



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA
(PPGIBA/ICB/UFAM)**



**AVALIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS DE *IL12B* EM PACIENTES COM
LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania guyanensis* NO ESTADO DO
AMAZONAS**

JOSUÉ LACERDA DE SOUZA

MANAUS/AM

ANO 2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA
(PPGIBA/ICB/UFAM)**



JOSUÉ LACERDA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS DE *IL12B* EM PACIENTES COM
LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania guyanensis* NO ESTADO DO
AMAZONAS**

Dissertação apresentada para aula de defesa de mestrado ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas.

Orientador: Prof. Dr. Rajendranath Ramasawmy

MANAUS/AM

Ano 2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729a Souza, Josué Lacerda de
Avaliação de variantes genéticas de IL12B em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *Leishmania guyanensis* no estado do Amazonas / Josué Lacerda de Souza . 2022
85 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Rajendranath Ramasawmy
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Leishmaniose cutânea (LC). 2. Eixo Th1 IL-12/IFN-. 3. Variante SNV. 4. Resposta celular Th1. I. Ramasawmy, Rajendranath. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela saúde, entendimento e paciência para enfrentar esse desafio de pós-graduação.

À família, minha vozinha, Ninfa Lopes (que hoje vive em meu coração e mente), minha mãe Francisca Socorro Lopes de Lacerda pessoas que foram responsáveis pela minha criação e educação, que sempre me incentivaram a percorrer o caminho justo e digno, pelo amor e carinho que me envolveram ao longo da minha vida. Também agradeço aos meus irmãos, Ninfa Lacerda de Souza, Jesse Lacerda de Sousa e Uriel Lopes de Lacerda por sempre me protegerem e ampararem nos mais diversos momentos de minha vida, sou muito grato por fazer parte dessa família que é minha força e esteio.

À pessoa que me inspirou na vida acadêmica, meu orientador e amigo Rajendranath Ramasawmy. Agradeço a minha equipe de laboratório, Lener Santos da Silva, José do Espírito Santo Júnior, Tirza Gabrielle Ramos de Mesquita, Tuanny.

Agradeço os secretários do PPGIBA, Edson Brazão e Ana Paula. Agradeço a todo o corpo docente do PPGIBA-UFAM, em especial à Coordenadora Jerusa Araújo Quintão. Agradeço à banca examinadora que se dispôs a ler e avaliar essa dissertação. Agradeço à FAPEAM, à Universidade Federal do Amazonas, nosso maior patrimônio, também a todos os pacientes que cederam suas amostras para fins de pesquisa científica.

Muito OBRIGADO!

*“ É muito melhor conquistar a
sabedoria do que o ouro puro. É
mais proveitoso obter o
entendimento do que a prata
mais valiosa. ”*

(Provérbios 16:16)

RESUMO

A Leishmaniose cutânea é uma doença infecciosa podendo ser causada por protozoário do gênero *L. guyanensis*, com diferentes manifestações clínicas. A infecção ocorre pela inoculação da forma promastigota metacíclica no corpo do hospedeiro, durante o repasto sanguíneo da fêmea do flebotomíneo infectada, desencadeando resposta imunológica. Interleucina 12 (IL-12) é citocina chave para o desenvolvimento de células Th1, resposta Th1 é conhecida pela eliminação de microrganismo intracelular, polarização de macrófagos (M1), aumento de IFN- γ , resistência contra LC. Estudo caso-controle, com objetivo de investigar variantes presentes ao longo do gene *IL12B* em pacientes com LC (grupo caso) e indivíduos saudáveis (grupo controle) sem histórico de Leishmaniose, procedentes das mesmas áreas endêmicas do grupo caso. As análises das variantes do *IL12B* foram realizadas por PCR-RFLP e a dosagem das citocinas (IL-12 e IFN- γ) pelo método Luminex. A partir dos resultados obtidos, foi visto que a presença do genótipo C/C da SNV rs2569253 foi associada com suscetibilidade a LC ($p=0.32$; OR=1.53 [95% IC 1.07-2.22]), em contraste, genótipo A/G da SNV rs3181224 foi associado a proteção contra LC ($p=0.032$; OR=0.68 [95% IC 0.51-0.91]). É observado também o desequilíbrio de ligação da SNV rs3181225 com rs919766 ($r^2=0.85$), e haplótipo H3 C/A/A/A associado com suscetibilidade frente a LC (OR 1.6; IC 95% [1.20-2.27]; $P=0.001$). É visto ainda, que o genótipo C/C, SNV rs2569253, (C/C vs T/T) foi correlacionado com baixa produção de IL-12 ($p=0.05$) no grupo controle. Desta forma, esses resultados sugerem que as variantes presentes no gene *IL12B* pode ter uma importante influência no desfecho clínico da LC.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea (LC); Eixo Th1 IL-12/IFN- γ ; Variante SNV; Resposta celular Th1.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis is an infectious disease and can be caused by protozoan of the genus *L. guyanensis*, with different clinical manifestations. Infection occurs by inoculation of the promastigotic form metacyclic into the host body during the blood supply of the infected female, triggering immune response. Interleucine 12 (IL-12) It is key cytokine for the development of TH1 cells, response TH1 is known for the elimination of intracellular microorganism, macrophage polarization (M1), IFN- γ increase, LC resistance. Case-control study, to investigate variants, present through the IL12B gene in LC patients (case group) and healthy individuals (control group) without leishmaniasis history, from the same endemic areas of the case group. IL12B variants analyzes were performed by PCR-RFLP and cytokine dosage (IL-12 and IFN- γ) by the Luminex method. From the results obtained, it was seen that the presence of the SNV C/C genotype RS2569253 was associated with LC susceptibility ($p = 0.32$; or = 1.53 [95% ic 1.07-2.22]), in contrast, genotype A/G da SNV RS3181224 was associated with LC protection ($p = 0.032$; or = 0.68 [95% IC 0.51-0.91]). The connection imbalance of SNV rs3181225 with rs919766 ($R^2 = 0.85$), and Haplotype H3 C/A/A/A/ is associated with susceptibility compared to LC (OR 1.6; 95% [1.20-2.27]; $p = 0.001$). It is also seen that the genotype c/c, snv RS2569253, (C/C vs T/T) It was correlated with low production of IL-12 ($p = 0.05$) in the control group. Thus, these results suggest that the variants present in the IL12B gene may have an important influence on the clinical outcome of LC.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis (CL); Th1 axis IL-12/IFN- γ ; SNV variant; Th1 cellular response.

ABREVIATURAS E SIGLAS

AM – Amazonas	LV – Leishmaniose Visceral
OMS – Organização Mundial da Saúde	PKDL - Post-Kala-azar Dermal Leishmaniasis
CD – Grupo de Diferenciação	MgCl ₂ – Cloreto de Magnésio
DNA – Ácido Desoxirribonucleico	NETs - Neutrophil Extracellular Traps
DNA – Ácido Desoxirribonucleico	AP-1 - Activator protein 1
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra- Acético dNTP – dinucleotídeo trifosfato	NF-κB - Nuclear factor-kappa B
FMT-HVD – Fundação de Medicina Tropical – Dr Heitor Vieira Dourado	STAT - Signal transducer and activator of transcription
IFN-γ – Interferon-Gama	NFATc2 - Fator Nuclear de Células T ativadas
MHC - Complexo Maior De Histocompatibilidade	OR – Odds ratio
TLR4 - Toll Like Receptor 4	PCR – Reação em cadeia da Polimerase
IL – Interleucina	RPM – Rotação Por Minuto
MAF - Fator De Ativação Dos Macrófagos	SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único
LC – Leishmaniose Cutânea	Taq – <i>Thermus aquaticus</i>
LCDB – Leishmaniose Cutânea Disseminada Bordeline	TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada	Th – Linfócito T Help
LM – Leishmaniose Mucosa	TNF – Fator de Necrose Tumoral
LMC – Leishmaniose CutâneoMucosa	TGF-β - Fator de transformação do crescimento beta
LPDE – Laboratório de Pesquisa em Doenças Endêmicas	PRRs - Receptores De Reconhecimento De Padrões
LT – Leishmaniose Tegumentar	CD – Células Dendriticas
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana	CCL3 - C-C Motif Chemokine Ligand 3

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição global das Leishmanioses.
- Figura 2.** Número de casos de LT, Brasil e regiões, 2003-2018.
- Figura 3.** Formas do parasito da *Leishmania*. **A.** Imagem da forma Promastigota. **B.** Imagem da forma Amastigota.
- Figura 4.** Ciclo biológico da *Leishmania*.
- Figura 5.** Paciente com leishmaniose visceral.
- Figura 6.** Tipos de lesões PKDL.
- Figura 7.** Lesão característica da forma cutânea da leishmaniose.
- Figura 8.** Lesão da forma mucosa da leishmaniose ML.
- Figura 9.** Família de citocinas heterodimerica.
- Figura 10.** Ilustração da via de sinalização IL-12, criada no site Biorender.
- Figura 11.** Gene *IL12B* e variantes.
- Figura 12.** Discriminação genotípica rs3181224.
- Figura 13.** Discriminação genotípica rs3181225.
- Figura 14.** Discriminação genotípica rs919766.
- Figura 15.** Discriminação genotípica rs2569153.
- Figura 16.** A distribuição e posição das variantes no gene *IL12*, e a estrutura de desequilíbrio de ligação das diferentes variantes do gene *IL12*.
- Figura 17.** Correlação dos genótipos das variantes rs2569253 e rs919766 com nível plasmático da citocina IL-12, grupo caso, controle e total, 2022.
- Figura 18.** Correlação dos genótipos das variantes rs3181224 e rs3181225 com nível plasmático da citocina IL-12, grupo caso, controle e total, 2022.
- Figura 19.** Correlação dos genótipos das variantes rs2569253 e rs919766, com nível plasmático da citocina IFN- γ , grupo caso, controle e total, 2022.
- Figura 20.** Correlação dos genótipos das variantes rs3181224 e rs3181225, com nível plasmático da citocina IFN- γ , grupo caso, controle e total, 2022.
- Figura 21.** Correlação dos genótipos da variante rs2569253 com nível plasmático da citocina IL-12 grupo controle, caso e total, 2022.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. SNV e primers, 2021.

Tabela 02. Programa de ciclagem para cada SNV, 2021.

Tabela 03. Distribuições das frequências alélicas e genotípicas da SNV rs2569253 estudada do gene IL12B, 2022.

Tabela 04. Distribuições das frequências alélicas e genotípicas da SNV rs919766 estudada do gene IL12B, 2022.

Tabela 05. Distribuições das frequências alélicas e genotípicas da SNV rs3181224 estudada do gene IL12B, 2022.

Tabela 06. Distribuições das frequências alélicas e genotípicas da SNV rs3183225 estudada do gene IL12B, 2022.

Tabela 07. Distribuições dos haplótipos do gene IL12 na população do estudo, 2022.

Tabela 08. Correlações dos genótipos das variantes rs2569253 e rs919766 com níveis plasmáticos das citocinas (IL-12 e IFN.γ), 2022.

Tabela 09. Correlações dos genótipos das variantes rs3181224 e rs3181225 com níveis plasmáticos das citocinas (IL-12 e IFN.γ), 2022.

Tabela 10. Correlações dos genótipos (sem a presença do C/T) da variante rs2569253 com níveis plasmáticos da citocina IL-12, 2022.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 Epidemiologia das Leishmanioses.....	15
2.2 Agente etiológico e Ciclo Biológico.....	17
2.3 Manifestações e formas clínicas da Leishmaniose.....	19
2.4 Aspectos imunológicos da Leishmaniose.....	24
2.5 As funções da Interleucina 12.....	32
2.5.1 Sinalização IL-12.....	34
2.6 Variantes genéticas.....	35
2.7 Variantes genéticas de IL12B.....	36
3. JUSTIFICATIVA.....	37
4. OBJETIVOS.....	37
4.1 Objetivo geral.....	37
4.2 Objetivos específicos.....	37
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
5.1 Tipo de Estudo.....	38
5.2 Aspectos Éticos.....	38
5.3 Área de Estudo.....	38
5.4 População de Estudo.....	39
5.5 Pacientes com leishmaniose cutânea.....	39
5.6 Grupo Controle.....	40
5.7 Material Biológico.....	40
5.8 Extração de DNA.....	40
5.9 Critérios da seleção das variantes.....	40

5.10 PCR das variantes no IL-12B	41
5.11 Genotipagem das variantes do IL12B	42
5.12 Quantificação de citocinas e quimiocinas em imunoensaio pelo método Luminex	44
5.13 Análise estatística.....	44
6. RESULTADOS.....	45
6.1 Frequências alélicas e genóticas dos SNVs do gene IL12B.....	45
6.2 Desequilíbrio de ligação (DL) das variantes do IL12B.....	50
6.3 Avaliação da influência dos genótipos das variantes com as concentrações de citocina IL-12 e IFN- γ	52
7. DISCUSSÃO	58
8. CONCLUSÃO	62
9. REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, é um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica transmitida por vetores ao hospedeiro humano (CHANG et al., 1985; BRASIL, 2007). Mudanças recentes nos padrões de transmissões de doenças vetoriais têm sofrido influências de fatores como modificações de ecossistemas por meio da agricultura, barragens e irrigações, desmatamentos, assentamentos humanos e urbanizações. Alguns desses fatores têm alterado o padrão de transmissão das Leishmanioses que são descritas inicialmente como uma zoonose, no qual o homem pode ser afetado pela doença de forma acidental no momento em que o hospedeiro entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, sendo considerado como uma antropozoonose, na qual a doença é transmitida primeiramente entre animais e posteriormente aos humanos. (PURSE et al., 2017) e (GRIMALDI e TESH, 1993; WHO, 2021).

