



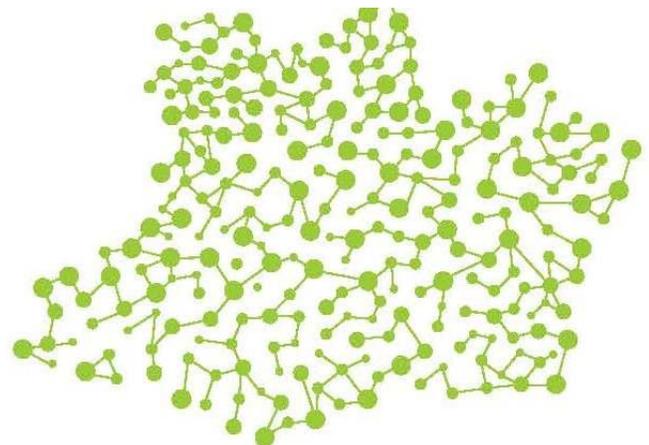
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS



**POLIMORFISMOS NO GENE *IL23R* EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE
CUTÂNEA EM MANAUS, AMAZONAS, BRASIL**

LENER SANTOS DA SILVA

**MANAUS
2021**



LENER SANTOS DA SILVA

**POLIMORFISMOS NO GENE *IL23R* EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE
CUTÂNEA EM MANAUS, AMAZONAS, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Rajendranath Ramasawmy

MANAUS

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

S237p Silva, Lener Santos da

Polimorfismos no gene IL-23R em pacientes com leishmaniose cutânea em Manaus, Amazonas, Brasil/
Lener Santos da Silva, - Manaus: [s.n.], 2021

Dissertação - PGSS – Doenças Tropicais e Infecciosas
(Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas,
Manaus, 2021.

Inclui bibliografia

Orientador(a): Ramasawmy, Rajendranath

1.Receptor da interleucina 23. 2. Leishmaniose cutânea. 3. Leishmania guyanensis. I. Ramasawmy, Rajendranath (Orient.) II. Universidade do Estado do Amazonas. III. Polimorfismos no gene IL-23R em pacientes com leishmaniose cutânea em Manaus, Amazonas, Brasil.

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

FOLHA DE JULGAMENTO**POLIMORFISMOS NO GENE *IL23R* EM PACIENTES
COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM MANAUS,
AMAZONAS, BRASIL****LENER SANTOS DA SILVA**

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:

Prof. Dr. Rajendranath Ramasawmy, Presidente

Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira (PPGMT)

Prof. Dr. Aya Sadahiro (UFAM)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Leomar Coelho dos Santos, Ligier Carvalho da Silva e minha esposa Naendria de Lima Sampaio dedico esta conquista. O apoio deles durante esta jornada tornou tudo mais fácil. Gratidão eterna.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por proporcionar forças e abençoar todos os meus dias durante esta jornada.

Aos meus pais, Ligier Carvalho e Leomar Coelho que sempre se fizeram presentes apesar da distância, sendo meus principais incentivadores e apoiadores. E nos momentos mais difíceis eles foram o meu esteio para seguir em frente e não desistir. A vocês dedico todo o meu amor, carinho e gratidão, vocês são meu referencial de caráter, honestidade, mansidão, sabedoria e perseverança. Com vocês aprendi que sempre haverá obstáculos durante a caminhada, mas com fé, persistência e muita força de vontade sempre poderei vencer, o segredo é nunca desistir. Ao meu irmão Leuner Santos pelo apoio e companheirismo.

A minha querida e amada esposa Naendria Sampaio que sempre esteve ao meu lado, incentivando-me a nunca desistir e sempre correr atrás dos meus sonhos, me dando toda atenção, carinho e amor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rajendranath Ramasawmy, por me conceder a oportunidade de fazer o mestrado, pela orientação, suporte, incentivo, ensinamentos e por confiar no meu trabalho.

Aos colegas de trabalho, Josué Lacerda, Cilana Chagas, Tirza Mesquita, Felipe Jules, Jose Júnior, Thaís Lacerda, Hector Graterol, Verônica Alice, Claudio Marcello, Krys Layane Guimarães, Felipe Menezes, Lizandra Menescal. E aos meus queridos colegas de turma Sabrina Brito, Brenda Karoline, Frandson Gean, Moyara Lima, Cecilia Caraballo, Cristina Rodrigues, Bernardo Maia, Salete Sara.

Ao instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB) e laboratório multidisciplinar, pelo apoio e acesso, proporcionando a realização de minhas atividades experimentais.

As secretarias do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Conceição Tufic e Altariza Freitas, por sempre estarem disponíveis em ajudar.

À Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e Universidade do Estado do Amazonas (UEA) pela oportunidade de adquirir um ensinamento de excelência.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento e bolsa, possibilitando o desenvolvimento do projeto.

E a todos que indiretamente me ajudaram na realização deste projeto.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Esta dissertação teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

EPIGRAFE

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Sir Isaac Newton

RESUMO

Introdução: As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. A manifestação clínica destas doenças depende de fatores epidemiológicos, genéticos, nutricionais e imunológicos. Na busca de entender os fatores imunogenéticos da leishmaniose foi analisado neste estudo um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single nucleotide polymorphisms*) rs11805303 presente no gene do receptor da interleucina 23 (*IL23R*) em pacientes com leishmaniose cutânea (LC) causada pela *Leishmania (Viannia) guyanensis* e em indivíduos saudáveis na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil.

Metodologia: Foram analisados 828 pacientes com LC e 806 indivíduos saudáveis procedentes das mesmas áreas endêmicas dos pacientes. O polimorfismo rs11805303 foi analisado pela técnica PCR-RFLP (do inglês, *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*). As citocinas foram mensuradas no plasma de 400 pacientes com LC e 400 indivíduos saudáveis para verificar se o polimorfismo estudado tem influência sob a expressão das citocinas TNF- α , IL6, IFN- γ , IL-1 β , e IL-17.

Resultados: Os genótipos divergiram entre os pacientes com LC e indivíduos saudáveis odds ratio (OR) comum de 1,78 ($p= 2,2 \times 10^{-11}$), a presença do alelo T (OR= 1.9 [95% IC 1.6 - 2.2] $p= 6.1 \times 10^{-12}$) em pacientes com LC confere suscetibilidade ($p= 9,9 \times 10^{-6}$) à infecção por *L. guyanensis*. Os níveis plasmáticos da citocina IL-17 diferiram significativamente em indivíduos homozigotos para o alelo T quando estratificamos os dados por gênero pacientes com LC do sexo masculinos possuem níveis mais elevado de IL-17.

Conclusão: A variante rs11805303 do gene *IL23R* demonstrou uma forte associação com o desenvolvimento da leishmaniose cutânea, sugerindo que o eixo IL-23/IL-23R pode desempenhar um papel importante na patogênese da LC causada por *L. guyanensis*

Palavras Chaves: Receptor da interleucina 23 - *Leishmania guyanensis* – Leishmaniose cutânea

ABSTRACT

Introduction: Leishmaniasis is a group of infectious diseases caused by intracellular protozoa of the genus *Leishmania*. The clinical manifestation of these diseases depends on several factors such as epidemiological, genetic, and immunological. To understand the Immunogenetic factors of leishmaniasis, a single nucleotide polymorphism (SNP) rs11805303 present in the *interleukin 23 receptor* gene (*IL23R*) in patients with cutaneous leishmaniasis (CL) was analyzed in this study caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* and healthy individuals without signs or symptoms in the city of Manaus, Amazonas, Brazil.

Methodology: Were analyzed 828 patients with CL and 806 healthy individuals from the same endemic areas of the patients. Polymorphism rs11805303 was analyzed using the molecular biology technique PCR-RFLP (polymerase chain Reaction-Restriction fragment length polymorphism). Genotypic and allelic frequencies were obtained by direct counting. Similarly, we also verified whether the polymorphism studied has to influence the expression of cytokines IL-1B, IL6, IL-17, IFN- γ and TNF- α .

Results: The genotypes differed between patients with LC and healthy individuals with a common odds ratio (OR) of 1.78 ($p = 2.2 \times 10^{-11}$), the presence of the T allele (OR = 1.9 [95% CI 1.6-2.2] $P = 6.1 \times 10^{-12}$) in patients with CL gives susceptibility ($p = 9.9 \times 10^{-6}$) to infection by *L. guyanensis*. Plasma levels of the IL-17 cytokine differed significantly in individuals homozygous for the T allele when we stratified the data by gender Male CL patients have higher levels of IL-17.

Conclusion: The rs11805303 variant of the *IL23R* gene demonstrated a strong association with the development of cutaneous leishmaniasis, suggesting that the IL-23 / IL-23R axis may play an important role in the pathogenesis of LC caused by *L. guyanensis*.

Keywords: Interleukin-23 receptor - *Leishmania guyanensis* - Cutaneous Leishmaniasis

RESUMO LEIGO

A leishmaniose é uma doença causada por parasitos chamados de leishmanias, a qual apresenta diversas formas clínicas da doença. A forma clínica mais comum desta doença é a leishmaniose cutânea causando lesões ulceradas na pele, sendo a mais comum na maioria dos casos da região norte do Brasil. A transmissão da *leishmania* ocorre por pequenos insetos fêmeas chamado flebotomíneos (conhecido popularmente como mosquito palha, cangalha, tatuquira, birigui). Em seguida o parasita invade as células de defesa do ser humano e transforma-se formas infectantes. Muitas pesquisas destacam a importância do papel das citocinas (grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desenvolvimento da resposta imune) nas doenças infecciosas. A interleucina 23 (IL-23) é uma proteína que desempenha atividades importantes no desenvolvimento das células de defesa, auxiliando no combate ao parasita e no equilíbrio do sistema imunológico. Este estudo avaliou uma região do gene que reconhece o receptor da interleucina 23 (*IL-23R*) em pacientes com leishmaniose cutânea causada pelo parasito *Leishmania guyanensis* (parasito mais presente do estado do Amazonas) e indivíduos saudáveis sem histórico ou sinal da doença, moradores das mesmas áreas endêmica dos pacientes. Os resultados demonstraram que o polimorfismo genético estudado esteve mais presente nos pacientes com leishmaniose do que em indivíduos saudáveis, apresentando uma forte relação com o desenvolvimento da doença.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia da <i>Leishmania</i>	2
Figura 2. Vetor Flebotomíneo Fêmea.....	5
Figura 3. Ciclo biológico.....	7
Figura 4. Lesão cutânea.....	8
Figura 5. Lesão disseminada.....	9
Figura 6. Lesão difusa.....	9
Figura 7. Lesão mucosa.....	10
Figura 8. Distribuição da leishmaniose cutânea no mundo (WHO, 2020).....	11
Figura 9. Fatores relacionados à infecção do hospedeiro.....	14
Figura 10. Ação de monócitos contra <i>Leishmania</i>	15
Figura 11. Subpopulações de células T no controle da infecção	17
Figura 12. Divisão de subconjuntos de células T.....	20
Figura 13. Papel de SNPs nas regiões gênicas.....	21
Figura 14. Família de citocinas da IL12 e seus receptores.....	24
Figura 15. Estrutura do eixo da IL-23.....	25
Figura 16. Via de Sinalização.....	26
Figura 17. Eixo IL-23 estimulando a produção de citocinas inflamatórias.....	26

Figura 18. Localização da variante do gene <i>IL-23R</i> no cromossomo.....	28
Figura 19. Níveis plasmáticos de IL-17.....	42
Figura 20. Níveis plasmáticos de IL-6.....	43
Figura 21. Níveis plasmáticos de INF- γ	44
Figura 22. Níveis plasmáticos de IL-1 β	45
Figura 23. Níveis plasmáticos de TNF- α	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação Taxonômica.....	4
--	---

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Leishmania</i> no Brasil.....	3
Tabela 2. Características básicas de um estudo de população.....	37
Tabela 3. Distribuição e comparação das frequências alélicas e genotípicas.....	38
Tabela 4 Distribuição das frequências alélicas e genotípicas estratificadas por gênero...	40

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

- CD** – Do inglês *cluster differentiation* – agrupamento de diferenciação;
- CDC** – Do inglês, Centers for Disease Control and Prevention - Centros de Controle e Prevenção de Doenças.
- DNA** – Do inglês *deoxyribonucleic acid* - Ácido desoxirribonucleico (ADN);
- dNTP** – Do inglês *deoxyribonucleotide triphosphate* - Desoxirribonucleotídeos trifosfato;
- EDTA** – Do inglês *ethylenediamine tetra-acetic acid* - Ácido etilenodiamino tetra-acético;
- FOXP3** – Do inglês *forkhead box P3* - Fator de transcrição caixa de forquilha P3;
- GBD** – Do inglês *global burden of disease* - Carga global de doenças;
- GP63** – Do inglês *glycoprotein 63* - Glicoproteína 63;
- GPI** – Do inglês *glycosylphosphatidyl inositol* - Glicosilfosfatidilinositol;
- HCL** – Ácido clorídrico;
- HIV** – Do inglês *human immunodeficiency virus* - Vírus da imunodeficiência humana;
- IBD** – Do inglês *Inflammatory bowel disease* – Doença inflamatória intestinal
- IFN- γ** – Do inglês *interferon gamma* - Interferon gama;
- IL** – Do inglês *interleukin* - Interleucina;
- IL-23R** – Do inglês *interleukin 23 receptor* - Receptor da interleucina 23
- INF- γ** – Do inglês *interferon-Gamma*
- kB** – Do inglês *kilobase* - kilo (quilo) pares de bases = 1.000 bp;
- kDa** – Do inglês *kilodalton* – Quilodalton;
- Kg** – Do inglês *kilogram* – Quilograma;
- LCL** – Leishmaniose cutânea localizada;
- LCD** – Leishmaniose cutânea difusa;
- LD** – Leishmaniose Disseminada;
- LM** – Leishmaniose Mucocutânea;
- LPG** – Do inglês *lipophosphoglycan* - Lipofosfoglicano;
- LRV1** – Do inglês *Leishmania RNA virus* - Vírus de RNA de Leishmania;
- LTA** – Leishmaniose tegumentar americana;
- MAF** – Do inglês *minor allele frequency* - Menor frequência alélica;

MCP-1 – Do inglês *Macrophage chemoattractant protein 1* - Proteína quimioatraente de macrófagos 1;

Mg – Miligrama;

min – Minuto;

MIP- 1 – Do inglês *Macrophage inflammatory protein 1alpha* - Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa;

ml – Mililitro;

NET – Do inglês neutrophil extracellular traps - Armadilhas de Neutrófilos Extracelular;

NK – Do inglês natural killer - Natural Killer;

OR – Odds ratio;

PBMC – Do inglês peripheral blood mononuclear cells - Célula mononuclear do sangue periférico;

PCR – Do inglês *polymerase chain reaction* – Reação em cadeia da polimerase;

pH – Potencial hidrogeniônico;

pmol – Picomol;

rDNA – Do inglês ribosomal DNA - DNA ribossômico;

RFLP – Do inglês polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição;

RNA – Ribonucleic acid - Ácido ribonucleico (ARN);

ROS – Do inglês reactive oxygen species - Espécies reativas de oxigênio;

RPM – Rotações por minuto;

SNP – Do inglês single nucleotide polymorphism - Polimorfismo de único nucleotídeo;

STAT – Do inglês signal transducer and activator of transcription - Transdutor de sinal e ativador de transcrição;

TAE – Tris-Acetato-EDTA;

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido;

Th – Do inglês T help cell - Linfócito T auxiliar;

TLR – Do inglês toll like receptor - Receptor toll-like;

TNF- α – Do inglês tumor necrosis factor alpha - Fator de necrose tumoral alfa;

Treg – Do inglês regulatory T cells - Linfócito T auxiliar regulatório;

UV – Luz ultravioleta;

χ^2 – Teste de Qui quadrado;

μL – Microlitro;

μmol – Micromol;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais	1
1.2 Agente etiológico	1
1.3 Leishmania (V.) guyanensis	3
1.4 Vetor e ciclo biológico.....	4
1.4.1 Formas clínicas da LTA.....	7
1.5 Epidemiologia	10
1.6 Tratamento	12
1.7 Imunopatogênese.....	13
1.7.1 Sistema imune inato	14
1.7.2 Sistema imune adaptativo	17
1.8 Propriedades genéticas.....	20
1.9 Eixo IL-23/IL-23R/IL-17	23
2 OBJETIVOS	30
2.1 Geral.....	30
2.2 Específicos	30
3 METODOLOGIA.....	31
3.1 Modelo de estudo	31
3.2 Aspectos éticos	31
3.3 Local de estudo	31
3.4 Amostras, população de estudo e recrutamento	32
3.4.1 Amostras	32
3.4.2 Grupo caso e controle	32
3.4.3 Recrutamento	33
3.4.4 Critérios de inclusão e não inclusão	33
3.5 Procedimentos.....	33
3.5.1 Caracterização do agente etiológico	33
3.5.2 Coleta de sangue	34

3.5.3 Extração de DNA.....	34
3.5.4 Quantificação do DNA extraído	34
3.5.5 PCR para genotipagem	35
3.5.6 Digestão enzimática	35
4 Dosagem de citocinas	36
5 Análise estatística.....	36
6 RESULTADOS	37
6.1 Características da população de estudo	37
6.2 Frequências alélicas e genotípicas do SNP rs11805303 do gene <i>IL-23R</i>	37
6.3 Níveis plasmáticos circulantes de IL-17 e IL-6	41
6.4 Comparação de IFN- γ , IL-1 β e TNF- α em indivíduos homocigotos T/T versus CC... 43	
7 DISCUSSÃO	47
8. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVA	51
9. CONCLUSÃO.....	51
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
11. ANEXOS E APÊNDICES.....	75
11.1 Procedimento operacional padrão – POP	75
11.2 Termo de consentimento livre e esclarecido	93
11.3 Identificação do voluntário.....	99
11.4 Parecer do comitê de ética	100
11.5 Outros anexos	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

A leishmaniose é uma doença infecciosa crônica não contagiosa, causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. São antroponoses que apresentam um amplo espectro clínico influenciado pelo estado imunológico, *status* nutricional, ambiente/clima e espécies de parasitos [1].

Existem duas formas principais de manifestações clínicas da Leishmaniose: Leishmaniose visceral (LV) forma mais letal da doença e Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), caracterizada por uma ou mais lesões cutâneas. De acordo com suas características, estão divididas em diferentes grupos: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), L. Cutânea difusa (LCD), L. Disseminada (LD) e L. mucocutânea (LM) [2,3].

1.2 Agente etiológico

O parasita *Leishmania* está inserido na ordem *Kinetoplastida*, da família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*, subgênero *Leishmania* ou *Viannia* [4]. O Cinetoplasto (DNA mitocondrial dos kinetoplastidae), é composta por 25 a 50 mini círculos com tamanho de 20 kb (do inglês *kilobase*) a 38 kb, havendo variação entre as diversas espécies. A *Leishmania* é um protozoário intracelular obrigatório, o parasito é dimórfico, possuindo duas formas em seu ciclo biológico, que são promastigota e amastigota (**Figura 1**) [5,6].

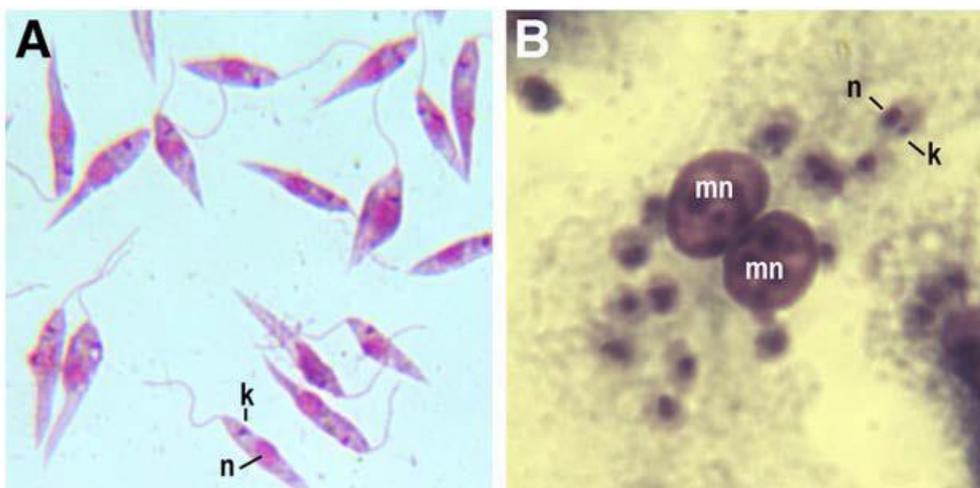


Figura 1. Morfologia da *Leishmania* **A:** Forma Promastigota. **B:** Macrófago infectado com formas Amastigotas. **Nota:** Símbolo das letras K (Kinetoplasto), n (Núcleo), mn (Núcleo do macrófago).
Fonte: Bifeld, 2015 [6]

As formas promastigotas apresentam um flagelo alongado, livre, emergido da parte anterior do parasito, esta forma possui aproximadamente 12 a 30 μm (micrometro). Seu citoplasma apresenta núcleo centralizado, blefaroplasto (corpúsculo basal), complexo de golgi, retículo endoplasmático, lisossomo e cinetoplasto. A forma paramastigota possui corpo oval ou arredondado, flagelo curto ligado ao trato intestinal do vetor, seu cinetoplasto encontrado próximo ao núcleo [6,7].

As formas amastigotas presentes no interior das células fagocíticas (2,5 a 5.0 μm), possuem forma oval com flagelo curto dentro da bolsa flagelar sendo possível observar o aparelho de golgi, retículo endoplasmático e cinetoplasto próximo ao núcleo. O núcleo do amastigota ocupa 1/3 do seu corpo [8,9].

As espécies causadoras de Leishmaniose no Brasil são a *L. (V.) naiffi*, *L. (v.) lindenbergi* e *L. (v.) shawi*. No estado do Amazonas, tem-se *L. (V) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) naiffi*. Estão descritas na **tabela 1** espécies e suas manifestações clínicas respectivamente [10,11]:

Tabela 1. Espécies de *Leishmania* que causam leishmaniose no Brasil.

Localizada	Disseminada	Mucosa	Difusa	Visceral
<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (L.) infantum</i>
<i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) guyanensis</i>		
<i>L. (L.) amazonensis</i>		<i>L. (L.) amazonensis</i>		
<i>L. (V.) lainsoni</i>				
<i>L. (V.) naiffi</i>				
<i>L. (V.) shawi</i>				
<i>L. (V.) lindenbergi</i>				

Fonte: Anversa, 2018 [11].

1.3 *Leishmania (V.) guyanensis*

Esta espécie pode ser encontrada na Guiana Francesa, Suriname, Bolívia, Brasil, Peru, Venezuela e Equador, no Brasil, possui ampla distribuição na região norte, principalmente entre os estados do Acre, Roraima, Amapá, Pará e Amazonas [3,12]. Foi descrita no ano de 1954 pelo Dr. Floch como *Leishmania tropica guyanensis* na Guiana Francesa e América Central [13].

Os pacientes com LCL desenvolvem lesões ulceradas com formato arredondado, base eritematosa com bordas elevada e fundo granulomatoso quando são infectados por *L. guyanensis*. 90% dos pacientes conseguem a cura espontânea da LC, todavia, ≤ 5% desses pacientes progridem para a forma LM [14,15,16,17].

A partir do uso das técnicas de biologia molecular foi possível realizar a identificação das espécies do subgênero *Viannia* [18]. Um exemplo é o uso da análise da variabilidade das sequências do mini éxon e análise da menor subunidade do RNA ribossômico – SSU rDNA [19,20]. O fenótipo de resistência ao SbIII (antimônio trivalente) é influenciado através da expressão do gene *Ornithine decarboxylase* (ODC) e *γ-glutamylcysteine synthetase* (GSH1) que são inerentes a *Leishmania* [21]. A falha terapêutica de antimonial foi associada a alta expressão de GSH1. No gene

aquaglycerporine-1 (LgAQP1) foi relatado que há quatro mutações que concedem resistência ao antimoniato. Todos os estudos citados sugerem que o aspecto genético do parasito possa conceder resistência aos tratamentos [22,23].

1.4 Vetor e ciclo biológico

Existem aproximadamente 800 espécies identificadas de flebotomíneos, no novo mundo que representam 464 espécies e no velho mundo 375, destas espécies somente 30 são potenciais vetores da *Leishmania*. Hospedeiros vertebrados são mamíferos, como: caninos, carnívoros, endentados, marsupiais, roedores e primatas (incluindo o homem). A transmissão do parasito ao homem ocorre através do repasto sanguíneo de um inseto fêmea de diversas espécies de flebótomos. Sua classificação taxonômica apresentada no quadro logo abaixo [24,25].

Quadro 1: Classificação taxonômica Fonte: Sharma, 2008 [24]

Reino: Animalia;

Filo: Artrópodes;

Classe: Insetos (Linnaeus, 1735);

Ordem: Díptera (Walker, 1851);

Família: *Psychodidae* (Zetterstedt, 1850);

Subfamília: Phlebotominae;

Gênero: *Phlebotomus* do velho mundo (Rondani e Berté, 1840);

Gênero: *Lutzomyia* do novo mundo (França, 1924);

Hospedeiros vertebrados são infectados no momento do repasto sanguíneo quando a fêmea do flebotomíneo (**figura 2**) se alimenta do sangue de mamíferos infectados, ingerindo o parasito na forma amastigota. Os parasitos sofrem modificações morfológicas no intestino do inseto onde as formas amastigotas passam por várias modificações morfológicas [24,26]. A matriz peritrófica rompe-se entre o terceiro e o quinto

dia, liberando assim os parasitos na forma promastigota. Logo após o rompimento os parasitos iniciam o processo de multiplicação sucessivamente por divisão binária, aderindo ao epitélio por meio do flagelo, evitando sua eliminação. A vida dos parasitos no interior do vetor varia entre 4 a 18 dias, dependendo das condições climáticas e da espécie de *Leishmania* [27,28]. Nesta etapa o parasito é denominado de promastigota procíclico (forma não infectante), em seguida se diferenciam em promastigota metacíclico (forma infectante) pelo processo de metaciclogênese. Na membrana do parasito promastigota metacíclico são encontradas várias moléculas como o lipofosfoglicano (LPG, do inglês, *Lipophosphoglycan*) e GP63 (Glicoproteína 63). Existem outras moléculas que também são expostas na membrana do parasito como a CP (Cisteína Protease), GIPLs (glicosil inositol fosfolípídeos) e GPI (glicosilfosfatidilinositol) [29,30,31]. Todas essas mudanças bioquímicas do parasito servem para torná-lo mais resistente ao sistema imune do hospedeiro vertebrado. Em seguida os promastigotas migram para a parte anterior do aparelho digestório do vetor (esôfago, faringe e probóscide) onde estarão aptos a serem transmitidos no próximo repasto sanguíneo. No decorrer do repasto sanguíneo, a saliva do inseto libera substâncias anticoagulantes, quimiotáticas, imunorreguladoras e vasodilatadoras o qual atrai as células ao sítio de infecção. Na espécie *Lutzomyia longipalpis* em sua saliva foi detectado um vasodilatador conhecido como MAX (*maxadilan*) o qual favorece a sobrevivência do parasito [26,32,33].



Figura 2. Vetor flebotomíneo fêmea espécie *Lutzomyia umbratilis*. **Nota:** imagem concedida pelo departamento de entomologia da FMT-HVD. **Fonte:** acervo pessoal.

No local da infecção onde o parasito é transmitido são encontrados histiócitos (células residentes). As moléculas do sistema complemento constituem outra barreira do sistema imune inato. No entanto, a presença de LPG nos parasitos não permite a ligação do complexo C5b-9 na membrana, além de que a gp63 promove a quebra da convertase-C3b em C3bi que bloqueia o complexo de ataque a membrana MAC (do inglês *Membrane attack Complex*). Além de prevenir o ataque das convertases, o parasito se aproveita da interação entre C3b e C3bi com os receptores do complemento CR (do inglês *Complement Receptor*) para ser fagocitado sem estimular a ativação do macrófago [34,35,36].

Após a fagocitose, as formas promastigotas ficam no fagossomo que se funde com lisossomos para formação do fagolisossomos que produz óxido nítrico ou NO (do inglês *Nitric Oxide*), espécies reativas de oxigênio ROS (do inglês *Reactive Oxygen Species*), óxidos, hidróxidos, hidroxilas, peróxidos e superóxidos (O⁻, OH⁻, H₂O₂) [37,38]. As formas promastigotas são vulneráveis neste ambiente por meio do LPG o parasita consegue retardar a junção do fagolisossomo, a proteína gp62 atua na degradação de enzimas lisossômicas [39]. Após serem internalizados pelos macrófagos, as formas promastigotas se diferenciam entre 12 a 24 horas em amastigotas, resistentes ao ambiente hostil do fagolisossomo [27]. As formas amastigotas através do processo de divisão binária multiplicam-se no interior dos macrófagos até romperem a membrana plasmática para saírem para o meio extracelular, com a finalidade de serem fagocitadas por outros macrófagos. O ciclo se completa quando ocorre a infecção de novos flebotomíneos durante o repasto sanguíneo (**figura 3**) [40,41].

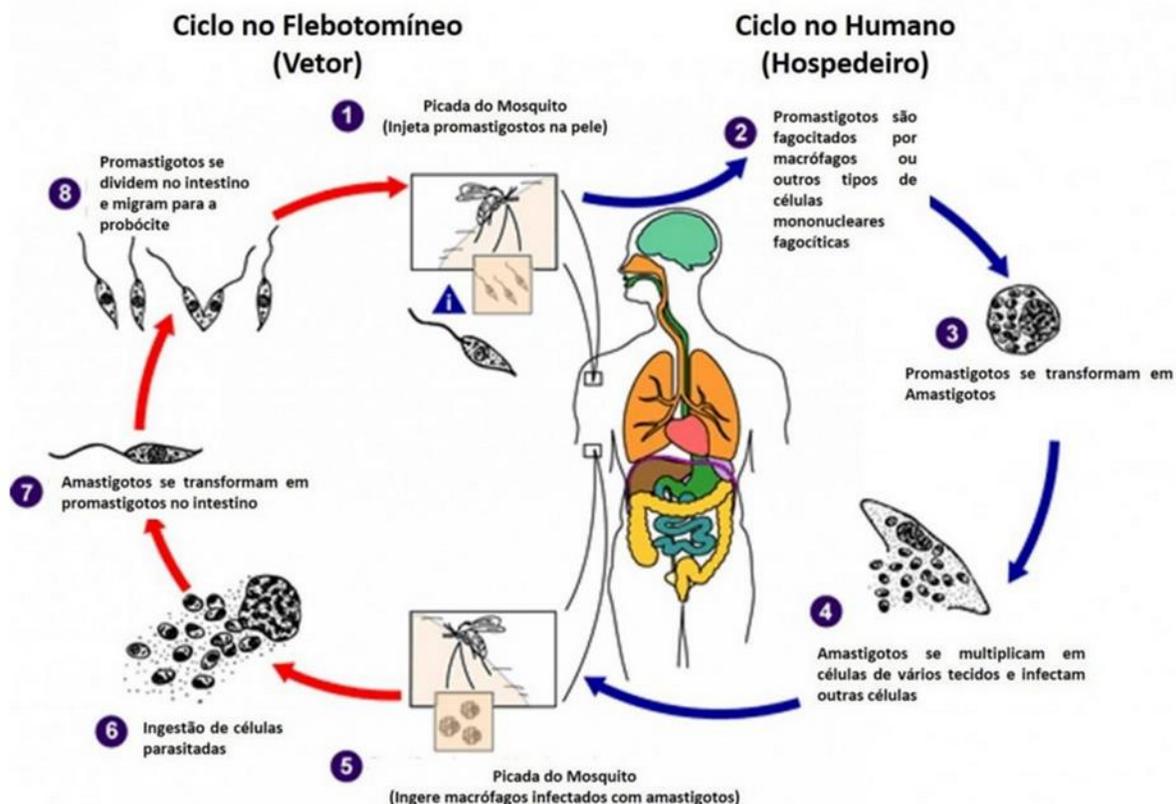


Figura 3. Ciclo biológico da *Leishmania* **Fonte:** Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [42].

1.4.1 Formas clínicas da LTA

Existem duas formas principais de manifestações clínicas da Leishmaniose: LV e LTA, estas diferem quanto à espécie do parasita que transmite ao ser humano. A LV está relacionada aos casos letais da doença causando manifestações clínicas mais graves com acometimentos de órgãos como fígado e baço, frequentemente levando a óbito quando não se tem um tratamento adequado [1,3,43].

A LTA possui um amplo espectro clínico com classificação decorrente do número de lesões cutâneas ao longo do corpo. A classificação correta das formas clínicas favorece um tratamento mais eficaz ao paciente. A LTA é classificada em: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), L. Disseminada (LD), L. Cutânea Difusa (LCD) e L. Mucocutânea (LM) [1,3].

