	1,712	0,319
MGI ID:1196256	1810043O07Rik	RIKEN cDNA 1810043O07 gene	FD	1,505	0,319
MGI ID:1860040	Trim3	tripartite motif protein 3	Outro	1,730	0,319
MGI ID:1931464	Calm4	calmodulin 4	Outro	1,525	0,319
GB ID:AA516600	---	---	FD	1,501	0,319
MGI ID:107755	Neurod2	neurogenic differentiation 2	CC	1,523	0,319
MGI ID:1914649	1110003B01Rik	RIKEN cDNA 1110003B01 gene	FD	1,558	0,319
GB ID:U10410	LOC56304	recombinant antineuraminidase single chain Ig VH and VL domains	RI	1,719	0,319
MGI ID:2137204	Mrp13	mitochondrial ribosomal protein L3	Prot	1,571	0,319
MGI ID:99262	Rpl22	ribosomal protein L22	Prot	1,524	0,319
MGI ID:88457	Col5a1	procollagen, type V, alpha 1	CA	1,753	0,319
MGI ID:1888711	Cxcl4	chemokine (C-X-C motif) ligand 4	RI	1,580	0,319
MGI ID:98968	Wt1	Wilms tumor homolog	Outro	1,833	0,319
MGI ID:1920081	Dhx30	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 30	Outro	1,598	0,319
MGI ID:98731	Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	Apop	1,626	0,319
MGI ID:2142562	---	Mus musculus B6-derived CD11 +ve dendritic cells cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:F730039M10 product:similar to phosphorylase kinase (EC 2.7.1.38) beta chain [Homo sapiens], full insert sequence	FD	1,526	0,319
MGI ID:96436	Igfbp1	insulin-like growth factor binding protein 1	CC	1,530	0,319
MGI ID:103010	Epb4.111	erythrocyte protein band 4.1-like 1	CA	2,075	0,319
MGI ID:1277103	D11Erd603e	DNA segment, Chr 11, ERATO Doi 603, expressed	FD	1,525	0,319
MGI ID:1098296	Cpt1a	carnitine palmitoyltransferase 1, liver	Met	1,519	0,319
MGI ID:1921496	Gale	galactose-4-epimerase, UDP	Met	1,584	0,319
MGI ID:95305	Eif4e	eukaryotic translation initiation factor 4E	Prot	1,690	0,319
MGI ID:1915240	Brp44l	brain protein 44-like	Apop	1,587	0,582
MGI ID:88090	Ass1	argininosuccinate synthetase 1	Met	1,812	0,832
MGI ID:88057	ApoE	apolipoprotein E	Met	1,514	0,832
MGI ID:1095406	Tuba3	tubulin, alpha 3	CA	1,921	0,832
MGI ID:107472	Clgn	calmegin	Prot	1,531	1,054
MGI ID:2442050	G630024C07Rik	RIKEN cDNA G630024C07 gene	FD	1,509	1,054
MGI ID:1351639	Mrp15	mitochondrial ribosomal protein L15	Prot	1,503	1,784
MGI ID:2444175	Ddx6	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6	Outro	1,506	1,784
MGI ID:97172	Mt2	metallothionein 2	SC	3,231	2,853

MGI ID:88070	Arg1	arginase 1, liver	Met	1,549	2,853
MGI ID:109326	Bnip3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 1, NIP3	Apop	1,705	2,961
MGI ID:87904	Actb	actin, beta, cytoplasmic	CA	1,516	3,644
GB ID:AV091761	---	---	FD	1,543	3,847
MGI ID:1929628	Vig1-pending	viral hemorrhagic septicemia virus(VHSV) induced gene 1	RI	1,868	4,973
MGI ID:87980	Ak4	adenylate kinase 4	Met	1,670	4,973
DEG com expressão diminuída na infecção					
MGI ID:1914514	Ndufb8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 8	Met	1,693	0,319
MGI ID:1916295	1810017G16Rik	RIKEN cDNA 1810017G16 gene	FD	1,708	0,319
MGI ID:101839	Rpl28	ribosomal protein L28	Prot	1,650	0,319
MGI ID:1201692	Rabac1	Rab acceptor 1 (prenylated)	SC	1,674	0,319
MGI ID:98970	Xbp1	X-box binding protein 1	CC	1,737	0,319
MGI ID:1913358	Ndufa9	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 9	Met	1,542	0,319
MGI ID:1915794	1110002H14Rik	RIKEN cDNA 1110002H14 gene	FD	1,713	0,319
MGI ID:1920987	1110008P14Rik	RIKEN cDNA 1110008P14 gene	FD	1,538	0,319
MGI ID:1099463	ldh3g	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+), gamma	Met	1,582	0,319
MGI ID:1349919	Np15	nuclear protein 15.6	FD	1,516	0,319
MGI ID:1922862	2610016K11Rik	RIKEN cDNA 2610016K11 gene	FD	1,563	0,319