As leishmanioses apresentam-se de três principais tipos de leishmaniose: i) Leishmaniose Visceral (LV); ii) Leishmaniose Cutânea (LC) sendo a forma mais comum; e iii) Leishmaniose Mucocutânea (LM), as LC e LM podem ser classificadas como Leishmaniose Tegumentar (LT) por provocar lesões na pele, no qual se difere quanto a distribuição geográfica da espécie do parasito causador da doença.

A LC está associada a fatores como desnutrição, sistema imunológico, deslocamento da população e moradia precária, e afeta pessoas carentes na África, Ásia e América Latina. Em 2019, 98 países se tornaram endêmicos para as leishmanioses, sendo 19 países endêmicos somente para forma de LC. Estima-se que aproximadamente 1,7 bilhão de pessoas ou 1/4 da população mundial vivem em áreas de risco para todos os tipos de Leishmanioses (WHO, 2021; JONES et al., 1987; SAMPAIO et al., 1997; PIGOTT et al., 2014).

Atualmente, são descritas diferentes espécies e subespécies de *Leishmania* que infectam humanos. A LT é a forma mais prevalente da doença com aproximadamente

90% dos casos. O Brasil está entre os 10 países do mundo que são responsáveis por mais de 70% dos casos de Leishmaniose Cutânea (ALVAR et al., 2012).

A Leishmaniose cutânea possui três formas clínicas que são: i) leishmaniose cutânea localizada (LCL) que caracteriza-se em lesões de pele mais superficiais, variando de 1 a 6 lesões da pele; ii) ou podendo se apresentar em forma de leishmaniose cutânea disseminada (LCD), quando o número de lesões for superior a 6 lesões; iii) ou podendo se apresentar também como leishmaniose cutânea difusa ou anérgica (LCDA) caracterizada por lesões nodulares ou papulosas contendo um grande número de parasitas sobre todo o corpo (GOTO e LINDOSO, 2010). Assim como, outras doenças que apresentam formas clínicas mais agressivas, a LM consistindo de lesões com infiltrados celulares resultando na destruição de regiões como cavidade nasal, faringe e laringe, se torna a forma mais agressiva da LC (VELOZO et al., 2006; GOTO et al., 2010).

O protozoário da LC é um microrganismo intracelular obrigatório pelo fato dele se utilizar do interior de células fagocíticas para sua multiplicação, o que faz a resposta imunológica ter um papel importante no desfecho da doença. A resposta imune mediada por células é o principal mecanismo efetor dos linfócitos Th1 que atuam contra microrganismos intracelulares que sobrevivem no interior de células fagocíticas ou em células não-fagocíticas. A citocina IL-12 é responsável pela diferenciação das células Th1 e pela indução de imunidade mediada por células. Os linfócitos Th1 produzem IFN- γ que ativam macrófagos a tornarem-se capazes de eliminar parasitos fagocitados (ABBAS et al., 2018).

Os mecanismos imunológicos e moleculares das Leishmanioses ainda não são totalmente compreendidos. Diferenças nas intensidades das respostas imunes celular são observadas entre diferentes infecções, como uma produção superior de IFN- γ e TNF em infecções por *L. (V.) braziliensis*, enquanto em pacientes com *L. (V.) guyanensis* são caracterizados por apresentar uma resposta imune celular menos intensa relacionada com um maior número de parasitas (CONVIT et al., 1993; MATTA et al., 2009).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia das Leishmanioses

As Leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e são caracterizadas por apresentarem repostas imunológicas complexas com amplo espectro clínico e diversidade epidemiológica, transmitida por vetores ao hospedeiro humano (BRASIL, 2007). As Leishmanioses estão descritas como uma zoonose no qual o homem é acometido pela doença no momento em que entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, deste modo, sendo considerado como uma antropozoonose (GRIMALDI & TESH, 1993; WHO, 2021).

Dos 200 países e territórios relataram casos das leishmanioses à Organização Mundial da Saúde (OMS), 98 países foram endêmicos para ambas as formas no ano 2019. Sendo, 71 países endêmicos para ambas as formas, LV e LC, 8 países para LV e 19 países somente para LC. Mais de 90% dos casos de LV foram reportados por 8 países: Argentina, Eritreia, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. No ano de 2019, 12 países registraram mais de 5.000 casos de LC: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Iraque, Líbia, Marrocos, Paquistão, Peru, República Árabe Síria e Tunísia, que juntos foram responsáveis por 91% dos casos de LC global (figura 1) (WHO, 2021).

No Brasil, o número de casos de Leishmaniose Tegumentar (LT) foi de 16.135 no ano de 2019, sofrendo aumento quando comparado ao ano anterior, tornando-se uma das manifestações dermatológicas que merece atenção devido à sua ampla distribuição geográfica. Somente no estado do Amazonas no ano de 2019 foram registrados 1.302 novos casos de LT (BRASIL, 2019). Na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Videira Dourado (FMT-HVD), localizada na cidade de Manaus, registrou 325 casos LT, sendo 11(3,4%) casos de LM e 314(96,6%) casos de LC (SINAN NET, 2019).

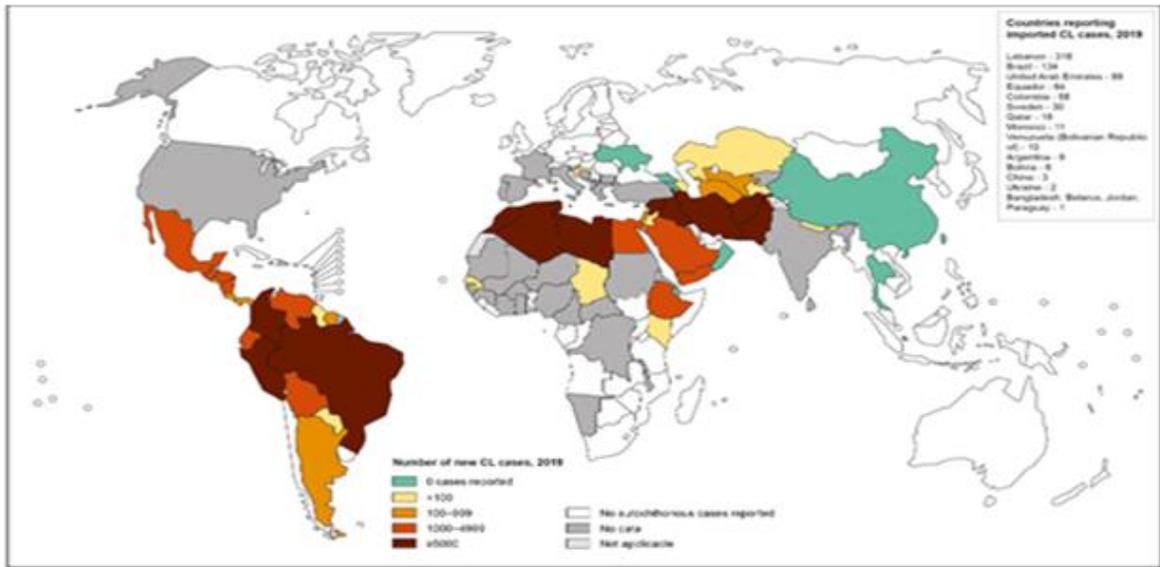


Figura 1. Distribuição global das Leishmanioses. **Fonte:** WHO, 2021.

No período de 2003-2018, foi registrado mais de 300.000 novos casos de LT, tendo uma média anual de 21.158 casos, sendo que a região norte tem sido a grande responsável pelo alto índice de coeficiente nacional na detecção de novos casos, o território nacional possui o coeficiente médio de 11,3 casos por 100.000 habitantes, com variação de 5,7 – 17,8. Dentre as manifestações clínicas, a forma de LC representa 92,3% e forma LM 7,7% **figura 2** (Brasil, 2019).

Os casos existentes estão diretamente relacionados com a expansão de áreas agrícolas, áreas de extração mineral, como ouro e petróleo, construções de estradas e da ocupação de novas áreas na periferia de cidades (GUERRA et al., 1998). Fazendo com que habitantes construam residências nas proximidades de densas florestas, o que acaba possibilitando a adaptação do flebotomíneo a esse novo ambiente, o que explica o aumento dos casos (BARBOSA et al., 2008).

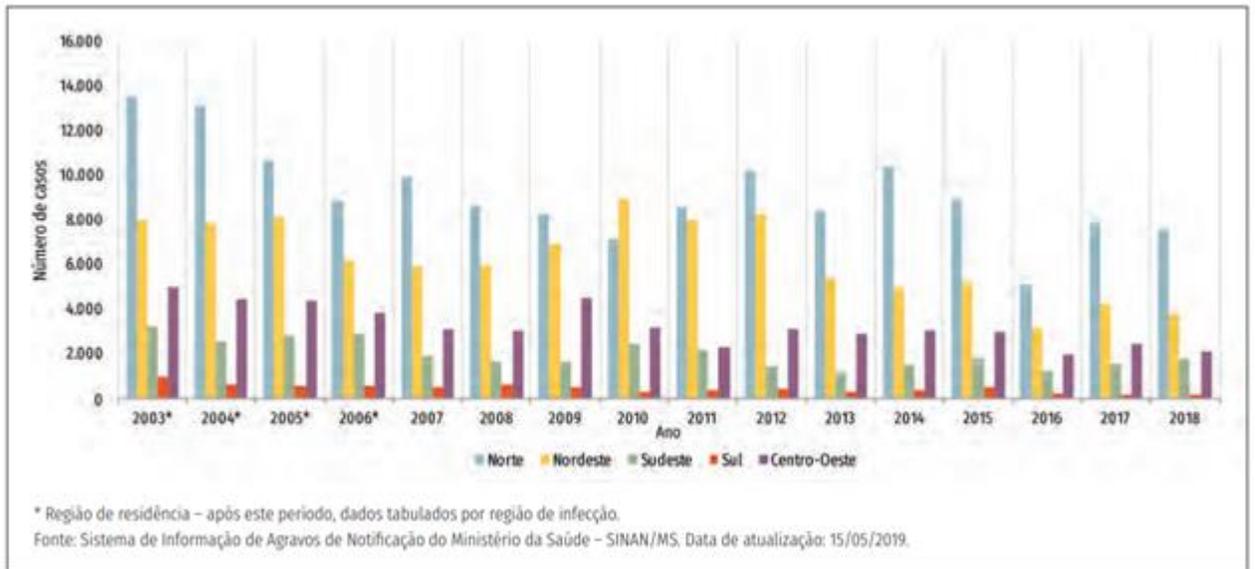


Figura 2. Número de casos de LT, Brasil e regiões, 2003-2018. **Fonte:** Ministério da Saúde e SINAN, 2019.

2.2 Agente etiológico e Ciclo Biológico

O agente etiológico *Leishmania* consiste de um protozoário pertencente a ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania* (SIMPSON, 1987). Ao longo do seu ciclo biológico o protozoário caracteriza-se por apresentar diferentes formas evolutivas, apresentando-se na forma de promastigota geralmente encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e de amastigota em células fagocíticas dos hospedeiros vertebrados (CHANG et al., 1985; WALTERS et al., 1987; GENARO, 2002). A forma promastigota (figura 3A) apresenta formato celular alongado, presença de flagelo e de mitocôndrias diferenciadas denominada de cinetoplasto; enquanto amastigotas (figura 3B) são estruturas celulares ovoides ou esféricas e não apresenta flagelo (CHANG et al., 1985; TELES et al., 2013).

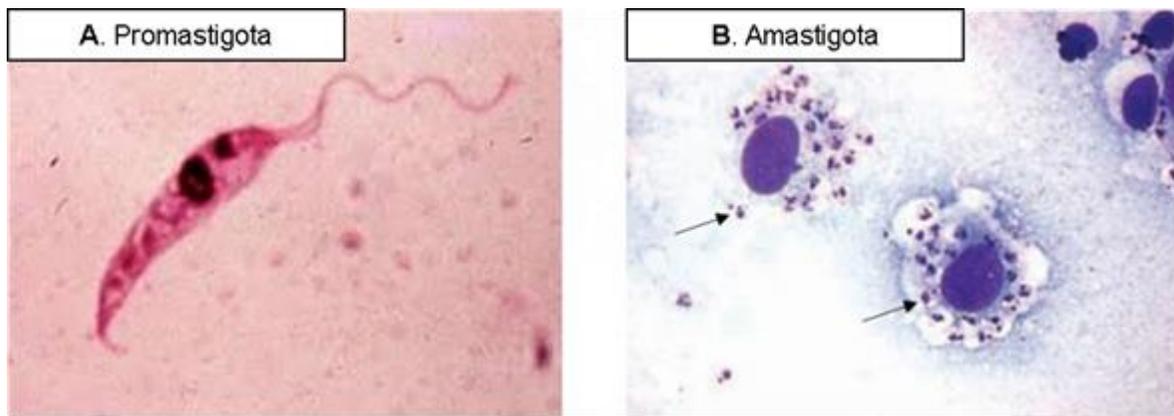


Figura 3. Formas do parasito da *Leishmania*. **A.** Imagem da forma Promastigota. **B.** Imagem da forma Amastigota. **Fonte:** IBAP / João Victor Roza Cruz, 2017.