A LCL é a forma mais comum da doença, sendo caracterizada por lesões na pele que podem variar entre única a múltiplas lesões (**Figura 4**). Normalmente a lesão inicia-se como uma pápula eritematosa a qual evolui gradativamente para um nódulo, ocorrendo ulcerações com bordas elevadas e fundo eritematoso, a lesão na pele aparece após um período de incubação entre 10 dias a três meses. Esta forma clínica está mais associada às infecções causadas pela *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* [1,43,44].



Figura 4. Leishmaniose Cutânea localizada **Fonte:** Torres-Guerrero, 2017 [1].

A LD é caracterizada por múltiplas lesões não ulceradas na pele, essas lesões são do tipo nodular ou papular distribuídas por todo o corpo (**Figura 5**). Os indivíduos apresentam parasitemia elevada e dificuldade em responder ao tratamento. Esta forma clínica está associada a infecções causadas por *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) amazonensis* [1,3].



Figura 5. Lesão disseminada. **Fonte:** Torres-Guerrero, 2017 [1].

A LCD é uma forma clínica grave e emergente, caracterizada pela presença de lesões crônicas com placas e múltiplas lesões nodulares não ulceradas (**Figura 6**). As manifestações clínicas estão principalmente associadas a infecções por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* [3].



Figura 6. Lesão difusa. **Fonte:** Manual de vigilância da LTA [3].

A LM é a forma clínica mais agressiva da leishmaniose, onde as lesões infiltradas e ulceradas comprometem o tecido mucoso do nariz, boca, cavidades da garganta e tecidos circundantes (**Figura 7**). Cerca de 5% dos pacientes com LC desenvolvem a LM. Esta infecção é causada principalmente pela *L. (V.) braziliensis*, e muito raramente pela *L. (V.) guyanensis* [45,46].



Figura 7. Lesão mucosa. **Fonte:** OMS, 2019 [47]

1.5 Epidemiologia

A leishmaniose é considerada um problema de saúde pública em 97 países tropicais e subtropicais. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) existe um bilhão de pessoas habitando em áreas de risco (**Figura 8**). Dentre as doenças infecciosas, a leishmaniose é a quarta doença com maior frequência e segunda com maior índice de mortalidade, mesmo assim não há vacinas ou tratamentos eficazes, sendo incluída entre as doenças negligenciadas [47,48,49,50]

A Carga Global de Doenças (GBD do inglês, *Global Burden of Disease*) mostrou que DALYs (do inglês *Disability-adjusted life-years*), ou seja, anos de vida ajustado por incapacidade é maior no Oriente Médio, Norte da África e América do Sul. A LTA apresenta ampla distribuição desde o Sul dos Estados Unidos, atravessando a América Central, chegando até o Sul da Argentina. Os países com maiores índices de notificações de LC incluem Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Paquistão,

República Árabe da Síria e Tunísia constituindo 85% dos casos de LC [51,52,53]. No Brasil 16.135 casos de LTA foram registrados no ano de 2019 [54]. Os casos de LTA têm sido registrados em todos os estados federativos, abrangendo 1.600 cidades com casos autóctones. O estado do Amazonas registrou 1.302 casos de LTA em 2019 [54]. A Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), considerada centro de referência para o tratamento de infecções tropicais no Brasil, localizada na cidade de Manaus, Amazonas, notificou 325 casos em 2019, sendo 314 LC e 11 LM. A LTA afeta principalmente os homens com idade entre 21 a 30 anos que trabalham com agricultura e ou são extrativistas [55,11].

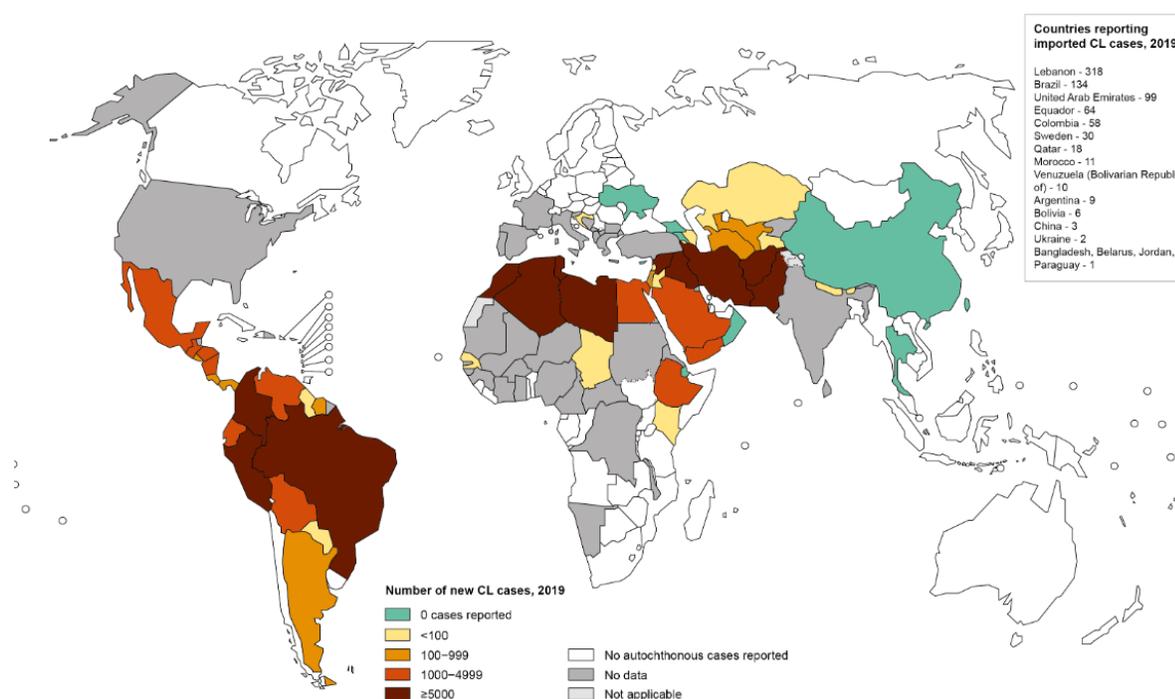


Figura 8. Distribuição da leishmaniose cutânea no mundo. **Fonte:** WHO, 2019 [47].

O crescimento populacional descontrolado na zona rural é uma das circunstâncias que expõe as pessoas ao vetor, outros fatores contribuem para o aumento dos casos de LC: construções de estradas e rodovias, exploração, mineração, irrigação, agricultura, turismo, ecoturismo, atividades militares e exploração de ambientes silvestres. Em locais sem saneamento básico como os subúrbios, favelas e zonas rurais, os índices de contaminação são maiores [56,57]. As mudanças climáticas são um fator potencial para

propagação de doenças transmitidas por vetores, pois já é possível identificar a migração dessas doenças para os grandes centros urbanos [49,58].

No Brasil a transmissão da LTA ocorre em três padrões epidemiológicos diferentes [3]:

Silvestre: Transmissão ocorre em ambientes com área de vegetação primária, em animais silvestres, onde o homem também pode ser infectado [3].

Lazer ou Ocupacional: Exploração desordenada da floresta com a derrubada da vegetação para construção de rodovias, extração de madeira, trabalho agropecuário, treinamento de militares e ecoturismo [3].

Rural ou periurbano: Relacionado com a migração, ocupações de encostas e aglomerados em centros urbanos associados a mata secundárias e residuais [3].

A coinfeção com HIV foi notificada em mais de 30 países e a população de risco abrange consumidores de drogas por via intravenosa, profissionais do sexo e motoristas de caminhão. As formas clínicas da LC, LM e LV com a imunossupressão tornam-se mais graves. O parasito pode ser transmitido por transplante de órgãos, transmissão congênita e transfusão de sangue, em situações raras [59,60,61].

1.6 Tratamento

Inicialmente o tratamento utilizado contra o parasito é feito com antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}). Estes antimoniais são considerados drogas leishmanicidas, pois são capazes de interferir na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania* [62]. Em caso de não obter uma resposta satisfatória ao tratamento com antimonial pentavalente, as drogas de segunda escolha são a anfotericina B e pentamidinas. Pacientes procedentes da Bahia foram tratados com antimonial pentavalente e obtiveram 26,3% de cura [63]. Um ensaio clínico realizado em Manaus com 20 pacientes tratados com uma

única dose de pentamidina (7mg/kg) durante 6 meses demonstrou 55% de eficácia [64]. No entanto, ao ser utilizado os antimoniais pentavalentes em pacientes peruanos os resultados demonstraram um alto índice de resistência a droga (74%) [65]. No estado do Amazonas foi realizado um ensaio clínico randomizado com 90 pacientes para comparar a eficácia da miltefosina e antimonial. Os resultados demonstraram que a miltefosina teve maior tolerância à taxa de cura (71%) do que o antimonial (54%) [66]. Ao ser utilizado Isotianato de pentamidina 4 mg/kg aplicados duas vezes a cada 48 horas evidenciou uma eficácia maior na taxa de cura (80%) em pacientes na Guiana Francesa sem nenhum efeito adverso observado. Uma outra alternativa para o tratamento seria o uso do fluconazol, porém mesmo sendo utilizados doses de 450 mg por dia não demonstrou eficácia em 95% dos pacientes [67,68].

Até o momento não há vacina para combater a leishmaniose. As medidas mais utilizadas para o combate da enfermidade baseiam-se em medidas preventivas, manejo ambiental, controle de vetores e reservatórios, proteção individual, diagnóstico precoce, tratamento, educação em saúde. As medidas de proteção consistem em basicamente diminuir o contato direto entre humanos e o vetor, nesse caso as orientações são, uso de repelentes, utilização de mosquiteiro, utilização de telas de proteção nas janelas, manter sempre limpas as áreas próximas às residências e abrigos de animais [3,69].

1.7 Imunopatogênese

O sistema imunológico tem como função defender o hospedeiro contra a microrganismos, gerando assim uma rápida resposta imune inata com específica ação adaptativa, autotolerância imune e manutenção da resposta de memória. O surgimento de uma doença infecciosa possui uma complexa interação entre hospedeiro e o patógeno. Com isso, os mecanismos biológicos ao longo dos anos foram cada vez mais compreendidos com ajuda de teorias microbiológicas, imunológicas, genéticas e ambientais. Aceita-se amplamente que a persistência da infecção é estabelecida por uma gama de fatores biológicos (**Figura 9**). Os aspectos imunogenéticos assim como fatores

inerentes do hospedeiro podem ser determinantes para o resultado da doença sendo fundamental na gravidade ou cura da doença [70,71,72].

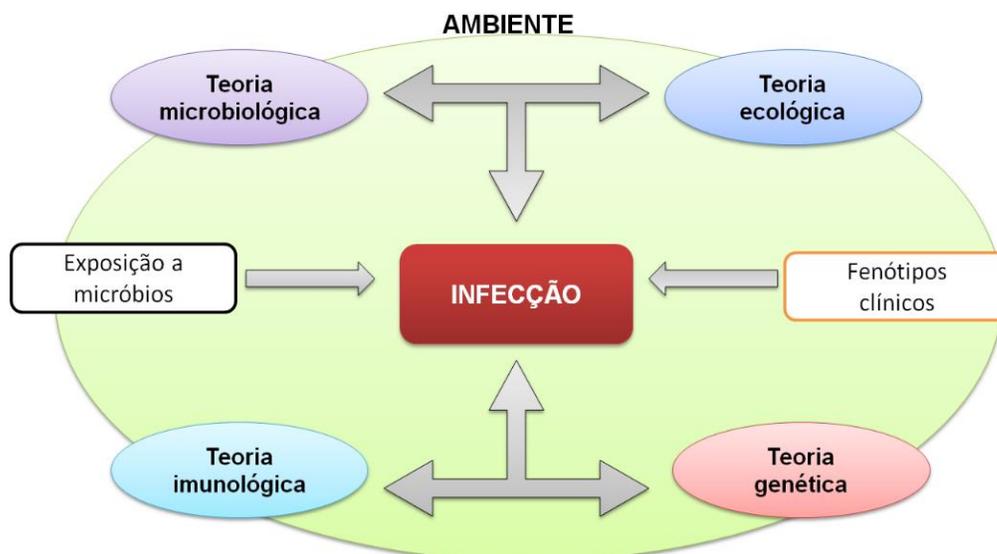


Figura 9. Fatores relacionados à infecção do hospedeiro (adaptado) **Fonte:** Casanova, 2013 [71].

1.7.1 Sistema imune inato

O vetor inocula durante o repasto sanguíneo o parasito e proteínas que se encontram presentes na sua saliva que possuem propriedades quimiotáticas, vasodilatadoras e imunorreguladoras colaborando para infecção na sua fase aguda. Uma substância produzida por glândulas salivares da espécie *L. longipalpis* denominada *Lundep* leva o aumento da expressão citocinas envolvidos na inflamação (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α) e recrutamento [73]. Em contrapartida, camundongos imunizados com saliva de *L. whitmani* contra *L. braziliensis* apresentaram resposta celulares e humorais potentes com a presença de infiltrados celulares intensos, produções de INF- γ e IL-10, carga parasitária baixa e lesões menores, Além dos mais indivíduos saudáveis residentes de áreas endêmicas apresentaram anticorpos responsivos para saliva de *L. whitmani* em comparação a baixa resposta de anticorpos de pacientes com LC [74].

O complexo MAC (do inglês, *membrane attack complex*) C5b-9 é desenvolvido logo após a inoculação do parasita, quando proteínas do sistema complemento como iC3b se

ligam ao parasita e logo se convertem em C3b, favorecendo a fagocitose pelas células hospedeiras que possuem receptores CR3/MAC-1. Os principais alvos da *Leishmania* são os macrófagos, monócitos, células dendríticas e neutrófilos pois estes possuem receptores C3b facilitando a sua ligação [75]. Às quimiocinas locais são produzidas aumentam e atraem células para o sítio de infecção. As células endoteliais liberam MCP-1 e induzem o recrutamento de monócitos (**figura 10**) que exercem funções efetoras no momento inicial da infecção, como produção de ROS no interior dos fagossomos para destruir a *Leishmania* [76,77].

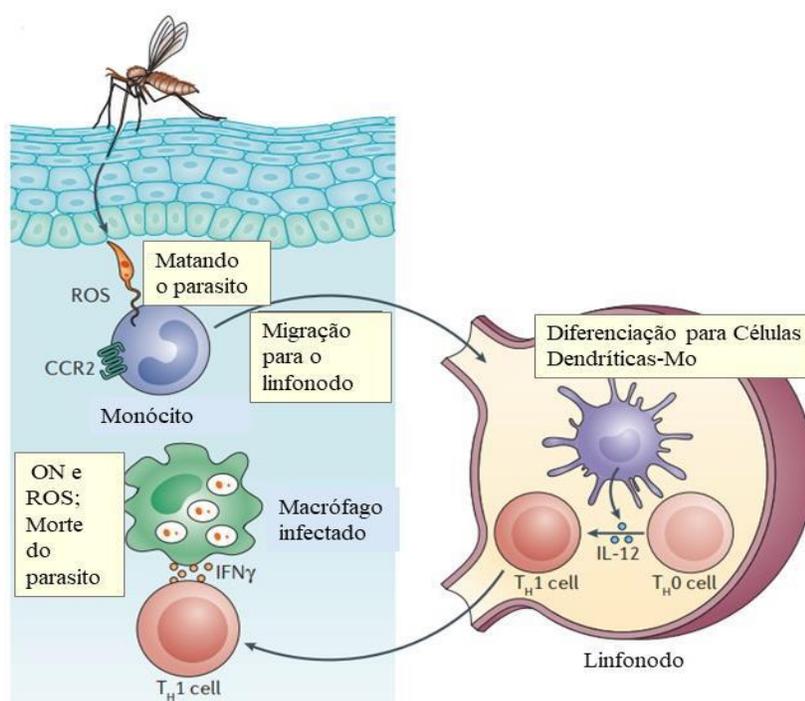


Figura 10. Ação de monócitos contra *Leishmania*, diferenciação em células dendríticas e ativação de células T efetoras. (Adaptado) Fonte: Scott, 2016 [76].

Os neutrófilos são responsáveis por criarem uma armadilha externa composta de uma malha de cromatina e proteínas chamadas de NETs (do inglês, *Neutrophils Extracellular Traps*), que capturam e eliminam os parasitos como foi demonstrado com espécie de *L. amazonensis*. A substância *Lundep* produzida por glândulas salivares da espécie *L. longipalpis* é capaz de causar a destruição dos NETs, favorecendo a sobrevivência do parasito [78,79,80].

A eliminação do parasito ocorre com a cooperação entre neutrófilos e macrófagos infectados. Em camundongos infectados por *L. amazonensis* os macrófagos do peritônio juntamente com neutrófilos inflamatórios destruíram de forma eficiente o parasito, no entanto a eliminação do parasito não depende somente da interação entre neutrófilos e macrófagos infectados, mas TNF- α , elastase de neutrófilos e fator de ativação de plaquetas (PAF, do inglês, *platelet activation factor*) estão envolvidos aos efeitos leishmanicidas independente da geração de radicais de nitrogênio e oxigênio [81]. Em infecções causada por *L. braziliensis* neutrófilos e macrófagos estabelecem uma colaboração protetora. A carga parasitária demonstrou estar significativamente reduzida em macrófagos de camundongos BALB/c que foram infectados por *L. braziliensis* na presença de neutrófilos, efeito análogo também observado em células humanas [82].

Em contrapartida, a proteção do hospedeiro por neutrófilos ainda permanece contraditória. Os neutrófilos são utilizados como reservatório pela *Leishmania*, ao ser realizada a fagocitose os neutrófilos podem levar a morte do parasito internalizada por eles, mas também à geração de corpos apoptóticos os quais são capazes de inibir uma resposta eficaz pelos macrófagos que estão no local da infecção servindo assim como “Cavalo de Tróia”, contribuindo com o aumento da carga parasitária de forma silenciosa para o aumento da infecção [83,84].

Os neutrófilos são mecanismos altamente inflamatórios, e favorecem a progressão da infecção por *L. mexicana* levando a cronificação da lesão correlacionado à alta produção de IL-17 que estimula a produção de CXCL8, sendo esta responsável pelo recrutamento dos neutrófilos [85]. As células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês, *Antigen Presenting Cellsconstituem*) possuem uma conexão entre o sistema imune inato e adaptativo por meio de peptídeos a serem apresentados às células T CD4⁺. As células dendríticas estimulam a diferenciação das células T por meio de interações via receptores de superfície e citocinas na qual induzem respostas imunológicas específicas a *Leishmania* [86]. Os monócitos se diferenciam em células dendríticas no início da infecção, posteriormente capturam o parasito e migram para o linfonodo mais próximo

onde induzem linfócitos T naive a diferenciar-se em subpopulações de células T helper efetoras CD4⁺. As células T ativadas são recrutadas através da liberação de CXCL10 para o local da infecção, onde num momento posterior medeiam respostas específicas contra *Leishmania* [87].

1.7.2 Sistema imune adaptativo

Os linfócitos T são os responsáveis de coordenar a imunidade celular, a qual é uma propriedade característica do sistema imune adaptativo, exercendo um papel fundamental na defesa contra *Leishmania*. As diferentes formas de manifestações clínicas estão relacionadas à polarização de subpopulações de linfócitos T. Desenvolver uma resposta equilibrada entre subpopulações de células T auxiliaadoras (**figura 11**), é um método de paralisar a multiplicação do parasito, visto que essas células produzem citocinas específicas que são determinantes para a cura ou para a evolução da leishmaniose [88,89].

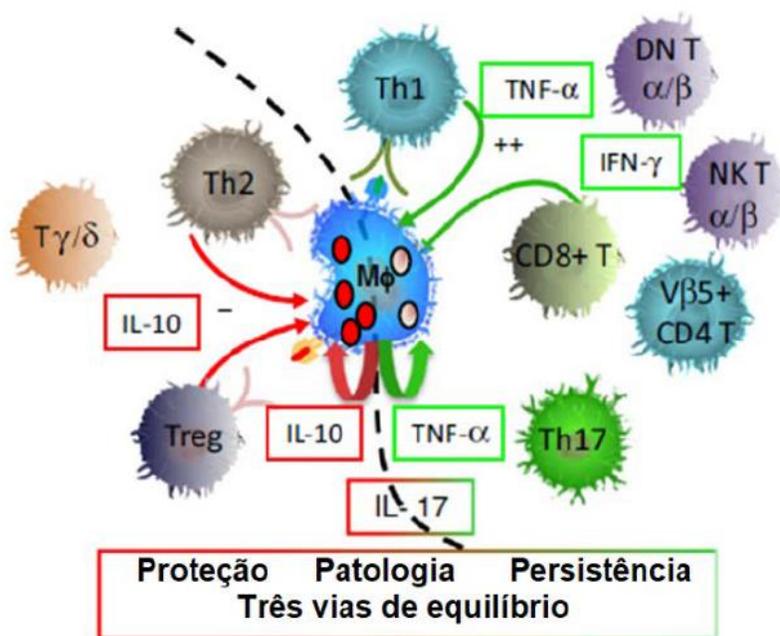


Figura 11. Subpopulações de células T no controle da infecção **Fonte:** Gollob, 2014 [89].

Os linfócitos TCD4⁺ se diferenciam em Th1 (do inglês, *T helper Th cells*) através de estímulos de IL-12 produzidas por células dendríticas ao mesmo tempo INF-γ é produzido

por células *Natural killer* no linfonodo. A produção de citocinas pró-inflamatórias como INF- γ e TNF- α são responsáveis por ativar mecanismos microbicidas nos lisossomos dos macrófagos, por exemplo produção de espécies reativas de oxigênio para destruição de patógenos intracelulares representando um mecanismo fundamental no controle da *Leishmania* [87,90].

A resposta celular Th1 está associada com o controle da infecção. Em camundongos BALB/c infectados com *L. donovani* demonstraram que as quimiocinas MIP-1 alfa (do inglês, *Macrophage inflammatory protein 1 alpha*) e MCP-1 (do inglês, *Macrophage chemoattractant protein 1*), induziram uma boa resposta Th1 [90,91]. O perfil Th1 também exibe um papel protetor no ser humano. Linfócitos T CD4 com macrófagos infectados por *L. braziliensis* demonstram uma forte resposta na eliminação da *Leishmania*, o que é modificado quando usado anti-INF- γ [93,94]. Citocinas Th1 estão associadas a cura clínica devido uma forte produção de INF- γ e uma baixa modulação de IL-4 e IL-10 detectados por imunoenensaio em PBMS de pacientes curados. Células T, INF- γ e alta produção de citocinas Th1 sobre citocinas Th2 apesar de níveis basais, podem prevenir a infecção e o desenvolvimento da lesão em indivíduos não infectados residentes de áreas endêmicas [95,96].

A principal citocina que induz a diferenciação de células T para o fenótipo Th1 é a IL-12. A persistência da infecção em LC está relacionada a capacidade de não ter uma resposta TCD4⁺ de pacientes infectados por *L. guyanensis* aos estímulos de IL-12 [97]. Não é totalmente compreendida a diferenciação de células T para células Th2, porém células T regulatórias e fatores transcricionais de células dendríticas do tecido podem estar envolvidas [98]. A IL-4 é a principal citocina indutora do perfil Th2 e possui funções anti-inflamatórias na LC. As citocinas Th2 são responsáveis por ativar as células B, estimulam a troca de classes de anticorpos, recrutam eosinófilos e conduzem uma resposta humoral incapaz de mediar a eliminação de patógenos intracelulares como a *Leishmania* [99,100].

Camundongos *knockout* para IL-4 infectados por *L. amazonensis* e *L. major* apresentaram lesões menores ao ser comparados à camundongos selvagens apesar de ambos não eliminarem os parasitos [101,99]. A IL-4 está relacionada à ativação da imunidade humoral, além de inibir a expressão do gene *IL-12R* limitando as respostas Th1, contribuindo com uma resposta favorável para a replicação da leishmaniasis. Na fase inicial da infecção por *L. guyanensis* as respostas Th2 são predominantes, correlacionada positivamente com a carga parasitária em biopsias de pacientes [102,103,104].

As células Th17 produtoras de IL-17, é uma citocina pró-inflamatória, responsáveis por ativar a produção de citocinas e quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos. A sua diferenciação é estimulada por IL-6, TGF β , IL-1 β e IL-23 [105,106]. As células Th17 tem sido correlacionadas em infecções por leishmaniasis as quais induzem fortes respostas neutrofílicas que levam o avanço da doença. Os camundongos BALB/c suscetíveis demonstraram aumento de células Th17 simultaneamente a neutrófilos exibindo níveis significantes quando comparados aos camundongos C57BL/6 após 90 dias de infecção por *L. mexicana* que permaneceu até a fase de cronificação da doença [85].

Em biopsias de pacientes com LM infectados por *L. braziliensis* de modo semelhante apresentaram neutrófilos e células T produtoras de IL-17 na lesão necrótica [107]. O *knockout* de camundongos suscetíveis a IL-17 diminuiu CXCL2 e neutrófilos que levou a redução significativa do tamanho da lesão quando comparado ao controle [108].

O paradigma das células Th1/Th2 é essencial no combate a *Leishmania*, células T regulatórias (Treg) produtoras de IL-10 e TGF- β desempenham funções de regulação de células efetoras (**Figura 12**). Células Treg (CD4⁺ CD245⁺ Foxp3⁺), um subconjunto de células T regulatórias, regulam a intensidade das respostas imunológicas ou aprazam respostas de células efetoras, tais como Th1, Th2 e Th17 [109].

Ao regular a resposta Th1, células Treg apresentam um mecanismo necessário para o controle das respostas inflamatórias exacerbadas. A ablação de células Tregs em

camundongos infectados por *L. panamensis*, aumentou a produção de IL-17 e IFN- γ levando ao aumento da lesão e da carga parasitária, mas não alterou os níveis de IL-10 e IL-13 [110]. Camundongos tratados com anticorpo IL-2/anti-IL-2 para amplificar Tregs pelo bloqueio do IL-2R β aumentando a afinidade das células Tregs CD25⁺, diminuiu a carga parasitária e pareceu ser mais efetivo do que a transferência direta de Tregs [110]. O equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias é necessário para uma resposta eficaz e controlada [89].

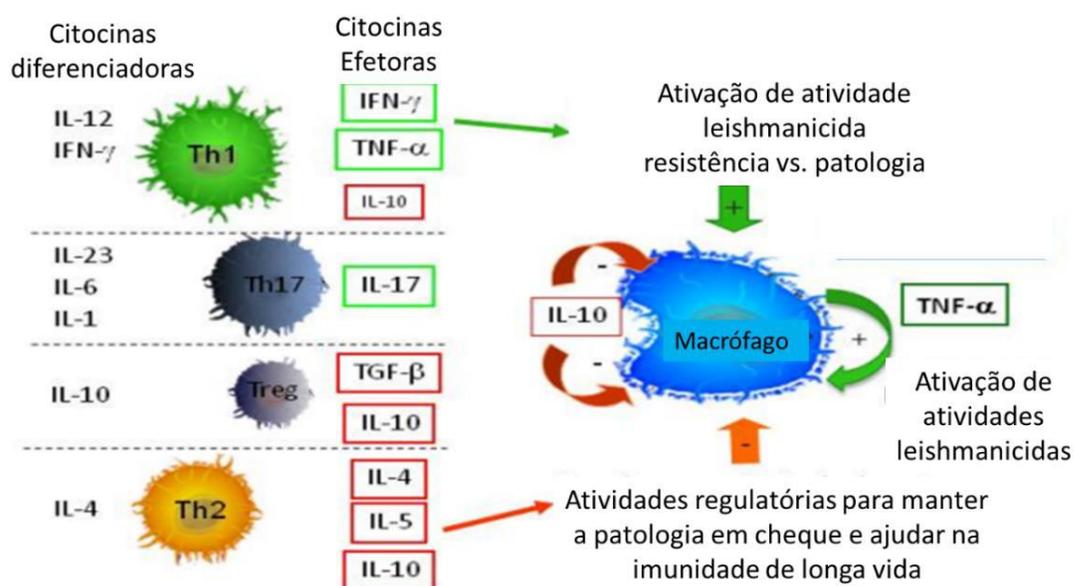


Figura 12. Divisão de subconjuntos de células T efectoras Th1, Th2, Th17, Treg e citocinas modulatórias da resposta imune (adaptado) **Fonte:** Gollob, 2014 [89].

1.8 Propriedades genéticas

O impacto das doenças inflamatórias é desencadeado pelo desequilíbrio da resposta imunológica influenciada por múltiplos genes. O mapeamento de genes suscetíveis a doenças infecciosas concebe uma tarefa árdua, pois a população humana possui diferentes estilos de vida e tempo variável exposto a patógenos. Sendo assim o papel desses genes ainda permanecem ocultos [111,112].

Estudos realizados em humanos e camundongos demonstraram que as formas da leishmaniose são influenciadas por fatores genéticos do hospedeiro [113]. Grande parte da variação genética está na forma de SNPs (do inglês *single nucleotide polymorphism*) podendo ser encontrados em qualquer região ao longo do gene. Dependendo da localização do SNP, pode haver alteração na produção da proteína, assim como na sua estrutura molecular (**Figura 13**) [114]. A utilização de modelos murinos consanguíneos (*inbred*) para análise imunológica, genética e fisiológica tornou esses animais ideais para pesquisas controladas. Assim sendo, vários estudos genéticos têm sido conduzidos em modelos murinos afetados com LC e LV com o desígnio de identificar o QTL (do inglês, *quantitative trait loci*) [115].

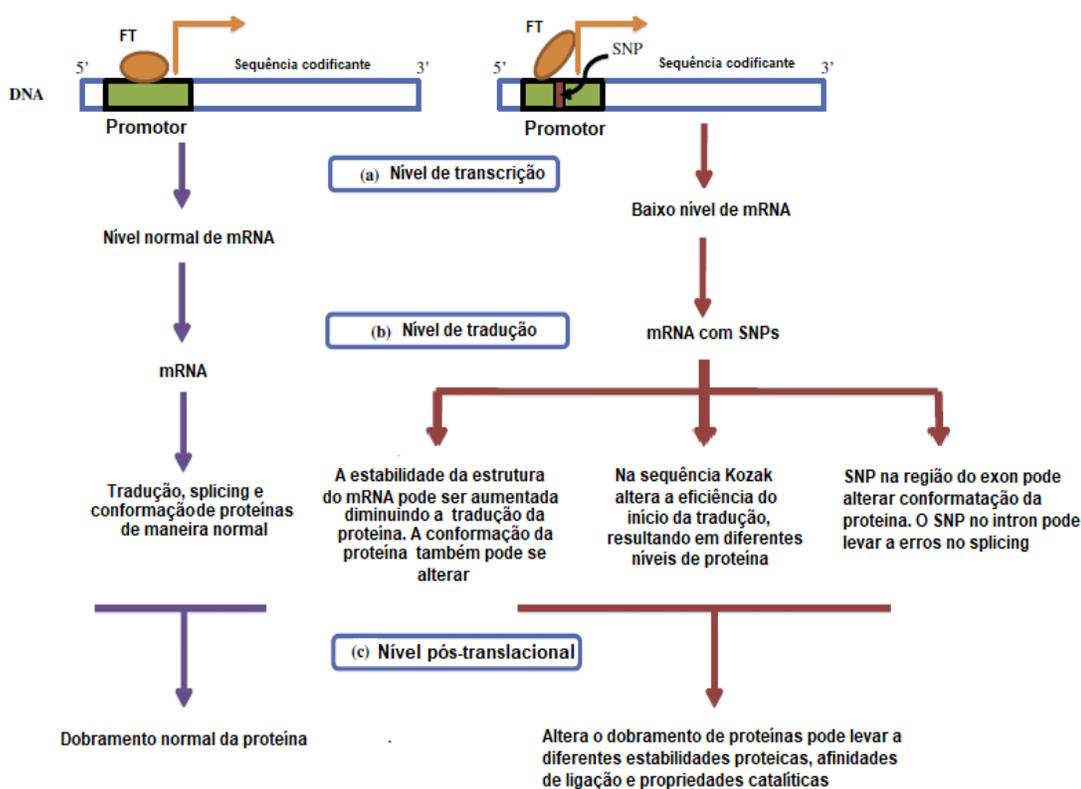


Figura 13. Papel de SNPs nas regiões gênicas **Nota:** Símbolo FT (fator de transcrição) **Fonte:** Fareed, 2013 [114].

É importante ressaltar que 80-90% dos indivíduos que habitam em regiões endêmicas são resistentes à infecção por *Leishmania*, estes indivíduos são positivos para o teste intradérmico, não apresentam histórico de leishmaniose ou são assintomáticos

para a doença [116]. Indivíduos assintomáticos são caracterizados por apresentarem uma forte resposta imunológica quando expostos a antígenos *Leishmania*, enquanto indivíduos sintomáticos são positivos à detecção de anticorpos anti-*Leishmania*. Sendo assim, fatores genéticos do hospedeiro evidenciam motivos reais que justifiquem os indivíduos com a mesma exposição à infecção diferirem quanto à suscetibilidade ou resistência à Leishmaniose [117,118].