MGI ID:1097682	Rps5	ribosomal protein S5	Prot	1,811	0,319
MGI ID:98166	Rps8	ribosomal protein S8	Prot	1,661	0,319
MGI ID:99600	Aldh2	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	Met	1,584	0,319
MGI ID:2384801	Gps1	G protein pathway suppressor 1	SC	1,514	0,319
MGI ID:104652	Capzb	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	CA	1,533	0,319
MGI ID:1195267	Ilk	integrin linked kinase	CA	1,513	0,319
MGI ID:1915592	Ndufb10	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10	Met	1,673	0,319
MGI ID:1913449	1110039H05Rik	RIKEN cDNA 1110039H05 gene	FD	1,515	0,319
MGI ID:107169	Srp14	signal recognition particle 14	Prot	1,671	0,319
MGI ID:1321133	Hint	histidine triad nucleotide binding protein	CC	1,873	0,319
MGI ID:1913670	Polr2e	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E	Prot	1,831	0,319
MGI ID:2137210	Mrpl4	mitochondrial ribosomal protein L4	Prot	1,785	0,319
MGI ID:1860603	Rpl36	ribosomal protein L36	Prot	1,708	0,319
MGI ID:1347054	Gnpda1	glucosamine-6-phosphate deaminase 1	Met	1,691	0,319
MGI ID:107185	Cct5	chaperonin subunit 5 (epsilon)	Prot	1,544	0,319
MGI ID:1913828	Eef1d	eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein)	Prot	1,743	0,319
MGI ID:2137648	Ifi30	interferon gamma inducible protein 30	RI	1,606	0,319
MGI ID:1277124	Asah1	N-acylsphingosine amidohydrolase 1	Met	1,536	0,319
MGI ID:1343877	Rpl10a	ribosomal protein L10A	Prot	1,703	0,319
MGI ID:105977	G6pd2	glucose-6-phosphate dehydrogenase 2	Met	2,282	0,319
MGI ID:1196624	Tcea1	transcription elongation factor A (SII) 1	Outro	1,554	0,319
MGI ID:1342286	Fliih	flightless I homolog (Drosophila)	CA	1,611	0,319
MGI ID:1194513	Psbm5	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 5	Prot	2,071	0,319
MGI ID:102520	Bcap37	B-cell receptor-associated protein 37	SC	1,590	0,319
MGI ID:2386052	Cerk	ceramide kinase	Met	1,567	0,319
MGI ID:1347070	Psm7	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 7	Prot	1,632	0,319
MGI ID:1350927	Rpl8	ribosomal protein L8	Prot	1,506	0,319
MGI ID:1859251	Dctn3	dynactin 3	CA	1,770	0,319
MGI ID:1926395	Wtap	Wilms' tumour 1-associating protein	CC	1,582	0,319
MGI ID:1924348	2810024B22Rik	RIKEN cDNA 2810024B22 gene	FD	1,540	0,319
MGI ID:1929722	Anapc5	anaphase-promoting complex subunit 5	CC	1,512	0,319
MGI ID:1914453	Nde1	nuclear distribution gene E homolog 1 (A nidulans)	CA	1,661	0,319
GB ID:U96810	---	---	FD	1,513	0,319
MGI ID:1920150	Ndufv2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2	Met	1,680	0,319
MGI ID:1915010	Slc38a2	solute carrier family 38, member 2	Outro	1,785	0,319
MGI ID:1919164	Antxr2	anthrax toxin receptor 2	Outro	1,627	0,319
MGI ID:97553	Pgd	phosphogluconate dehydrogenase	Met	1,526	0,319
MGI ID:2444233	9430020E02Rik	RIKEN cDNA 9430020E02 gene	FD	1,559	0,319

MGI ID:105110	Rps2	ribosomal protein S2	Prot	1,511	0,319
MGI ID:1914273	2010315L10Rik	RIKEN cDNA 2010315L10 gene	FD	1,719	0,319
MGI ID:104571	Clcn4-2	chloride channel 4-2	Outro	1,523	0,319
MGI ID:1913361	1200002G13Rik	RIKEN cDNA 1200002G13 gene	FD	1,520	0,319
MGI ID:1098757	D11Erd99e	DNA segment, Chr 11, ERATO Doi 99, expressed	FD	1,522	0,319
GB ID:AF043285	---	---	FD	1,843	0,319
MGI ID:1915291	3110038L01Rik	RIKEN cDNA 3110038L01 gene	FD	1,763	0,319
MGI ID:1916321	1810014L12Rik	RIKEN cDNA 1810014L12 gene	FD	1,566	0,319
MGI ID:1858234	Gpiap1	GPI-anchored membrane protein 1	Outro	1,524	0,319
MGI ID:1913418	1110025J15Rik	RIKEN cDNA 1110025J15 gene	FD	1,659	0,319