O ciclo biológico (figura 4) tem início no momento em que o flebotomíneo fêmea infectado realiza o repasto sanguíneo em um indivíduo sadio, transmitindo a este a forma promastigota metacíclica, sendo esta infectante para o hospedeiro vertebrado. Após a internalização do protozoário pelos macrófagos, as promastigotas sofrem diferenciação para a forma amastigota, processo que leva de 12 a 24 horas. Essa última forma irá resistir ao ambiente hostil no interior do macrófago levando este a multiplicar-se, por divisão binária, promovendo lise do macrófago, sendo liberado no meio extracelular; podendo ser fagocitado por outros macrófagos. Em um novo repasto sanguíneo, as formas amastigotas irão infectar o flebotomíneo sadio. No intestino do hospedeiro invertebrado, o parasito sofre diferenciação celular, processo chamado de metaciclogênese, assumindo então a forma promastigota metacíclica, capacitando-o a ultrapassar as barreiras imunológicas. As promastigotas dirigem-se para a parte anterior do aparelho digestório do inseto (esôfago, faringe e probóscida) pronto a ser transmitido no próximo repasto sanguíneo (CUNNINGHAM, 2002; BATES, 2007).

Leishmaniasis

(*Leishmania*) spp.

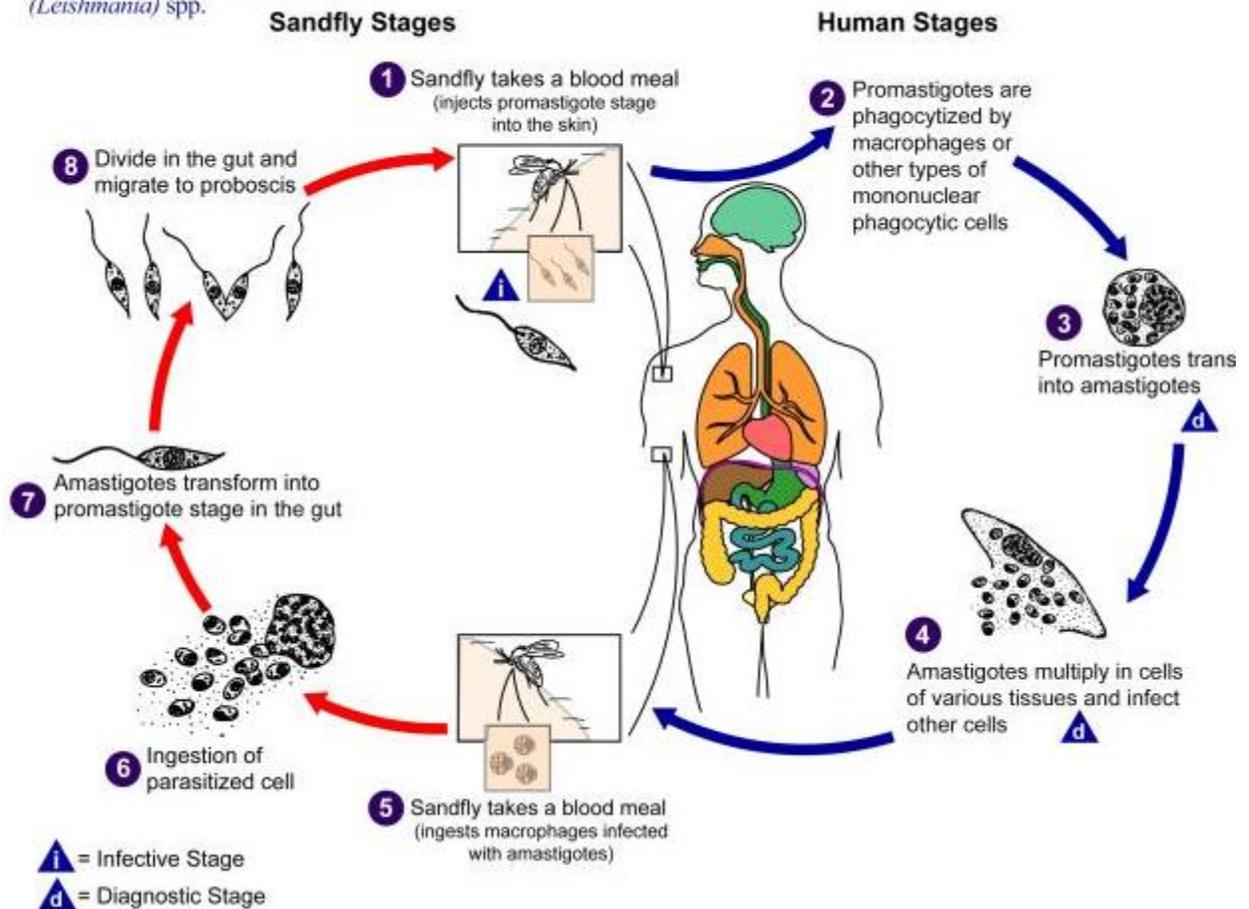


Figura 4. Ciclo biológico da *Leishmania*. Fonte: CDC/ Alexander J. da Silva, 2002.

2.3 Manifestações e formas clínicas da Leishmaniose

As manifestações clínicas da *Leishmania* são caracterizadas por duas formas principais em Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV), nos quais diferem quanto a distribuição geográfica e espécie do protozoário causador da doença (SAMPAIO et al., 1997).

Leishmaniose visceral (LV) ou Kala-zar

A LV causada por *L. donovani* é também conhecida por Kala-azar e sua manifestação clínica é caracterizada por picos de febre, perda de peso, anemia grave e com aumento do baço e fígado (Figura 5).



Figura 5. Paciente com leishmaniose visceral. **Fonte:** WHO, 2021.

A Post-Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) é uma complicação da leishmaniose visceral causada por *L. donovani* e sua manifestação clínica é caracterizada por erupção do tipo papular (**fig. 6A**) sendo a mais frequente com 51% em pacientes LV, outros tipos de erupções como nodular (**fig. 6B**) frequente em 23% dos pacientes, micropapular (**fig. 6C**), semelhante ao sarampo, frequente em 17% e macular (**fig. 6D**) frequente em 9% foram observadas em pacientes no leste de Sudão (ZIJLSTRA et al., 2003).



Figura 6. Tipos de lesões PKDL. **Fonte:** Zijlstra et al., 2003.

Nomenclatura das Leishmanioses Tegumentares

A terminologia que descreve as diferentes manifestações clínicas envolvendo lesões no tecido tegumentar pode ser um pouco confusa. A “leishmaniose tegumentar” é generalizada para todas as formas de leishmaniose que envolve lesão ao tecido tegumentar, enquanto que “Leishmaniose Cutânea” (geralmente abreviada CL) refere-se também a leishmaniose cutânea localizada (abreviada LCL), por outro lado, a forma disseminada de leishmaniose tegumentar chamada de “leishmaniose cutânea disseminada” e “leishmaniose cutânea difusa” são formas diferentes, mas ambas são abreviada na literatura como DCL, a leishmaniose cutânea difusa é uma forma anérgica as vezes chamada de “leishmaniose cutânea anérgica difusa” abreviada ADCL. Outra forma de leishmaniose disseminada que afeta o tecido mucoso geralmente chamada de leishmaniose cutânea mucosa (abreviada MCL), essa mesma manifestação também é chamada de “leishmaniose mucosa” (abreviada ML), é uma manifestação que se desenvolve a partir de complicação da leishmaniose cutânea localizada LCL (SCORZA et al., 2017).

As Leishmanioses Tegumentares (TL)

A manifestação clínica mais comum é a leishmaniose cutânea LC que é relacionada aos aspectos imunológicos e genéticos do hospedeiro e quando associadas à anamnese podem auxiliar no diagnóstico do paciente. (SILVEIRA et al., 2008; AMEEN, 2010).

A CL é caracterizada pelo aparecimento de uma única lesão ou por múltiplas lesões cutâneas, podendo ser difusa e/ou disseminadas pelo corpo, lesões que são exclusivas da pele que se iniciam com a inoculação da forma promastigota do parasito, através do repasto sanguíneo do vetor. Após a inoculação passa-se um período de incubação que varia de 10 dias a 3 meses desencadeando uma papula eritematosa que evolui para um nódulo, com a evolução que acontece gradativamente aparece a característica lesão ulcerada com borda elevada (Figura 7). (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994).



Figura 7. Lesão característica da forma cutânea da leishmaniose. **Fonte:** Suzana Kanawati, 2015.

As Leishmanioses cutâneas localizadas (LCL) caracterizam-se em lesões de pele mais superficiais, variando de 1 a 6 lesões de pele; ou podendo ser do tipo disseminada quando apresentando o número for superior a 6 lesões de pele ou do tipo difusa ou anérgica caracterizado por lesões nodulares ou papulosas contendo um grande número de parasitas sobre todo o corpo (GOTO e LINDOSO, 2010).

A Leishmaniose Cutâneo-Mucosa (MCL) ou Mucosa (ML) é a forma clínica mais agressiva da doença, consistindo de lesões com infiltrados celulares, resultando na

destruição de regiões como cavidade nasal, faringe e laringe (Figura 8) (VELOZO et al., 2006; GOTO et al., 2010). Esta manifestação clínica pode desenvolver em aproximadamente 3-5% dos casos de LCL e está comumente associada a infecções pelo *L. (V.) braziliensis* (LLANO-CUENTAS et al., 1984; VELOZO et al., 2006).



Figura 8. Lesão da forma mucosa da leishmaniose ML. **Fonte:** WHO, 2021.

Entre as formas cutâneas e mucosas existe a forma intermediária denominada de Leishmaniose Cutânea Disseminada Borderline (LCDB), na qual os pacientes são caracterizados por apresentar resposta imune celular parcialmente inibida ou anérgica semelhante às encontradas nas formas cutâneas. Estas manifestações clínicas estão principalmente associadas a infecções por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (SILVEIRA et al., 2004; SILVEIRA et al., 2008).

2.4 Aspectos imunológicos da Leishmaniose

As amplas manifestações clínicas da leishmaniose cutânea têm sido de interesse particular dos imunologistas pelo tipo e magnitude da resposta imune do hospedeiro e também por se assemelhar a hanseníase (antiga lepra) e tuberculose.

Experimentos com infecções em camundongos exibem um espectro de manifestações clínicas que dependem da linhagem do animal e da cepa parasitária. Como por exemplo, infecção causada por *L. major* em camundongos BALB/c que são suscetíveis pois são incapazes de conter a multiplicação parasitária no local da infecção e drenar aos linfonodos. Em contraste, camundongos C57BL/6 são resistentes a infecção por *L. major*, pois conseguem desenvolver uma lesão no sítio da inoculação, controlar a carga parasitária e desenvolver imunidade protetora contra uma reinfecção.

Em pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL), a forma mais branda da LTA, foi correlacionada positivamente com o número de monócitos do sangue periférico e produção de TNF e IL-10, enquanto nas formas mais grave da doença, não foi possível observar correlação. Diferença na intensidade de resposta imunológica celular foi observada entre as infecções por diferentes espécies de *Leishmania*, como uma alta produção IFN- γ e TNF em infecções por *L. (V.) braziliensis*, enquanto em pacientes com *L. (V.) guyanensis* são caracterizadas por apresentar uma resposta imune celular limitada relacionada com maior carga parasitária (CONVIT et al., 1993; MATTA et al., 2009).

Os neutrófilos, células dendríticas e monócitos (que se diferenciam em macrófagos) são algumas das células pertencentes ao sistema inato (ABBAS et al., 2018). Durante a infecção por *L. braziliensis* se desenvolvem lesões clínicas que coincidem com infiltrados de células inflamatórias inatas tais como macrófagos, neutrófilos e eosinófilos pois atuam em cooperação conferindo resistência contra o parasito. Embora o macrófago seja a célula hospedeira primária da *Leishmania*; as células dendríticas e neutrófilos também são recrutados e podem ser infectados pela *Leishmania* (NOVAIS et al., 2009).

As funções do Neutrófilo

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundante do sangue e desempenham funções importantes na resposta imune inata. São as primeiras células que chegam ao local da infecção e são fontes de citocinas como interleucina-2 (IL-2), IL-10, interferon gama (IFN- γ) e TNF- α (CARMO et al., 2010 e ROCHAEL et al., 2015).

Neutrophil Extracellular Traps (NETs), consiste na liberação da cromatina, grânulos e proteínas intracelulares após sofrerem estímulos externos. Parasitos do gênero *Leishmania* podem induzir a produção de NETs independente de difenilenodônio (inibidor de NO), porém este mecanismo é dependente da atividade de elastase. Com esse mecanismo os neutrófilos podem eliminar a forma promastigota *Leishmania amazonensis* através do NETs, no entanto a saliva do vetor contém algumas proteínas que podem proteger os parasitos que foram inoculados, por isso o papel funcional deste mecanismo protetor do NETs *in vivo* não está totalmente claro (ROCHAEL et al., 2015).