A resposta imune do hospedeiro ou *status* da resposta imune é determinante para a evolução das manifestações clínicas da leishmaniose [89]. Diferenças nas características genéticas em diferentes indivíduos podem afetar o equilíbrio da resposta, pois a mesma espécie de *Leishmania* pode levar a diferentes desfechos patológicos, os quais estão relacionados à intensidade da resposta imune [76].

Foi identificado em estudo prospectivo que indivíduos infectados por *Leishmania braziliensis* apresentaram um mesmo perfil inflamatório mesmo sendo realizado o tratamento da doença. Quando avaliados aqueles que evoluíram para formas mais grave da doença, observou-se níveis elevados de citocinas inflamatórias e baixa produção de citocinas anti-inflamatórias quando comparados a indivíduos assintomáticos ou aqueles que evoluíram para a cura da doença [119].

Foram observados em um estudo de GWLS (do inglês *Genome-Wide linkage scan*), fatores associados com a suscetibilidade da LV com famílias oriundas do Sudão, Brasil e Índia [116]. Estudos genéticos em infecções como a leishmaniose são de suma importância para obter compreensão sobre a influência do perfil genético diante a resposta imune do hospedeiro. Deste modo, variações em genes de citocinas ou receptores podem influenciar na elucidação da resposta imune [120].

Estudos realizados em mais de 40 genes envolvidos na resposta imune do hospedeiro e localizados nos cromossomos 1, 3, 5, 6 e 10, apresentaram associação de variações genéticas com o desenvolvimento da Leishmaniose [121]. As variações genéticas associadas a doença, consistem em SNPs presentes em genes responsáveis

pela regulação da resposta imune do hospedeiro ou de moléculas que regulam a produção de citocinas efetoras de células Th1 [122,123]. Em vista disso, estudos têm sido conduzidos para descrever variações nos genes da resposta imune relacionados com a suscetibilidade ou proteção à doença leishmaniose cutânea [124,125].

Estudos recentes demonstram que polimorfismos presentes nos genes *IL1B* e *IFNG* estão associados a LC e influenciam em diferentes concentrações de citocinas, afetando o equilíbrio e ação da resposta imune frente a infecções por *L. guyanensis* [126]. Variantes presentes nos genes *MBL2* (do inglês, *Mannose-binding lectin 2*) e *TOLLIP* (do inglês, *Toll-interacting protein*), também estão relacionados à suscetibilidade à leishmaniose cutânea causada por *L. guyanensis* [127,128]. SNPs das regiões promotoras dos genes *IL6* e *MCP1* (do inglês, *Monocyte chemoattractant protein*) estão associados ao desenvolvimento da forma mucosa [123]. Mutações gênicas na região codificadora do gene *TLR4* têm sido responsáveis pelo aumento do risco de infecção causada por *L. major*, assim como a gravidade da doença [125]. As características genéticas do hospedeiro podem agir como um fator crucial para promover o desenvolvimento da doença, evolução e manifestações das formas clínicas mais graves [124,129].

1.9 Eixo IL-23/IL-23R/IL-17

A polaridade das células T é relacionada com o eixo da interleucina 23. A IL-23, citocina heterodimérica, compreende as subunidades IL-23p19 e IL-12p40 e ao se ligar ao receptor IL-23 (*IL-23R*) atua na diferenciação e manutenção de células T CD4⁺. A IL-23 faz parte da família da IL-12, onde seus membros diferem na composição de suas subunidades, representando a única família de citocinas com estrutura heterodimérica (**figura 14**) [130,131,132].

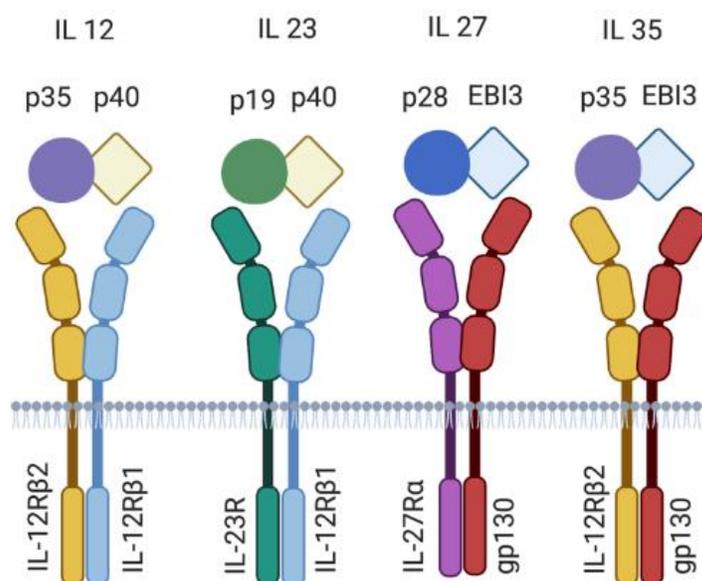


Figura 14. Família de citocinas da IL-12 e seus receptores. Fonte: Jefremow, 2020 [130].

IL-23R é uma proteína transmembranar do tipo I, com o peso molecular de 69 KDa composto por 629 aminoácidos, constituindo três domínios extracelulares (Figura 13), pode ser encontrada em células T, células de memória, células NK, monócitos e células dendríticas [131,133,134].

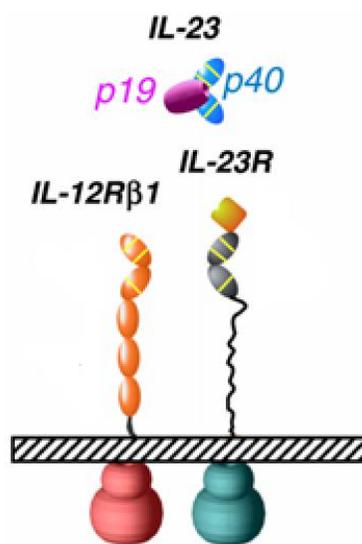


Figura 15. Estrutura do eixo da IL23 Fonte: Lupardus, 2008 [134].

A via de sinalização da IL-23 é similar a via da IL-12, diferem somente na ligação dos seus respectivos receptores e funções (**figura 16**). Ao ser formado o complexo IL-23/IL-23R ocorre o desencadeamento de sinalização de fosfatase JAK (do inglês, *Janus Kinase*), ativando assim o fator de transcrição STAT 3 (do inglês, *Signal transducer and activator of transcription*). A ligação da subunidade IL-23p19 ao seu receptor IL-23 resulta em alterações estruturais que facilitam a associação de alta afinidade da subunidade IL-12p40 com a cadeia IL-12 R β 1. Esses processos induzem a ativação de JAK2 e TYK2 (do inglês, *Tyrosine kinase 2*), que estão associados aos receptores IL-12R β 1 e IL-23R. Ativação de IL-23R resulta na formação de homodímeros de STAT3 com o objetivo de se deslocarem ao núcleo para realização de transcrição de genes [135,136].

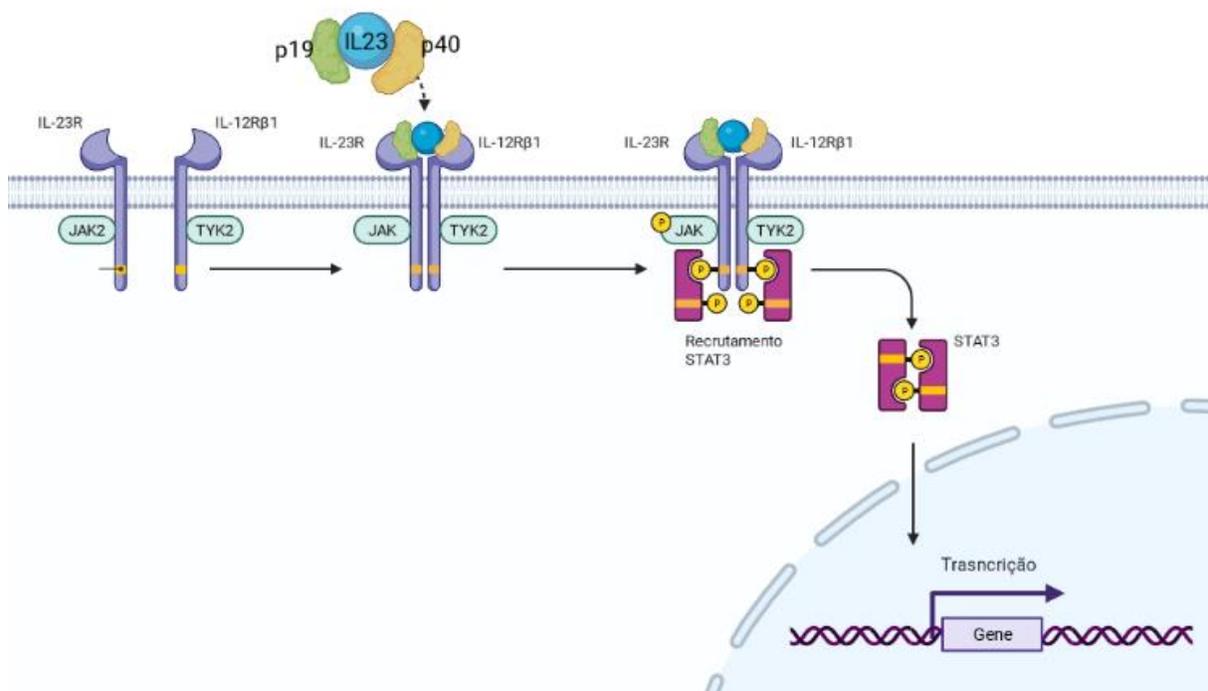


Figura 16. sinalização do eixo IL-23 (adaptado - biorender.com) **Fonte:** Moschen, 2019 [135].

A capacidade do eixo da IL-23 em estimular as células T CD4⁺ a produzir IL-17, IL-6 e TNF tem um papel dominante no desenvolvimento e manutenção da inflamação (**Figura 17**) [131,137].



Figura 17. Eixo IL-23 estimulando produção de citocinas inflamatórias **Fonte:** Hunter, 2005 [131].

A via Th17 desempenha um papel de suma importância no controle de infecções microbianas agudas [138,139]. O *IL-23R* é descrito como componente essencial para a diferenciação terminal das células Th17 [140]. Evidências crescentes sugerem que o *IL-23R* pode ter um papel chave no desenvolvimento da inflamação crônica [141,142]. Além do mais, em camundongos transgênicos que expressam a subunidade IL-23p19 generalizada demonstrou que a IL-23 é considerada um potente condutor de processos inflamatórios [143]. A subunidade IL-23p19 também foi descrita como sendo responsável pela progressão da doença em camundongos BALB/c suscetíveis inoculados com *L. major* [144].

Em pacientes com LC infectados com *L. braziliensis* foram observados altos níveis de IL-17 [145]. Em um estudo utilizando camundongos BALB/c deficientes de IL-17 desenvolvem lesões menores quando infectados com espécies de *L. major* quando comparado aos camundongos controle, sugerindo que a IL-17 promove lesões. Camundongos C57BL/6 infectados com *L. major*, ao ser tratados com anticorpos monoclonais anti-receptor de IL-10 e anti- $\text{INF-}\gamma$, demonstraram lesões em tamanhos maior com o aumento de produção de IL-17 e infiltrados de neutrófilos no local da lesão em comparação com camundongos tratados com anti-IL-17 [108,146].

Em um estudo utilizando sangue periférico de pacientes com LC infectados por *L. braziliensis* foram estimulados com anti-Leishmania, o que resultou na produção de IL-17 em níveis mais elevados na presença de anti- $\text{INF-}\gamma$ [146]. Em biópsias de pele de pacientes com LC não ulceradas infectados por *L. infantum chagasi*, demonstrou uma conexão positiva entre as células $\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ e células $\text{TGF}\beta^+$, IL-6^+ , IL-17^+ e IL-23^+ no desenvolvimento e manutenção de células Th17 [147]. Do mesmo modo, a presença dessas células também foi demonstrada em biópsias de lesões cutâneas de pacientes infectados com *L. (V.) panamensis* [148]. Altos níveis de mRNA de marcadores Th17 (IL-17, IL-23 e $\text{ROR}\gamma\text{t}$) e Treg foram observadas em lesões de pele de pacientes com LC infectados por *L. tropica* [149]. É importante lembrar que $\text{ROR}\gamma\text{t}$ é responsável por ativar a transcrição de IL-23 e IL-17 [150].

O gene *IL-23R* possui um tamanho de 121.341 pb (pares de base) e está localizado no cromossomo 1p31.3. Contém 11 éxons que traduzem uma proteína formada por 629 aminoácidos (**Figura 18**). Neste gene foi analisado o SNP rs11805303 G/A (MAF: T = 0.2922) localizado no 6° íntron [151].

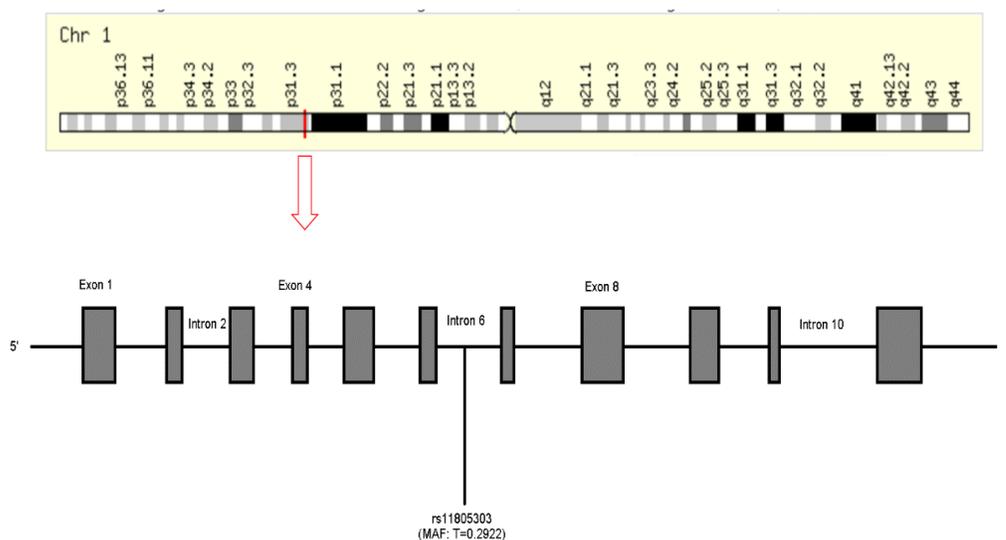


Figura 18. Localização do gene *IL23R* no cromossomo 1p31.3 e estrutura do gene **Fonte:** Gene Card [151] e Acervo pessoal.

Até o momento não existe uma vacina no mercado contra a *Leishmania* em decorrência de ainda não serem compreendidos completamente os fatores que favorecem a sobrevivência do parasito. Entretanto, estudos clínicos de fase III demonstraram bons resultados em cães e humanos [152,153]. Recentemente, foi avaliada a eficácia da vacina composta por *L. major* atenuada combinado com TLR4 agonista sintético. Os resultados mostram que a vacinação em camundongos produziu altos níveis de IFN- γ , IL-2 e IL-17^a [154].

Mediante esse cenário, o eixo IL-23/*IL-23R* chamou atenção de diversos ramos da medicina, pois apresentou uma série de funções imunológicas nas doenças autoimunes e degenerativas. Ademais, o papel do eixo IL-23/*IL-23R* no controle da LTA tem estado em discussão nos últimos anos. Deste modo, identificar mecanismos moleculares aumentaria a compreensão sobre imunopatogênese subjacente da leishmaniose, com o objetivo de

desenvolver no futuro novos alvos terapêuticos. O acervo de evidências destaca o papel crucial também do eixo IL-17/IL-23 na patogênese da LC causada por diferentes espécies de *Leishmania*, pois a IL23 desempenha papel fundamental na diferenciação, manutenção e expansão de células Th17. Neste estudo investigamos se a variante rs11805303 no gene *IL-23R* pode estar associada ao desenvolvimento da LC causada por *L. guyanensis*. Assim como analisamos a influência dos genótipos nos níveis plasmáticos circulantes de IL-17, TNF- α e IL-1 β , IL-6, TGF- β .

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar associação do polimorfismo rs11805303 do gene *IL23R* em indivíduos com leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) guyanensis* no estado do Amazonas e em indivíduos saudáveis sem histórico de leishmaniose, procedentes das mesmas áreas endêmicas.

2.2 Específicos

- Determinar e Comparar as frequências alélicas e genóticas do polimorfismo rs11805303 em pacientes e controles saudáveis;
- Correlacionar um possível efeito do SNP rs11805303 sobre concentrações das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-17, INF- γ e TNF- α presente no plasma.

3 METODOLOGIA

3.1 Modelo de estudo

A presente pesquisa consiste em um estudo genético caso-controle de pesquisa básica onde foi utilizado técnicas de biologia molecular para comparação de diversas variáveis entre pacientes com LC e indivíduos saudáveis. Cada grupo foi constituído sem relação de parentesco sendo provenientes das mesmas áreas endêmicas. Este estudo seguiu os critérios do guideline STREGA (do inglês, *Strengthening the reporting of genetic association studies*).

3.2 Aspectos Éticos

Este projeto de pesquisa faz parte integrante de um projeto maior intitulado “Polimorfismos Genéticos dos Genes Envolvidos na Resposta Imune e na Cicatrização das lesões em Pacientes com Leishmaniose Cutânea em uma população caso-controle de Manaus, Amazonas”, tendo como principal pesquisador responsável o Prof. Dr. Rajendranath Ramasawmy. Este estudo esteve de acordo com os princípios expressos na declaração de Helsinki e as resoluções do Conselho Nacional de ética em Pesquisa (CONEP) sobre pesquisa em seres humanos, com as resoluções CNS 446 de 12/12/2012 e 441/2011, aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) da Fundação de Medicina Tropical - Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) sob o número do CAAE: 09995212.0.0000.0005. Este projeto de pesquisa possui financiamento aprovado pelo CNPq e FAPEAM.

3.3 Local de estudo

O presente estudo foi realizado no Ambulatório de dermatologia da FMT-HVD, sendo realizado o recrutamento dos pacientes (grupo caso), que apresentaram lesões cutâneas as quais tiveram seu diagnóstico confirmado através de exame direto. A coleta de indivíduos saudáveis (grupo controle) foi realizada nas regiões endêmicas para

leishmaniose, localizadas nas proximidades do município de Manaus, nas rodovias AM-010 (Manaus – Itacoatiara), e BR-174 (Manaus – Boa Vista). Dentre as localidades abrangidas neste percurso, onde ocorreram casos confirmados de leishmaniose, nossa equipe de pesquisa visitou algumas comunidades como o Ramal do Pau-Rosa e o Ramal da Cooperativa, e seus vicinais km21 da BR-174, ramal agua branca I (Km32), ramal agua branca II (Km35), Ramal do Leão (Km37) Ramal do Banco (KM 127) da AM – 010 regiões estas consideradas endêmicas por serem áreas de floresta tropical que sofrem com o desmatamento, levando em ocorrência invasões e assentamentos populacionais nas proximidades das áreas de mata, fazendo com que essa população fosse exposta a infecção por *Leishmania*.

3.4 Amostras, População de estudo e Recrutamento

3.4.1 Amostras

Neste estudo realizou-se coleta de 1634 amostras. Todos os pacientes e indivíduos foram devidamente orientados a ler o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), devidamente aprovado pelo comitê de ética (CEP) pertinente, e aplicado questionário para coleta de sangue após consentimento dos mesmos.

3.4.2 Grupo caso e Controle

O grupo caso foi composto por 828 pacientes da FMT-HVD recrutados no ambulatório de Dermatologia de segunda a sexta feira, das 8 horas às 11 horas da manhã com lesões cutâneas que tiveram o seu diagnóstico confirmado através do exame direto.

No grupo controle foram recrutados 806 indivíduos saudáveis sem sinal, histórico ou manifestações de LC, os mesmos são procedentes das áreas endêmicas adjacentes as rodovias AM 010 e BR 174, as mesmas de onde provieram os indivíduos do grupo caso.

3.4.3 Recrutamento

O recrutamento dos participantes teve início em janeiro de 2009 e finalizou em março de 2016. Para o grupo controle foram averiguados os locais de procedência dos participantes da pesquisa para que então fosse feita a escolha dos locais de recrutamento para o grupo saudável. Para o grupo controle, a entrevista e coleta, foram realizadas aos fins de semana, por se tratar de um grupo que exerce atividade agrícola constante nas matas do peridomicílio. Concluiu-se que aos domingos, os trabalhadores estão em suas residências, tornando-se assim mais fácil encontra-los para realizar a entrevista e fazer a coleta.

3.4.4 Critérios de inclusão e não inclusão

Para o critério de inclusão dos indivíduos para compor o grupo controle utilizamos o tempo de moradia nas áreas endêmicas, o qual foi igual ou superior a 5 anos, e não possuir sinais, sintomas ou histórico da doença. No grupo Caso usamos a confirmação do diagnóstico através do exame direto para LC. A faixa etária incluída neste estudo foi de 12 a 65 anos de idade para ambos os grupos. Os indivíduos com sorologia positiva para HIV, militar e gestante não foram incluídos no estudo.

3.5 Procedimentos

3.5.1 Caracterização do agente etiológico

A distinção da espécie de leishmania foi realizada a partir das biopsias da lesão dos pacientes recrutados para o estudo, foram empregados na caracterização molecular do gênero e espécie do parasito. A biopsia da lesão foi realizada com punch 4mm de diâmetro ou em cunha com o uso de bisturi, de preferência, na borda das lesões ulceradas.

3.5.2 Coleta de Sangue

A coleta dos pacientes e indivíduos saudáveis foi realizada através de uma punção venosa para coleta de 5 ml de sangue periférico em tubo vacutainer contendo anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético). Depois de realizada a coleta, o material biológico foi preservado em gelo e encaminhado imediatamente ao laboratório térreo do Instituto de Pesquisa Carlos Borborema (IPCCB) da FMT-HVD onde os procedimentos cabíveis foram executados. As amostras de sangue foram centrifugadas a 2.000 RPM (Rotação por minuto) em centrifuga de bancada por exatamente 10 minutos para promover a separação da camada leucocitária (Buffy Coat) e do plasma.

3.5.3 Extração de DNA

Amostras de DNA foram extraídas através da técnica de “*salting-out*”. As amostras extraídas foram devidamente identificadas e estratificadas em solução de estoque e armazenada em freezer a -80°C, no crio banco da fundação e solução de trabalho diário diluídas para 50 ng/ml e armazenadas no freezer a -30°C.

3.5.4 Quantificação do DNA extraído

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro de microvolume, em comprimentos de onda de 260nm a 280 nm pelo nanodrop ND-2000 (*Thermo Scientific*). Depois de homogeneizado a amostra, foi utilizado 1 µL para quantificação do DNA em ng/µL e determinado a pureza através da razão entre a absorbância de 260/280nm.

3.5.5 PCR para Genotipagem

A PCR (Reações em Cadeia da Polimerase) foi realizada para volume final de 25µL contendo 50 ng/mL de DNA genômico, tampão da *Taq polimerase* (500 mmol/L KCl e 100 mol/L Tris-HCl, pH 8.3), MgCl₂ 2.5 mmol/L, primer *forward* e *reverse* 0.2 pmol/L, dNTP 0,4 µM e 1 U de *Taq polimerase*. As condições de ciclagem foram uma etapa inicial de desnaturação de 5 minutos a 95 ° C seguida, subsequentemente, por 40 ciclos de 15 s a 95 ° C, 15 s a 57 ° C, 30 s a 72 ° C e uma etapa de extensão final a 72 ° C por 7 minutos. Para a amplificação genômica de interesse do gene *IL23R*, os seguintes primers senso (5'-TCTTCCCAGTCTCCAGTGTG-3') e anti-senso (5'-GGGAAACA AAAATTGTTCCGG-3'), foram utilizados para amplificar a região genômica do SNP gerando um fragmento de 373 pb, as reações de amplificação foram realizadas em Termociclador Veriti da Applied Biosystems. A análise do produto amplificado foi feita na eletroforese em gel de agarose a 2% corado por brometo de etídeo. A foto documentação foi realizada no trasiluminador sob luz UV (ultravioleta).

3.5.6 Digestão Enzimática

A digestão foi feita utilizando a enzima de restrição *Mnl I* (New England Biolabs) de acordo com o protocolo do fabricante. Esta enzima reconhece uma sequência padrão de 4 nucleotídeos 5'-CCTC-3'. Foi utilizado um mix com volume final de 20 µl, sendo 10 µl do produto de PCR + 10 µl de mix padrão de digestão enzimática, que foi precisamente ajustado para conter 1U de enzima *MNLI*, tampão *cutsmart* a 1x. As amostras com o mix de digestão foram encubadas em banho Maria por 01h30min a 37°C. Após esse procedimento foi realizado a técnica de eletroforese em gel de agarose a 3% corado com 0,7 µl brometo de etídeo para visualização em transiluminador com luz UV para obter visualização dos fragmentos digeridos. Na presença do alelo C, três fragmentos de 198, 136 e 39 pb são gerados, enquanto para o alelo T, apenas dois fragmentos de 237 e 136 pb são observados. O fragmento de 39 pb não é possível ser visualizado no gel.

4 Dosagem de citocinas

Pacientes com LC forneceram 5 mL de sangue periférico antes de iniciar o tratamento. Todas as amostras de plasma (400 dos controles e 400 dos pacientes com LC) foram mantidas congeladas a -80°C até a dosagem das citocinas. A dosagem de citocinas IL17, IL6, IL1 β , INF- γ e TNF- α foi realizada por meio do Kit Bio-Plex ProTM Human Cytokines GRP I Panel 27-plex (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), seguindo as instruções e protocolos do fabricante. As concentrações foram medidas através do método de imunensaio multiplex. Este método utiliza de microesferas sensibilizadas com anticorpos de captura específicos para distintas citocinas e utilização de anticorpos de detecção marcados com fluorescência e analisados por meio do Bioplex 200 Protein Array System (Luminex Corporation, Austin, TX, USA). Os valores originados após análises para cada citocina foram observados em picogramas por mililitro (pg/ml).

5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através de regressão logística no site <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. Para comparação entre os grupos usamos teste do χ^2 o odds ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% [IC]. O Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) foi determinado comparando o número observado de diferentes genótipos com número esperados. A influência dos genótipos sobre as concentrações de citocinas foi analisada através do software R versão 3.5.1 pacote ggplot 2. Os valores que foram inferiores a $P < 0,05$ foram considerados significativos.

6 RESULTADOS

6.1 Características da população de estudo

Neste estudo foi recrutado um total de 1634 indivíduos oriundos da mesma área endêmica para *L. guyanensis*, sendo 828 pacientes com diagnóstico para LC e 806 indivíduos controles saudáveis, conforme demonstrado na **Tabela 2**. A distribuição por sexo apresentou uma diferença entre os pacientes do grupo caso e indivíduos saudáveis grupo controle ($p = 0,002$). Os indivíduos participantes do grupo controle apresentaram idade superior ao grupo caso ($p < 0,0001$).

Tabela 2. Características básicas de um estudo de população

	Pacientes com LC		Controles		Valor de <i>p</i>
	N=828		N=806		
	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres	
Gênero	620 (75%)	208 (25%)	561 (70%)	245 (30%)	0.002
Idade (média ± SEM³)	34.49 ± 0.56	37.14 ± 1.09	41.62 ± 0.77	40 ± 1.08	<0.0001

Valor de *p* significativo <0,05; SEM: erro padrão da média

6.2 Frequências Alélicas e Genóticas do SNP rs11805303 do gene *IL-23R*

Para avaliar a influência do SNP rs11805303 no gene *IL-23R* na população estudada, as frequências alélicas e genóticas foram determinadas e a força de associação foi medida através do odds ratio (OR) (**tabela 3**). A distribuição das frequências de genótipos e alelos não demonstrou desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg em pacientes com LC e indivíduos saudáveis. As frequências de genótipos e alelos apresentaram diferenças entre os grupos, com um OR comum de 1,78 ($p = 3.3 \times 10^{-11}$) para o alelo T.

Tabela 3. Distribuição e comparação de frequências de genótipos e alelos entre pacientes com LC e indivíduos controles saudáveis.

Frequência de Genótipos e Alelos

	Pacientes com LC	Controles	Comparações	OR (95% CI)	Valor de P
Genótipos					
rs11805303	n = 828	n =806			
CC	483 (58.3%)	593 (73.6%)	TT vs CC	3.0 (1.8 – 5.0)	9.9 x 10 ⁻⁶
CT	291 (35.1%)	191 (23.7%)	CT vs CC	1.9 (1.5 – 2.3)	1.6 x 10 ⁻⁸
TT	54 (6.5%)	22 (2.7%)	TT+CT vs CC	2.0 (1.6 – 2.5)	8.3 x 10 ⁻¹¹
Alelos					
C	1257 (76%)	1377 (85%)	T vs. C	1.9 (1.6 – 2.2)	6.1x 10 ⁻¹²
T	399 (24%)	235 (15%)			

Alelo T comum confere o risco $p < 0,0001$ OR=1,8 (1,3 a 2,2)

Indivíduos do grupo caso homocigotos para o alelo T (6.5%) apresentaram risco elevado de 200% para progressão da doença, com risco variando de 81% a 400% ($p = 8,3 \times 10^{-11}$) quando comparados aos indivíduos que são homocigotos para o alelo C. Da mesma forma, os portadores do alelo T (TT + CT) apresentaram risco 193% de desenvolver a doença quando comparados com homocigotos CC (OR, 2.0; IC de 95%, 1.6 – 2.5; $P = 8.3 \times 10^{-11}$). Indivíduos heterocigotos (CT) têm um risco de 90% para o desenvolvimento da LC com relação aos indivíduos homocigotos CC (OR, 1.9; IC 95%, 1.5 – 2.3; $P = 1.6 \times 10^{-8}$). A presença predominante do alelo T em pacientes com LC infectados por *L. guyanensis* confere risco elevado para desenvolver a doença (OR, 1.9; IC de 95%, 1.55 – 2.20; $P = 6.1 \times 10^{-12}$).

Devido à diferença entre a distribuição de sexo em ambos grupos, pacientes e controles, estratificamos os participantes deste estudo por sexo para averiguar se a associação do alelo T é dependente do sexo. Conforme exibido na **tabela 4**, as frequências genóticas são semelhantes entre homens e mulheres no grupo de pacientes com LC, o mesmo resultado se repetiu no grupo controle. A distribuição dos genótipos se encontra de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg em todos os grupos estratificados. Indivíduos do sexo masculino e feminino portadores homozigotos do alelo T apresentaram risco elevado de 200% (OR, 3.0; IC 95%, 1.7 – 5.50; $P = 1.7 \times 10^{-4}$) e 180% (OR, 2.8; IC 95%, 1.0 – 7.7; $P = 0.04$), para desenvolvimento da doença. Além disso, os portadores do alelo T apresentaram um risco elevado de 100% (OR, 2.0; IC de 95%, 1.5 – 2.7; $P_{\text{adj}} / \text{idade} = 5.2 \times 10^{-7}$) e 160% (OR, 2.6; IC de 95%, 1.6 – 4.2; $P_{\text{adj}} / \text{idade} = 7.5 \times 10^{-5}$) para homens e mulheres, respectivamente. Destarte a associação do alelo T com a leishmaniose cutânea causada por *L. guyanensis* não depende do sexo.

Tabela 4. Distribuição e comparação das frequências genóticas e alélicas entre pacientes com LC e indivíduos controles estratificados por sexo.