MGI ID:1933185	Ctps2	cytidine 5'-triphosphate synthase 2	Met	1,525	0,319
MGI ID:1919240	Ddx54	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 54	Outro	1,546	0,319
MGI ID:1915445	0610007O07Rik	RIKEN cDNA 0610007O07 gene	FD	1,651	0,319
MGI ID:104871	Ppp1cb	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	Prot	1,671	0,319
MGI ID:1927167	Morf4l2	mortality factor 4 like 2	Apop	1,698	0,319
MGI ID:1888697	Taf9	TAF9 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	Outro	1,514	0,319
GB ID:M17551	---	---	FD	1,638	0,319
MGI ID:1915599	Ndufs3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3	Met	1,526	0,319
GB ID:U96810	---	---	FD	1,612	0,319
MGI ID:1914164	Vps28	vacuolar protein sorting 28 (yeast)	CA	1,512	0,319
MGI ID:1274789	Taldo1	transaldolase 1	Met	1,520	0,319
GB ID:AW124386	---	---	FD	1,595	0,319
MGI ID:95288	Eef2	eukaryotic translation elongation factor 2	Prot	1,671	0,319
MGI ID:1890510	Atp6v0b	ATPase, H ⁺ transporting, V0 subunit B	Met	1,733	0,319
MGI ID:1913484	Sc4mol	sterol-C4-methyl oxidase-like	Met	1,850	0,319
MGI ID:1099438	Nsdhl	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	Met	1,625	0,319
MGI ID:1913654	2410001C21Rik	RIKEN cDNA 2410001C21 gene	FD	1,531	0,319
MGI ID:97356	Nme2	expressed in non-metastatic cells 2, protein	Met	1,503	0,319
MGI ID:105922	Rpl13	ribosomal protein L13	Prot	1,566	0,319
MGI ID:97810	Ptpcr	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	SC	1,570	0,319
MGI ID:1278340	Rpl21	ribosomal protein L21	Prot	1,546	0,319
MGI ID:104888	Fdps	farnesyl diphosphate synthetase	Met	2,170	0,319
MGI ID:1347076	Rpl27a	ribosomal protein L27a	Prot	1,664	0,319
MGI ID:1855692	Nono	non-POU-domain-containing, octamer binding protein	Outro	1,512	0,319
GB ID:M85078	---	Mus musculus transcribed sequence with weak similarity to protein pir:S06945 (H.sapiens) S06945 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor A precursor - human	FD	1,586	0,319
MGI ID:1354692	Lsm4	LSM4 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	Outro	1,503	0,319
MGI ID:1919292	Cotl1	coactosin-like 1 (Dictyostelium)	CA	2,408	0,319
MGI ID:1920181	2900010J23Rik	RIKEN cDNA 2900010J23 gene	FD	1,522	0,319
MGI ID:1916051	Elov15	ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids (yeast)	Met	1,596	0,319
MGI ID:108017	Laptm4a	lysosomal-associated protein transmembrane 4A	Outro	1,581	0,319
MGI ID:108057	Rpl6	ribosomal protein L6	Prot	1,574	0,319
MGI ID:96836	Lta4h	leukotriene A4 hydrolase	Prot	1,570	0,319
MGI ID:1915295	2700060E02Rik	RIKEN cDNA 2700060E02 gene	FD	1,625	0,319
MGI ID:1098268	Kif5b	kinesin family member 5B	CA	1,868	0,319
MGI ID:1343045	Rbmxt	RNA binding motif protein, X chromosome retrogene	Outro	1,506	0,319
MGI ID:95298	Elf1a	eukaryotic translation initiation factor 1A	Prot	1,507	0,319
MGI ID:1321389	Vamp3	vesicle-associated membrane protein 3	CA	1,632	0,319
MGI ID:1196624	Tcea1	transcription elongation factor A (SII) 1	Outro	1,753	0,319
MGI ID:88047	Aplp2	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	Outro	1,740	0,319
MGI ID:1924284	2510039O18Rik	RIKEN cDNA 2510039O18 gene	FD	1,529	0,319
MGI ID:1914980	Gabarapl1	gamma-aminobutyric acid	Outro	1,532	0,319
MGI ID:109618	Atp6v1b2	ATPase, H ⁺ transporting, V1 subunit B, isoform 2	Met	1,971	0,319
MGI ID:96819	Anxa1	annexin A1	RI	2,350	0,319

MGI ID:104888	Fdps	farnesyl diphosphate synthetase	SC	1,839	0,319
MGI ID:96794	Lmna	lamin A	CA	1,555	0,319
MGI ID:108089	Erh	enhancer of rudimentary homolog (Drosophila)	Outro	1,628	0,319
MGI ID:894320	Prdx6	peroxiredoxin 6	Outro	1,641	0,319