Os neutrófilos contribuem para o controle da infecção por *Leishmania braziliensis* (*Lb*) e *L. amazonensis* por meio da interação com macrófagos. Durante infecção experimental com *L. braziliensis* *in vivo*, mostrou que a depleção de neutrófilos é capaz de aumentar o tamanho da lesão e carga parasitária. Contudo em cultura de neutrófilos com *L. braziliensis* teve resultado contrário. Em cultura de macrófagos e neutrófilos BALB/c infectados com *L. braziliensis* mostraram uma redução de células infectadas e carga parasitária, essa interação foi associada com aumento na produção de TNF- α e superóxido que desempenham papéis importantes na ativação clássica de macrófagos (NOVAIS et al., 2009). Os neutrófilos (cavidades peritoneais) inflamatórios foram cultivados com macrófagos infectados com *L. amazonensis* isolados de cavidades peritoneais, os macrófagos foram capazes de destruir os amastigotas de *L. amazonensis*, e na ausência de neutrófilos notou-se concentrações baixas de IL-10, IL-12, IFN- γ , em contraste com as concentrações altas de TNF- α , MCP-1 e IL-6 mostrando um ambiente totalmente inflamado (CARMO et al., 2010). Os neutrófilos desempenhando papel protetor na interação com macrófagos infectados.

A função essencial dos neutrófilos é eliminar bactéria via fagocitose e promover reparação tecidual após infecção ou lesão do tecido (RIBEIRO GOMES et al., 2012). Outra função importante é modular o microambiente e influenciar o tipo de resposta via secreção de quimiocinas e citocinas. Os neutrófilos de C57BL/6 expostos a *L. major* secretaram CCL3 que é um quimioatratante para células dendríticas imaturas (iCD), enquanto os neutrófilos de BALB/c tiveram uma baixa produção de CCL3 (depleção de neutrófilos teve redução significativa em iCD confirmando o resultado) (CHARMOY et al., 2010). Os neutrófilos infectados por *L. major*, que foram capturados por células dendríticas, foram capazes de reduzir expressão de MHC-II, CD40 e CD86 em comparação com células dendríticas que capturaram neutrófilos não infectados (RIBEIRO-GOMES et al., 2015).

As funções do Macrófago

Os macrófagos estão amplamente distribuídos no corpo humano e são comumente usados para manter a homeostase além também de resistir à invasão de patógenos (DAVIES et al., 2013).

Os macrófagos podem estar em repouso (naive ou M0) ou podem estar ativados via clássica pró-inflamatória (M1) ou estar ativados via alternativa anti-inflamatória (M2), estes fenótipos são devidos aos estímulos recebidos pelo microambiente em que estão inseridos (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018).

Macrófagos ativados classicamente após o reconhecimento do patógeno pelos receptores de superfície, fatores de transcrição como AP-1, STATs, NFκ-B e IRFs são ativados e deslocados para região promotora dos seus respectivos genes, presente no núcleo, o qual aumenta produção de citocinas pro-inflamatórias tais como TNF-alfa, IL-1b, IL-6, IL-12, IL-18, IL-23 e IFN, aumento de fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que atuam na eliminação e controle intracelular do patógeno (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018). Monócitos foram infectados com *L. braziliensis* e depois estimulados com IFN-γ (citocina produzida por Th1 aonde IL-12 atua na sua diferenciação) levando ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) que

conduziu para morte parasitária e controle da infecção, dados que mostraram a importância do mecanismo ROS e sua dependência de IFN- γ . Em contraste, óxido nítrico (NO) não mostrou um papel essencial no controle da infecção por *L. braziliensis* em camundongos (NOVAIS et al., 2014).

Macrófagos ativados alternativamente ou M2 exibem um fenótipo imunorregulador e/ou anti-inflamatório que se relaciona com remodelação e reparação do tecido lesionado. O M2 foi caracterizado inicialmente pela expressão do receptor de manose (CD206), mas o M2 sofre diferentes estímulos como IL-4, IL-13, IL-10, TGF- β , M-CSF, vitamina D e imunocomplexos que induzem macrófagos M2 (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018). Além disso, a IL-21 é capaz de reduzir iNOS, CD86, TLR-4, IL-6 e TNF- α via fosforilação STAT3 induzindo a manutenção do fenótipo M2 (LI et al., 2013). O M2 tem função reguladora devido a secreção de IL-10 em resposta ao receptor Fc- γ (SUTTERWALA et al., 1998). As células Th2 são poderosas estimulantes para polarização de M2 devido sua alta secreção de IL-4, esse mecanismo de polarização pode estar relacionado ao fator de ativação dos macrófagos (MAF) e fatores de transcrição (MAFB) (JENKINS et al., 2011 e AZIZ et al., 2009).

Uma boa resposta imunológica ao agente etiológico da leishmaniose cutânea é o equilíbrio entre a polarização M1 e M2, porque o organismo precisa de uma resposta M1 que seja eficaz na eliminação do parasito, mas também é danosa ao tecido provocando lesões. Então, nesse momento, é necessária uma resposta M2 para controlar M1 e realizar o reparo tecidual local. O desequilíbrio na resposta imunológica pode ser muito danoso com desfechos clínicos não favoráveis ao hospedeiro.

As funções da Célula Dendrítica (DC)

As células dendríticas em estado imaturo residem em todos os tecidos periféricos, são apresentadoras de antígenos profissionais (APCs). As DCs podem ser divididas em duas categorias: DCs plasmocitóides secretoras de IFN-I e DCs convencionais capazes de internalizar antígenos, processá-los e apresentá-los para células T no linfonodo sendo capaz de modular suas respostas (ABBAS et al., 2018). O

processo de maturação das DCs consiste em primeiro; aumento na expressão do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) e coestimuladores CD40, CD80, CD86, CD54; segundo, baixa captura e fagocitose de antígenos; terceiro, produção de citocinas; quarto, diferentes padrões de expressões de receptores de quimiocinas e quimiocinas, permitindo sua migração e recrutamento de outras células para o local da infecção (REIS et al., 2004).

DCs são capazes de internalizar antígenos via receptor Fc, receptor de lectina tipo C (CLRs), receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como Toll-Like. As interações dos antígenos com receptores permitem que as DCs reconheçam uma gama de microrganismos e liberem diferentes estímulos (TAKEDA et al., 2004). DCs com parasitas em seu interior migram do tecido para transportar antígenos ao linfonodo (HU et al., 2013). As DCs são capazes de iniciar uma das ligações do sistema inato ao adaptativo, elas iniciam uma resposta imune específica ao antígeno da *Leishmania* e são a principal fonte de IL-12 para manutenção de Th1 (STEBUT et al., 1998). Estudos anteriores têm mostrado importante papel decisivo das DCs do tecido cutâneo, as DCs de langerhans na ativação de linfócitos T mediante apresentação de antígenos da *Leishmania* (BLANK et al., 1983; MOLL, 1993; AKUFFO et al., 1993). As células de Langerhans são células dendríticas apresentadoras de antígenos que residem no epitélio (ROMANI et al., 2010).

Sistema Adaptativo e resposta Th1

A reação inflamatória inicial é acompanhada simultaneamente pela ação de DCs que migram aos linfonodos e apresentam antígenos aos linfócitos T, com sinais coestimulatórios e as citocinas produzidas, estimulam a diferenciação dos linfócitos T em linfócitos TCD₄⁺ Th1, Th2 ou outros subconjuntos (XU et al., 2004). As fases de resposta da célula T se inicia no órgão linfoide: com reconhecimento do antígeno; ativação dos linfócitos; proliferação; diferenciação e sua função efetora esta já no tecido periférico (ABBAS et al., 2018).

As DCs internalizam *Leishmania* e utilizam as moléculas de MHC classe I e classe II apresentam antígenos aos linfócitos T. Mas antes do desenvolvimento das células Th1, o IFN- γ é produzido principalmente por células Natural Killer (NK) que recebem estímulos das células dendríticas nos linfonodos (SCHARTON et al., 1993). Após apresentação dos antígenos (*L. major*), as DCs passam a produzir IL-12p70 (A IL-12 é responsável pela diferenciação das células Th1 e pela indução de imunidade mediada por células) funcional que é extremamente importante para diferenciação de células T naive (Th0) para o subconjunto de Th1 e sua polarização que resultará na produção de mais IFN- γ . Esse IFN- γ que é produzido por Th1 estimulando a polarização dos macrófagos para o fenótipo M1 que resultará na destruição de microrganismos intracelulares via aumento de ROS e citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IL-1b, IL-6, IL-12, IL-18, IL-23 e IFN-1, como foi mostrado anteriormente (HENRY et al., 2002 e SCOTT et al., 2016).

Ativação Th1, células T CD4+ produtoras de citocinas que são correlacionadas com resposta imune efetiva a leishmaniose mucosa o que não leva necessariamente à eliminação do parasito e ainda pode ser prejudicial ao hospedeiro quando não modulada devidamente (BACELLAR et al., 2002). A IL-10 tem um papel importante na modulação negativa da resposta Th1 que torna pacientes com VL e CL incapazes de produzir IFN. Por outro lado, a IL-10 adicionada é capaz de regular negativamente as respostas de células T em indivíduos curados de VL (BACELLAR et al., 2002). No início da infecção por *L. braziliensis* as células T são reguladas negativamente por IL-10 o que pode resultar na multiplicação parasitária (ROCHA et al., 1999). Nesse raciocínio, a resposta inicial para CL deveria ser Th1 (eliminação da carga parasitária) que venha ser posteriormente controlada negativamente por IL-10 evitando assim as lesões característica da CL (em qual momento IL-10 deveria controlar a resposta, não se sabe).

Sistema Adaptativo e resposta Th2

Células T helper (Th) CD4 são muito importantes durante uma resposta imune adaptativa. Mossman e Coffman foram os primeiros a reconhecer a existência de

subconjuntos de Th, que receberam a nomenclatura de Th1 e Th2, as quais são cruciais na resposta imune adaptativa (MOSSMAN et al,1986).

Células T CD4 desempenham um papel chave durante a resposta imune adaptativa. Durante a diferenciação de CD4 que ocorre via sinalização e coestimulação do receptor de célula T (TCR), os sinais recebidos pela célula T é capaz de determinar o destino e comprometimento desta célula. Por exemplo, com as ligações TCR–MHC-II e IL-4–IL-4Ra/yc tem a transdução do sinal que ativa fator de transcrição 6 (STAT6), o qual desempenha um papel importante durante a diferenciação Th2, embora essa diferenciação possa ocorrer também na ausência de IL-4 sob certas condições in vivo (TAKEDA et al., 1996 e JANKOVIC et al., 2000). Agora, diferenciação Th2 é dependente ou independente de IL-4, ambas ativam o fator de transcrição GATA-3 que é responsável pelas mudanças epigenéticas em muitos loci de genes específicos para Th2 (ZHENG et al., 1997 e PAI et al., 2004).

Diferente da Th1 que é crucial para infecção por microrganismo intracelular a Th2 é direcionada para infecções de parasitas extracelulares, tais como helmintos; Th2 também é responsável pelo desenvolvimento de algumas doenças alérgicas e asmáticas (ZHU et al., 2015). Th2 via IL-4 induz células B a produzirem anticorpos do isótipos IgG1 e IgE que estimulam degranulação dos mastócitos; produção de IL-4 e IL-13, células Th2 induzem ativação alternativa de macrófagos M2 (KOPF et al., 1993 e GORDON et al., 2003). A produção de IL-4 e IL-13 pela célula Th2 é capaz de estimular a polarização dos macrófagos em direção a ativação alternativa de M2 o que resultaria na expressão do fenótipo imunorregulador e/ou anti-inflamatório que se relaciona com a remodelação e reparação do tecido lesionado, além da produção de IL-10.

A produção de IL-4 durante a resposta imune inata demonstrou possuir influência na capacidade de resposta do subconjunto Th1 para IL-12, essa influência acontece devido a IL-4 diminuir a expressão do receptor da IL-12 e como consequência de pouco receptor terá pouca resposta a IL-12 e uma supressão do subconjunto Th1 (LAUNOIS et al., 1997). Ao analisar IL-12 in vitro num experimento de células de camundongos transgênicos com TCR específico para ovoalbumina, foi observado que células Th1 e Th2 expressaram a cadeia do receptor IL-12Rb1, entretanto a cadeia do receptor IL-

12Rb2 (responsável pela sinalização intracelular) não foi expressa em células Th2 (JONES et al., 1998). A perda da capacidade de resposta da célula T para IL-12 é um evento crucial para a diferenciação das células T em direção ao subconjunto Th2.

Sistema Adaptativo e resposta Treg

O desfecho clínico da leishmaniose é dependente da capacidade e habilidade do organismo do hospedeiro em controlar a resposta imunológica uma vez iniciada contra o agente invasor. Boa parte dos indivíduos infectados com *Leishmania braziliensis* desenvolve lesões cutâneas localizadas que são facilmente tratadas enquanto outros indivíduos têm desenvolvimento de lesões mais graves da doença, mutiladora como leishmaniose cutânea mucosa ML (GOLLOB et al., 2005). Lesões que são desenvolvidas pelo próprio hospedeiro devido uma resposta tão intensa e desequilibrada gerando dano ao tecido.

Indivíduos infectados com leishmaniose cutânea normalmente possuem concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias quando comparados com indivíduos saudáveis. A IL-10 mostrou regular negativamente IFN- γ em culturas de células sanguíneas de pacientes com ML (BACELLAR et al., 2002). A principal fonte de produção da IL-10 em pacientes com ML é a célula T reguladora, mostrando um papel diferente das demais CD4+.

Comparação entre assintomáticos e pacientes com doença ativa mostrou que indivíduos assintomáticos apresentaram baixas concentrações de IFN- γ enquanto tinham concentrações elevadas de IL-10 em sobrenadante de cultura, sugerindo um papel protetor da IL-10 (BITTAR et al., 2007). Esses dados sugerem que pacientes que desenvolveram a forma mais grave da doença ML carecem de uma regulação entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias que é feita pela IL-10, como um dos mecanismos de controle da resposta imunológica.