Frequência dos Genótipos e Alelos				
rs11805303	Pacientes com LC		Controles	
	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres
Genótipos	N=620	N=208	N=561	N=245
CC	362 (58.4%)	121(58.2%)	410 (73.1%)	183 (74.7%)
CT	215 (34.7%)	76 (36.5%)	135 (24.1%)	56 (22.9%)
TT	43 (6.90%)	11 (5.30%)	16 (2.90%)	6 (2.40%)
Alelos				
C	939 (76%)	318 (76%)	955 (85%)	422 (86%)
T	301 (24%)	98 (24%)	167 (15%)	68 (14%)
Comparações estatísticas entre pacientes com LC e Controles				
Modelos de herança	Homens		Mulheres	
	OR [CI 95%]	Valor de P	OR [CI 95%]	Valor de P
Codominante				
CC				
CT	1.9 [1.4 - 2.6]	1.1 x 10 ⁻⁶	2.6 [1.6 - 4.3]	4.0 x 10 ⁻⁴
TT				
Dominante				
CC vs CT+TT	2.0 [1.5 - 2.7]	5.2 x 10 ⁻⁷	2.6 [1.6 - 4.2]	7.5 x 10 ⁻⁵
Recessivo				
CC+CT vs.TT	2.6 [1.4 - 4.9]	2.6 x 10 ⁻³	1.9 [0.6 - 6.1]	2.6 x 10 ⁻¹
Comparação dos Genótipos				
TT vs CC	3.0 [1.7 - 5.5]	1.7 x 10 ⁻⁴	2.8 [1.0 – 7.7]	0.04
CT vs. CC	1.8 [1.4 - 2.3]	6.4 x 10 ⁻⁶	2.1 [1.4 – 3.1]	6.1 x 10 ⁻⁴
T vs. C	1.8 [1.5 - 2.3]	1.1 x 10 ⁻⁸	1.9 [1.4 – 2.7]	1.7 x 10 ⁻⁴
Alelo T comum confere o risco (OR= 1.77; P= 1.2 x 10⁻⁴)			(OR= 1.8; P= 2.1 x 10⁻⁴)	

6.3 Níveis plasmáticos circulantes de IL-17 e IL-6

As citocinas IL-17 e IL-6 desempenham um importante papel para a diferenciação das células Th17, produtoras de IL-17, e atuam em conjunto com TNF- α e IFN- γ aumentando a inflamação. Portanto foi de interesse investigar se a presença do polimorfismo exerce efeitos sobre as concentrações dessas citocinas secretadas no plasma dos indivíduos do grupo caso.

Os níveis plasmáticos de IL-17 foram baixos entre os controles quando comparados com os pacientes com LC. Similarmente, não foi diferente para os genótipos do SNP rs11805303 nos controles, pacientes com LC e os totais (pacientes com LC + controles) como mostrado na **figura 19**. Quando estratificamos por sexo, pacientes com LC do sexo masculino homozigotos para o alelo T apresentaram altos níveis de IL-17 (média \pm SEM; 12.4 ± 2.9 pg / mL) quando comparados com indivíduos homozigotos para o alelo C (7.9 ± 0.47 pg / mL) e indivíduos heterozigotos (CT) (7.67 ± 0.85 pg / mL) ($P_{\text{adj}} / \text{idade} = 0.03$). Essa tendência não foi observada entre homens do grupo controle nem em mulheres com LC.

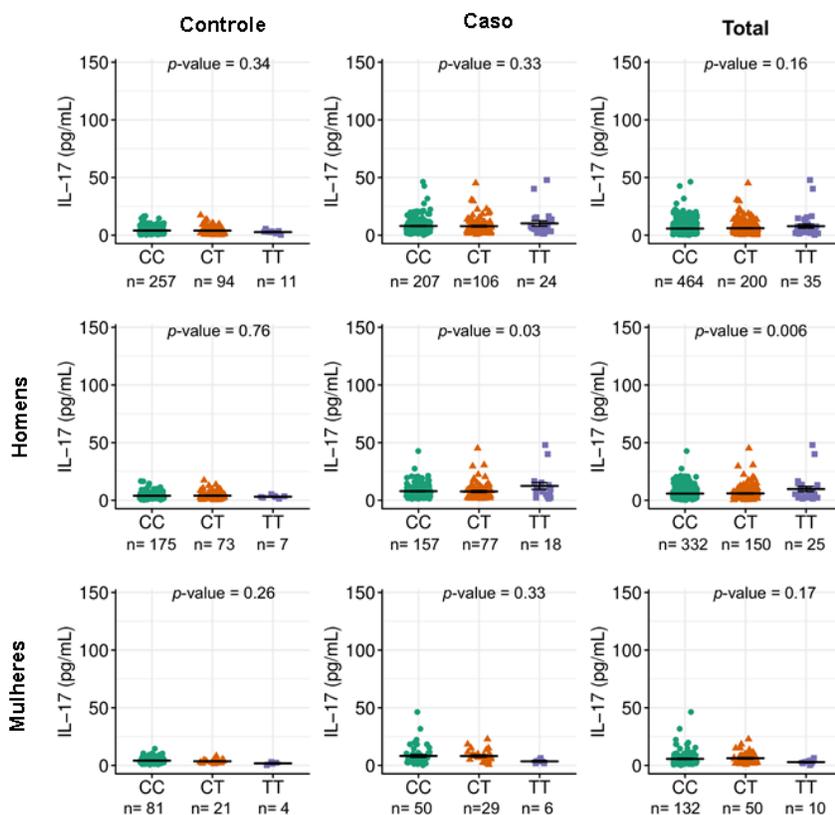


Figura 19. Níveis plasmáticos da IL -17 para os genótipos (CC-CT-TT) da variante rs11805303 do gene *IL-23R* em indivíduos saudáveis, pacientes com LC e total e estratificados por sexo. As concentrações estão em picogramas por mililitro (pg / mL). Os valores P são ajustados por idade. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Experimentos em camundongos deficientes para subunidade p19 ou tratados com anticorpos que bloqueiam p19 ou *IL-23R* mostraram uma redução na produção de IL-6 [155,156]. As comparações plasmáticas da IL-6 com os genótipos estão exibidas na **figura 20**. Os resultados demonstraram uma tendência no aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 apenas em pacientes do sexo masculino homocigotos TT (1.1 ± 0.21 pg / mL) quando comparado com homocigotos CC (0.70 ± 0.04 pg / mL) e heterocigotos CT (0.66 ± 0.07).

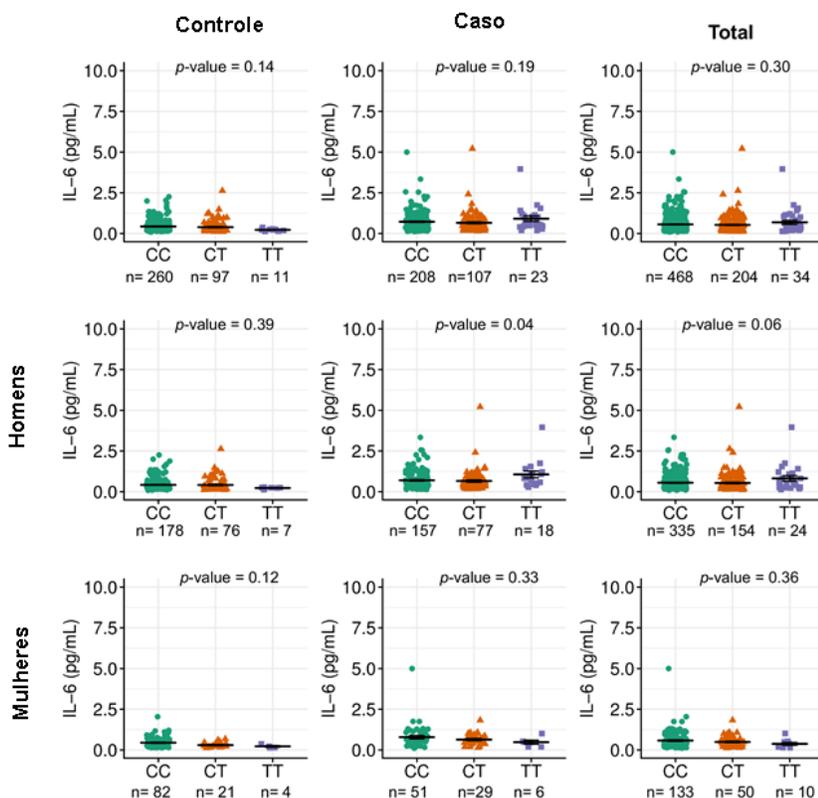


Figura 20: Níveis plasmáticos da IL-6 para os genótipos (CC-CT-TT) da variante rs11805303 do gene *IL-23R* em indivíduos saudáveis, pacientes com LC e total, estratificados por sexo. As concentrações estão em picogramas por mililitro (pg / mL). Os valores P são ajustados por idade. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6.4 Comparação de IFN- γ , IL-1 β e TNF- α em indivíduos homozigotos T/T versus CC

Os níveis plasmáticos de IFN- γ , IL-1 β e TNF- α são mostrados nas **figuras 21,22,23**. Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que um haplótipo no gene *IFNG* está associado à baixos níveis plasmáticos de IFN- γ o qual conferiu suscetibilidade para desenvolvimento da LC [157]. Castellucci, demonstrou em seu estudo de GWAS (do inglês, *GenomeWide Association Study*) vários *loci* de riscos genéticos por meio da regulação positiva de IFN- γ e antisense RNA1 [158]. Os níveis de IFN- γ em homens com LC foram semelhantes entre os genótipos, enquanto em pacientes do sexo feminino, os indivíduos homozigotos para o alelo T mostraram baixa produção de IFN- γ (15.4 ± 2.2 pg

/ mL) em comparação com homozigotos CC ($32.5 \pm 5.7\text{pg} / \text{mL}$), porém sem significância estatística.

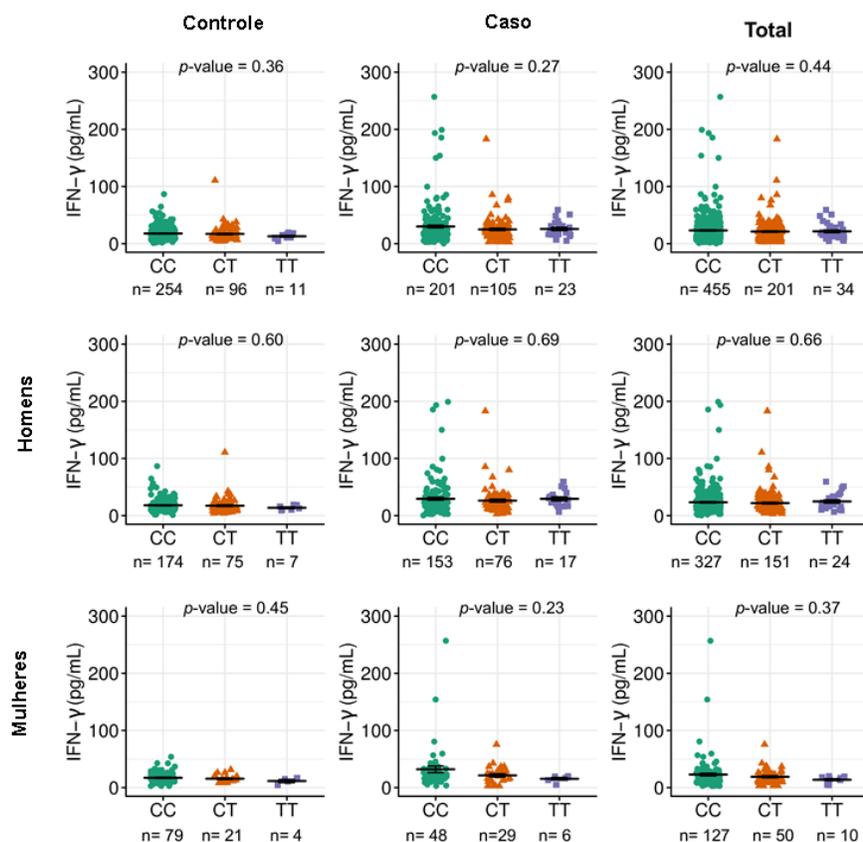


Figura 21: Níveis plasmáticos de IFN- γ para os genótipos (CC-CT-TT) da variante rs11805303 do gene *IL-23R* em indivíduos saudáveis, pacientes com LC e total, estratificados por sexo. As concentrações estão em picogramas por mililitro (pg / mL). Os valores P são ajustados por idade. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

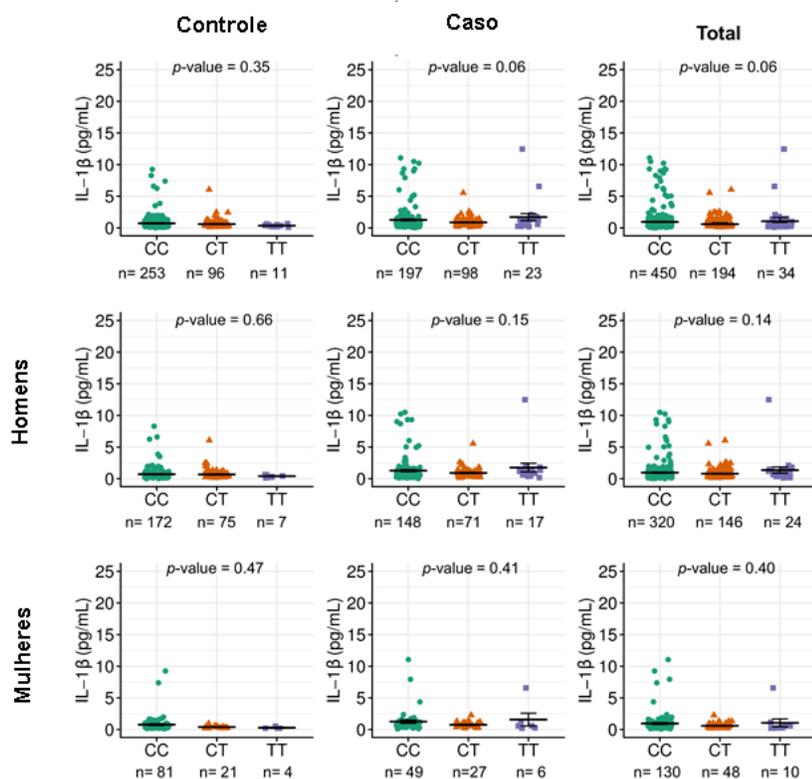


Figura 22: Níveis plasmáticos de IL-1 β para os genótipos (CC-CT-TT) da variante rs1805303 do gene *IL-23R* em indivíduos saudáveis, pacientes com LC e total, estratificados por sexo. As concentrações estão em picogramas por mililitro (pg / mL). Os valores P são ajustados por idade. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

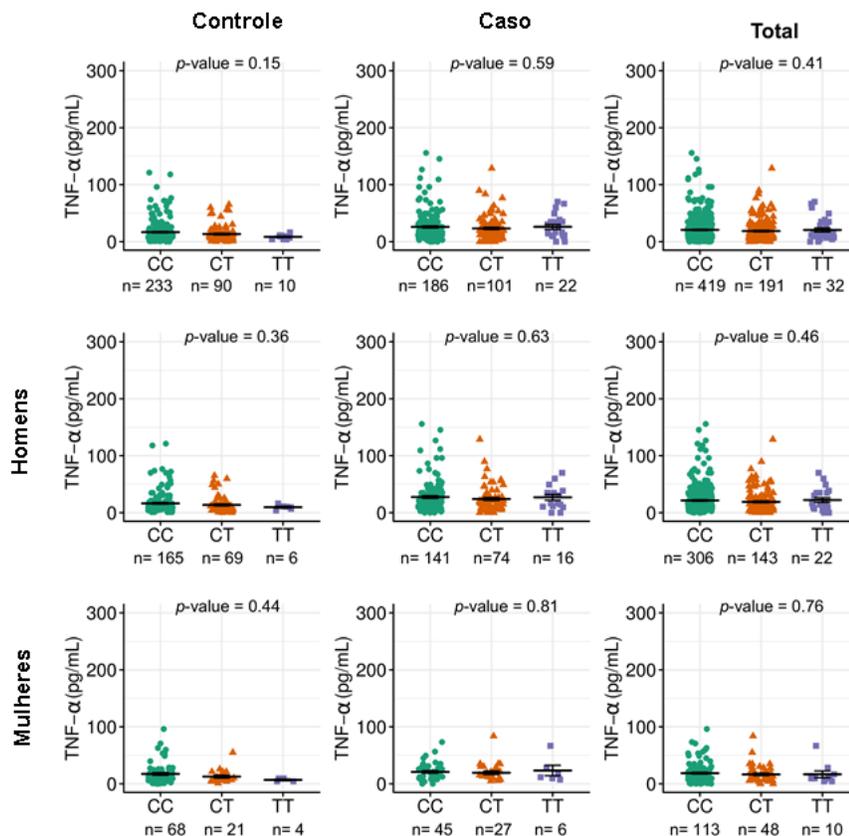


Figura 23: Níveis de plasmáticos de TNF- α para os genótipos (CC-CT-TT) da variante rs11805303 do gene *IL-23R* em indivíduos saudáveis, pacientes com LC e total, estratificados por sexo. As concentrações estão em picogramas por mililitro (pg / mL). Os valores P são ajustados por idade. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

A citocina TGF β , na presença de IL-6 em camundongos e IL-1 β em humanos, desencadeia uma diferenciação de células T auxiliares CD⁺ naive no subconjunto de células Th17 [159]. Pacientes homozigotos TT, mulheres (1.6 ± 1.0 pg / mL) e homens (1.75 ± 0.7 pg / mL), apresentaram níveis elevados de IL-1 β ao contrário de indivíduos homozigotos CC (mulheres; 1.25 ± 0.27 e homens; 1.27 ± 0.16 pg / mL). TNF- α e IL-1 β podem aumentar simultaneamente a expressão de IL-6, que pode ainda estar envolvidas na diferenciação de células naive em Th17 [160]. A distribuição de TNF- α foi semelhante entre os genótipos em pacientes do sexo masculino e feminino.

7. DISCUSSÃO

Os mecanismos imunológicos e a patogênese da leishmaniose ainda não foram totalmente esclarecidos e compreendidos. Uma desregulação na resposta inflamatória do hospedeiro pode se relacionar ao aparecimento de várias lesões tegumentares. Obter uma compreensão da imunogenética do hospedeiro frente a leishmaniose cutânea pode contribuir para esclarecer os mecanismos que levam à progressão da doença em indivíduos geneticamente suscetíveis infectados por *Leishmania*. Notavelmente, apenas uma proporção de indivíduos infectados por *Leishmania* que vivem em áreas endêmicas para leishmaniose cutânea desenvolvem a doença.

Linfócitos diferenciados em subconjunto Th17 e interação no eixo IL-17/IL23 desempenham um papel crucial nas respostas inflamatórias de doenças infecciosas [161], além de que várias variantes nos genes do eixo IL-23/IL23R foram associadas a doenças autoimunes, inflamatórias intestinais e doença de Crohn [162].

Até o presente momento existem apenas dois estudos de variantes no gene da *IL-23R* em doenças infecciosas causadas por protozoários. Um dos estudos é a associação de haplótipos *IL23R* [163] e o outro é uma variante rs6682413 situada entre os genes *IL23R* e *IL12RB2* com malária grave que foram relatados [164]. Por sinal, existe uma região intergênica que regula a expressão de citocinas do eixo IL-17/IL-23. Mizuki e colaboradores mostraram uma associação de polimorfismos nesta região com suscetibilidade com doença de Behçet, doença inflamatória autoimune [165].

Na população sul asiática, dois estudos reportaram associações do polimorfismo rs11805303. Niriella e colaboradores mostraram que o alelo T também foi mais presente em pacientes promovendo risco para IBD (do inglês, *inflammatory bowel disease*) [166]. Outro estudo, mostrou que a presença das variantes alelo G rs2275913 no gene *IL17A*, do alelo T rs11805303 no gene *IL23R* e um haplótipo no gene *IL23R* (rs11805303 e rs7517847) foram associados ao risco em pacientes coliti ulcerativa [167]. Neste estudo, demonstramos que o alelo T da variante rs11805303 do gene *IL-23R* está associado à

suscetibilidade a LC provocada por *L. guyanensis* e indivíduos homozigotos para o alelo T possuem um risco muito elevado de desenvolver a doença.

As citocinas IL-6, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α e IL-17 tiveram seus níveis mais elevados em pacientes com LC do que em indivíduos saudáveis. Foi demonstrado que o TGF β juntamente com a IL-6 ou IL-1 β que regula negativamente o FOXP3, o que acarreta para uma diminuição das células T regulatórias, que conseqüentemente causa o aumento da ativação do fator de transcrição ROR γ t e a diferenciação de células naive em subconjunto Th17, motivo pelo qual as células T reguladoras perdem o seu efeito controlador sobre a resposta imunológica que pode acabar com um possível desequilíbrio na resposta imune do hospedeiro [168]. Além disso, TNF- α e IL-1 β podem aumentar sinergicamente a expressão de IL-6 [160]. As formas amastigotas de *L. braziliensis* especificamente, são capazes de induzirem a produção de IL-1 β , IL-6 e TGF β em células PBMC de indivíduos de áreas endêmicas [168]. Curiosamente, neste estudo, homozigotos TT do gênero masculinos têm IL-6, IL-1 β e IL-17 relativamente elevados nos níveis plasmáticos o que difere dos portadores do alelo C.

Variantes do IFNG e IFNG-AS1 que possuem associação com os baixos níveis de IFN- γ estão em maior risco de desenvolver LC [157,158]. Portanto, pode-se supor que indivíduos infectados por *L. guyanensis* produzem baixos níveis de IFN- γ e portadores do alelo T da variante rs11805303 são mais vulneráveis ao desenvolvimento da doença por uma produção elevada de células Th17 que contribuem para a patogênese. É importante ressaltar que a associação do alelo T com a Leishmaniose Cutânea causada por *L. guyanensis* não é absoluta, mas é entre outros, um alelo de risco que atuam sinergicamente em um ambiente favorável para o desenvolvimento da doença em indivíduos que são geneticamente suscetíveis.

Embora, o alelo T esteja associado a um risco maior de desenvolver a LC entre mulheres, ele não está associado com a citocina IL-17. Surpreendentemente mulheres com genótipos homozigotos TT com LC produziram níveis plasmáticos de IFN- γ menor que seus respectivos homozigotos CC, enquanto que em homens os níveis plasmáticos

de IFN- γ são semelhantes entre os genótipos. Até o momento não temos explicações para essa discordância e mais estudos são necessários para poder elucidar essa discrepância.

Vários estudos demonstraram que a IL23 possui um papel central na patogênese de doenças inflamatórias crônicas [162,166,155]. Na resposta imune inata células como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos são capazes de produzir e liberar para o microambiente citocina IL-23 via sinalização dos receptores TLR, o qual transloca para o núcleo fatores de transcrição como NF- κ B [169]. De fato, no local da infecção por *Leishmania*, o aumento da infiltração de neutrófilos foi observado [146]. A IL-23 liberada por monócitos / macrófagos ativados e células apresentadores de antígenos, liga-se a IL-23R para induz a expressão ROR γ t para transcrever IL-17 e, assim, manter e proliferar as células Th17 junto com TNF- α , IL-1 β e IL-6 [170,171]. Níveis elevados dessas citocinas provavelmente participam da patogênese da LC em indivíduos portadores do alelo T da variante rs11805303 de IL-23R associado à doença.

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que estimula fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e epiteliais a secretarem mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-6, NOS e metaloproteases para induzir inflamação [172,173]. A IL-23 pode ativar subconjuntos de macrófagos e células dendríticas que expressam IL-23R para produzir citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1 β [174]. Neste estudo o nível plasmático da IL-17 é maior em pacientes com LC e está de acordo com o estudo em pacientes infectados por *L. tropica* com LC [149].

Níveis elevados de IL-17 são correlacionados com a magnitude do infiltrado celular em pacientes com LC infectados por *L. braziliensis* [145]. Além disso a presença de IL-17 foi encontrada em lesões cutâneas de pacientes com LC [146,149]. Todos esses estudos apontam para a influência das células Th17 em potencializar processos inflamatórios na infecção por *Leishmania* e contribuir para a patogênese da doença.

O papel biológico da variante rs11805303 presente no gene *IL-23R* e seu efeito na funcionalidade do gene é ainda desconhecida, porém não pode ser descartada a hipótese de que esta variante possa estar em desequilíbrio de ligação com outra variante fora do gene da *IL-23R* podendo estar envolvida na sua regulação. Contudo, identificamos a variante rs11805303 como fator de risco para o desenvolvimento de LC causada por *L. guyanensis*, fornecendo um possível papel no envolvimento molecular do eixo IL-23/IL-17 na imunopatogênese da doença.

8. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVA

Os indivíduos saudáveis deste estudo não foram submetidos ao teste de reação intradérmica de Montenegro com objetivo de comprovar a presença do parasito da *Leishmania* nesse grupo, sendo está a principal limitação do estudo. Entretanto, esta limitação não intervém nos resultados pois esses indivíduos são residentes das áreas endêmicas por mais de 5 anos, tendo em vista que a população do estudo são trabalhadores rurais. O baixo n amostral no grupo de indivíduos homozigotos TT nas análises de citocinas se deu pelo fato da frequência alélica de T ser menos frequente na população de estudo.

9. CONCLUSÃO

Através dos resultados alcançados neste estudo pode-se concluir que o SNP rs11805303 presente no gene *IL-23R* demonstrou uma associação a indivíduos portadores do genótipo TT para desenvolvimento da LC causada por *L. guyanensis* na população estudada. O resultado da LC pode ser influenciado por polimorfismos genéticos em diferentes concentrações de citocinas como a IL-17, IL-6 e IL1- β como demonstrado neste estudo afetando o equilíbrio e ação da resposta imune frente a infecção por *L. guyanensis*. Portanto, mais estudos são necessários para mostrar possível influência de SNPs em desequilíbrio de ligação na regulação do gene *IL23R*.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Res*. 2017 May 26; 6: 750.
2. Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica*. 1994;10 Suppl 2: 359-75.
3. BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana [livro online]. 2ª ed. Brasília: Editora Ministério da Saúde, 2007.
4. Shaw, Jeffrey. (1997). Ecological and evolutionary pressures on leishmanial parasites. *Brazilian Journal of Genetics*, 20.
5. Shlomai J. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Curr Mol Med*. 2004 Sep; 4 (6): 623-47.
6. Bifeld E, Clos J. The genetics of *Leishmania* virulence. *Med Microbiol Immunol*. 2015 Dec; 204 (6): 619-34.
7. Bates PA, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med*. 2004 Sep; 4 (6): 601-9.
8. Wheeler RJ, Sunter JD, Gull K. Flagellar pocket restructuring through the *Leishmania* life cycle involves a discrete flagellum attachment zone. *J Cell Sci*. 2016 Feb 15; 129 (4): 854-67.
9. Bouazizi-Ben Messaoud H, Guichard M, Lawton P, Delton I, Azzouz-Maache S. Changes in Lipid and Fatty Acid Composition During Intramacrophagic Transformation

of *Leishmania donovani* Complex Promastigotes into Amastigotes. *Lipids*. 2017 May;52 (5): 433-441.

10. Grimaldi G Jr, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*. 1993 Jul; 6 (3): 230-50.
11. Anversa L, Tiburcio MGS, Richini-Pereira VB, Ramirez LE. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2018 Mar; 64 (3): 281-289.
12. Borges AF, Gomes RS, Ribeiro-Dias F. *Leishmania (Viannia) guyanensis* in tegumentary leishmaniasis. *Pathog Dis*. 2018 Jun 1; 76 (4).
13. Floch H. *Leishmania tropica guyanensis* n. ssp., cause of cutaneous leishmaniasis in the Guianas and Central America. *Publ Inst Pasteur Guyane Fr Inini*. 1954; 15 (328): 1-4.
14. Benício E, Cordeiro M, Monteiro H, Saboia Moura MA, Oliveira C, *et al.*. Sustained Presence of Cutaneous Leishmaniasis in Urban Manaus, the Largest Human Settlement in the Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2015 Dec; 93 (6): 1208-13.
15. Camara Coelho LI, Paes M, Guerra JA, Barbosa Md, Coelho C, Lima B, Brito ME, Brandão Filho SP. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Res*. 2011 Mar;108 (3): 671-7.
16. Romero GA, Vinitius De Farias Guerra M, Gomes Paes M, de Oliveira Macêdo V. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. *Clin Infect Dis*. 2001 May 1; 32 (9): 1304-12.
17. Prestes Suzane Ribeiro, Guerra Jorge Augusto de Oliveira, Romero Gustavo Adolfo Sierra, Magalhaes Laylah Kelre Costa, Santana Rosa Amelia Gonçalves, Maciel

Marcel Gonçalves *et al.* Polymerase chain reaction-based method for the identification of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in mucosal tissues conserved in paraffin. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [Internet]. 2015.

18. Benicio Ede A, Gadelha EP, Talhari A, Silva RM Jr, Ferreira LC, Santos MC, Mira MT, Oliveira CM, Talhari C, Talhari S, Machado PR, Schriefer A. Combining diagnostic procedures for the management of leishmaniasis in areas with high prevalence of *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol.* 2011 Nov-Dec; 86 (6).
19. Pacheco RS, Fernandes O, Salinas G, Segura I, Momen H, Degraeve W, Saravia NG, Campbell DA. Intraspecific heterogeneity in the mini-exon gene localization of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* from Colombia. *J Parasitol.* 2000 Dec;86 (6):1250-3.
20. Rotureau B, Ravel C, Nacher M, Couppié P, Curtet I, Dedet JP, Carme B. Molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) guyanensis* in French Guiana. *J Clin Microbiol.* 2006 Feb;44 (2): 468-73.
21. Fonseca MS, Comini MA, Resende BV, Santi AM, Zoboli AP, Moreira DS, Murta SM. Ornithine decarboxylase or gamma-glutamylcysteine synthetase overexpression protects *Leishmania (Vianna) guyanensis* against antimony. *Exp Parasitol.* 2017 Apr; 175: 36-43.
22. Torres DC, Adauí V, Ribeiro-Alves M, Romero GA, Arévalo J, Cupolillo E, Dujardin JC. Targeted gene expression profiling in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania guyanensis* parasites isolated from Brazilian patients with different antimonial treatment outcomes. *Infect Genet Evol.* 2010 Aug; 10 (6):727-33.
23. Monte-Neto R, Laffitte MC, Leprohon P, Reis P, Frézard F, Ouellette M. Intrachromosomal amplification, locus deletion and point mutation in the

aquaglyceroporin AQP1 gene in antimony resistant *Leishmania (Viannia) guyanensis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Feb 13; 9 (2).

24. Sharma U, Singh S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*. 2008 Dec; 45 (4): 255-72. Retraction in: *J Vector Borne Dis*. 2012 Mar; 49 (1): 54.
25. Pakpour N, Riehle MA, Luckhart S. Effects of ingested vertebrate-derived factors on insect immune responses. *Curr Opin Insect Sci*. 2014 Sep 1; 3: 1-5.
26. Svensjö E, Saraiva EM, Amendola RS, Barja-Fidalgo C, Bozza MT, Lerner EA, Teixeira MM, Scharfstein J. Maxadilan, the *Lutzomyia longipalpis* vasodilator, drives plasma leakage via PAC1-CXCR1/2-pathway. *Microvasc Res*. 2012 Mar; 83 (2): 185-93.
27. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. 2007 Aug; 37 (10): 1097-106.
28. Secundino NF, Eger-Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta PF. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *J Med Entomol*. 2005 Nov; 42 (6): 928-38.
29. Muskus CE, Marín Villa M. Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. *Biomedica*. 2002 Jun; 22 (2): 167-77. Spanish.
30. McConville MJ, Turco SJ, Ferguson MA, Sacks DL. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J*. 1992 Oct; 11(10): 3593-600.
31. Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K, Shio MT. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect*. 2012 Dec; 14 (15): 1377-89.

32. Ribeiro JM, Vachereau A, Modi GB, Tesh RB. A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Science*. 1989 Jan 13; 243 (4888): 212-4.
33. Lerner EA, Ribeiro JM, Nelson RJ, Lerner MR. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem*. 1991 Jun 15; 266 (17): 11234-6.
34. Puentes SM, Da Silva RP, Sacks DL, Hammer CH, Joiner KA. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol*. 1990 Dec 15; 145 (12): 4311-6.
35. Blackwell JM. Role of macrophage complement and lectin-like receptors in binding *Leishmania* parasites to host macrophages. *Immunol Lett*. 1985; 11(3-4): 227-32.
36. Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol*. 1995 Sep 15; 155 (6): 3102-11.
37. Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, Cos P. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med*. 2011 Jul 15; 51 (2): 337-51.
38. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med*. 2000 Jul; 109 (1): 33-44.
39. Sørensen AL, Hey AS, Kharazmi A. *Leishmania major* surface protease Gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. *APMIS*. 1994 Apr; 102 (4): 265-71.

40. Podinovskaia M, Descoteaux A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol.* 2015; 10 (1): 111-29.
41. Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Exp Mol Pathol.* 2002 Apr; 72 (2): 132-41.
42. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) acessado em 11 de outubro de 2020 <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>.
43. Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar Americana. *Rev. Soc. Bras. Med Trop.* 2003; 36: 71-80.
44. Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010 Apr; 8 (4): 419-33.
45. de Faria MF, Ferreira MBG, Felix MMDS, Calegari IB, Barbosa MH. Factors associated with skin and mucosal lesions caused by medical devices in newborns: Observational study. *J Clin Nurs.* 2019 Nov; 28 (21-22): 3807-3816.
46. Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC. Mucosal leishmaniasis Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop.* 2008 Jan; 105 (1): 1-9.
47. World Health Organization W. Cutaneous Leishmaniasis. World Health Organization, (WHO) and Pan-American Health Organization, (PAHO/WHO) 2019.
48. Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008; 2 (10): e 313.
49. Okwor I, Uzonna J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2016 Mar;94(3):489-93.

50. Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, Savioli L. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med*. 2007 Sep 6; 357 (10): 1018-27.
51. Karimkhani C, Wanga V, Coffeng LE, Naghavi P, Dellavalle RP, Naghavi M. Global burden of cutaneous leishmaniasis: a cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect Dis*. 2016 May; 16 (5): 584-591.
52. Brandão E, Romero S, da Silva MAL, Santos FLN. Neglected tropical diseases in Brazilian children and adolescents: data analysis from 2009 to 2013. *Infect Dis Poverty*. 2017 Nov 3; 6 (1): 154.
53. McIlwee BE, Weis SE, Hosler GA. Incidence of Endemic Human Cutaneous Leishmaniasis in the United States. *JAMA Dermatol*. 2018 Sep 1; 154 (9): 1032-1039.
54. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), Ministério da Saúde (MS) [Homepage] Boletim Epidemiológico [acessado - 11/04/2021] disponível: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>.
55. Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado [homepage]. SINAM. Leishmaniose (LTA) notificada na FMT-HVD – 2015-2017. [acesso -11/04/2020]. Disponível:http://www.fmt.am.gov.br/layout2011/vigiweb/vg_2018/Doencas_e_Agravoslist.asp.
56. Oryan A, Akbari M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pac J Trop Med*. 2016 Oct; 9 (10): 925-932.
57. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004 Sep; 27 (5): 305-18.
58. Carneiro FRO, Amin GA, Cruz LBP, Daher BA. Urban American cutaneous leishmaniasis. *An Bras Dermatol*. 2018 Jan-Feb; 93 (1): 156-158.

59. Lindoso JA, Cunha MA, Queiroz IT, Moreira CH. Leishmaniasis-HIV coinfection: current challenges. *HIV AIDS (Auckl)*. 2016 Oct 7; 8: 147-156.
60. Zijlstra EE. PKDL and other dermal lesions in HIV co-infected patients with Leishmaniasis: review of clinical presentation in relation to immune responses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Nov 20; 8 (11): e 3258.
61. Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infect Dis*. 2008 Mar; 8 (3): 191-9.
62. Mans DR, Kent AD, Hu RV, *et al*. Monitoring the response of patients with cutaneous leishmaniasis to treatment with pentamidine isethionate by quantitative real-time PCR, and identification of *Leishmania* parasites not responding to therapy. *Clin Exp Dermatol*. 2016 Aug; 41 (6): 610-5.
63. Romero GA, Vinitius De Farias Guerra M, Gomes Paes M, de Oliveira Macêdo V. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. *Clin Infect Dis*. 2001 May 1; 32 (9): 1304-12.
64. Gadelha EP, Talhari S, Guerra JA, Neves LO, Talhari C, Gontijo B, Silva Junior RM, Talhari AC. Efficacy and safety of a single dose pentamidine (7mg/kg) for patients with cutaneous leishmaniasis caused by *L. guyanensis*: a pilot study. *An Bras Dermatol*. 2015 Nov-Dec; 90 (6): 807-13.
65. Arevalo J, Ramirez L, Adai V, *et al*. Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2007 Jun 15; 195 (12): 1846-51.

66. Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Chrusciak Talhari C, *et al.* Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Feb; 84 (2): 255-60.
67. Ginouvès M, Simon S, Nacher M, Demar M, Carme B, Couppié P, Prévot G. In Vitro Sensitivity of Cutaneous *Leishmania* Promastigote Isolates Circulating in French Guiana to a Set of Drugs. *Am J Trop Med Hyg.* 2017 May; 96 (5): 1143-1150.
68. Francesconi VA, Francesconi F, Ramasawmy R, Romero GAS, Alecrim MDGC. Failure of fluconazole in treating cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania guyanensis* in the Brazilian Amazon: An open, nonrandomized phase 2 trial. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 Feb 26; 12 (2): e 0006225.
69. de Mendonça SC, Cysne-Finkelstein L, Matos DC. Kinetoplastid Membrane Protein-11 as a Vaccine Candidate and a Virulence Factor in *Leishmania*. *Front Immunol.* 2015 Oct 13; 6: 524.
70. Abbas AK, Lichtman AH, PILLAI SIV. *Imunologia celular e molecular.* 9. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.
71. Casanova JL, Abel L. The genetic theory of infectious diseases: a brief history and selected illustrations. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2013; 14: 215-43.
72. Somech R, Amariglio N, Spierer Z, Rechavi G. Genetic predisposition to infectious pathogens: a review of less familiar variants. *Pediatr Infect Dis J.* 2003 May; 22 (5): 457-61.
73. Giraud E, Lestina T, Derrick T, *et al.* *Leishmania* proteophosphoglycans regurgitated from infected sand flies accelerate dermal wound repair and exacerbate leishmaniasis

via insulin-like growth factor 1-dependent signalling. *PLoS Pathog.* 2018 Jan 19; 14 (1): e1006794.

74. Gomes R, Cavalcanti K, Teixeira C, Carvalho AM, Mattos PS, Cristal JR, Muniz AC, Miranda JC, de Oliveira CI, Barral A. Immunity to *Lutzomyia whitmani* Saliva Protects against Experimental *Leishmania braziliensis* Infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Nov 3; 10 (11): e0005078.
75. Gurung P, Kanneganti TD. Innate immunity against *Leishmania* infections. *Cell Microbiol.* 2015 Sep;17 (9): 1286-94.
76. Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* 2016 Sep; 16 (9): 581-92.
77. Goncalves R, Zhang X, Cohen H, Debrabant A, Mosser DM. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *J Exp Med.* 2011 Jun 6; 208 (6): 1253-65.
78. Dyer DP, Thomson JM, Hermant A, Jowitt TA, Handel TM, Proudfoot AE, Day AJ, Milner CM. TSG-6 inhibits neutrophil migration via direct interaction with the chemokine CXCL8. *J Immunol.* 2014 Mar 1; 192 (5): 2177-85.
79. Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceição-Silva F, Saraiva EM. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Apr 21;106(16):6748-53.
80. Chagas AC, Oliveira F, Debrabant A, Valenzuela JG, Ribeiro JM, Calvo E. Lundepe, a sand fly salivary endonuclease increases *Leishmania* parasite survival in neutrophils and inhibits XIIa contact activation in human plasma. *PLoS Pathog.* 2014 Feb 6; 10 (2): e1003923.

81. de Souza Carmo EV, Katz S, Barbiéri CL. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. *PLoS One*. 2010 Nov 3; 5 (11): e13815.
82. Novais FO, Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A, de Oliveira CI. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J Immunol*. 2009 Dec 15; 183 (12): 8088-98.
83. Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol*. 2003 May; 11 (5): 210-4.
84. Shapira M, Zinoviev A. *Leishmania* parasites act as a Trojan horse that paralyzes the translation system of host macrophages. *Cell Host Microbe*. 2011 Apr 21; 9 (4):257-9.
85. Pedraza-Zamora CP, Delgado-Domínguez J, Zamora-Chimal J, Becker I. Th17 cells and neutrophils: Close collaborators in chronic *Leishmania mexicana* infections leading to disease severity. *Parasite Immunol*. 2017 Apr; 39 (4).
86. Gonzalez-Leal IJ, Röger B, Schwarz A, Schirmeister T, Reinheckel T, Lutz MB, Moll H. Cathepsin B in antigen-presenting cells controls mediators of the Th1 immune response during *Leishmania major* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Sep 25; 8 (9): e3194.
87. León B, López-Bravo M, Ardavín C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity*. 2007 Apr; 26 (4): 519-31.

88. Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *Int J Mol Sci.* 2017 Jun 18; 18 (6): 1296.
89. Gollob KJ, Viana AG, Dutra WO. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite Immunol.* 2014 Aug; 36 (8): 367-76.
90. Liew FY, Li Y, Millott S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology.* 1990 Dec; 71 (4): 556-9.
91. Wilhelm P, Ritter U, Labbow S, Donhauser N, Röllinghoff M, Bogdan C, Körner H. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *J Immunol.* 2001 Mar 15; 166 (6): 4012-9.
92. Ashkani-Esfahani S, Zarifi F, Asgari Q, Samadnejad AZ, Rafiee S, Noorafshan A. Taurine improves the wound healing process in cutaneous leishmaniasis in mice model, based on stereological parameters. *Adv Biomed Res.* 2014 Oct 7; 3: 204.
93. Dey R, Majumder N, Bhattacharyya Majumdar S, Bhattacharjee S, Banerjee S, Roy S, Majumdar S. Induction of host protective Th1 immune response by chemokines in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice. *Scand J Immunol.* 2007 Dec; 66 (6): 671-83.
94. Santos Cda S, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha A, Costa J, Borges VM, de Oliveira CI, Van Weyenbergh J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI. CD8 (+) granzyme B (+) - mediated tissue injury vs. CD4 (+) IFN γ (+) - mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol.* 2013 Jun; 133 (6): 1533-40.
95. Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessen H, Prata A, Dessen A, Rodrigues V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and

clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum Immunol.* 2009 Jun; 70 (6): 383-90.

96. Baratta-Masini A, Teixeira-Carvalho A, Malaquias LC, Mayrink W, Martins-Filho OA, Corrêa-Oliveira R. Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. *Front Biosci.* 2007 Jan 1; 12: 839-49.
97. Bourreau E, Prévot G, Pradinaud R, Launois P. Unresponsiveness of specific T cells to IL-12 is associated with active cutaneous leishmaniasis owing to *Leishmania guyanensis*. *Scand J Immunol.* 2001 Sep; 54 (3): 335-9.
98. Connor LM, Tang SC, Cognard E, Ochiai S, Hilligan KL, Old SI, Pellefigues C, White RF, Patel D, Smith AA, Eccles DA, Lamiable O, McConnell MJ, Ronchese F. Th2 responses are primed by skin dendritic cells with distinct transcriptional profiles. *J Exp Med.* 2017 Jan ;214 (1): 125-142.
99. Kopf M, Brombacher F, Köhler G, Kienzle G, Widmann KH, Lefrang K, Humborg C, Ledermann B, Solbach W. IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. *J Exp Med.* 1996 Sep 1; 184 (3): 1127-36.
100. Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol.* 2009 Apr; 10 (4): 385-93.
101. Felizardo TC, Gaspar-Elsas MI, Lima GM, Abrahamsohn IA. Lack of signaling by IL-4 or by IL-4/IL-13 has more attenuating effects on *Leishmania amazonensis* dorsal skin--than on footpad-infected mice. *Exp Parasitol.* 2012 Jan; 130 (1): 48-57.
102. Maspi N, Abdoli A, Ghaffarifar F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathog Glob Health.* 2016 Sep; 110 (6): 247-260.

103. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*. 2002 Nov; 2 (11): 845-58.
104. Bourreau E, Gardon J, Pradinaud R, Pascalis H, Prévot-Linguet G, Kariminia A, Pascal L. Th2 responses predominate during the early phases of infection in patients with localized cutaneous leishmaniasis and precede the development of Th1 responses. *Infect Immun*. 2003 Apr; 71 (4): 2244-6.
105. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol*. 2007 Dec; 8 (12): 1390-7.
106. McGeachy MJ, Cua DJ. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity*. 2008 Apr; 28 (4): 445-53.
107. Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, de Andrade J, Dos Santos WL, Clarêncio J, Silva JS, Borges VM, Barral-Netto M, Brodskyn CI, Barral A. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol*. 2010 Oct; 40 (10): 2830-6.
108. Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol*. 2009 Mar 1; 182 (5): 3039-46.
109. Ji J, Masterson J, Sun J, Soong L. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol*. 2005 Jun 1; 174 (11): 7147-53.
110. Ehrlich A, Castilho TM, Goldsmith-Pestana K, Chae WJ, Bothwell AL, Sparwasser T, McMahon-Pratt D. The immunotherapeutic role of regulatory T cells in *Leishmania (Viannia) panamensis* infection. *J Immunol*. 2014 Sep 15; 193 (6): 2961-70.

111. David T, Ling SF, Barton A. Genetics of immune-mediated inflammatory diseases. *Clin Exp Immunol.* 2018 Jul; 193 (1): 3-12.
112. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet.* 2009 Apr; 10 (4): 241-51.
113. Handman E, Elso C, Foote S. Genes and susceptibility to leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2005; 59: 1-75.
114. Fareed, M., & Afzal, M. (2013). Single nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: A tool for broad spectrum service. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 14(2), 123–134.
115. Sakthianandeswaren A, Foote SJ, Handman E. The role of host genetics in leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2009 Aug; 25 (8): 383-91.
116. Blackwell JM, Fakiola M, Ibrahim ME, Jamieson SE, Jeronimo SB, Miller EN, Mishra A, Mohamed HS, Peacock CS, Raju M, Sundar S, Wilson ME. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. *Parasite Immunol.* 2009 May; 31 (5): 254-66.
117. Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis.* 2002 Jun 1; 34 (11): E54-8.
118. Salhi A, Rodrigues V Jr, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, Sertorio M, Rafati S, Chevillard C, Prata A, Alcaïs A, Argiro L, Dessein A. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol.* 2008 May 1; 180 (9): 6139-48.

119. Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Aug; 102 (5): 625-30.
120. Oliveira PR, Dessein H, Romano A, Cabantous S, de Brito ME, Santoro F, Pitta MG, Pereira V, Pontes-de-Carvalho LC, Rodrigues V Jr, Rafati S, Argiro L, Dessein AJ. IL2RA genetic variants reduce IL-2-dependent responses and aggravate human cutaneous leishmaniasis. *J Immunol*. 2015 Mar 15; 194 (6): 2664-72.
121. Weirather JL, Duggal P, Nascimento EL, Monteiro GR, Martins DR, Lacerda HG, Fakiola M, Blackwell JM, Jeronimo SM, Wilson ME. Comprehensive candidate gene analysis for symptomatic or asymptomatic outcomes of *Leishmania infantum* infection in Brazil. *Ann Hum Genet*. 2017 Jan; 81 (1): 41-48.
122. Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*. 1995 Nov 1; 182 (5): 1259-64.
123. Castellucci L, Menezes E, Oliveira J, *et al*. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J Infect Dis*. 2006 Aug 15; 194 (4): 519-27.
124. Ajdary S, Ghamilouie MM, Alimohammadian MH, Riazi-Rad F, Pakzad SR. Toll-like receptor 4 polymorphisms predispose to cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect*. 2011 Mar; 13 (3): 226-31.
125. Ramasawmy R, Menezes E, Magalhães A, Oliveira J, Castellucci L, Almeida R, Rosa ME, Guimarães LH, Lessa M, Noronha E, Wilson ME, Jamieson SE, Kalil J, Blackwell JM, Carvalho EM, de Jesus AR. The -2518bp promoter polymorphism at

CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol.* 2010 Jul; 10 (5): 607-13.

126. da Silva GAV, de Mesquita TGR, de Souza Encarnação HV, do Espírito Santo Junior J, *et al.* A polymorphism in the IL1B gene (rs16944 T/C) is associated with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania guyanensis* and plasma cytokine interleukin receptor antagonist. *Cytokine.* 2019 Nov; 123: 154788.
127. de Araujo FJ, Mesquita TG, da Silva LD, de Almeida SA, de S Vital W, Chrusciak-Talhari A, de O Guerra JA, Talhari S, Ramasawmy R. Functional variations in MBL2 gene are associated with cutaneous leishmaniasis in the Amazonas state of Brazil. *Genes Immun.* 2015 Jun; 16 (4): 284-8.
128. de Araujo FJ, da Silva LD, Mesquita TG, Pinheiro SK, Vital Wde S, Chrusciak-Talhari A, Guerra JA, Talhari S, Ramasawmy R. Polymorphisms in the TOLLIP Gene Influence Susceptibility to Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania guyanensis* in the Amazonas State of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Jun 24; 9 (6): e0003875.
129. Dutra WO, de Faria DR, Lima Machado PR, Guimarães LH, Schriefer A, Carvalho E, Gollob KJ. Immunoregulatory and Effector Activities in Human Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis: Understanding Mechanisms of Pathology. *Drug Dev Res.* 2011 Sep; 72 (6): 430-436.
130. Jefremow A, Neurath MF. All are Equal, Some are More Equal: Targeting IL 12 and 23 in IBD - A Clinical Perspective. *Immunotargets Ther.* 2020 Nov 26; 9: 289-297.
131. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol.* 2005 Jul; 5 (7): 521-31.

132. Floss DM, Schröder J, Franke M, Scheller J. Insights into IL-23 biology: From structure to function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015 Oct; 26 (5): 569-78.
133. Parham C, Chirica M, Timans J, *et al.* A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol.* 2002 Jun 1; 168 (11): 5699-708.
134. Lupardus PJ, Garcia KC. The structure of interleukin-23 reveals the molecular basis of p40 subunit sharing with interleukin-12. *J Mol Biol.* 2008 Oct 17; 382 (4): 931-41.
135. Moschen AR, Tilg H, Raine T. IL-12, IL-23 and IL-17 in IBD: immunobiology and therapeutic targeting. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019 Mar; 16 (3): 185-196.
136. Watford WT, Hissong BD, Bream JH, Kanno Y, Muul L, O'Shea JJ. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol Rev.* 2004 Dec; 202: 139-56.
137. Pastor-Fernández G, Mariblanca IR, Navarro MN. Decoding IL-23 Signaling Cascade for New Therapeutic Opportunities. *Cells.* 2020 Sep 7; 9 (9): 2044.
138. Zhong Z, Su G, Kijlstra A, Yang P. Activation of the interleukin-23/interleukin-17 signalling pathway in autoinflammatory and autoimmune uveitis. *Prog Retin Eye Res.* 2021 Jan; 80: 100866.
139. Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jun; 8 (6): 458-66.
140. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol.* 2006 Jan; 27 (1): 17-23.

141. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, McClanahan TK, O'Shea JJ, Cua DJ. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol.* 2009 Mar; 10 (3): 314-24.
142. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005 Jan 17; 201 (2): 233-40.
143. Wiekowski MT, Leach MW, Evans EW, *et al.* Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit p19 induces multiorgan inflammation, runting, infertility, and premature death. *J Immunol.* 2001 Jun 15; 166 (12): 7563-70.
144. Dietze-Schwonberg K, Lorenz B, Kostka SL, Schumak B, Gessner A, von Stebut E. Insufficient generation of Th17 cells in IL-23p19-deficient BALB/c mice protects against progressive cutaneous leishmaniasis. *Exp Dermatol.* 2018 Jan; 27 (1): 101-103.
145. Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO, Scott P, Carvalho EM. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2009 Jul 1; 200 (1): 75-8.
146. Gonzalez-Lombana C, Gimblet C, Bacellar O, Oliveira WW, Passos S, Carvalho LP, Goldschmidt M, Carvalho EM, Scott P. IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. *PLoS Pathog.* 2013 Mar; 9 (3): e1003243.
147. Araujo Flores GV, Sandoval Pacheco CM, Sosa Ochoa WH, Gomes CMC, Zúniga C, Corbett CP, Laurenti MD. Th17 lymphocytes in atypical cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi* in Central America. *Parasite Immunol.* 2020 Nov; 42 (11): e12772.

148. Gonzalez K, Calzada JE, Corbett CEP, Saldaña A, Laurenti MD. Involvement of the Inflammasome and Th17 Cells in Skin Lesions of Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) panamensis*. *Mediators Inflamm*. 2020 Oct 27; 2020: 9278931.
149. Katara GK, Raj A, Kumar R, Avishek K, Kaushal H, Ansari NA, Bumb RA, Salotra P. Analysis of localized immune responses reveals presence of Th17 and Treg cells in cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. *BMC Immunol*. 2013 Nov 22; 14: 52.
150. Khan D, Ansar Ahmed S. Regulation of IL-17 in autoimmune diseases by transcriptional factors and microRNAs. *Front Genet*. 2015 Jul 14; 6: 236.
151. Gene Card [Homepage] acessado em 24/04/2020 disponível em <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL23R&keywords=IL23R>.
152. Alvar J, Croft SL, Kaye P, Khamesipour A, Sundar S, Reed SG. Case study for a vaccine against leishmaniasis. *Vaccine*. 2013 Apr 18; 31 Suppl 2: B244-9.
153. Khamesipour A, Dowlati Y, Asilian A, Hashemi-Fesharki R, Javadi A, Noazin S, Modabber F. Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine*. 2005 May 25; 23 (28): 3642-8.
154. Noorpisheh Ghadimi S, Farjadian S, Hatam GR, Kalani M, Sarkari B. Vaccination with Live Attenuated *L. Major* and TLR4 Agonist Promotes a Th1 Immune Response and Induces Protection against *L. Major* Infection in BALB/c Mice. *Iran J Immunol*. 2018 Jun; 15 (2): 74-83.
155. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein

- RA, Rennick D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*. 2006 May; 116 (5): 1310-6.
156. Imamura E, Taguchi K, Sasaki-Iwaoka H, Kubo S, Furukawa S, Morokata T. Anti-IL-23 receptor monoclonal antibody prevents CD4+ T cell-mediated colitis in association with decreased systemic Th1 and Th17 responses. *Eur J Pharmacol*. 2018 Apr 5; 824: 163-169.
157. da Silva GAV, Mesquita TG, Souza VC, Junior JDES, Gomes de Souza ML, Talhari AC, Talhari S, Naveca FG, Ramasawmy R. A Single Haplotype of IFNG Correlating With Low Circulating Levels of Interferon- γ Is Associated With Susceptibility to Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania guyanensis*. *Clin Infect Dis*. 2020 Jul 11;71(2):274-281.
158. Castellucci LC, Almeida L, Cherlin S, *et al*. A Genome-Wide Association Study Identifies SERPINB10, CRLF3, STX7, LAMP3, IFNG-AS1 and KRT80 As Risk Loci Contributing to Cutaneous Leishmaniasis In Brazil. *Clin Infect Dis*. 2020 Aug 23: ciaa1230.
159. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006 Feb; 24 (2): 179-89.
160. Ruddy MJ, Wong GC, Liu XK, Yamamoto H, Kasayama S, Kirkwood KL, Gaffen SL. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. *J Biol Chem*. 2004 Jan 23; 279 (4): 2559-67.
161. Bunte K, Beikler T. Th17 Cells and the IL-23/IL-17 Axis in the Pathogenesis of Periodontitis and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019 Jul 10; 20 (14): 3394.

162. Neurath MF. IL-23 in inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019 Feb; 45: 1-8.
163. Munde EO, Raballah E, Okeyo WA, Ong'echa JM, Perkins DJ, Ouma C. Haplotype of non-synonymous mutations within IL-23R is associated with susceptibility to severe malaria anemia in a *P. falciparum* holoendemic transmission area of Kenya. *BMC Infect Dis.* 2017 Apr 20; 17 (1): 291.
164. Ravenhall M, Campino S, Sepúlveda N, Manjurano A, Nadjm B, Mtove G, Wangai H, Maxwell C, Olomi R, Reyburn H, Drakeley CJ, Riley EM, Clark TG; MalariaGEN. Novel genetic polymorphisms associated with severe malaria and under selective pressure in North-eastern Tanzania. *PLoS Genet.* 2018 Jan 30; 14 (1): e1007172.
165. Mizuki N, Meguro A, Ota M, *et al.* Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behçet's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010 Aug; 42 (8): 703-6.
166. Niriella MA, Liyanage IK, Kodisinghe SK, *et al.* Genetic associations of inflammatory bowel disease in a South Asian population. *World J Clin Cases.* 2018 Dec 6; 6 (15): 908-915.
167. Yu P, Shen F, Zhang X, Cao R, Zhao X, Liu P, Tu H, Yang X, Shi R, Zhang H. Association of single nucleotide polymorphisms of IL23R and IL17 with ulcerative colitis risk in a Chinese Han population. *PLoS One.* 2012; 7 (9): e44380.
168. Gomes CM, Ávila LR, Pinto SA, *et al.* *Leishmania braziliensis* amastigotes stimulate production of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TGF- β by peripheral blood mononuclear cells from nonendemic area healthy residents. *Parasite Immunol.* 2014 May; 36 (5): 225-31.

169. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*. 2005 Mar; 22 (3): 285-94.
170. Gooderham MJ, Papp KA, Lynde CW. Shifting the focus - the primary role of IL-23 in psoriasis and other inflammatory disorders. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018 Jul; 32 (7): 1111-1119.
171. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest*. 2006 May;116(5):1218-22.
172. Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004 Oct; 21 (4): 467-76.
173. Nakae S, Saijo S, Horai R, Sudo K, Mori S, Iwakura Y. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13; 100 (10): 5986-90.
174. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, *et al*. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003 Feb 13; 421 (6924): 744-8.

11. ANEXOS E APÊNDICES

11.1 Procedimento Operacional Padrão – POP



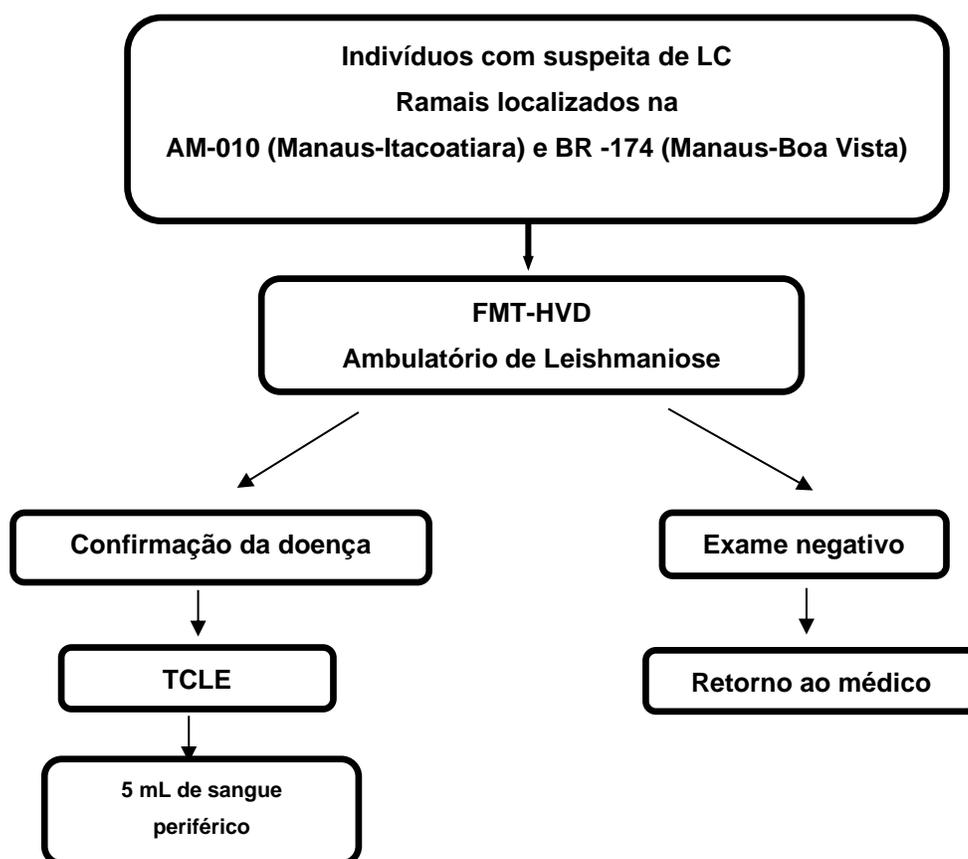
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO LABORATÓRIO DE PESQUISA EM DOENÇAS ENDÊMICAS (LPDE)

Código	POP_LPDE_LB_001_v01		
Título	Recrutamento de pacientes com leishmaniose cutânea		
Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:	Data de aplicação:
Felipe Jules Suzana K. Pinheiro Luan Diego Oliveira Data & Assinatura	Dr. Rajendranath Ramasawmy Data & Assinatura	 Data & Assinatura	 Data da próxima revisão:

1. **Objetivo:** Recrutamento de pacientes com LC causada por *L. guyanensis* que apresentam de uma a seis lesões ulceradas na pele que procuram o ambulatório do FMT-HVD (1).
2. **Definições:** Não se aplica.
3. **Responsável:** Todos os alunos que estão envolvidos no desenvolvimento do projeto.
4. **Procedimentos:**
 - A. **Materiais**
 - Material de expediente;
 - Jaleco;

- TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido;
 - Ficha de identificação do voluntário;
 - Tubo tipo vacutainer® contendo anticoagulante EDTA;
 - Agulhas a vácuo para coleta múltipla;
 - EPI (equipamentos de proteção individual);
 - Caixa térmica.
- B. Equipamentos:** Não se aplica.
- C. Reagentes:** Não se aplica.

5. Fluxograma



- 6. Biossegurança:** Todos os procedimentos realizados no laboratório atenderão aos critérios internacionais de biossegurança e boas práticas de laboratório. Organização da

área de trabalho antes e depois dos procedimentos e descarte de materiais contaminantes ou tóxicos nos devidos lugares (2).

7. Referências:

1. Fletcher RH, Fletcher SW. Epidemiologia Clínica. Elementos Essenciais. 4a Ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2006.
2. Pedro TS. Biossegurança: Uma abordagem multidisciplinar. 2º Ed. Rio de Janeiro. FIOCRUZ, 2010.



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO LABORATÓRIO DE PESQUISA EM DOENÇAS ENDÊMICAS (LPDE)

Código	POP_LPDE_LB_002_v01		
Título	Recrutamento de indivíduos saudáveis sem histórico de LTA		
Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:	Data de aplicação:
Felipe Jules Suzana K. Pinheiro Luan Diego Oliveira	Dr. Rajendranath Ramasawmy		
Data & Assinatura	Data & Assinatura	Data & Assinatura	Data da próxima revisão:

1. **Objetivo:** Recrutamento de indivíduos saudáveis sem histórico de LTA nas áreas endêmicas das rodovias AM-010 e BR-174 onde procede os indivíduos do grupo caso (1).
2. **Definições:** Não se aplica.
3. **Responsável:** Todos os alunos que estão envolvidos no desenvolvimento do projeto.

4. **Procedimentos:**

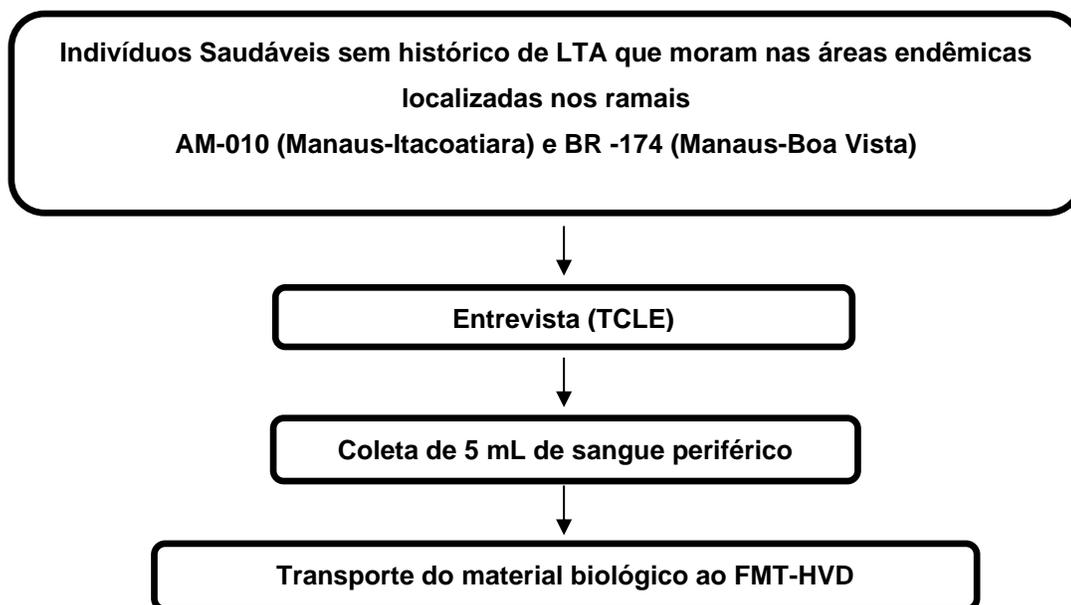
A. **Materiais**

- Material de expediente;
- Jaleco;
- TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido;
- Ficha de identificação do voluntário;
- Tubo tipo vacutainer® contendo anticoagulante EDTA;
- Agulhas a vácuo para coleta múltipla;
- EPI (equipamentos de proteção individual);
- Caixa térmica.

B. **Equipamentos:** Não se aplica.

C. **Reagentes:** Não se aplica.

5. **Fluxograma:**



6. **Biossegurança:** Todos os procedimentos realizados no laboratório atenderão aos critérios internacionais de biossegurança e boas práticas de laboratório. Organização da

área de trabalho antes e depois dos procedimentos e descarte de materiais contaminantes ou tóxicos nos devidos lugares (2).