MGI ID:95865	Gstp2	glutathione S-transferase, pi 2	Met	1,532	0,319
MGI ID:107592	Hmgcs1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	Met	1,945	0,319
MGI ID:1202875	Btf3	basic transcription factor 3	Outro	1,611	0,319
MGI ID:88105	Atp1a1	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 1 polypeptide	Met	1,665	0,319
MGI ID:1261437	Atp5c1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1	Met	1,658	0,319
MGI ID:1914416	2610313E07Rik	RIKEN cDNA 2610313E07 gene	FD	1,762	0,319
MGI ID:108563	Ptpns1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1	CC	1,576	0,466
MGI ID:99600	Aldh2	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	Met	1,566	0,466
MGI ID:109555	Psmc2	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 2	Prot	1,512	0,466
MGI ID:1289301	D19Erd721e	DNA segment, Chr 19, ERATO Doi 721, expressed	FD	1,793	0,466
MGI ID:97365	Pnp	purine-nucleoside phosphorylase	Met	1,655	0,582
MGI ID:2148924	Clic1	chloride intracellular channel 1	Outro	1,684	0,582
MGI ID:106095	Naca	nascent polypeptide-associated complex alpha polypeptide	Outro	1,545	0,582
MGI ID:1929269	1110032D12Rik	RIKEN cDNA 1110032D12 gene	FD	1,876	0,582
MGI ID:1916804	Klhdc2	kelch domain containing 2	Outro	1,500	0,582
MGI ID:2147598	Al837181	expressed sequence Al837181	FD	1,578	0,582
MGI ID:88224	C1qb	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	RI	1,674	0,582
MGI ID:1927947	Sep15-pending	selenoprotein	Outro	2,108	0,582
MGI ID:1353510	Arhgef1	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	SC	1,512	0,582
MGI ID:104757	Ephb4	Eph receptor B4	SC	1,678	0,832
MGI ID:95929	H2-Q10	histocompatibility 2, Q region locus 10	RI	2,509	0,832
MGI ID:1859353	Mkrm1	makorin, ring finger protein, 1	Outro	1,504	0,832
MGI ID:1195969	Pira3	paired-Ig-like receptor A3	RI	1,579	0,832
MGI ID:1346341	Rnf13	ring finger protein 13	Outro	1,704	0,832
MGI ID:1859293	Sca10	spinocerebellar ataxia 10 homolog (human)	Outro	1,738	0,960
MGI ID:95851	Gsn	gelsolin	CA	1,519	0,960
MGI ID:99529	Cd63	Cd63 antigen	RI	1,535	1,054
MGI ID:1353611	Sc5d	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (S. cerevisiae)	Met	1,827	1,054
MGI ID:1913485	1500010B24Rik	RIKEN cDNA 1500010B24 gene	FD	1,569	1,054
MGI ID:88345	Cd72	CD72 antigen	RI	1,765	1,054
MGI ID:96878	Blnk	B-cell linker	CC	1,526	1,054
MGI ID:1922955	2310046H11Rik	RIKEN cDNA 2310046H11 gene	FD	1,627	1,441
MGI ID:1347048	Clcn7	chloride channel 7	Outro	1,635	1,784
MGI ID:108563	Ptpns1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1	CA	1,774	1,784
MGI ID:105068	Rab7	RAB7, member RAS oncogene family	SC	1,959	1,784
MGI ID:2442264	Idi1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase	Met	1,695	2,853
MGI ID:1914416	2610313E07Rik	RIKEN cDNA 2610313E07 gene	FD	1,563	2,853
MGI ID:1914582	Snrpd3	small nuclear ribonucleoprotein D3	Outro	1,589	2,853
MGI ID:1353611	Sc5d	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (S. cerevisiae)	Met	1,847	3,068
MGI ID:96607	Itgam	integrin alpha M	CA	1,769	3,644
MGI ID:96902	Lzp-s	P lysozyme structural	Prot	1,561	3,847
MGI ID:1914687	0610038P07Rik	RIKEN cDNA 0610038P07 gene	FD	1,502	4,973

1. Número de acesso em banco de dados. MGI, Mouse Genome Informatics; GB, Genebank

2. Grupos funcionais segundo a classificação da figura 15. SC, sinalização celular; RI, resposta imune; Met, metabolismo; Apop, apoptose; CC, ciclo celular; CA, citoesqueleto/adesão celular; Prot, síntese/metabolismo de proteínas; Outro, outros; FD, função desconhecida.