2.5 As funções da Interleucina 12

A IL-12 é capaz de influenciar o desfecho de câncer, infecção e processos de doenças inflamatórias; esta proteína é capaz de influenciar células B; pode estimular citotoxicidade e produção de IFN- γ por células NK, e possui influência também nas células T (TAIT et al., 2019).

No ano de 1989, Trinchieri e colaboradores conseguiram purificar a IL-12, uma proteína heterodimérica composta pelas subunidades 35kDa e 40kDa, conforme a **fig. 9**, que são conectadas por ligações dissulfetos (TAIT et al., 2019). O gene do menor monômero 35kDa possui cadeia alfa e é encontrado no cromossomo 3, enquanto o gene de maior monômero 40kDa é encontrado no cromossomo 5. A expressão dos dois monômeros resulta na formação do heterodímero p70 biologicamente ativo (ULLRICH et al., 2020).

Na busca para revelar o receptor da IL-12, o estudo de Chua e colaboradores mostrou que o receptor é um complexo heterodimérico formado por IL-12RB1 e IL-12RB2 (CHUA et al., 1994). O receptor IL-12B1 (IL-RB1) é codificado no cromossomo 19 e tem um peso molecular de 100kDa, é uma proteína transmembranar com domínio extracelular contendo 516 aminoácidos que interage com a subunidade IL-12p40 e que interessantemente faz parte do receptor IL-23 (CHUA et al., 1994). O gene que codifica o receptor IL-12B2 (IL-RB2) é localizado no cromossomo 1 e é traduzido para uma proteína extracelular contendo 595 aminoácidos e peso molecular de 130kDa que vai interagir com a subunidade IL-12p35 (PRESKY et al., 1996). A subunidade IL-12RB2 é responsável pela sinalização intracelular pelo fato de possuir resíduos de tirosina em seu domínio citoplasmático (CHUA et al., 1994 e PRESKY et al., 1996). O componente IL-12p40 também pode se associar com IL-23p19 e forma a proteína IL-23 que possui receptor heterodímero formado por IL-12RB1 e IL-23Ra (TAIT et al., 2019).

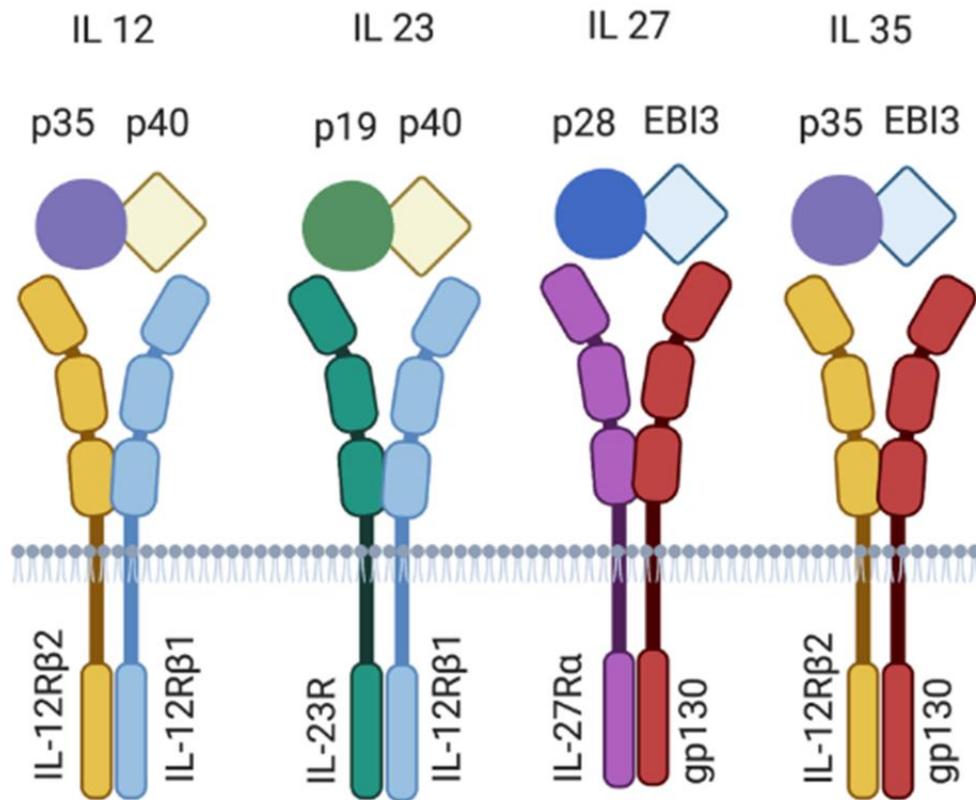


Figura 9. Família de citocinas heterodimerica. **Fonte:** André Jefremow, 2020.

A sinalização via receptor TCR aumenta a expressão de outros receptores nas células T, os que as tornam responsivas as citocinas presente no microambiente que pode desencadear diferenciação e amplificação de determinado subconjunto de linfócitos, isso acontece devido ao comprometimento com a via e inibição de outras vias. Por exemplo, a sinalização IL-12 promove a expressão T-bet que está associado ao desenvolvimento do subconjunto Th1, e conseqüentemente, inibe a expressão do fator de transcrição ROR- γ t que está associada ao desenvolvimento do subconjunto Th-17 (TAIT et al., 2019). Nessa mesma linha, IL-4 e IFN- γ são capazes de modificar significativamente a expressão do receptor IL12RB2, que não é expresso em células T naive, mas tem a expressão induzida após a apresentação do antígeno por uma APC. A IL-4 inibe a expressão IL-12RB2 causando a perda da sinalização IL-12, proporcionando um ponto de regulação para promover o comprometimento da via Th2. Tratamento com

IFN- γ no início do desenvolvimento Th2 mantem a expressão do IL-12RB2 e restaura a sinalização IL-12, mas não inibe diretamente a produção de IL-4 ou produção de IFN- γ . (SZABO et al.,1997).

Snijders e colaboradores mostraram que em monócitos a regulação acontece nas sínteses das subunidades, porque a subunidade p40 é produzida em maior escala quando comparada com a subunidade p35, sugerindo que a cadeia p35 é a etapa limitadora da taxa de secreção da IL-12p70 biologicamente ativa (LIU et al.,2003 e SNIJDERS et al., 1996). Wang e colaboradores propuseram o seguinte modelo em que diversos fatores de transcrições caminham pela via ICSBP para regulação da IL-12p40. Estimulação por LPS, ligação CD40/CD40L, IFN- γ e patógenos são capazes de ativar fatores de transcrição como NF- κ B (LPS e CD40/CD40L) e STAT1 (IFN- γ e patógenos) ambos os fatores estimulam a atividade do ICSBP (do inglês IFN Consensus Sequence Binding Protei) o qual é montado na região promotora da IL-12p40 (WANG et al., 2000).

2.5.1 Sinalização IL-12

Uma vez que IL-12 é produzida por células APC, está ativa um fator de transcrição específico em células Th, vários estudos demonstraram que o STAT4 é o fator de transcrição requerido pela IL-12 para diferenciação em Th1 enquanto Th2 responde a IL-4 via STAT6 (SINIGAGLIA et al., 1999). Em células Th1, a interação IL-12/IL-12R resulta na fosforilação da tirosina 693 e serina 721 do STAT4. Então STAT4 se transporta para o núcleo ligando-se em sequencias especifica do DNA levando a transcrição de genes de citocinas inflamatórias como IFN- γ .

A expressão de T-bet em células T ativada é dependente de IFN- γ e STAT1, mas é independente de STAT4, interessante, é que expressão do IFN- γ depende da sinalização intracelular da IL-12 em células T, vias T-bet e STAT4 são vias aparentemente independentes, porém ambas atuam no desenvolvimento do fenótipo Th1. Enquanto a expressão do T-bet é induzida pela sinalização do IFN- γ , a ativação da IL-12 resulta na ativação do STAT4 que é responsável por inibir GATA-3 se comprometendo com o fenótipo Th1 (AFKARIAN et al.,2002).

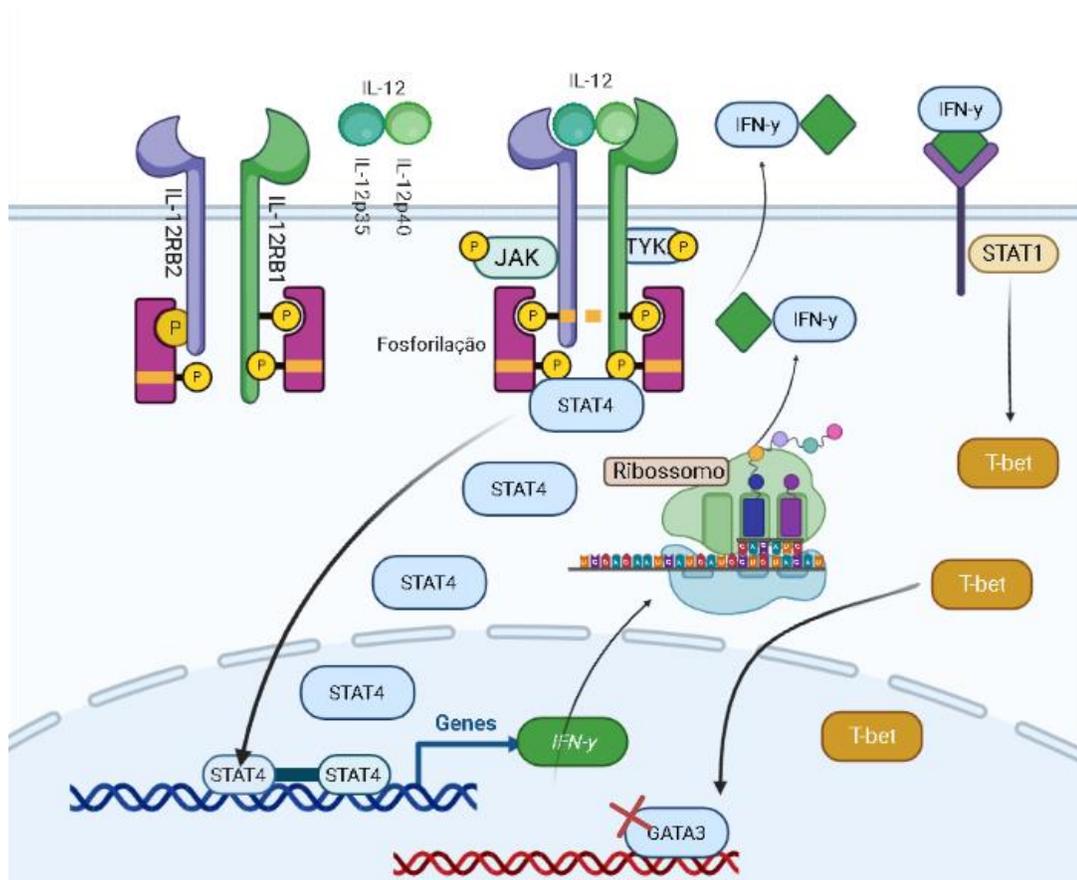


Figura 10. Ilustração da via de sinalização IL-12, criada no site Biorender. **Fonte:** acervo pessoal, 2022.

2.6 Variantes genéticas

Os alelos variantes surgiram por mutação nos genes em algum momento no passado. Se existirem pelo menos dois alelos relativamente comuns do *locus* na população, diz-se que o *locus* exibe polimorfismo, considerando uma variante comum quando encontrada em mais de 1% de cromossomos na população geral, a variante constitui o que é conhecido como polimorfismo genético. Além de um alelo normal ou dois alelos polimórficos normais, os *loci* também podem possuir um ou mais alelos variantes raros. Alguns desses alelos raros foram originalmente identificados por causarem doenças genéticas, e outros podem aumentar a suscetibilidade à doença. Alguns polimorfismos são devidos às variantes que consistem em deleções, duplicações,

triplicações e assim por diante, de centenas a milhões de pares de bases de DNA (NUSSBAUM *et al.*, 2008).

2.7 Variantes genéticas de *IL12B*

O gene *IL12B* humano, localizado no braço longo do cromossomo 5q33.3, codifica a subunidade da IL-12p40 da IL-12 (MANOLOVA *et al.*, 2020). Gene *IL12B* possui 8 Exons e 7 Introns, 15.708pb, 328aa. Ao longo do *IL12B* existem várias variantes distribuídas nos exons, introns, região UTR e região promotora do gene, dentre essas variantes foram selecionadas as seguintes rs2569253, rs919766, rs3181224 e rs3181225 para serem estudadas (**Fig.11**).