7. Referências:

1. Fletcher RH, Fletcher SW. Epidemiologia Clínica. Elementos Essenciais. 4a Ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2006.
2. Pedro TS. Biossegurança: Uma abordagem multidisciplinar. 2º Ed. Rio de Janeiro. FIOCRUZ, 2010.



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO LABORATÓRIO DE PESQUISA EM DOENÇAS ENDÊMICAS (LPDE)

Código	POP_LPDE_LB_003_v01		
Título	Procedimento para separação de plasma, <i>Buffy Coat</i> e hemácias.		
Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:	Data de aplicação:
Felipe Jules de A. Santos Suzana K. Pinheiro Data & Assinatura	Dr. Rajendranath Ramasawmy Data & Assinatura	 Data & Assinatura	 Data da próxima revisão:

1. **Objetivo:** Separação de plasma, *Buffy Coat* e hemácias.
2. **Definições:** Através do sangue total é realizado uma centrifugação que facilita a separação do sangue total, o que permite a formação de 3 camadas denominadas de plasma, *Buffy Coat* e hemácias (1,2).
3. **Responsável:** Todos os alunos que estão envolvidos no desenvolvimento do projeto.
4. **Procedimentos**

A. Materiais

- Micropipetas de 10 μ L, 200 μ L e 1000 μ L;
- Ponteiras com ou sem filtro (autoclavada) para micropipetas;
- Tubos para 1.5, 2, 0.2 μ L;
- Luva, jalecos, máscara e tocas.

B. Equipamentos:

- Centrífuga

C. Reagentes:

- H₂O Mili Q ou H₂O de injeção.

5. Protocolo:

1. Obter 5 mL de sangue venoso em tubo de EDTA identificado;
2. Limpar bancada e centrífuga com álcool a 70%, antes e após o procedimento;
3. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min (visualizar as 3 fases – plasma, *Buffy Coat* e eritrócitos);
4. Retirar o plasma e colocar em tubo de 1,5 ou 2,0 mL;
5. Retirar a camada leucocitária (*Buffy Coat*) – tomar cuidado para não retirar as hemácias e colocar em tubo de 1,5 ou 2,0 mL. No tubo de *Buffy Coat* completar com H₂O Mili Q ou H₂O de injeção (gelada), fechar o tubo e homogeneizar abruptamente (na primeira vez e nas demais homogeneizar suavemente). Centrifugar a 13000 RPM por 5min. Obs: Repetir 3 vezes, até limpar;
6. Armazenar o material em tubos de 1,5 e 2,0 mL;
7. Guardar no freezer a -80°C conforme as caixas indicadas (plasma e *Buffy Coat*).

6. **Biossegurança:** Todos os procedimentos realizados no laboratório atenderão aos critérios internacionais de biossegurança e boas práticas de laboratório. Organização da área de trabalho antes e depois dos procedimentos e descarte de materiais contaminantes ou tóxicos nos devidos lugares (3).

7. Referências:

1. Victor H. Fundamentos em Hematologia. 6° Ed. São Paulo. Artmed, 2011.
2. Sambrook, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO LABORATÓRIO DE PESQUISA EM DOENÇAS ENDÊMICAS (LPDE)

Código	POP_LPDE_LB_004_v01		
Título	Extração de DNA genômico por <i>Salting-out</i>		
Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:	Data de aplicação:
Felipe Jules Tirza Mesquita	Dr. Rajendranath Ramasawmy		
Data & Assinatura	Data & Assinatura	Data & Assinatura	Data da próxima revisão:

1. **Objetivo:** Extrair DNA genômico dos pacientes com LC e Indivíduos saudáveis para posterior genotipagem.
2. **Definições:** O ácido desoxirribonucleico é o composto orgânico responsável pela constituição genética de todas as células. o procedimento que isola o DNA da célula é chamado de extração de DNA (1,2).
3. **Responsável:** Todos os alunos que estão envolvidos no desenvolvimento do projeto.

4. **Procedimentos:**

A. **Materiais**

- Pipetas de 100 µL e 1000 µL;
- Ponteiras com filtro;
- Tubos para 1,5 ou 2,0 mL.

B. **Equipamentos:**

- Centrífuga;
- Vortex;
- Banho Maria.

C. **Reagentes:**

Reagente	Armazenamento
NaCl 3M	4° C
Clorofórmio	Temp. Ambiente
Etanol 70%	20° C
Etanol 99,5%	20° C
H ₂ O Mili Q ou H ₂ O destilada	4° C
Nuclease free water	4° C
Proteinase K	20° C
SDS 10%	Temp. Ambiente
Tampão de Proteinase K	4° C

5. **Protocolo:**

1. Separa as amostras e reagentes que serão utilizados;
2. Identificar tubos (1,5 ou 2mL) para cada amostra (tubos de descarte apenas com numeração, sem informação do paciente, totalizando 5 tubos para cada amostra);

3. Transferir *Buffy Coat* para tubos de 1,5mL, a amostra de ser totalmente descongeladas;

4. Adicionar:

- A- Tampão de proteinase K -----160 μ L
Protocolo: Tris – HCL 0,5 (500 mm) - EDTA 0,5 (500 mm) - NaCl2 3M (3.000 mm).
- B- Proteinase K (40 μ l /ml) -----10 μ L
- C- SDS 10% -----80 μ L
- D- H₂O miliQ ou destilada -----290 μ L

5. Homogeneizar por Vortex por 20 segundos;

6. Incubar em banho-maria à 65°C durante 2 ou overnight;

7. Retirar as amostras do banho-maria, deixar esfriar as amostras, adicionar 500 μ L de clorofórmio e homogeneizar vigorosamente e centrifugar à 13.000 RPM 4°C por 10 minutos;

8. Remover o sobrenadante cuidadosamente para não aspirar as hemácias ou clorofórmio;

9. Repetir 2x a 7° e 8° fase;

10. Transferir o sobrenadante limpo para tubos de 1,5 mL e acrescentar NaCl 3M, homogeneizar vigorosamente;

11. Centrifugar à 13.000 RPM 4°C por 10 minutos;

12. Dividir o sobrenadante 450 μ L por tubo. Usar o tubo identificado para o final;

13. Adicionar 1.000 μ L de etanol 99% gelado;

14. Deixa o DNA precipitar invertendo o tubo gentilmente. Centrifugar 13.000 RPM 4°C por 15 minutos;

15. Descarte o sobrenadante e adicione 1.000 μ L de etanol 70% gelado. Após centrifugue à 13.000 RPM 4°C por 15 minutos;

16. Despreze o etanol cuidadosamente para não perde o DNA. Depois levar os tubos para secarem por completo no fluxo laminar ou na bancada;

17. Ressuspender a amostra de DNA adicionando 100 μ L de água miliQ ou *nuclease free water*;

18. Estocar na geladeira à 4°C. Depois armazenar no -80°C.

6. **Biossegurança:** Todos os procedimentos realizados no laboratório atenderão aos critérios internacionais de biossegurança e boas práticas de laboratório. Organização da área de trabalho antes e depois dos procedimentos e descarte de materiais contaminantes ou tóxicos nos devidos lugares (3).

7. **Referências:**

1. Marlene TS, Marcelo MB, Andréia QM. Técnicas Básicas em Biologia Molecular. 2º Ed. Brasília. UNB, 2016.
2. Sambrook, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
3. Pedro TS. Biossegurança: Uma abordagem multidisciplinar. 2º Ed. Rio de Janeiro. FIOCRUZ, 2010.



**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO
LABORATÓRIO DE PESQUISA EM DOENÇAS ENDÊMICAS (LPDE)**

Código	POP_LPDE_LB_005_v01		
Título	Reação em Cadeia da polimerase – PCR		
Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:	Data de aplicação:
Felipe Jules Luan Oliveira Data & Assinatura	Dr. Rajendranath Ramasawmy Data & Assinatura	 Data & Assinatura	 Data da próxima revisão:

1. **Objetivo:** Realizar multiplicação da região genica de interesse por reação em cadeia da polimerase (PCR).

2. **Definições:** Técnica baseada em uma reação da síntese de DNA *in vitro* que consiste em uma PCR (do inglês *polymerase chain reaction*) do qual aumenta exponencialmente fragmentos específicos de DNA (1,2).

3. **Responsável:** Todos os alunos que estão envolvidos no desenvolvimento do projeto.

4. **Procedimentos:**

A. **Materiais**

- Micropipetas de 10 µL, 200 µL e 1000 µL;
- Ponteiras com ou sem filtro (autoclavada) para micropipetas;
- Tubos para 1.5, 2, 0.2 µL;
- Luva, jalecos, máscara e tocas;
- Caixa de gelo.

B. **Equipamentos:**

- Centrífuga;
- Fluxo;
- Termociclador.

C. **Reagentes:**

Reagente	Concentração	Armazenamento
Água		Temp. Ambiente
Tampão de PCR	1 x	-30° C
MgCl ₂	1,5 mM	-30° C
dNTP	40 µM	-30° C
Primers	0,2 µM	-30° C
Taq polimerase	2,0 U	-30° C

5. **Protocolo:**

1. Porta jaleco limpo de manga longa, luvas novas sem talco, mascaras e toucas;
2. Bancada e fluxos: limpar com etanol 70%, ou hipoclorito de sódio 1%;

3. Retirar do armário placas, ponteiras, tubos, suporte para tubos e caixa com gelo e expor a UV (20 minutos);
4. Retirar os reagentes para descongelar na geladeira (tampão 10X, MgCl₂, dNTP, Primers e água para PCR);
5. Pipetar os reagentes para formação do mix;
6. Adicionar a *Taq polimerase* por último no mix e devolve rapidamente ao -30° C;
7. Levar o mix a cabine de pipetagem de DNA e adicionar o DNA;
8. Lacrar a placa com adesivo e dar um spin caso a PCR for em placas de 96 poços;
9. Levar ao termociclador.

6. Biossegurança: Todos os procedimentos realizados no laboratório atenderão aos critérios internacionais de biossegurança e boas práticas de laboratório. Organização da área de trabalho antes e depois dos procedimentos e descarte de materiais contaminantes ou tóxicos nos devidos lugares (3).

7. Referências:

- 1- Marlene TS, Marcelo MB, Andréia QM. Técnicas Básicas em Biologia Molecular. 2° Ed. Brasília. UNB, 2016.
- 2- Sambrook, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- 3- Pedro TS. Biossegurança: Uma abordagem multidisciplinar. 2° Ed. Rio de Janeiro. FIOCRUZ, 2010.



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO
LABORATÓRIO DE PESQUISA EM DOENÇAS ENDÊMICAS (LPDE)

Código	POP_LPDE_LB_006_v01		
Título	Preparação da reação enzimática (Digestão Enzimática)		
Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:	Data de aplicação:
Felipe Jules Luan Oliveira Data & Assinatura	Dr. Rajendranath Ramasawmy Data & Assinatura	 Data & Assinatura	 Data da próxima revisão:

1. **Objetivo:** Realizar clivagem de regiões específicas do DNA através de enzimas de restrição.

2. **Definições:** As enzimas modificadoras de ácidos nucleicos são ferramentas essenciais em engenharia genética, pois permite a manipulação *in vitro* de moléculas de DNA e RNA (1,2).

3. **Responsável:** Todos os alunos que estão envolvidos no desenvolvimento do projeto.

4. **Procedimentos**
 - A. **Materiais**
 - Micropipetas de 10 µL e 200 µL;
 - Ponteiras com ou sem filtro para micropipetas;
 - Luva, jalecos, máscara e tocas;
 - Óculos de proteção;

- Caixa de gelo;
- Tubo para o mix.

B. Equipamentos:

- Cabine de fluxo;
- Banho Maria ou termo bloco.

C. Reagentes:

Reagente	Armazenamento
H ₂ O	Temp. Ambiente
Buffer 10x	-30° C
Enzima de restrição	-30° C
BSA	-30° C

5. Protocolo

1. Configurar a temperatura do banho maria ou termo bloco antecipadamente;
2. Bancadas ou fluxo laminar: limpar com etanol 70%, ou hipoclorito de sódio 1%;
3. Pipetas, caixinha para descarte de produto de PCR e papel toalha limpar com etanol 70%, ou hipoclorito de sódio 1%;
4. Retirar o volume do produto de PCR desejado;
5. Descongelar reagentes da digestão. Obs: a enzima deve ser mantida a -30°C, somente no final do preparo do mix a enzima deve ser adicionada;
6. Adicionar o volume desejado de mix ao produto de PCR;
7. Dar um spin na placa ou nos tubos;
8. Rapidamente leva-lo ao banho maria ou termo bloco;
9. Tempo mínimo para reação de 2 horas.

- 6. Biossegurança:** Todos os procedimentos realizados no laboratório atenderão aos critérios internacionais de biossegurança e boas práticas de laboratório. Organização da

área de trabalho antes e depois dos procedimentos e descarte de materiais contaminantes ou tóxicos nos devidos lugares (3).

7. Referências:

1. Marlene TS, Marcelo MB, Andréia QM. Técnicas Básicas em Biologia Molecular. 2º Ed. Brasília. UNB, 2016.
2. Sambrook, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
3. Pedro TS. Biossegurança: Uma abordagem multidisciplinar. 2º Ed. Rio de Janeiro. FIOCRUZ, 2010.



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO LABORATÓRIO DE PESQUISA EM DOENÇAS ENDÊMICAS (LPDE)

Código	POP_LPDE_LB_007_v01		
Título	Análise de DNA por eletroforese		
Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:	Data de aplicação:
Felipe Jules Luan Oliveira Data & Assinatura	Dr. Rajendranath Ramasawmy Data & Assinatura	 Data & Assinatura	 Data da próxima revisão:

1. **Objetivo:** Analisar amplificação de regiões específicas do DNA e padrão de bandas digeridas por enzima de restrição.

2. **Definições:** Esta análise verifica a integridade do DNA após ser clivado por enzimas de restrição para posteriormente realizar a discriminação alélica (1,2).

3. **Responsável:** Todos os alunos que estão envolvidos no desenvolvimento do projeto.

4. **Procedimentos:**

A. **Materiais**

- Micropipetas de 10 µL e 200 µL;
- Ponteiras com ou sem filtro para micropipetas;
- Luva, jalecos, máscara e tocas;
- Óculos de proteção;
- Caixa de gelo;
- Erlenmeyer.

B. **Equipamentos:**

- Cuba de eletroforese;
- Fonte de eletroforese;
- Microondas;
- Transluminador;
- Máquina fotográfica Cannon.

C. **Reagentes:**

Reagente	Armazenamento
Agarose	Temp. Ambiente
TBE 10x	Temp. Ambiente
TBE 1x	Temp. Ambiente
Brometo de etídeo	Temp. Ambiente
Ladder 100bp	-30° C

Tabela de concentração do gel de agarose

^a CC	Agarose (g)	TBE 1X (mL)	Brometo (µL)	CC	Agarose (g)	TBE 1X (mL)	Brometo (µL)
1%	0.5 g	50 mL	0.9 µL	1%	1g	100 mL	1.0 µL
2%	1.0 g	50 mL	0.9 µL	2%	2g	100 mL	1.0 µL
3%	1.5g	50 mL	0.9 µL	3%	3g	100 mL	1.0 µL
4%	2 g	50 mL	0.9 µL	4%	4g	100 mL	1.0 µL
^a CC	Agarose (g)	TBE 1X (mL)	Brometo (µL)	CC	Agarose (g)	TBE 1X (mL)	Brometo (µL)
1%	1.5 g	150 mL	1.2 µL	1%	2g	200 mL	1.5 µL
2%	3 g	150 mL	1.2 µL	2%	4g	200 mL	1.5 µL
3%	4.5g	150 mL	1.2 µL	3%	6g	200 mL	1.5 µL
4%	6g	150 mL	1.2 µL	3%	8g	200 mL	1.5 µL

5. Protocolo

1. Porta jaleco limpo de manga longa, luvas novas, mascaras e toucas;
2. Bancadas: limpar com etanol 70%, ou hipoclorito de sódio 1%;
3. Pipetas, Erlenmeyer, provetas, suporte do gel de agarose e cuba de eletroforese: limpar com etanol 70%, ou hipoclorito de sódio 1%;
4. Pesar agarose e medir volume de TBE 1X de acordo com a tabela acima;
5. Misturar agarose e TBE 1X no Erlenmeyer;
6. Fundir a solução no microondas até homogeneizar (aproximadamente 40 segs. na potência máxima – evitar fervura);
7. Acrescentar de brometo de etídeo (10mg/mL) e misturar com leve agitação. Obs: brometo de etídeo é mutagênico e deve ser manuseado com luvas;
8. Despejar a solução de gel no suporte sem fazer bolhas. Colocar o pente da espessura desejada no suporte. Obs: Verificar o número e o volume das amostras para escolher o pente mais adequado. Esperar a solução polimerizar;

9. Colocar o suporte com o gel na cuba de eletroforese. Adicionar tampão TBE 1X até cobrir a superfície do gel;
10. Homogeneizar amostra com azul de bromofenol e aplicar as amostras nos poços;
11. Reservar 1 poço para utilização de um padrão de corrida (Ladder-1Kb);
12. Ajustar a voltagem de acordo com o tempo de corrida desejado (média utilizada 80V);
13. Analisar o gel sob radiação ultravioleta (Alpha Imager);
14. Fotodocumentação dos resultados obtidos;
15. Descarta o gel em descartes *SAFE PACK*.

6. Biossegurança: Todos os procedimentos realizados no laboratório atenderão aos critérios internacionais de biossegurança e boas práticas de laboratório. Organização da área de trabalho antes e depois dos procedimentos e descarte de materiais contaminantes ou tóxicos nos devidos lugares (3).

7. Referências:

1. Marlene TS, Marcelo MB, Andréia QM. Técnicas Básicas em Biologia Molecular. 2° Ed. Brasília. UNB, 2016.
2. Sambrook, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
3. Pedro TS. Biossegurança: Uma abordagem multidisciplinar. 2° Ed. Rio de Janeiro. FIOCRUZ, 2010.

11.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DOS GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE E NA CICATRIZAÇÃO DAS LESÕES EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM UMA POPULAÇÃO CASO-CONTROLE DE MANAUS, AMAZONAS.

Introdução: Você está sendo convidado para participar do projeto de pesquisa citado acima. Este estudo será coordenado pelo Dr. Rajendranath RAMASAWMY pesquisador visitante sênior e professor permanente do programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e Infecciosas da UEA/FMT-HVD. Antes de tomar qualquer decisão, é importante que você leia e compreenda as seguintes explicações sobre o procedimento proposto. Esta declaração descreve o objetivo, procedimento, benefícios e riscos do estudo, e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Estas informações estão sendo dadas para esclarecer quaisquer dúvidas sobre a pesquisa proposta, antes de obter o seu consentimento.

Justificativa: Leishmaniose tegumentar ou ferida braba é uma doença causada por um pequeno parasita que fica na pele, mas existem diferentes espécies de parasito que podem causar a mesma doença, assim sendo, é importante saber qual o tipo de parasito que pode estar causando sua doença, ou se você não teve essa doença queremos saber se você tem mais possibilidade de contraí-la de que outra pessoa.

Dessa forma, queremos que você participe deste estudo permitindo que seja retirada uma pequena amostra de sangue da sua veia pra fazermos testes que vão nos dizer se você tem mais chance de ter leishmaniose causada pela parasita *Leishmania guyanensis* do que outra pessoa. Caso você tenha essa doença queremos saber se você tem no seu organismo (na parte genética) capacidade de boa cicatrização, após ter sido tratado com um medicamento específico para essa doença.

Métodos: Caso você concordar em participar desse estudo, você será submetido a um exame médico, e uma coleta de 5 mL de sangue do seu antebraço, com uma agulha nova descartável, após a assepsia local (limpeza). Se o médico suspeitar que você tenha leishmaniose, você poderá ser submetido ainda a uma coleta para biópsia de pele realizada por um dos médicos (Dr. Jorge Guerra ou Dra. Anette Talhari) integrantes da equipe. Os indivíduos não afetados por leishmaniose e sem histórico de leishmaniose, que procurem o ambulatório de dermatologia da FMT-HVD, serão selecionados para e, caso aceitem participar, comporão o grupo controle. Os indivíduos que, depois de examinados pelo dermatologista, forem caracterizados como não afetados por leishmaniose, e que não apresentarem história de infecções crônicas, inflamação e doenças autoimunes, serão considerados candidatos.

A biópsia será utilizada para identificação do parasita que está causando sua doença. A biópsia é um procedimento no qual se colhe uma pequena quantidade de pele, isto é, uma amostra, de tecido ou células, para posterior estudo em laboratório. A grande maioria dos pequenos procedimentos de biópsia é muito segura, tendo apenas um pequeno risco de sangramento ou infecção no local da biópsia. Ela é feita após anestesia local na borda local da ferida e depois de isso retirar um pequeno pedaço de pele com auxílio de instrumento cortante esterilizado chamado de punch. A amostra de sangue servirá para saber o que

queremos através de testes feitos no laboratório, além disso, com sua autorização, informações de prontuários clínicos também poderão ser lidas pelos participantes do estudo para comparar o resultado dos testes feitos em seu sangue e a resposta de seu tratamento.

1) **Local do estudo**

Os procedimentos descritos acima serão realizados no ambulatório de Dermatologia (avaliação clínica e biópsia) sob a responsabilidade do Dr. Jorge Guerra ou Dra. Anette Talhari, médicos integrantes da equipe de pesquisa e nos laboratórios da FMT-HVD sob a responsabilidade do Dr. Rajendranath Ramasawmy.

Rubrica do pesquisador

Rubrica do participante

Número do Prontuário: _____

Número da ficha: _____

2) **Permissão para estocagem**

Está sendo solicitada a sua permissão para estocagem (guarda ou armazenamento) de sua amostra de biópsia, soro e de DNA na FMT-HVD sob a responsabilidade do Dr. Rajendranath Ramasawmy de acordo com a resolução CNS Nº441 de 12 de maio de 2011 e da portaria Nº00212/2012-GDP/FMT-HVD. Se assinar esse termo de consentimento, você está autorizando estocagem de longo prazo das amostras para estudos futuros. Isso evitará procedimentos como nova coleta de sangue bem como a diminuição de recursos financeiros para novos procedimentos.

A sua amostra de DNA será mantida indefinidamente. Isto significa que a sua amostra não será destruída após um determinado período de tempo, mas sim será estocada pelo tempo que ela durar. Amostras estocadas serão usadas exclusivamente para fins de pesquisas e poderão ser utilizadas para outros estudos a respeito da suscetibilidade à leishmaniose. O uso de sua amostra estocada terá como condição uma nova avaliação e aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética pertinente. Sua permissão será solicitada. Se você concorda, você será pedir de assinar um novo TCLE com as justificativas e especificidades.

3) **Risco físico para saúde/desconfortos**

Os riscos físicos para a saúde na participação deste estudo são limitados ao procedimento de biópsia e coleta de sangue, ambos de rotina nos laboratórios clínicos. Em ambos os casos, você poderá sentir um desconforto temporário devido à introdução da agulha. A grande maioria dos procedimentos de biópsia é muito segura, tendo apenas um risco de sangramento ou infecção no local da biópsia. Ela é feita

após anestesia local na borda local da ferida e depois de isso retirar um pequeno pedaço de pele com auxílio de instrumento cortante esterilizado chamado de punch. Durante a realização de biópsia, pode ocorrer pequeno sangramento que acostuma regredir em seguida. Pode também acontecer infecção se não houver cuidado de limpeza durante e depois desse procedimento. De qualquer maneira, você receberá uma pomada de antibiótico para evitar infecção. Entretanto, caso você tenha febre ou dor, "inchaço" (edema), rubor ou sangramento no local de biópsia deve procurar a equipe da pesquisa (Dr. Jorge Guerra ou Dra. Anette Talhari). Existe também a possibilidade de risco de perda da confidencialidade tal como outras pessoas poderiam ter acesso aos seus dados e identificá-lo. Entretanto, serão tomados cuidados especiais para que isso não aconteça pois, sua identificação será feita por meio códigos. O seu nome não estará visível nos frascos contendo as amostras biológicas, elas serão codificadas para evitar o risco de perda da confidencialidade.

4) Indenização e compensação por danos

Se você desenvolver uma infecção localizada devido ao procedimento de coleta de sangue ou biópsia, você será assistido pelo Dr. Jorge Guerra ou a Dra. Anette Talhari, médicos integrantes da equipe de pesquisa no FMT-HVD. O custo desse tratamento será totalmente coberto pelo projeto. Qualquer dano decorrente de sua participação somente neste estudo referente a qualquer procedimento relacionado, você será assistido na FMT-HVD e terá direito a indenizações ou ressarcimentos em casos de danos decorrentes de sua participação no estudo.

5) Desligamento

A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios os quais você tenha direito.

Se você estiver afetado pela leishmaniose, acesso a procedimentos médicos para diagnósticos e tratamento da doença será providenciado mesmo que não queira participar deste estudo.

Se você não estiver afetado pela leishmaniose, você está sendo convidado a participar do estudo como parte do grupo controle ou como familiar do afetado. Neste caso, sua decisão de participar ou não, ou de cessar sua participação a qualquer momento, não irá interferir de nenhuma forma nos procedimentos médicos para diagnóstico ou tratamento da leishmaniose que você possa necessitar no futuro. Da mesma forma, sua decisão não irá refletir no acesso a procedimentos médicos necessários a algum familiar ou contato afetado pela leishmaniose.

Rubrica do pesquisador

Rubrica do participante

Número do prontuário: _____

Número da ficha: _____

6) Custo para os participantes

No caso de você decidir participar do estudo, você não terá nenhum custo. Custos com testes laboratoriais e análises de suas amostras na pesquisa serão cobertos pelo estudo.

7) Benefícios

Em longo prazo, os procedimentos médicos e laboratoriais aos quais você será submetido poderão facilitar a detecção de resistência à leishmaniose e seu tratamento, tornando possível evitar tratamentos inadequados. Além disso, espera-se que conhecimentos científicos adicionais sejam alcançados, com consequente melhoria do tratamento de pessoas afetadas pela leishmaniose.

8) Reembolso

Já que não haverá gastos adicionais de transporte e alimentação devido a sua participação no estudo, você não será reembolsado por participar deste estudo.

9) Exclusividade de uso de material genético e biológico

Amostras de DNA serão utilizadas apenas para pesquisa de suscetibilidade à leishmaniose. Todos os resultados obtidos no estudo, após análise do conjunto completo dos dados, serão publicados em artigos científicos. É importante reafirmar que o alvo de nossos estudos é a identificação do fator de risco genético à leishmaniose e contribuição no entendimento do mecanismo da doença.

10) Confidencialidade dos dados

Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidencialmente até onde é permitido por lei e todas as informações estarão restritas à equipe responsável pelo projeto. Nenhuma informação genética individual será tornada pública. As informações serão codificadas e mantidas em local protegidas o tempo todo. Somente os pesquisadores envolvidos neste estudo terão acesso às informações. Após o término deste estudo, as informações serão transcritas dos questionários para os arquivos de computador, mantidos em local restrito com acesso permitido apenas aos mesmos pesquisadores. Os dados deste estudo poderão ser discutidos com pesquisadores de outras instituições, mas nenhuma identificação será fornecida. Você tenha direito de conhecer os resultados dos testes laboratoriais que serão realizados. Os resultados da pesquisa em nenhum momento irão interferir no tratamento já preconizado.

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DOS GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE E NA CICATRIZAÇÃO DAS LESÕES EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM UMA POPULAÇÃO CASO-CONTROLE DE MANAUS, AMAZONAS.

Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento para mantê-lo consigo. Se você tiver qualquer dúvida no futuro sobre sua participação neste estudo, você pode e deve utilizar os seguintes meios de contato com os pesquisadores responsáveis:

Dra. Anette TALHARI
Telefone: (92) 2127 3429

Dr. Jorge GUERRA
(92) 2127 3429

Dr. Rajendranath RAMASAWMY
(92) 2127 3447

E-mail: anette@dermatologiatalhari.com.br jguerra291@gmail.com ramasawm@gmail.com

Para quaisquer informações, fica disponibilizado o endereço do CEP/FMT-HVD, sito à Av. Pedro Teixeira nº25 Dom Pedro I, Cep 69040-000, Manaus-AM, que funciona de 2ª a 6ª feira, das 08:00 às 14:00 horas, telefone (92)2127-3572, e-mail: CEP@fmt.am.gov.br

Consentimento

Li e entendi as informações precedentes. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando o meu consentimento em participar do estudo, até que eu decida o contrário.

Assinatura ou impressão digital do voluntario

Nome completo e nº do prontuário

Assinatura do entrevistador

Nome completo do entrevistador

Assinatura testemunha 1

Data

TERMO DE COMPROMISSO

Eu, **Rajendranath Ramasawmy**, coordenador do projeto intitulado: “*Polimorfismos genéticos dos genes envolvidos na resposta imune e na cicatrização das lesões em pacientes com leishmaniose cutânea em uma população caso-controle de Manaus, Amazonas*”, manifesto perante a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas Doutor Heitor Vieira Dourado, o meu compromisso de uso e metodologia de identificação que assegure o sigilo e garanta respeito e confidencialidade dos indivíduos envolvidos na pesquisa supracitados, bem como assegurar que o sistema de identificação, utilizado garanta a recuperação de informações dos indivíduos pesquisados, visando possível necessidade de fornecimento de informações de interesse ou para obtenção de consentimento específico para uso em novo projeto de pesquisa.

Autorizo a instituição a avaliar com prioridade absoluta os meus atos a partir do momento em que haja dúvida sobre as amostras biológicas a serem armazenadas.

Concordo expressamente com as propostas deste termo, pelo que subscrevo-me.

Assinatura

Nome: Rajendranath Ramasawmy

CPF: 230660558-09

Local: Manaus Data: 30 de outubro de 2012

11.3 Identificação do voluntário

Identificação do voluntário

Projeto Imunogenética da Leishmaniose

1. Nome: _____
2. Gênero: Masculino () Feminino ()
3. D/N ___/___/_____
4. Idade: _____
5. Etnia: Branco: (); Misto (); Índio: () Outro(qual): _____
6. Tipo e local de trabalho: _____

Dados para contato:

1. Telefone: _____
2. Endereço: _____
3. Referência: _____
4. Tempo de Residência: _____
5. Histórico de Residência (onde já morou e por quanto tempo): _____

Dados Clínicos:

1. Já teve leishmaniose? Sim () Não ()

a) Se Sim (grupo caso):

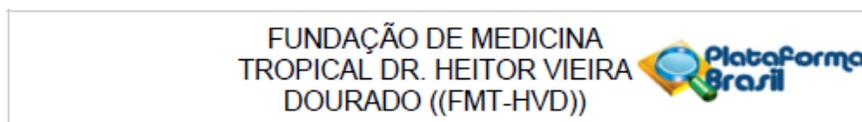
- i) Caso ativo ou histórico? Ativo () Histórico ()
- ii) Teve mais de uma vez (se sim, responder iii a viii para cada episódio): Sim () Não ()
- iii) Data de diagnóstico: ___/___/_____
- iv) Forma clínica: cutânea () Mucosa ()
- v) Local de provável infecção: _____
- vi) Tratamento: _____
- vii) Reposta ao tratamento: Sim () Não ()
- viii) Se caso histórico: Sim () Não ()

b) Se não (grupo controle) - confirmado por ausência de cicatriz

2. Já teve malária? Sim () Não ()
- a) Se Sim quantas: _____
3. Já teve outras doenças? _____
4. Prontuário da FMT-HVD: _____

11.4 Parecer do comitê de ética

Folha de rosto Plataforma Brasil – Projeto maior



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: POLIMORFISMOS GENÉTICOS DOS GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE E NA CICATRIZAÇÃO DAS LESÕES EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM UMA POPULAÇÃO CASO-CONTROLE DE MANAUS, AMAZONAS

Pesquisador: RAJENDRANATH RAMASAWMY

Área Temática: Área 1. Genética Humana.
(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 3

CAAE: 09995212.0.0000.0005

Instituição Proponente: Diretoria de Ensino e Pesquisa - DENPE

Patrocinador Principal: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((CNPq))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 289.683

Data da Relatoria: 24/05/2013

Apresentação do Projeto:

Este é um estudo genético/epidemiológico quantitativo, transversal, de ciência básica, que utilizará ferramentas de análise genética para avançar na dissecção do componente genético de controle da susceptibilidade do hospedeiro à LTA causada pela espécie *Leishmania guyanensis*. Brevemente, análise de associação caso-controle será aplicada, a fim de se detectar distribuição distinta das frequências alélicas e genotípicas entre grupos de casos e controles não afetados pela doença, recrutados de forma prospectiva, o que indicaria envolvimento do gene investigado no controle da susceptibilidade à doença.