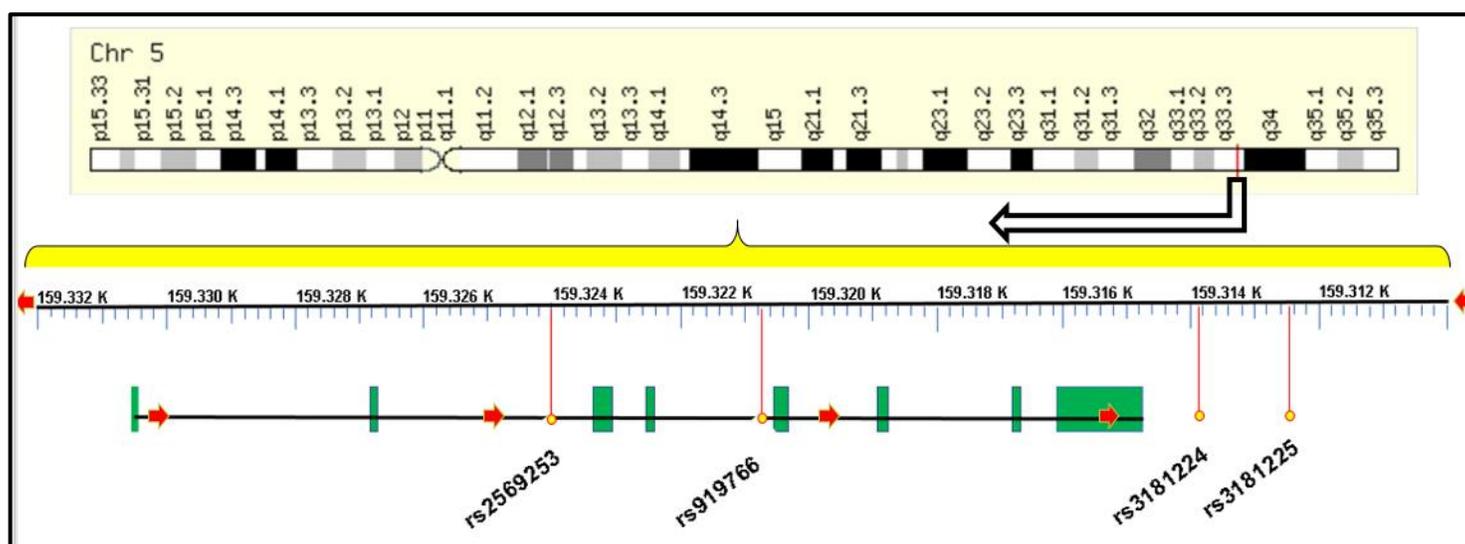


Figura 11. Gene *IL12B* e variantes. **Fonte:** Souza JL, 2021.

3. JUSTIFICATIVA

Diversos são os estudos envolvendo perfil imunológico e marcadores genéticos na Leishmaniose Cutânea, entretanto, estudando a espécie *L. guyanensis* somos pioneiros. A suscetibilidade de humano a fenótipos da leishmaniose, tal como a doença *per se*, é parcialmente controlada por determinantes genéticos. De particular interesse é o papel de genes envolvidos no sistema imune sobre o controle da suscetibilidade do hospedeiro as doenças infecciosas causadas por diferentes parasitos intracelulares. Considerando a importância da sinalização e ativação das respostas celulares através da ação de citocinas como IL-12 e IFN- γ na eliminação do protozoário *Leishmania*, ao nosso conhecimento, até o momento estudos de polimorfismos genéticos do gene de *IL12B* ainda não foram realizados em pacientes acometidos por Leishmanioses. A nossa hipótese é de que variações genéticas presentes no gene de *IL12B* possam estar envolvidos diretamente com o resultado da doença, no controle ou para suscetibilidade do hospedeiro a infecções causadas por *Leishmania*. A realização deste estudo possibilitará contribuir com novas compreensões dos mecanismos moleculares da doença visando possíveis futuras intervenções terapêuticas dos pacientes.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar variantes genéticas presente em regiões do gene *IL12B* em pacientes com Leishmaniose Cutânea causada por *L. guyanensis* no estado do Amazonas.

4.2 Objetivos específicos

- Analisar variantes genéticas de base única (SNV) em regiões do gene de *IL12B* em pacientes Leishmaniose Cutânea causada por *L. guyanensis* e em indivíduos controles;

- Correlacionar as variantes estudadas com a suscetibilidade ou proteção a leishmaniose cutânea;
- Correlacionar as variantes estudadas com os níveis de citocinas plasmáticas de indivíduos controles.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Tipo de Estudo

Estudo de caso e controle com componente analítico de associação, consistindo na comparação das diferentes variáveis entre pacientes e indivíduos saudáveis, cada população foi constituída por indivíduos sem relação de parentesco e todos procedentes da mesma área endêmica. Este estudo foi proposto a partir dos objetivos contemplados pelo projeto “Polimorfismos genéticos dos genes envolvidos na resposta imune e na cicatrização das lesões em pacientes com leishmaniose cutânea”.

5.2 Aspectos Éticos

O presente trabalho obteve aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação de Medicina Tropical – Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), no dia 31/05/2013, sob o parecer de número do CAAE: 09995212.0.0000.0005 e seguiu as recomendações da Declaração de Helsinque, 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.

5.3 Área de Estudo

O presente estudo foi realizado em indivíduos residentes de regiões endêmicas para leishmaniose localizadas nas proximidades do município de Manaus, rodovias AM-010 Manaus – Itacoatiara; e BR-174 Manaus – Boa Vista. Algumas das localidades utilizadas para o estudo apresenta casos confirmados de leishmaniose: BR-174 - Ramal do Pau-Rosa e Ramal da Cooperativa e suas vicinais (Km 21); AM-010 - Ramal Água Branca I (Km 32) e Ramal Água Branca II (Km 35), Ramal do Leão (Km 37). Estas regiões

são caracterizadas por serem áreas de floresta tropical que ao longo dos anos sofreram desmatamento, com presença de moradia próxima às áreas de mata e população que utilizam de atividades agropecuárias como fonte principal de renda, contudo indivíduos expostos e suscetíveis à infecção por *Leishmania*.

5.4 População de Estudo

A população de estudo é constituída por 1.600 indivíduos, dentre os quais, 800 pacientes com Leishmaniose Cutânea (LC) e 800 controles, indivíduos saudáveis e sem histórico de Leishmaniose procedentes das mesmas áreas endêmicas.

5.5 Pacientes com leishmaniose cutânea

Os pacientes convidados a participar deste estudo foram indivíduos de ambos os sexos, atendidos na FMT-HVD com procedência do estado do Amazonas e idade entre 12 e 65 anos. O diagnóstico clínico da Leishmaniose foi realizado com apoio de médicos especializados, sendo a Leishmaniose Cutânea definida pela presença de uma a seis lesões ulceradas na pele. A confirmação do diagnóstico foi mediada em pelo menos um dos exames: Pesquisa direta de amastigotas de *Leishmania* em esfregaços de material escarificado da borda das lesões corado com GIEMSA; observação de amastigotas em exame histopatológico corado em Hematoxilina e Eosina. Depois da confirmação por exame direto o paciente foi convidado a participar do estudo, momento este em que foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Durante aplicação do TCLE foi realizado uma explicação sobre o estudo e em seguida realizada a entrevista do paciente sendo aplicado um questionário para coleta de informações pessoais e do quadro clínico do paciente. Em caso de pacientes menores de 18 anos, o TCLE foi apresentado e assinado por um dos responsáveis ou guardião legal.

Após a confirmação do diagnóstico pelo exame direto foi feito uma biópsia da lesão para identificação da espécie.

Ressaltando que a população pertencente ao grupo caso são sem parentesco entre si e sem parentesco com o grupo controle.

5.6 Grupo Controle

O grupo controle foi constituído de indivíduos provenientes das mesmas regiões endêmicas dos indivíduos do grupo caso avaliado, sem desenvolvimento da doença aparente (sem histórico de lesão). O recrutamento de indivíduos controles foi realizado por meio de visitas da equipe de pesquisa às localidades de regiões endêmicas previamente citadas. Foram incluídos na população controle indivíduos sem parentesco entre si e sem relação de parentesco com pacientes com Leishmanioses. Após explicação do projeto e aceite em participar do estudo foi aplicado o TCLE para o consentimento do participante, assim como aplicado formulário para coleta de informações pessoais.

5.7 Material Biológico

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubo contendo anti-coagulante EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético) dos pacientes e dos indivíduos controles. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa em Doenças Endêmicas (LPDE) da FMT-HV onde foi realizada a extração de DNA e separação do plasma para dosagem de citocinas e quimiocinas. As amostras de plasmas dos indivíduos de ambos os grupos foram armazenadas no freezer a -80°C .

5.8 Extração de DNA

As amostras de sangue periférico dos participantes foram centrifugadas a 2.000 rotações por minuto (RPM) em centrifuga de bancada durante 10 minutos, sendo coletados aproximadamente 220 a 400 μL da camada de leucócitos (Buffy Coat). A extração de DNA foi realizada segundo a metodologia de “salting-out” (Sambrook, 1986). As amostras de DNA purificadas foram eluídas em água livre de nucleases e armazenadas a -80°C .

5.9 Critérios da seleção das variantes

Utilizando bancos de dados públicos que estão disponíveis na plataforma SNPinfo Web Server, selecionamos as variantes para o estudo (SNPinfo, 2022). Para escolha das variantes foi usado como critérios como, taxa global da frequência de menor

alelo (MAF \geq 5%); marcadores tido como tag SNP que carregam informação de determinado bloco formado por variantes que estão em desequilíbrio de ligação. As variantes tag SNP foram selecionadas visando uma maior cobertura do gene e redução do número de variantes para ser estudada.

Uma vez que a variante é tag SNP em determinada população não significa que a mesma será tag SNP em outra população isso é possível devido a diferença na informação genética que cada população carrega.

Ao todo, quatro variantes distribuídas em diferentes regiões do gene *IL12B* foram selecionadas, uma variante na região do 2 intron do gene (rs2569253), outra na região do 4 intron (rs919766), duas na região 3'UTR do gene (rs3181224 e rs3181225). Todas as variantes selecionadas estão distribuídas em regiões não codificantes de aminoácidos.

5.10 PCR das variantes no *IL-12B*

A PCR foi otimizada com adequações das concentrações de cada reagente. Para as variantes rs3181224 e rs3181225 (mesmo par de primer), rs919766 e 2569253 foram desenhados um par de primers para cada variante, conforme a tabela 01 abaixo.

SNV	Pares de Primers
rs3181224 rs3181225	IL12B1225F: 5'- GGA CAG TCC TGG AGA CTA TC-3' IL12B1225R: 5'-TCT TTG CCA ACC TTT GGA GCA-3'
rs919766	IL12B9766F: 5'- GGG TCA GAA GAG CTG AAG TCA AAG-3' IL12B9766R: 5'-TCC ATA TTC ATT TAG TCC AGA GAC-3'
rs2569253	IL12B253F: 5'- TGC CTT ACA TTT GAC TGA GGA TT -3' IL12B253R: 5'- CAC TGG TGA TTT AAA ACA GAG GG -3'

Tabela 01. SNV e primers, 2021.

A reação da PCR foi preparada com volume final de 25 μ L contendo, 1,0 mmol/L de MgCl₂, tampão contendo 500mmol/L de KCl e 100mol/L de Tris-HCl (pH8,3), 40 μ mol/L dNTP, 0.2pmol/L de cada primer forward e reverse, 40 ng de DNA e 1U de *Taq*

polimerase. No termoclicador foi criado um programa específico para cada variante, conforme a tabela 02, abaixo. Após o término da PCR a mesma foi testada em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio.

	Ciclos	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Tamanho em pb.
rs3181224 rs3181225	X38			56.6°C/15s			361pb
rs919766	X40	95°C/5min	95°C/15s	58°C/15s	72°C/30s	72°C/7min	228pb
rs2569253	X38			53°C/15s			201pb

Tabela 02. Programa de ciclagem para cada SNV, 2021.

5.11 Genotipagem das variantes do *IL12B*

A digestão enzimática para a variante rs3184224 foi preparada com volume final de 20µL, contendo 10µL do produto de PCR, tampão cutsmart 25x e 1/4 U de enzima de restrição *HpyCH4III* com o seguinte sítio 5'...ACN'GT...3' e atividade a 37°C. Na presença do alelo A o fragmento permanece 361pb enquanto na presença do alelo G é gerado fragmentos de 297pb,59pb e 5pb. A separação dos fragmentos foi feita em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio. A discriminação genotípica fica semelhante à figura 12, abaixo.



Figura 12. Discriminação genotípica rs3181224. **Fonte:** acervo pessoal, 2021.

A digestão enzimática para a variante rs3184225 foi preparada no volume final de 20µL, contendo 10µL do produto de PCR, tampão cutsmart 25x e 1/4 U de enzima de

restrição *MbolI* com o seguinte sitio 5'...GATC...3' e atividade a 37°C. Na presença do alelo G o fragmento permanece inalterado com 361pb enquanto na presença do alelo A é gerado fragmentos 287pb e 74pb. A separação dos fragmentos foi feita em gel de agarose 3.5% corado com brometo de etídio. A discriminação genotípica fica semelhante à figura 13, abaixo.

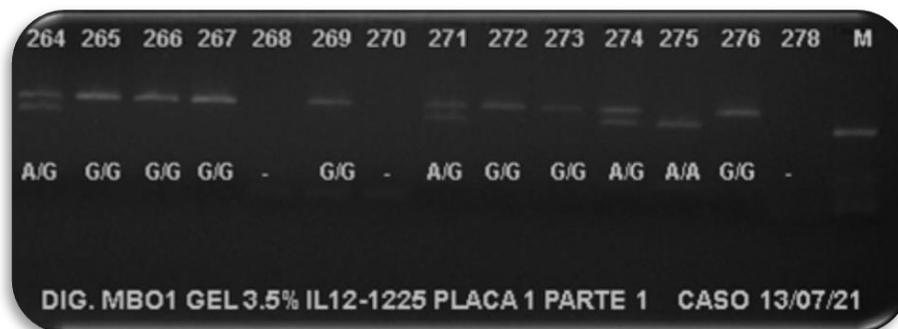


Figura 13. Discriminação genotípica rs3181225. **Fonte:** acervo pessoal, 2021.

A digestão enzimática para a variante rs919766 foi preparada no volume final de 20µL, contendo 10µL do produto de PCR, tampão cutsmart 25x e 1/4 U de enzima de restrição *BsaJI* com o seguinte sitio 5'...C'CNNGG...3' e atividade a 60°C. N presença do alelo C é gerado fragmentos de 121pb, 60pb e 47pb enquanto na presença do alelo A é gerado fragmentos 168pb e 60pb. A separação dos fragmentos foi feita em gel de agarose 3.5% corado com brometo de etídio. A discriminação genotípica fica semelhante à figura 14, abaixo.



Figura 14. Discriminação genotípica rs919766. **Fonte:** acervo pessoal, 2021.

A digestão enzimática para a variante rs2569253 foi preparada no volume final de 20µL, contendo 10µL do produto de PCR, tampão cutsmart 25x e 1/4 U de enzima de restrição *BsaJI* com o seguinte sitio 5'...C'CNNGG...3' e atividade a 60°C. Na presença do alelo T é gerado fragmentos 155pb e 46pb enquanto na presença do alelo C é gerado fragmentos 110pb, 46pb e 45pb. A separação dos fragmentos foi feita em gel de agarose 3.5% corado com brometo de etídio. A discriminação genotípica fica semelhante à figura 15, abaixo.



Figura 15. Discriminação genotípica rs2569153. **Fonte:** acervo pessoal, 2021.

5.12 Quantificação de citocinas e quimiocinas em imunoensaio pelo método Luminex

Os níveis plasmáticos de IFN- γ e IL-12 (p70), foram dosados em ambos os grupos do estudo, pela utilização de imunoensaio multiplexado com microesferas em um analisador Luminex (Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA) de acordo com as instruções do fabricante. A dosagem foi realizada em microplacas de 96 poços contendo microesferas revestidas por anticorpos monoclonais contra os diferentes respectivos alvos.

5.13 Análise estatística

As frequências genotípicas e alélicas das SNVs foram determinadas através de contagem direta. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi calculado comparando os genótipos observados com os esperados por meio do teste Chi-quadrado (χ^2) para cada SNV. As comparações das frequências dos alelos e genótipos entre os grupos (caso e controle), foram calculadas utilizando pacote SNPAssoc do software R (v.4.2.1), que

conta com testes como χ^2 , razão de chance ou *Odds Ratio* (OR), intervalo de confiança (IC) de 95% e o valor de p (sendo considerados significativos valores abaixo de 0,05).

O desequilíbrio de ligação foi feito através do software Haploview versão 4.2, e a influência dos genótipos sobre as concentrações de citocinas plasmáticas (IL12 e IFN- γ) foi analisada através do software R versão 4.1.2, pacote ggplot 2. Considerando significativos valores inferiores a $P < 0,05$. Os valores de p foram corrigidos de acordo Benjamini e Hochberg.

6. RESULTADOS

6.1 Frequências alélicas e genotípicas dos SNVs do gene *IL12B*

É um estudo de caso e controle. Quatro SNVs do gene *IL12B* foram escolhidas de acordo com a frequência de menor alelo (MAF), superior a 5% em diferentes populações. Essas variantes são tags SNP de acordo com o desequilíbrio de ligação com várias variantes do gene em diferentes populações. Importante ressaltar que a população do estudo é uma miscigenação de nativos americanos (50-60%), europeus (40-50%) e africanos (10%) (ANDRÉS et al., 2014).

O gene de *IL12B* possui o tamanho de 15.708pb, 8 exons, 7 introns e codifica 328 aminoácidos para formar a subunidade p40 da IL-12p70. As quatro variantes rs2569253, rs919766, rs3181224, e rs3181225 estão distribuídas ao longo do gene *IL12B*, conforme a **fig. 11**.

As distribuições e comparações das frequências alélicas e genotípicas das variantes rs2569253, rs919766, rs3181224, rs3181225 são demonstradas nas tabelas 4, 5, 6 e 7 respectivamente. As comparações entre os modelos codominante, dominante, recessivo e superdominante juntamente com seus OD e IC 95%. Todas as variantes estudadas se encontram dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos.

rs2569253**FREQUÊNCIAS DOS GENÓTIPOS E ALELOS, E COMPARAÇÕES
ESTATÍSTICAS ENTRE CASO E CONTROLE**

	CASO (%)	CONTROLE (%)		
Codominante	TOTAL =682	TOTAL =671	OR [IC 95%]	Valor-p
T/T	315 (46,2%)	352 (52,5%)	1	
T/C	284 (41,6%)	259 (38,6%)	1.22 [0.98-1.53]	
C/C	83 (12,2%)	60 (8,9%)	1.53 [1.07-2.22]	0.032
Alelos				
T	914 (67%)	963 (71,7%)		
C	450 (33%)	379 (28,3%)		
Dominante				
T/T vs C/T-C/C			1.28 [1.04-1.58]	0.021
Recessivo				
C/T-T/T vs C/C			1.40 [0.99-2.0]	0.052
Superdominante				
T/T-C/C vs T/C			1.14 [0.90-1.4]	0.253

Abreviações: IC, intervalo de confiança; OR, odds ratio.

Tabela 03. Distribuições das frequências alélicas e genotípicas da SNV rs2569253 estudada do gene *IL12B*, 2022

rs919766				
FREQUÊNCIAS DOS GENÓTIPOS E ALELOS, E COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE CASO E CONTROLE				
	Caso (%)	Controle (%)		
Codominante	Total = 748	Total = 719	OR²[IC⁹⁵%]	Valor-p
A/A	578 (77,3%)	559 (77,7%)	1	
A/C	153 (20,5%)	149 (20,7%)	1.01 [0.78-1.30]	
C/C	17 (2,3%)	11 (1,5%)	0.67 [0.31-1.44]	0.579
Alelos				
A	1309 (87,5%)	1267 (88,1%)		
C	187 (12,5%)	171 (11,9%)		
Dominante				
A/A vs C/A-C/C			0.97 [0.76-1.24]	0.827
Recessivo				
C/C vs C/A-A/A			0.67 [0.31-1.44]	0.296
Superdominante				
A/A-C/C vs A/C			1.02 [0.79-1.31]	0.898
Abreviações: IC, intervalo de confiança; OR, odds ratio.				

Tabela 04. Distribuições das frequências alélicas e genotípicas da SNV rs919766 estudada do gene *IL12B*, 2022.

rs3181224				
FREQUÊNCIAS DOS GENÓTIPOS E ALELOS, E COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE CASO E CONTROLE				
	Caso (%)	Controle (%)		
Codominante	TOTAL = 755	TOTAL = 781	OR [IC 95%]	Valor-p
A/A	664 (87,9%)	653 (83,3%)	1	
A/G	87 (11,5%)	125 (16%)	0.68 [0.51-0.91]	
G/G	4 (0,5%)	3 (0,4%)	0.76 [0.17-3.42]	0.036
Alelos				
A	1415 (93,7%)	1431 (91,6%)		
G	95 (6,3%)	131 (8,4%)		
Dominante				
A/A vs G/A-G/G			0.69 [0.52-0.93]	0.014
Recessivo				
G/A-A/A vs G/G			0.46 [0.08-2.54]	0.671
Superdominante				
A/A-G/G vs G/A			0.68 [0.51-0.91]	0.010
Abreviações: IC, intervalo de confiança 95%; OR, odds ratio.				

Tabela 05. Distribuições das frequências alélicas e genotípicas da SNV rs3181224 estudada do gene *IL12B*, 2022.

rs3181225				
FREQUÊNCIAS DOS GENÓTIPOS E ALELOS, E COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE CASO E CONTROLE				
	Caso (%)	Controle (%)		
Codominante	TOTAL = 774	TOTAL = 794	OR [IC 95%]	Valor-p
G/G	619 (80%)	658 (82,9%)	1	
A/G	147 (19%)	128 (16,1%)	0.82 [0.63-1.06]	
A/A	8 (1%)	8 (1%)	0.94 [0.35-2.52]	0.324
Alelos				
A	163 (10,5%)	144 (9,1%)		
G	1385 (89,5%)	1444 (90,9%)		
Dominante				
G/G vs G/A-A/A			0.83 [0.64-1.07]	0.140
Recessivo				
A/A vs G/A-G/G			0.97 [0.36-2.61]	0.959
Superdominante				
A/A-G/G vs G/A			0.82 [0.63-1.06]	0.134
Abreviações: IC, intervalo de confiança 95%; OR, odds ratio.				

Tabela 06. Distribuições das frequências alélicas e genótípicas da SNV rs3183225 estudada do gene *IL12B*, 2022.

As variantes rs2569253 e rs3183224 mostraram diferenças entre as frequências dos genótipos e alelos entre os casos e controles. No modelo de herança codominante da variante rs2569253, indivíduos portadores do genótipo heterozigoto T/C mostram chance de risco de 22% para desenvolver a LC (OD 1.22, IC de 95%, 0.98-1.53, P= 0.032), indivíduos homozigotos para o alelo C (12,2%) têm risco de 53% para o desenvolvimento LC (OD 1.53, IC de 95%, 1.07-2.22, P= 0.032). A suscetibilidade é notada nos modelos dominante com 28% (OD 1.28, IC de 95%, 1.04-1.58, P= 0.021), recessivo com 40% (OD 1.4, IC de 95%, 0.99-2.0, P= 0.052) como mostra a tabela 4.

Indivíduos heterozigotos A/G apresentam 32% (OD 0.68, IC de 95%, 0.51-0.91, P= 0.01) chance de não desenvolver a LC em comparação aos homozigotos A/A. No modelo dominante, os indivíduos homozigotos para o alelo A têm 43% (OD 1.43, IC de 95%, 1.07-1.91, P= 0.014) de risco para desenvolver LC, também foi visto risco nos

modelos superdominante 46% (OD 1.46, IC de 95%, 1.09-1.96, P= 0.010) como mostrado na tabela 06.

Em contraste, as outras variantes mostraram semelhanças nas frequências alélicas e genótípicas entre os grupos do estudo onde o valor de p confirmou que não houve correlação das variantes rs919766, rs3183225 com suscetibilidade ou proteção contra LC, como mostrado nas tabelas 05 e 07, respectivamente.

6.2 Desequilíbrio de ligação (DL) das variantes do *IL12B*

Com o intuito de avaliar as variantes que estão sendo segregadas juntas, foi calculado o desequilíbrio de ligação entre as variantes, **fig. 16**

As quatro variantes genéticas distribuídas ao longo do gene *IL12* estão cobrindo uma região com mais de 10kb do gene, abrangendo 6 Íntrons e 6 Éxons. A variante rs2569253 localizada no intro 2 possui uma distância de 3.429pb da variante rs919766 localizada na região do intro 4. A variante rs919766 tem uma distância de 6.714pb da variante rs3181224 que é próxima da variante rs3181225 com apenas 227pb de distância e ambas estão na região UTR'. Todas as variantes estudadas estão em regiões que são conhecidas por não codificarem aminoácidos, mas pode estar envolvida na regulação da sua respectiva proteína.

O bloco total que é composto pelos dois grupos (caso e controle) mostrou a variante rs3181225 está em DL com rs3181224 ($r^2=0.80$) e variante rs919766 ($r^2=0.85$), a variante rs919766 está em DL com a rs2569253 ($r^2=0.79$).

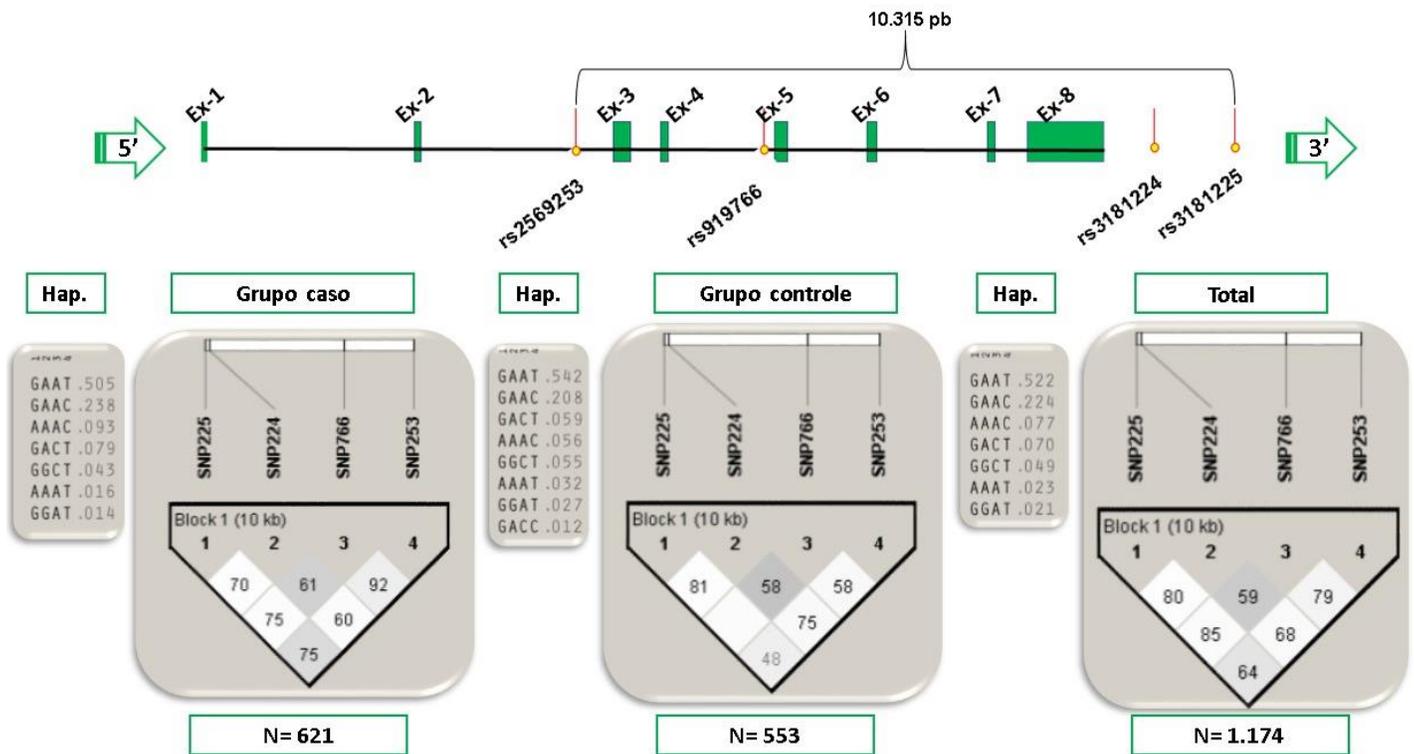


Figura 16. A distribuição e posição das variantes no gene *IL12*, e a estrutura de desequilíbrio de ligação das diferentes variantes do gene *IL12*.