Objetivo da Pesquisa:**Objetivo Primário:**

- Avançar no entendimento da complexa natureza do controle molecular da susceptibilidade e a cura da lesão do ser humano à LTA. Para isso, nós aplicaremos técnicas de análise genética de associação baseada em populações, na investigação de locus candidato ao controle da susceptibilidade à doença em uma população brasileira.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

**FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))**


Continuação do Parecer: 289.683

Objetivo Secundário:

- Descrever, clinicamente e epidemiologicamente, uma amostra populacional de indivíduos afetados por LTA, recrutados na FMT-HVD, Manaus, adequada para estudos de análise genética da susceptibilidade do hospedeiro a fenótipos da leishmaniose;
- Descrever uma população sem sinal ou histórico de leishmaniose, recrutada na mesma região geográfica que o grupo de casos e pareada para idade, gênero e etnia, para compor o grupo controle;
- Genotipar marcadores dos genes citados acima nos indivíduos de ambos os grupos de casos e controles, a fim de se estabelecer as frequências alélicas e genotípicas em cada grupo;
- Dosar as citocinas em amostras de sangue dos pacientes com LC antes e após o tratamento com miltefosina;
- Aplicar análise de associação baseada em populações a fim de buscar evidências da participação de variantes dos genes envolvidos no controle da suscetibilidade do hospedeiro à doença;
- Comparar os genótipos dos genes estudados e a concentração das citocinas com o tempo de cura.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

- Os riscos de participação dos voluntários de pesquisa neste estudo são aceitáveis levando-se em consideração os eventos adversos (EAs) já descritos em inúmeros ensaios clínicos que utilizaram a Miltefosina no tratamento da Leishmaniose Visceral e da Leishmaniose Tegumentar. Os riscos físicos para a saúde de participação neste estudo são muito pequenos e limitados ao procedimento de biópsia e coleta de sangue, ambos de rotina nos laboratórios clínicos. Em ambos os casos, você poderá sentir um desconforto temporário devido a introdução da agulha. Tanto a biópsia quanto a coleta de sangue poderá resultar em uma pequena lesão que quase sempre cura-se sozinha. Em raros casos, pode ocorrer infecção localizada.

Benefícios:

- Possivelmente os resultados deste estudo, contribuirão para a incorporação da miltefosina como medicamento a ser recomendado pelo MS no tratamento da leishmaniose cutânea. A longo prazo, os procedimentos médicos e laboratoriais aos quais você será submetido poderão facilitar a detecção de resistência à leishmaniose e seu tratamento, tornando possível evitar tratamentos inadequados. Além disso, espera-se que conhecimentos científicos adicionais sejam alcançados.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 289.683

com consequente melhoria do tratamento de pessoas afetadas pela leishmaniose.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é de grande relevância pois pretende elucidar a susceptibilidade do ser humano a fenótipos da leishmaniose. Pretende verificar o papel de genes envolvidos no sistema imune e na cura de lesão sobre o controle da suscetibilidade do hospedeiro a doenças infecciosas causadas por pelo diferentes parasitas intracelulares. O Pesquisador crê que variantes dos genes possam estar envolvidos no controle da suscetibilidade do ser humano e a cura da lesão a leishmaniose cutânea causada pela *L. guyanensis* em uma população recrutada no município de Manaus.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo contém os itens fundamentais para ser avaliado pelo CEP descritas na Resolução 196/96, item VI - Protocolo de Pesquisa.

Recomendações:

Adequar o projeto e TCLE conforme as pendências relatadas a seguir.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Folha de rosto:

1- Falta preenchimentos dos itens: 10 (Outro Telefone), 12 (cargo), 16 (telefone), 17 (outro telefone). Todos os itens da folha de rosto devem ser preenchidos, se houver dificuldade em preencher devido inconsistências do sistema, sugerimos imprimir, preencher a mão, escanear e posteriormente anexar à Plataforma Brasil para análise por este CEP.

Resposta do pesquisador: Os campos foram preenchidos e a nova Folha de Rosto foi anexada.

Conclusão do relator: Pendência atendida.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

Após análise do TCLE observa-se houve adequação de algumas pendências, porém outras ainda carecem de maior esclarecimento, segundo o relatado abaixo:

a) Observa-se discrepância nos métodos descritos no modelo de projeto da plataforma Brasil e o TCLE, pois no projeto esta descrito a retirada de 5 ml de sangue e no TCLE esse volume é de 10ml.

Resposta do pesquisador: Os itens foram corrigidos.

Parecer do relator: Identificado no TCLE a referencia de coleta de 5ml de sangue. Pendência atendida

b) Descrever o procedimento, riscos e desconfortos da biópsia de pele esclarecendo como será

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25	
Bairro: D. Pedro I	CEP: 69.040-000
UF: AM	Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572	Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

**FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))**


Continuação do Parecer: 289.683

feito o exame.

Resposta do pesquisador: Os itens foram corrigidos.

Parecer do relator: O TCLE informa o desconforto, sangramento e infecção, além de quebra da confidencialidade, informando como será realizado os exames, bem as medidas para minimizar os riscos. Pendência atendida.

c) No tópico local do estudo, não está clara a procedência do grupo controle e o TCLE nem menciona o recrutamento do grupo controle.

Resposta do pesquisador: Foi corrigido no TCLE - métodos.

Parecer do relator: Pendência atendida.

d) No tópico permissão para estocagem, adicionar após a palavra estocagem os termos guarda ou armazenamento, a fim de facilitar a compreensão do sujeito da pesquisa.

Resposta do pesquisador: Foi realizado a mudança conforme solicitado pelo relator. Anexado a permissão de estocagem.

Parecer do relator: Pendência atendida.

e) No tópico riscos para a saúde/desconforto esclarecer quais seriam os desconfortos que o paciente pode sentir (dor, sangramento, roxo, inchaço no local e até infecção no local). Relatando ainda que existe o risco de perda da confidencialidade e que mecanismos o projeto pretende adotar para minimiza-los. Este tópico foi abordado no item 10 confidencialidade dos dados, mas merece a menção pois essa perda de confidencialidade também representa risco ao indivíduo.

Resposta do pesquisador: Foi corrigido no TCLE.

Parecer do relator: O TCLE informa o desconforto, sangramento e infecção, além de quebra da confidencialidade, informando como será realizado os exames, bem as medidas para minimizar os riscos. Pendência atendida.

f) Dentro das atribuições previstas no item VIII.4.c.8 da resolução 196/96, cabe a CONEP, após aprovação do CEP institucional, apreciar as pesquisas enquadradas nessa área temática.

Resposta do pesquisador: De acordo com a revisão da Resolução 446/2011, este protocolo não se inclui mais em área temática especial e, portanto, não deve ser encaminhado a CONEP: Seção VII das competências da comissão - IV - Analisar e emitir parecer, no prazo de 60 dias, e acompanhar os protocolos de pesquisa em áreas temáticas especiais em genética humana sempre que o

Endereço:	Av. Pedro Teixeira, 25		
Bairro:	D. Pedro I	CEP:	69.040-000
UF:	AM	Município:	MANAUS
Telefone:	(92)2127-3572	Fax:	(92)2127-3572
		E-mail:	cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 289.683

projeto envolver: 1) envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético; 2) armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais; 3) alterações da estrutura genética de células humanas para utilização in vivo; 4) pesquisas na área de genética da reprodução humana (reprogenética); 5) pesquisa em genética do comportamento e 6) pesquisas em que esteja prevista a dissociação irreversível dos dados dos sujeitos da pesquisa. Parecer do relator: A resolução citada trata da reestruturação da comissão da CONEP, contudo a descrição se refere a resolução 340/04. VI.3. O projeto não preenche nenhum desses critérios. Pendência atendida.

Detalhar na metodologia e no TCLE:

a) No tópico critério de inclusão, não há referência sobre o grupo controle.

Resposta do pesquisador: Foi detalhado tanto na metodologia (projeto de pesquisa quanto no TCLE.

Parecer do relator: Pendência atendida.

b) No tópico critério de exclusão está mencionando "crianças que não conseguem ingerir as cápsulas". Isso deixa dúvidas com relação a faixa etária de 4 a 65 anos, pois crianças de 4 anos não ingerem capsulas. Sugiro rever a faixa etária com base nesse critério de exclusão.

Resposta do pesquisador: Como sugerido pelo relator, foi corrigido no projeto - critério de inclusão "10 a 65 anos".

Parecer do relator: Pendência atendida.

c) No tópico riscos, volto a reforçar a necessidade de descrever os riscos, que não podem ser considerados pequenos, pois além dos riscos resultantes dos procedimentos, há o risco de perda da confidencialidade.

Resposta do pesquisador: Foi corrigido tanto no projeto como no TCLE.

Parecer do relator: Pendência atendida.

d) Ajustar cronograma para início do projeto após aprovação em comitê de ética, pois segundo o cronograma existente o recrutamento de pacientes iniciou em 03/12/12.

Resposta do pesquisador: O cronograma foi corrigido tanto no projeto anexo pelo pesquisador

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 289.683

quanto na Plataforma Brasil.

Parecer do relator: Pendência atendida.

e) Solicitar a permissão para estocagem do material biológico: CNS Resolução 441/2011.

Resposta do pesquisador: Foi anexado ao protocolo o formulário padrão de armazenamento de material biológico, assinado pelo diretor da DEMPE.

Parecer do relator: Pendência atendida.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Considerando o feriado de 30/05/13 e o decreto de ponto facultativo em 31/05/13 que implicou em suspensão da reunião ordinária deste CEP, o coordenador-1 acata ad referendum o parecer da relatora, considerando que o interessado atendeu a todas as pendências apontadas.

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 196/96 de 10 de outubro de 1996, item IX.2,"c", utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

MANAUS, 31 de Maio de 2013

Assinador por:

Maria Paula Gomes Mourão
(Coordenador)

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

11.5 Outros Anexos

Esboço do artigo

IL-23R variant rs11805303 is associated with susceptibility to the development of cutaneous leishmaniasis in *Leishmania guyanensis*-infected individuals

Lener Santos da Silva^{1,2}, José do Espírito Santo Júnior^{1,3}, Tirza Gabrielle Ramos de Mesquita^{1,2}, Veronica Alice Marinho Santos¹, Josué Lacerda de Souza^{1,3}, Felipe Jules de Araújo^{1,2}, Cláudio Marcello da Silveira Júnior¹, Cilana Chagas da Silva¹, Krys Layane Guimarães Duarte Queiroz¹, Héctor David Graterol Sequera^{1,2}, Marcus Vinitius de Farias Guerra¹, Mara Lúcia Gomes de Souza¹, Rajendranath Ramasawmy^{1,2,3,4}

1. Fundação de , Medicina Tropical Dr Heitor Viera Dourado, Manaus, Amazona
2. PPGMT, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas
3. PPGIBA, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas
4. Faculdade de Medicina, Universidade Nilton Lins, Manaus, Amazonas

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis; *Leishmania guyanensis*; IL23R variant; susceptibility

Running Title: *IL23R* variant in cutaneous leishmaniasis

Corresponding Author: Rajendranath Ramasawmy, Faculdade de Medicina, Universidade Nilton Lins, Av Prof Nilton Lins, Parque Larangeiras, Manaus, Amazonas, Brasil, CEP 69058030 Email: ramasawm@gmail.com

Alternative corresponding author: José do Espírito Santo Júnior, Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil Email: sdjunior.biol@gmail.com

Summary: IL23R variant is associated with susceptibility to Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania guyanensis* and seems to influence plasma circulating levels of IL-17. The IL-17/IL23 axis may play a role in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis in genetically susceptible *L. guyanensis*-infected individuals.

Background: Emerging evidence suggests that the IL-17/IL-23 axis may play a role in the pathogenesis of leishmaniasis. Our aim was to investigate whether the *IL-23R* variant rs11805303 is a risk factor for the development of cutaneous leishmaniasis in *Leishmania guyanensis*-infected individuals.

Methods: We genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism the rs11805303 C/T in 828 patients with cutaneous leishmaniasis and 806 healthy individuals with no history of leishmaniasis coming from the same area of *L. guyanensis* endemicity. Cytokines TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-1 β and IL-17 were measured in plasma from 400 patients with CL and 400 HC using the luminex technology and Bioplex assay.

Results: The distribution of the genotypes differed between patients with CL and HC with a common odds ratio (OR) of 1.78 ($p = 2.2 \times 10^{-11}$) for the disease-associated T allele. *L. guyanensis*-infected individuals homozygous for the T allele show a 200% increased risk of progressing to disease development, with a 95% confidence interval (CI) ranging from 81% to 400% ($P = 9.9 \times 10^{-6}$) in comparison to individuals homozygous for the C allele. The plasma levels of IL-17 differed significantly by the IL-23R rs11805303 genotypes in males. Males homozygous for the T allele have higher plasma levels of IL-17 compared with heterozygous or homozygous CC individuals.

Conclusion: The present association of the *IL-23R* variant rs11805303 with the development of cutaneous leishmaniasis suggests that the IL-17/IL-23 axis may play an important role in the pathogenesis of CL caused by *L. guyanensis* in genetically susceptible individuals.

Introduction

Leishmaniasis is caused by infection with the intracellular protozoan parasite *Leishmania*. The clinical manifestations of *Leishmania*-infection depend on the genetic background of the host, the vector, the site of infection, the skin microbiota and the *Leishmania* spp [1-4]. The clinical outcome may range from asymptomatic, self-healing to non-healing cutaneous lesions known as cutaneous leishmaniasis (CL) or to severe disfiguring condition classified as mucosal leishmaniasis (ML), and to fatal visceral leishmaniasis (VL) if goes untreated.

Leishmania infect phagocytes cells like macrophages. Interferon gamma (IFN- γ)-activated macrophages control the replication of the parasite, suggesting a Th1 response is needed to avoid disease development. However, an imbalance overexaggerated immune Th1 response liberating high IFN- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α may contribute to the pathogenesis associated with the *Leishmania*-infection despite the presence of very few parasites in the lesions [5,6].

Naïve CD4⁺ T helper cells can differentiate into several subsets of T helpers upon entering in contact with antigens. In the presence of interleukin (IL)-12, naïve CD4⁺ T helper cells differentiate into Th1 cells to mediate cellular immunity and produce IFN- γ . When stimulated with interleukin (IL)-4, these cells progress to Th2 cells and is involved in humoral immunity producing IL-4, IL-5 and IL-13 while upon exposition to tumour growth factor (TGF) β , IL-6 and IL-23 evolve to Th17 cells that produce IL-17. IL-23, a heterodimeric cytokine comprising of IL-23p19 and IL-12p40, is the main cytokine that upon binding to its receptor, IL-23 receptor (IL-23R), is involved in the differentiation and maintenance of CD4⁺ T helper cells IL-17-producing effector Th17 cells [7]. Th17 cells secrete IL-17, TNF- α and IL-6 but not IFN- γ and IL-4.

The Th17 pathway plays key role in controlling acute microbial infections [8,9]. IL-23R is described as the essential component for the terminal differentiation of Th17 cells [7]. IL-23R is a heterodimer of IL-23R α and IL-12R β 1. Growing evidence suggests that IL-23R may be a main key player in the development of chronic inflammation [7,10]. Furthermore, IL-23 is a potent driver of inflammatory processes in transgenic mice expressing ubiquitously IL-23p19 subunit [11]. IL-23p19 was also reported to be

responsible for disease progression in susceptible BALB/c mice inoculated with *L. major* [12].

High levels of IL-17 have been observed in *L. braziliensis*-infected patients with CL [13]. BALB/c mice deficient for IL-17 develop smaller lesions when infected with *L. major* than control mice [14], suggesting that IL-17 promotes lesions. *L. major*-infected C57BL/6 mice, treated with anti-IL-10 receptor monoclonal antibody and anti-IFN- γ , showed larger lesion size with increased production of IL-17 and neutrophil infiltration at the site of lesion compared with mice treated with anti-IL-17 [15]. Peripheral blood from *L. braziliensis*-infected patient with CL, stimulated with soluble leishmanial antigens, produced IL-17 and higher levels in the presence of anti-IFN- γ [15]. A positive correlation between ROR γ t⁺ cells and TGF β ⁺, IL-6⁺, IL-17⁺ and IL-23⁺ cells was observed in skin biopsies of non-ulcerated CL from *L. infantum chagasi*-infected individuals [16]. Similarly, the presence of ROR γ t⁺, TGF β ⁺, IL-6⁺, IL-17⁺ and IL-23⁺ cells was also demonstrated in biopsies of skin lesions of *L. panamensis*-infected patients with CL [17]. Elevated mRNA levels of IL-17, IL-23 and ROR γ t have been reported in skin lesions of *L. tropica*-infected patients with CL [18]. Notably, ROR γ t activates the transcription of IL-17 and IL-23R [19].

Accumulating evidence highlights the crucial role of the IL-17/IL-23 axis in the pathogenesis of CL caused by different species of *Leishmania*. Because the maintenance and expansion of Th17 cells are IL-23 dependent and IL-23R plays a key role for the terminal differentiation of Th17 cells, we investigated whether the variant rs11805303 in the *IL-23R* gene may be associated with the development of CL caused by *L. guyanensis*. We also analysed plasma circulating levels of IL-17, TNF and IL-1 by its genotypes. This variant is associated with susceptibility to the development of CL and high level of plasma circulating IL-17 in males individuals.

Materials and Methods

Study area and population

The study was performed in the perirural areas of Manaus, the capital city of the Amazonas state of Brazil. More specifically, all the participants in the study were from the communities of Pau-Rosa, Cooperativa, Agua-Branca, Leão, and Brasileirinho that are situated around the highways BR-174 and AM-010. Over the years, there have been increased

deforestation in these regions for settlements, agriculture, and farming. These regions are endemic for *L. guyanensis*. All the patients with active CL, defined as the presence of chronic ulcerative lesions without mucosal involvement, had fewer (\leq) than six lesions and were followed at the Fundação de Medicina Tropical-Dr Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) in Manaus, a referral hospital for treating tropical diseases. After confirmation of the presence of *Leishmania* parasites by direct microscope-examination of Giemsa-stained specimens from lesion scarification, patients were invited to participate in the study. The healthy individuals, included in the study as the controls group (HC), were devoid of any scars suggestive of CL and had no history of leishmaniasis. The study abides to the principles expressed in the declaration of Helsinki and was approved by the Research Ethics Committee of the FMT-HVD and granted under the file number CAAE:09995212.0.0000.0005. All participants or parents/guardians for individuals younger than 18 years of age signed written informed consent.

Biological samples

Identification of Leishmania species and IL-23R rs11805303 genotyping

All patients with CL provided a biopsy sample from the ulcerated lesion for DNA extraction and identification of the *Leishmania* species as described elsewhere by PCR-RFLP and direct nucleotide sequencing [20]. At the time of enrolment in the study, all the participants provided 5 mL of peripheral blood collected by venipuncture into ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-containing Vacutainer tubes (Becton Dickinson) for DNA extraction and cytokine assay. DNA extraction was realized by the proteinase K and the salting-out method. A fragment of 373bp of the *IL-23R* gene was amplified by PCR with the sense (5'-TCTTCCCAGTCTCCAGTGTG-3') and antisense (5'-GGGAAACA AAAATTGTTCCGG-3') primers flanking the variant rs11805303. The PCR conditions consisted of 0.4 μ M of each deoxynucleotides triphosphate (dNTP), 2.5 mM of MgCl₂, 1 U of Taq polymerase and 50 ng of DNA in a final volume of 25 μ L containing the Taq polymerase buffer (500 mmol/L KCl and 100 mmol/L Tris-HCl). The cycling conditions were an initial denaturation step of 5 minutes at 95°C followed subsequently by 40 cycles of 15 s at 95°C, 15 s at 57°C, 30 s at 72°C and a final extension step at 72°C for 7 minutes. 10 μ L of the PCR product was digested with the restriction enzyme *Mnl* I (New England Biolabs) according to the manufacturer protocol. The generated restriction fragments were

size separated in a 3 % agarose by electrophoresis. In the presence of the C allele, three fragments of 198, 136, and 39 bp are generated while for the T allele, only two fragments of 237 and 136bp are observed.

Plasma Cytokines assay

Patients with CL provided 5 mL of peripheral blood before initiating treatment. All the plasma samples (400 from HC and 400 from patients) were kept frozen at -80°C until assay of the cytokines. Plasma IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-17 cytokines levels were determined using the multiplex cytokine commercial kit Bio-Plex Pro-human Cytokine Grpl Panel 27-Plex (Bio-Rad) following the manufacturer's protocols in the Bio-Plex 200 protein Array System (Luminex Corporation).

Statistical Analysis

The Mann-Whitney and χ^2 test were applied for comparison of basic characteristics of patient with CL to HC. Hardy-Weinberg equilibrium's calculations as well as comparison of genotypes between patients with CL and HC were performed through the website <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. Plasma cytokines by genotypes were analysed with the SNP Assoc and the R software version 3.5.1 package ggplot 2.

RESULTS

Characteristics of the study population

The study population consisted of 1634 unrelated individuals living in an endemic area of leishmaniasis caused by *L. guyanensis*. Most of the participants are farming or agricultural workers. 806 are HC with no history of leishmaniasis and devoid of any scar suggestive of Leishmaniasis. 828 are patients with CL. The gender distribution differs between patients with CL and HC ($p=0.002$). 620 (75%) patients are males with a mean age of $34.49 \pm \text{SEM}0.56$ years and 208(25%) females (mean \pm SEM age; 37 ± 1.09 years). Among the HC, 561(70%) are males (41.62 ± 0.77 years) and 245 females (40 ± 1.08 years). The HC are older ($p < 0.0001$).

Statistical comparisons of the genotypes of *IL-23R* variant rs11805303 between patients with CL and HC

The *IL23R* gene is located on chromosome 1p31 and the rs11805303 variant results in the substitution of the C wild type allele to T allele in the sixth intron of the *IL23R* gene. The distribution of the genotypes and alleles frequencies are shown in Table 1 and show no

deviation from HWE in both patients with CL and HC. Genotypes and alleles frequencies differ between the groups, with a common odds ratio (OR) of 1.78 ($p = 3.3 \times 10^{-11}$) for the T allele. *L. guyanensis*-infected individuals homozygous for the T allele show a 200% increased risk of progressing to disease development, with a 95% confidence interval (CI) ranging from 81% to 400% ($P = 9.9 \times 10^{-6}$) in comparison to individuals homozygous for the C allele. Similarly, carriers of the T allele (TT+CT) with respect to homozygous CC individuals are at 193% risk of developing CL (OR, 2.0; 95% CI, 1.6 – 2.5; $P = 8.3 \times 10^{-11}$). Heterozygous CT individuals have an increased risk of 90 % of developing CL with respect to CC individuals ((OR, 1.9; 95% CI, 1.5 – 2.3; $P = 1.6 \times 10^{-8}$). Likewise, the predominant T allele among the patients with CL confers an elevated risk of developing CL in *L. guyanensis*-infected individuals (OR, 1.85; 95% CI, 1.55 – 2.20; $P = 6.1 \times 10^{-12}$).

Due to the difference among gender distribution in both groups, patients with CL and HC, we stratified the participants of the study into males and females to see if the T allele-disease association is gender dependent. As shown in Table 2, the genotype frequencies are similar among males and females in the patient with CL group and likewise in the HC. The distribution of the genotypes is in accordance with HWE in all the groups stratified. Males and females individuals homozygous for the T allele revealed an increased risk of 200% (OR, 3.0; 95% CI, 1.7 – 5.50; $P = 1.7 \times 10^{-4}$) and 180% (OR, 2.80; 95% CI, 1.0 – 7.7; $P = 0.04$), respectively. Similarly, carriers of the T allele exhibit an elevated risk of 100% (OR, 2.0; 95% CI, 1.5 – 2.7; $P_{adj/age} = 5.2 \times 10^{-7}$) and 160% (OR, 2.6; 95% CI, 1.6 – 4.2; $P_{adj/age} = 7.53 \times 10^{-5}$) for males and females respectively. The T allele association with CL caused by *L. guyanensis* is not gender dependent.

Circulating plasma levels of IL-17 and IL-6 by IL-23R variant rs11805303 genotypes

The plasma levels of IL-17, IL-6, IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ (mean \pm SEM pg/mL) for patients with CL, HC and totals (patients with CL + HC) are shown in supplementary Table 1 and stratified by gender in supplementary Table 2.

The levels of plasma IL-17 were extremely low among the HC compared with patients with CL. Plasma IL-17 did not differ by *IL-23R* variant rs11805303 genotypes in the HC, patients with CL and the totals (patients with CL + HC) as shown in Figure 1. Stratification by gender reveals that individuals homozygous for the disease-associated T allele have higher

plasma IL-17 (mean \pm SEM; 12.4 \pm 2.9 pg/mL) compared with individuals homozygous for the C allele (7.9 \pm 0.47pg/mL) and heterozygous (C/T) individuals (7.67 \pm 0.85pg/mL) (P_{adj/age} = 0.03) among males patients with CL. This tendency is not observed among male controls, and females with CL.

A reduced production of IL-6 has been shown to occur in mice deficient for p19 or treated with antibodies for p19 or IL-23R [21,22]. Comparisons of the plasma IL-6 by genotypes, as shown in Figure 2, show a tendency of increased levels only male patients TT homozygotes (1.1 \pm 0.21pg/mL) compared with CC homozygotes (0.70 \pm 0.04pg/mL) and heterozygotes (0.66 \pm 0.07).

Comparison of plasma IFN- γ , IL-1 β and TNF- α of homozygous TT versus CC individuals

The distribution of plasma IFN- γ , IL-1 β and TNF- α are shown in supplementary Figure 1, 2 and 3. Recently, we and others showed that individuals with a propensity to produce low levels of plasma IFN- γ or low *Leishmania* antigen-specific IFN- γ -producing T cells are susceptible to developing CL in *Leishmania*-infection ([23,24]. Plasma IFN- γ in males with CL were similar across the genotypes, while in female patients homozygous individuals for the T allele had lower Plasma IFN- γ (15.4 \pm 2.2pg/mL) compared with CC homozygotes (32.5 \pm 5.7pg/mL).

TGF β , in the presence of IL-6 in mice and IL-1 β in humans, triggers the differentiation of naïve CD4+T helper cells into Th17 cells [25]. Both females (1.6 \pm 1.0pg/mL). and males (1.75 \pm 0.7pg/mL) patients TT homozygotes had higher levels of IL-1 β than their respective CC homozygotes (females; 1.25 \pm 0.27 and males;(1.27 \pm 0.16pg/mL).

TNF- α and IL-1 β can synergistically enhance the expression of IL-6 that may further be involved in the differentiation of Th17 cells [26]. The distribution of TNF- α was similar across the genotypes in both male and female patients.

Discussion

The immunomechanism and pathogenesis of Leishmaniasis is still not completely understood and elucidated. A dysregulated inflammatory network in the host may be involved in the development of the disease. Understanding the host immunogenetics of leishmaniasis may contribute to enlighten and elucidate the mechanism leading to

progression of the disease in genetically susceptible *Leishmania*-infected individuals. Notably, only a proportion of *Leishmania*-infected individuals living in area of endemicity for leishmaniasis progress to disease development. Familial clustering of CL and ML in an endemic area *L. braziliensis* have been observed [27].

Th17 cells and the IL-17/IL-23 axis have been suggested to play a crucial role in immune-mediated inflammatory diseases [28] and several variants in the *IL-23/IL-23R* gene have been associated with autoimmune disorders, inflammatory bowel and Crohn disease [29]. There are only two studies so far of *IL-23R* variants in protozoan infectious diseases. An association of *IL-23R* haplotypes and a variant rs6682413 situated in between *IL-23R* and *IL12RB2* genes with severe malaria are reported [30,31]. Interestingly, this region was linked to inflammatory and immune-mediated diseases [32]. In this study, we show that the T allele of the *IL23R* rs11805303 is associated with susceptibility to *L. guyanensis*-provoked CL and individuals homozygous for the T allele-disease associated have a 200% increased risk of developing CL.

Plasma IL-6, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α and IL-17 were higher in patients with CL than in HC. TGF β together with IL-6 or IL-1 β have been shown to downregulate FOXP3, leading to a decrease of regulatory T cells while enhancing the activation of ROR γ t and differentiation of Th17 cells [33]. Furthermore, TNF- α and IL-1 β can synergistically enhance the expression of IL-6 [26]. *L. braziliensis*-amastigotes, but not promastigotes, induced the production of IL-1 β , IL-6 and TGF β in peripheral mononuclear blood cells from healthy non-resident endemic area of leishmaniasis ([34]. Interestingly in this study, male TT homozygotes have relatively higher plasma IL-6, IL-1 β and IL-17 than carriage of the C allele.

Variants in *IFNG* and *IFNG-AS* associated with low producers of IFN- γ are at increased risk of developing CL ([23,24]. Together, it can be assumed that *L. guyanensis*-infected individuals low producers of IFN- γ and bearers of the *IL-23R* rs11805303 T allele-disease associated are prone to progress to disease development in genetically susceptible individuals by producing more Th17 cells that contribute to the pathogenesis due to their low capacity of controlling the parasite. It is noteworthy to remind that the association of the T allele with *L. guyanensis* CL is not absolute but is one among other

predisposing risk alleles acting synergistically in a favorable environment to progress to disease development in genetically susceptible individuals.

Although the T allele is also associated with increased risk of developing CL among females, it is not associated with plasma IL-17. Surprisingly, homozygous TT females with CL had lower plasma IFN- γ than their respective CC homozygotes while in males, plasma IFN- γ was similar across the genotypes. We have no explanations for this discordance and further studies are required to elucidate this discrepancy.

Several studies have pointed a pivotal role of IL-23 in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases [29]. Tissue-infiltrating neutrophils also produce IL-23 besides macrophages and dendritic cells upon TLR signalling [35]. Indeed, at the site of infection with *Leishmania*, increased neutrophils cells infiltration has been observed [15]. IL-23, liberated by activated monocytes/macrophages and antigen-presenting cells, binds to IL-23R to express ROR γ t to transcribe IL-17 and hereby, maintain and expand Th17 cells along with TNF, IL-1 β , and IL-6 [36,37]. High levels of this cocktail of cytokines may probably participate in pathogenesis of CL in individual bearers of the T disease-associated allele of the variant rs11808303 of *IL-23R*.

IL-17 is a proinflammatory cytokine that stimulates fibroblasts, macrophages, endothelial and epithelial cells to secrete proinflammatory mediators such as TNF α , IL-6, NOS and metalloproteases to induce inflammation [38,39]. IL-23 may activate subset of macrophages and dendritic cells that expressed IL-23R to produce inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β [40]. In this study, plasma IL-17 is higher in patients with CL and is in line with a study in *L. tropica*-infected patients with CL [18]. Increased levels of IL-17 are cited to correlate with the magnitude of cellular infiltrate in *L. braziliensis*-infected patients with CL [13]. Furthermore, IL-17 has been shown in skin lesions of patients with CL [15-18]. All these studies point for a role that Th17 cells may enhance inflammatory processes in *Leishmania*-infection and contribute to the pathogenesis of the disease.

The biological consequence of this variant *IL-23R* rs11805303 and its eventual effect on the functionality of the gene is unknown and it cannot be ruled out that this variant may be in complete linkage disequilibrium with another variant in the *IL-23R* gene or very far from the gene that might be involved in the regulation of the gene. Altogether, we identify the *IL23R* variant rs11805303 as a risk factor to developing CL, caused by *L. guyanensis*

and provide a possible lead in the molecular involvement of the IL-23/IL-17 axis in the immunopathogenesis of the disease.

Funding

This work was supported by the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant number 40181/2012-0) to R.R. and the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas to R.R. (grant number 06201954/2015).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest

Acknowledgements. The authors thank all the participants from the endemic areas who were willing to participate in the study. We also thank Luan Diego Oliveira and Suzana Kanawati Pinheiro for field work.

References

1. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Jul 11;9(8):604-15.
2. Naik S, Bouladoux N, Wilhelm C, et al; Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science.* 2012 Aug 31;337(6098):1115-9.
3. Baldwin TM, Elso C, Curtis J, Buckingham L, Handman E. The site of *Leishmania major* infection determines disease severity and immune responses. *Infect Immun.* 2003 Dec;71(12):6830-4.
4. Stamper LW, Patrick RL, Fay MP, et al. Infection parameters in the sand fly vector that predict transmission of *Leishmania major*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Aug;5(8):e1288.
5. Novoa R, Bacellar O, Nascimento M, et al. IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection. *Parasite Immunol.* 2011 Feb;33(2):132-6.
6. Soong L, Chang CH, Sun J, et al. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol.* 1997 Jun 1;158(11):5374-83.
7. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol.* 2009 Mar;10(3):314-24.

8. Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jun;8(6):458-66.
9. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol.* 2006 Jan;27(1):17-23.
10. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005 Jan 17;201(2):233-40.
11. Wiekowski MT, Leach MW, Evans EW, et al. Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit p19 induces multiorgan inflammation, runting, infertility, and premature death. *J Immunol.* 2001 Jun 15;166(12):7563-70.
12. Dietze-Schwonberg K, Lorenz B, Kostka SL, Schumak B, Gessner A, von Stebut E. Insufficient generation of Th17 cells in IL-23p19-deficient BALB/c mice protects against progressive cutaneous leishmaniasis. *Exp Dermatol.* 2018 Jan;27(1):101-103.
13. Bacellar O, Faria D, Nascimento M, et al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2009 Jul 1;200(1):75-8.
14. Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol.* 2009 Mar 1;182(5):3039-46.
15. Gonzalez-Lombana C, Gimblet C, Bacellar O, et al. IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. *PLoS Pathog.* 2013 Mar;9(3):e1003243.
16. Araujo Flores GV, Sandoval Pacheco CM, Sosa Ochoa WH, et al. Th17 lymphocytes in atypical cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi* in Central America. *Parasite Immunol.* 2020 Nov;42(11):e12772.
17. Gonzalez K, Calzada JE, Corbett CEP, Saldaña A, Laurenti MD. Involvement of the Inflammasome and Th17 Cells in Skin Lesions of Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) panamensis*. *Mediators Inflamm.* 2020 Oct 27;2020:9278931.

18. Katara GK, Raj A, Kumar R, et al. Analysis of localized immune responses reveals presence of Th17 and Treg cells in cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. *BMC Immunol*. 2013 Nov 22;14:52.
19. Khan D, Ansar Ahmed S. Regulation of IL-17 in autoimmune diseases by transcriptional factors and microRNAs. *Front Genet*. 2015 Jul 14;6:236.
20. da Silva GAV, de Mesquita TGR, de Souza Encarnação HV, et al. A polymorphism in the IL1B gene (rs16944 T/C) is associated with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania guyanensis* and plasma cytokine interleukin receptor antagonist. *Cytokine*. 2019 Nov;123:154788.
21. Yen D, Cheung J, Scheerens H, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*. 2006 May;116(5):1310-6.
22. Imamura E, Taguchi K, Sasaki-Iwaoka H, Kubo S, Furukawa S, Morokata T. Anti-IL-23 receptor monoclonal antibody prevents CD4+ T cell-mediated colitis in association with decreased systemic Th1 and Th17 responses. *Eur J Pharmacol*. 2018 Apr 5;824:163-169.
23. da Silva GAV, Mesquita TG, Souza VC, et al. A Single Haplotype of IFNG Correlating With Low Circulating Levels of Interferon- γ Is Associated With Susceptibility to Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania guyanensis*. *Clin Infect Dis*. 2020 Jul 11;71(2):274-281.
24. Castellucci LC, Almeida L, Cherlin S, et al. A Genome-Wide Association Study Identifies SERPINB10, CRLF3, STX7, LAMP3, IFNG-AS1 and KRT80 As Risk Loci Contributing to Cutaneous Leishmaniasis In Brazil. *Clin Infect Dis*. 2020 Aug 23:ciaa1230.
25. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006 Feb;24(2):179-89.
26. Ruddy MJ, Wong GC, Liu XK, et al. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. *J Biol Chem*. 2004 Jan 23;279(4):2559-67.

27. Castellucci L, Cheng LH, Araújo C, et al. Familial aggregation of mucosal leishmaniasis in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Jul;73(1):69-73.
28. Bunte K, Beikler T. Th17 Cells and the IL-23/IL-17 Axis in the Pathogenesis of Periodontitis and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019 Jul 10;20(14):3394.
29. Neurath MF. IL-23 in inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019 Feb;45:1-8.
30. Munde EO, Raballah E, Okeyo WA, Ong'echa JM, Perkins DJ, Ouma C. Haplotype of non-synonymous mutations within IL-23R is associated with susceptibility to severe malaria anemia in a *P. falciparum* holoendemic transmission area of Kenya. *BMC Infect Dis.* 2017 Apr 20;17(1):291.
31. Ravenhall M, Campino S, Sepúlveda N, et al. Novel genetic polymorphisms associated with severe malaria and under selective pressure in North-eastern Tanzania. *PLoS Genet.* 2018 Jan 30;14(1):e1007172.
32. Mizuki N, Meguro A, Ota M, et al. Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behçet's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010 Aug;42(8):703-6.
33. Min Wang, Tian Tian, Shuang Yu, Na He, and Daoxin Ma. Th17 and Treg Cells in Bone Related Diseases. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:203705.
34. Gomes CM, Ávila LR, Pinto SA, et al. *Leishmania braziliensis* amastigotes stimulate production of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TGF- β by peripheral blood mononuclear cells from nonendemic area healthy residents. *Parasite Immunol.* 2014 May;36(5):225-31.
35. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity.* 2005 Mar;22(3):285-94.
36. Gooderham MJ, Papp KA, Lynde CW. Shifting the focus - the primary role of IL-23 in psoriasis and other inflammatory disorders. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2018 Jul;32(7):1111-1119.
37. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest.* 2006 May;116(5):1218-22.

38. Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):467-76.
39. Nakae S, Saijo S, Horai R, Sudo K, Mori S, Iwakura Y. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5986-90.
40. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003 Feb 13;421(6924):744-8.

Table 1. Distribution and Comparison of Genotypes and Alleles frequencies of the IL-23R Variant rs11805303 between Patients with Cutaneous Leishmaniasis (CL) and Healthy Controls Subjects (HC)

Genotypes and Alleles frequencies					
	Patients with CL	Healthy Control	Comparisons	OR (95% CI)	P value
Genotypes					
rs11805303	n = 828	n = 806			
C/C	483 (58.3%)	593 (73.6%)	TT vs CC	3.0 (1.8 – 5.0)	9.9 x 10 ⁻⁶
C/T	291 (35.1%)	191 (23.7%)	CT vs CC	1.9 (1.5 – 2.3)	1.6 x 10 ⁻⁸
T/T	54 (6.5%)	22 (2.7%)	TT+CT vs CC	2.0 (1.6 – 2.5)	8.3 x 10 ⁻¹¹
Alleles					
C	1377 (85%)		T vs. C	1.9 (1.6 - 2.2)	6.1x 10 ⁻¹²
T	235 (15%)				
Common Odds Ratio for the risk Allele T (OR=1.8; P = 2.2 x 10⁻¹¹)					

Table2. Distribution and Comparison of Genotypes and Alleles frequencies of the IL-23R Variant rs11805303 between Patients with Cutaneous Leishmaniasis (CL) and Healthy Controls Subjects (HC) Stratified According to Gender

Genotype and Allele frequencies				
rs11805303	Patients with CL		Controls	
	Male	Female	Male	Female
Genotypes	N=620	N=208	N=561	N=245
CC	362 (58.4%)	121(58.2%)	410 (73.1%)	183 (74.7%)
CT	215 (34.7%)	76 (36.5%)	135 (24.1%)	56 (22.9%)
TT	43 (6.90%)	11 (5.30%)	16 (2.90%)	6 (2.40%)
Alleles				
C	939 (76%)	318 (76%)	955 (85%)	422 (86%)
T	301 (24%)	98 (24%)	167 (15%)	68 (14%)
Statistical comparisons between patients with CL and Controls adjusted by age				
Inheritance models	Male		Female	
	OR [CI 95%]	p-value	OR [CI 95%]	p-value
Codominant				
CC				
CT	1.9 [1.4 - 2.6]	1.1 x 10 ⁻⁶	2.6 [1.6 - 4.3]	4.0 x 10 ⁻⁴
TT				
Dominant				
CC vs CT+TT	2.0 [1.5 - 2.7]	5.2 x 10 ⁻⁷	2.6 [1.6 - 4.2]	7.5 x 10 ⁻⁵
Recessive				
CC+CT vs.TT	2.6 [1.4 - 4.9]	2.6 x 10 ⁻³	1.9 [0.6 - 6.1]	2.6 x 10 ⁻¹
Genotypes Comparisons				
TT vs CC	3.0 [1.7 - 5.5]	1.7 x 10 ⁻⁴	2.8 [1.0 – 7.7]	0.04
CT vs. CC	1.8 [1.4 - 2.3]	6.4 x 10 ⁻⁶	2.1 [1.4 – 3.1]	6.1 x 10 ⁻⁴
T vs. C	1.8 [1.5 - 2.3]	1.1 x 10 ⁻⁸	1.9 [1.4 – 2.7]	1.7 x 10 ⁻⁴
Common Odds Ratio for risk T allele (OR= 1.77; P= 1.2 x 10 ⁻⁴)			(OR= 1.8; P= 2.1 x 10 ⁻⁴)	

4)

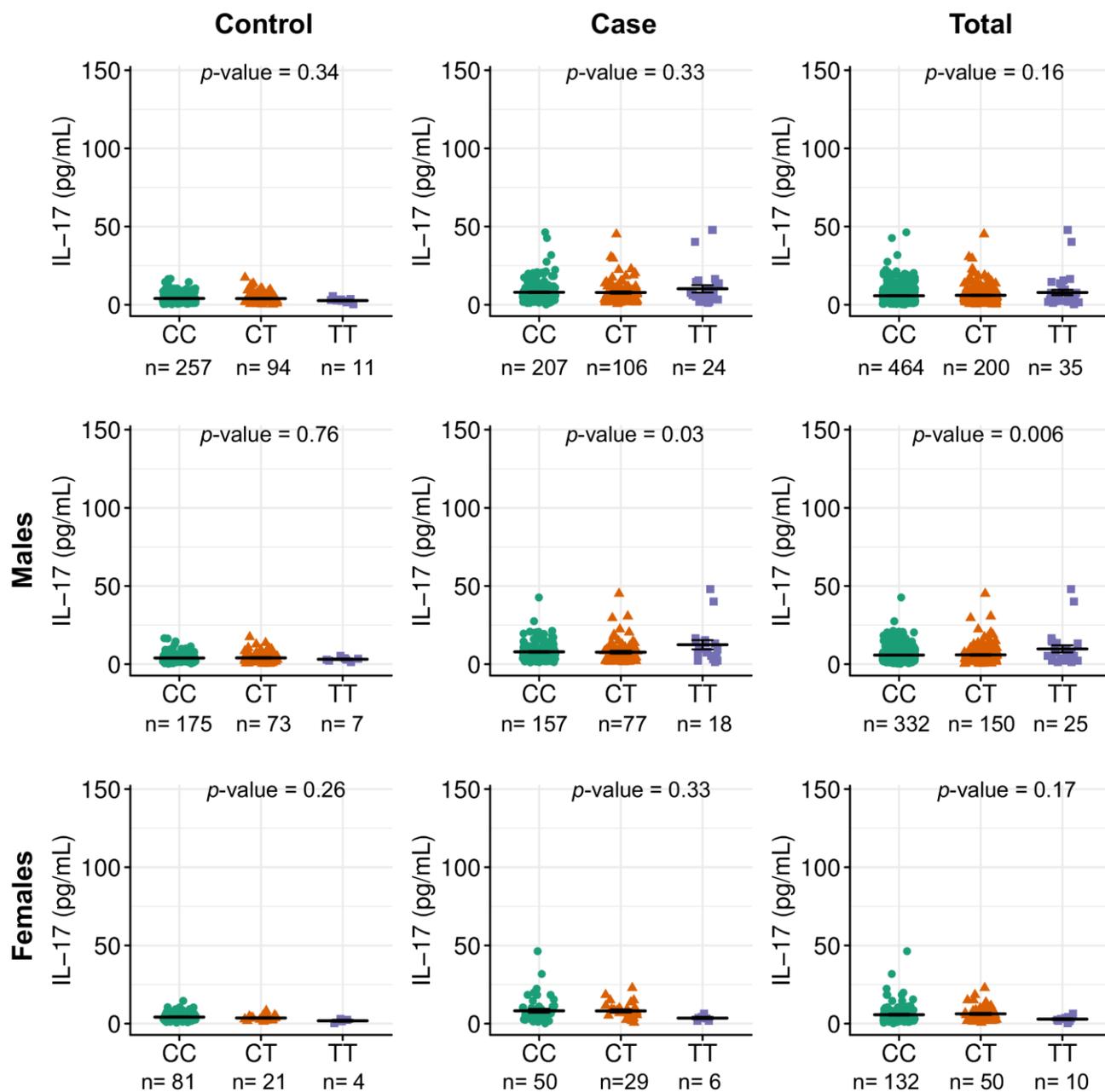


Figure 1. Plasma IL-17 by rs11805303 genotypes in healthy individuals, patients with CL and total (healthy individuals + patients with C) and stratified by gender. The concentrations of IL-17 are in picogram per millilitre (pg/mL). P values are adjusted by age. The p -values < 0.05 were considered statistically significant.

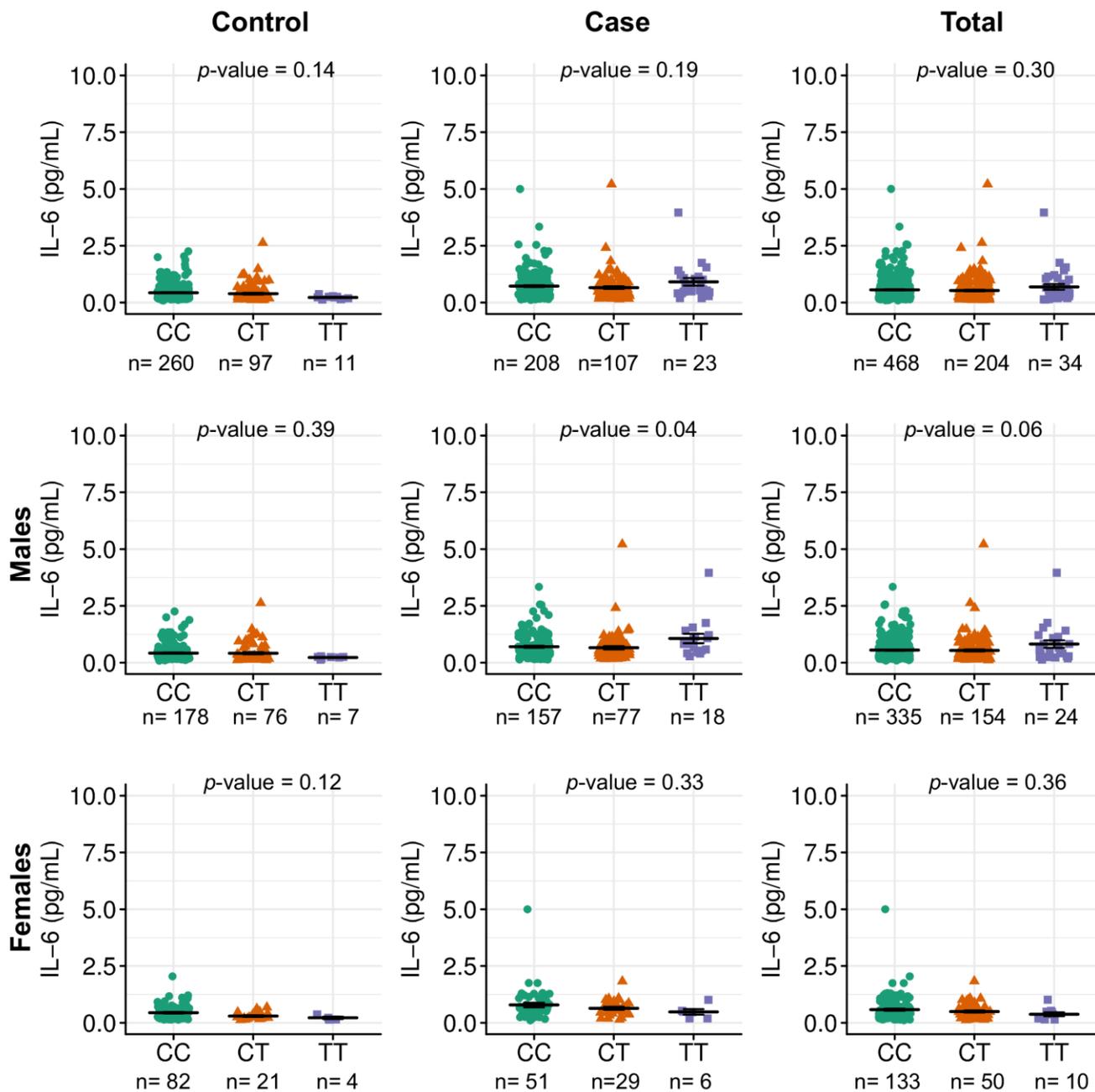


Figure 2. Plasma IL-6 by rs11805303 genotypes in healthy individuals, patients with CL and total (healthy individuals + patients with C) and stratified by gender. The concentrations of IL-6 are in picogram per millilitre (pg/mL). P values are adjusted by age. The p -values < 0.05 were considered statistically significant.

Supplementary Table 1. Mean and standard error mean levels (mean \pm SEM pg/mL) of plasma cytokines IL-17, IL-1 β , IL-6, TNF- α and IFN- γ by IL-23R rs11805303 genotypes among patients with CL (CL) and healthy controls (HC) stratified by gender

		MALES			FEMALE		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	
IL-17 HC	3.92 \pm 0.21	4.01 \pm 0.41	3.12 \pm 0.46	4.17 \pm 0.30	3.60 \pm 0.37	1.80 \pm 0.61	
CL	7.90 \pm 0.47	7.67 \pm 0.85	12.4 \pm 2.90	8.20 \pm 1.20	8.10 \pm 0.96	3.50 \pm 0.69	
IL-1 β HC	0.71 \pm 0.08	0.67 \pm 0.09	0.41 \pm 0.08	0.77 \pm 0.14	0.40 \pm 0.04	0.29 \pm 0.08	
CL	1.27 \pm 0.16	0.91 \pm 0.09	1.75 \pm 0.70	1.25 \pm 0.27	0.74 \pm 0.09	1.60 \pm 1.01	
IL-6 HC	0.42 \pm 0.03	0.42 \pm 0.05	0.23 \pm 0.02	0.44 \pm 0.04	0.30 \pm 0.03	0.22 \pm 0.05	
CL	0.70 \pm 0.04	0.66 \pm 0.07	1.10 \pm 0.21	0.80 \pm 0.10	0.64 \pm 0.07	0.48 \pm 0.12	
TNF- α HC	16.4 \pm 1.5	13.6 \pm 1.7	9.6 \pm 1.7	17.2 \pm 2.2	12.6 \pm 2.6	6.70 \pm 1.5	
CL	27.5 \pm 2.3	24.1 \pm 2.5	27.0 \pm 5.2	20.8 \pm 2.2	19.4 \pm 3.2	23.2 \pm 9.2	
IFN- γ HC	18.1 \pm 0.9	17.4 \pm 1.6	13.8 \pm 1.6	17.2 \pm 1.1	15.6 \pm 1.4	11.6 \pm 2.8	
CL	29.5 \pm 2.5	26.1 \pm	29.4 \pm 3.5	32.5 \pm 5.7	21.4 \pm 2.9	15.4 \pm 2.2	

Supplementary Table 2. Mean and standard error mean levels (mean \pm SEM pg/mL) of plasma cytokines IL-17, IL-1 β , IL-6, TNF- α and IFN- γ by IL-23R rs11805303 genotypes among patients with CL (CL) and healthy controls (HC)

	CC	CT	TT
IL-17 HC	3.99 \pm 0.17	3.92 \pm 0.33	2.64 \pm 0.41
CL	7.95 \pm 0.46	7.79 \pm 0.67	10.2 \pm 2.30
Total	5.76 \pm 0.24	6.0 \pm 0.40	7.8 \pm 1.70
IL-1 β HC	0.73 \pm 0.07	0.61 \pm 0.07	0.36 \pm 0.06
CL	1.26 \pm 0.14	0.86 \pm 0.07	1.70 \pm 0.56
Total	0.96 \pm 0.07	0.74 \pm 0.05	1.30 \pm 0.39
IL-6 HC	0.43 \pm 0.02	0.39 \pm 0.03	0.22 \pm 0.02
CL	0.72 \pm 0.04	0.65 \pm 0.06	0.91 \pm 0.17
Total	0.56 \pm 0.02	0.53 \pm 0.04	0.69 \pm 0.12
TNF- α HC	16.6 \pm 1.2	13.4 \pm 1.5	8.50 \pm 1.2
CL	25.9 \pm 1.8	22.8 \pm 2.0	25.0 \pm 4.4
Total	20.7 \pm 1.1	18.4 \pm 1.3	20.5 \pm 3.4
IFN- γ HC	17.8 \pm 0.7	17.0 \pm 1.3	12.9 \pm 1.4
CL	30.2 \pm 2.3	24.8 \pm 2.1	25.7 \pm 2.9
Total	23.3 \pm 1.1	21.1 \pm 1.3	21.6 \pm 2.2

Supplementary Material

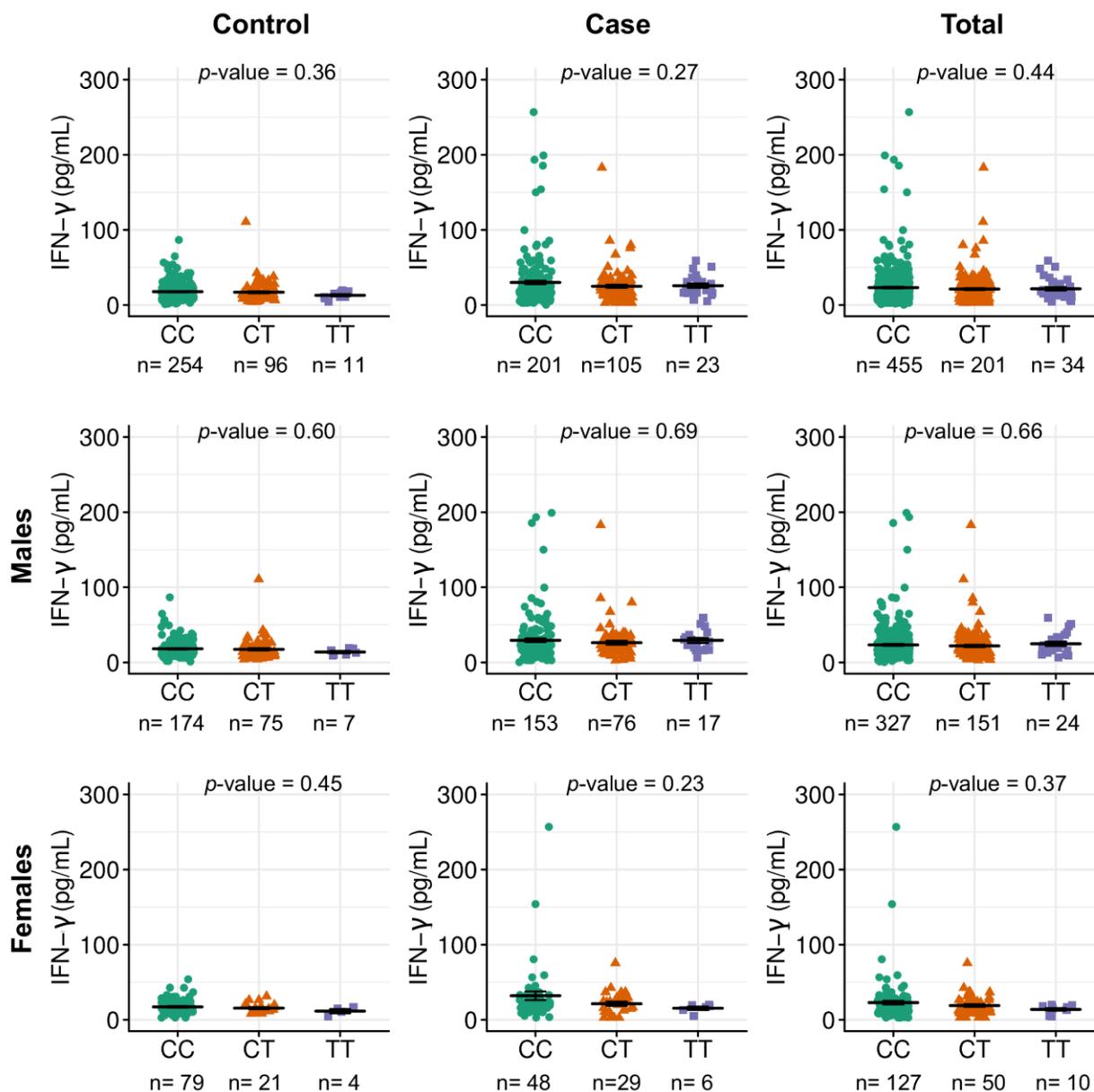


Figure 1. Plasma IFN- γ by rs11805303 genotypes in healthy individuals, patients with CL and total (healthy individuals + patients with C) and stratified by gender. The concentrations of IL-17 f are in picogram per millilitre (pg/mL). P values are adjusted by age. The p -values < 0.05 were considered statistically significant.

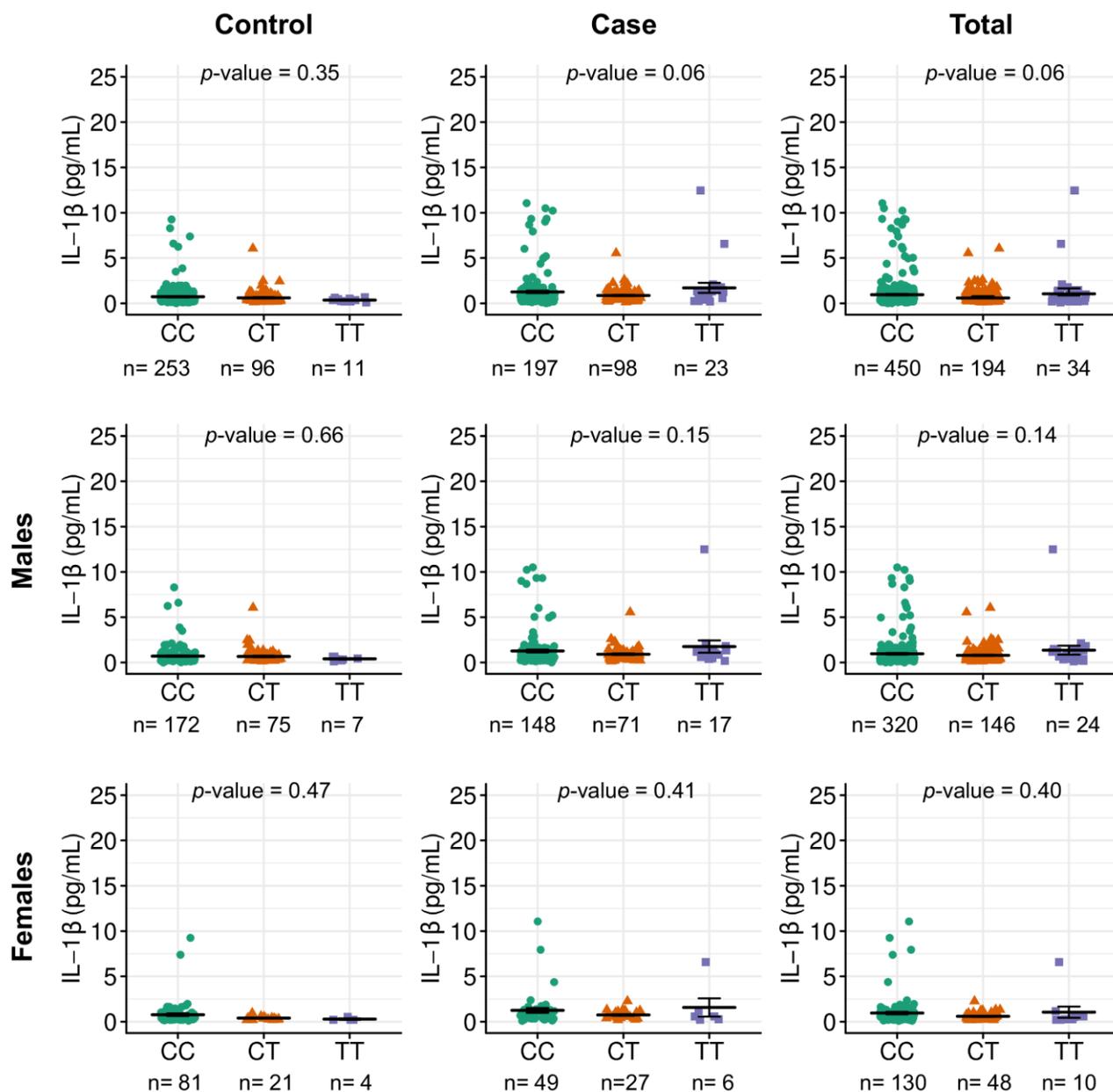


Figure 2. Plasma IL-1 β by rs11805303 genotypes in healthy individuals, patients with CL and total (healthy individuals + patients with C) and stratified by gender. The concentrations of IL-17 f are in picogram per millilitre (pg/mL). P values are adjusted by age. The p -values < 0.05 were considered statistically significant.

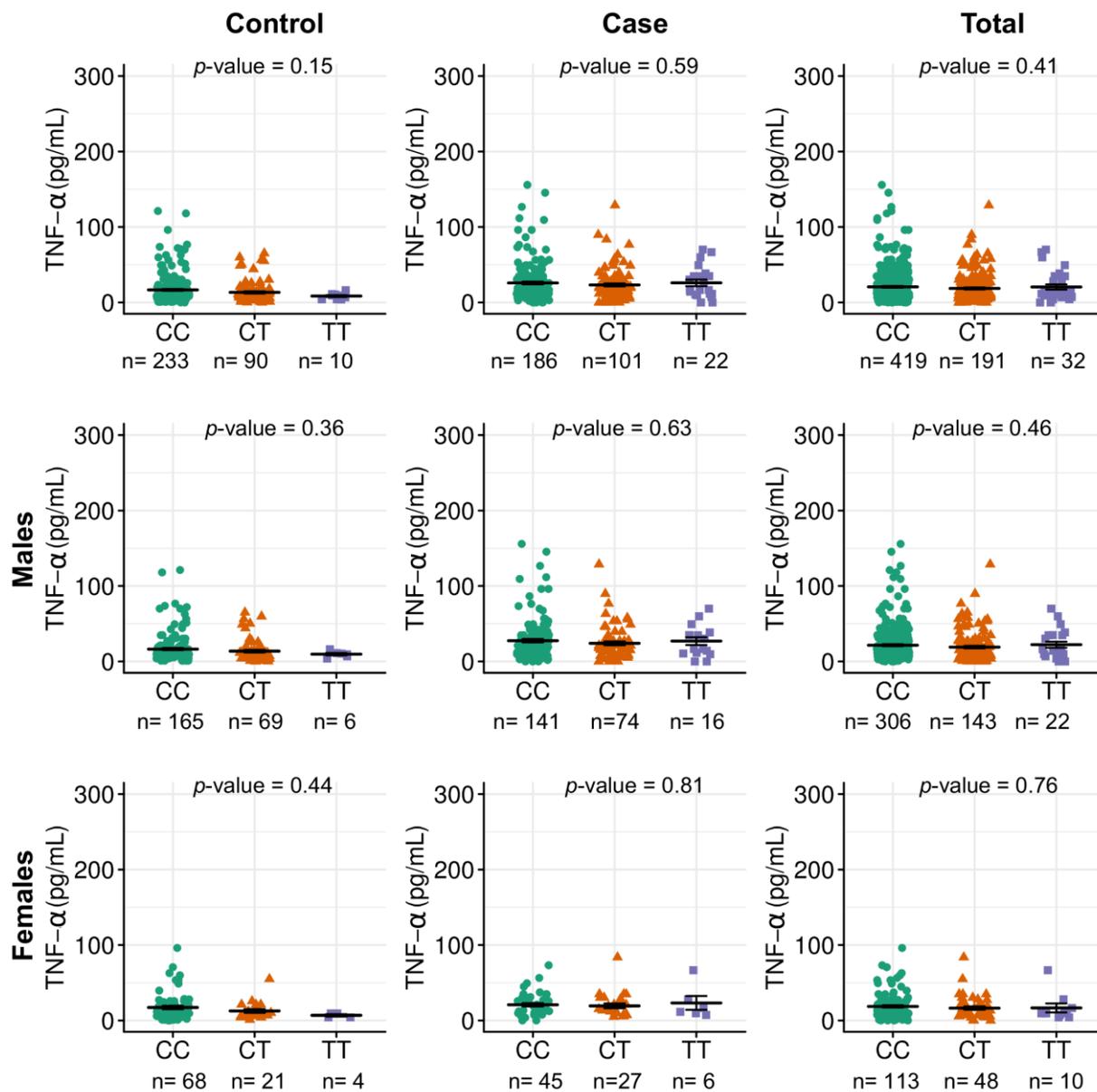


Figure 3. Plasma TNF- α by rs11805303 genotypes in healthy individuals, patients with CL and total (healthy individuals + patients with C) and stratified by gender. The concentrations of IL-17 f are in picogram per millilitre (pg/mL). P values are adjusted by age. The p -values < 0.05 were considered statistically significant.