Com o programa Haploview foi possível desenvolver os haplótipos pelo algoritmo de maximização da expectativa (EM). A análise dos haplótipos mostrou 7 haplótipos, aqui denominados de H1 a H7. Os haplótipos distribuídos entre os grupos caso e controle mostraram diferenças, conforme a tabela 08.

Os haplótipos (H1) T/A/A/G e H3 C/A/A/A mostraram diferenças na comparação dos grupos do estudo (caso CS (50%) e controle CT (54%) e (CS (9%) e CT (6%)), respectivamente. O haplótipo H1 está associado a proteção (OR 0.85; IC 95% 0.72-1.00; $p=0.06$) e o haplótipo H3 C/A/A/A á suscetibilidade a LC (OR 1.6; IC 95% [1.20-2.27]; $p=0.001$).

Hap.	SNV253	SNV766	SNV224	SNV225	CS%	CT%	X ²	OR	IC 95%	Valor P
1	T	A	A	G	0,50	0,54	3.47	0.85	[0.72-1.00]	0.06
2	C	A	A	G	0,24	0,21	2.89	1.2	[0.97-1.44]	0.08
3	C	A	A	A	0,09	0,06	9.93	1.6	[1.20-2.27]	0.001
4	T	C	A	G	0,08	0,06	2.02	1.3	[0.91-1.74]	0.15
5	T	C	G	G	0,04	0,06	2.56	0.73	[0.50-1.08]	0.10
6	T	A	A	A	0,02	0,03	2.84	0.62	[0.35-1.07]	0.09
7	T	A	G	G	0,01	0,02	3.01	0.60	[0.33-1.05]	0.08

Abreviações: CS, grupo caso; CT, grupo controle; X², Chi-square; OR, odds ratio.

Tabela 07. Distribuições dos haplótipos do gene *IL12* na população do estudo, 2022.

6.3 Avaliação da influência dos genótipos das variantes com as concentrações de citocina IL-12 e IFN- γ .

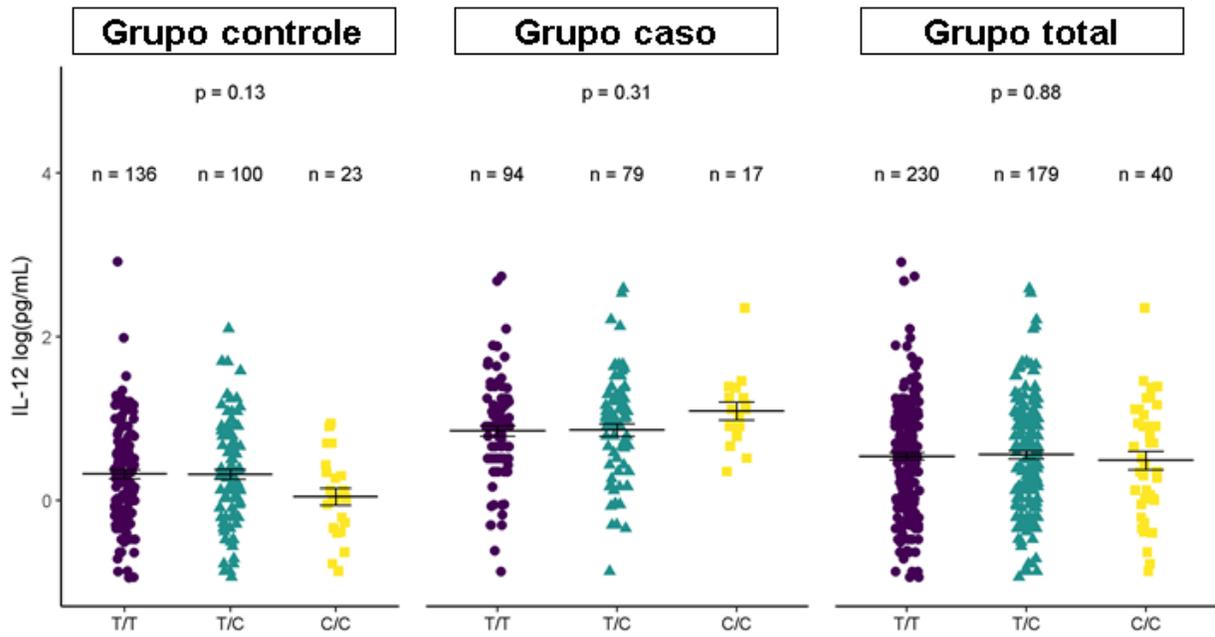
Os genótipos das variantes foram correlacionados com os níveis plasmáticos das citocinas IL-12 e IFN- γ . As correlações foram feitas em caso, controle e total (caso + controle), conforme as figuras abaixo.

A correlação dos genótipos (C/C, C/T e T/T) da variante rs2569253 com IL-12 não mostrou nenhuma diferença significativa. Entretanto, indivíduos homozigotos C/C mostrou uma baixa produção no grupo controle, quando comparado com os genótipos T/T e T/C, o mesmo é observado inversamente no grupo caso, conforme a **fig. 17**.

A influência observada, no grupo caso, da variante rs3181224 ($p=0.03$), sobre o nível plasmático da IL-12 não pode ser considerada devido o número amostral ($n=2$), ser baixo por causa da baixa frequência do genótipo homozigoto para o alelo G na população estudada, conforme **fig. 18**.

Os genótipos das variantes rs919766 e rs3181225 não mostraram correlação e tendência com nível de IL-12 circulantes, conforme **fig. 17 e 18**.

rs 2569253



rs 919766

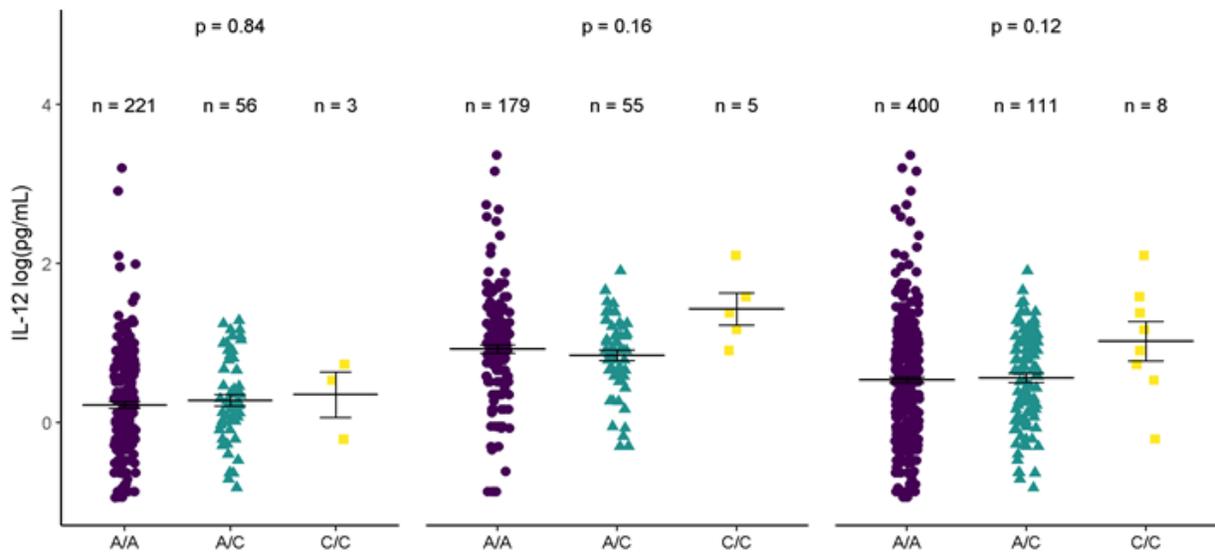


Figura 17. Correlação dos genótipos das variantes rs2569253 e rs919766 com nível plasmático da citocina IL-12, grupo caso, controle e total, 2022.

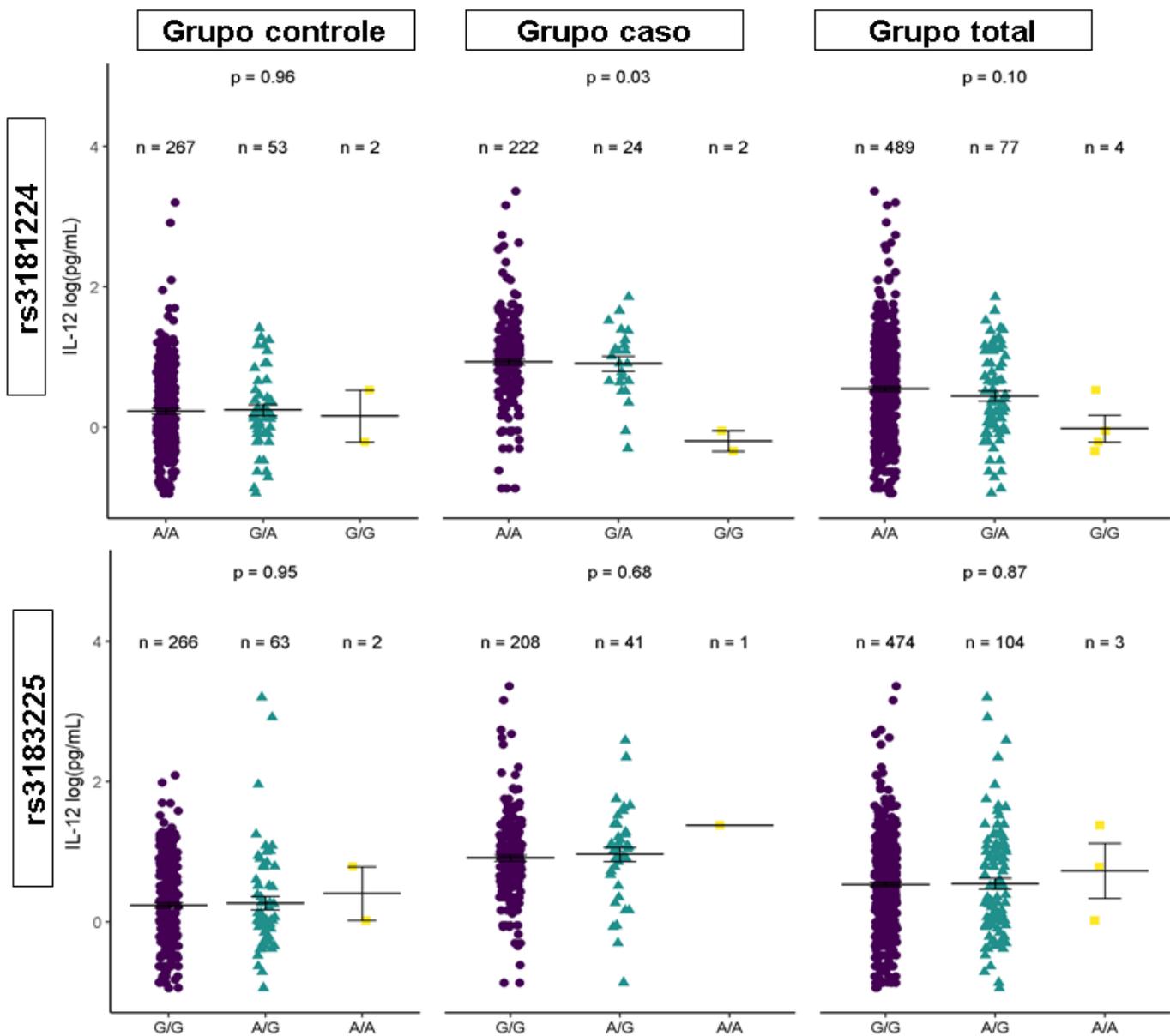


Figura 18. Correlação dos genótipos das variantes rs3181224 e rs3181225 com nível plasmático da citocina IL-12, grupo caso, controle e total, 2022.

As variantes rs2569253, rs919766, rs3183224 e rs3183225 mostraram não possuir influência no nível circulante de IFN- γ , conforme as **fig.19 e 20**.

O desvio padrão observado, no grupo controle da correlação entre a variante rs919766 e IFN- γ , na figura 19, acontece pelo baixo número amostral (n=3), do genótipo C/C.

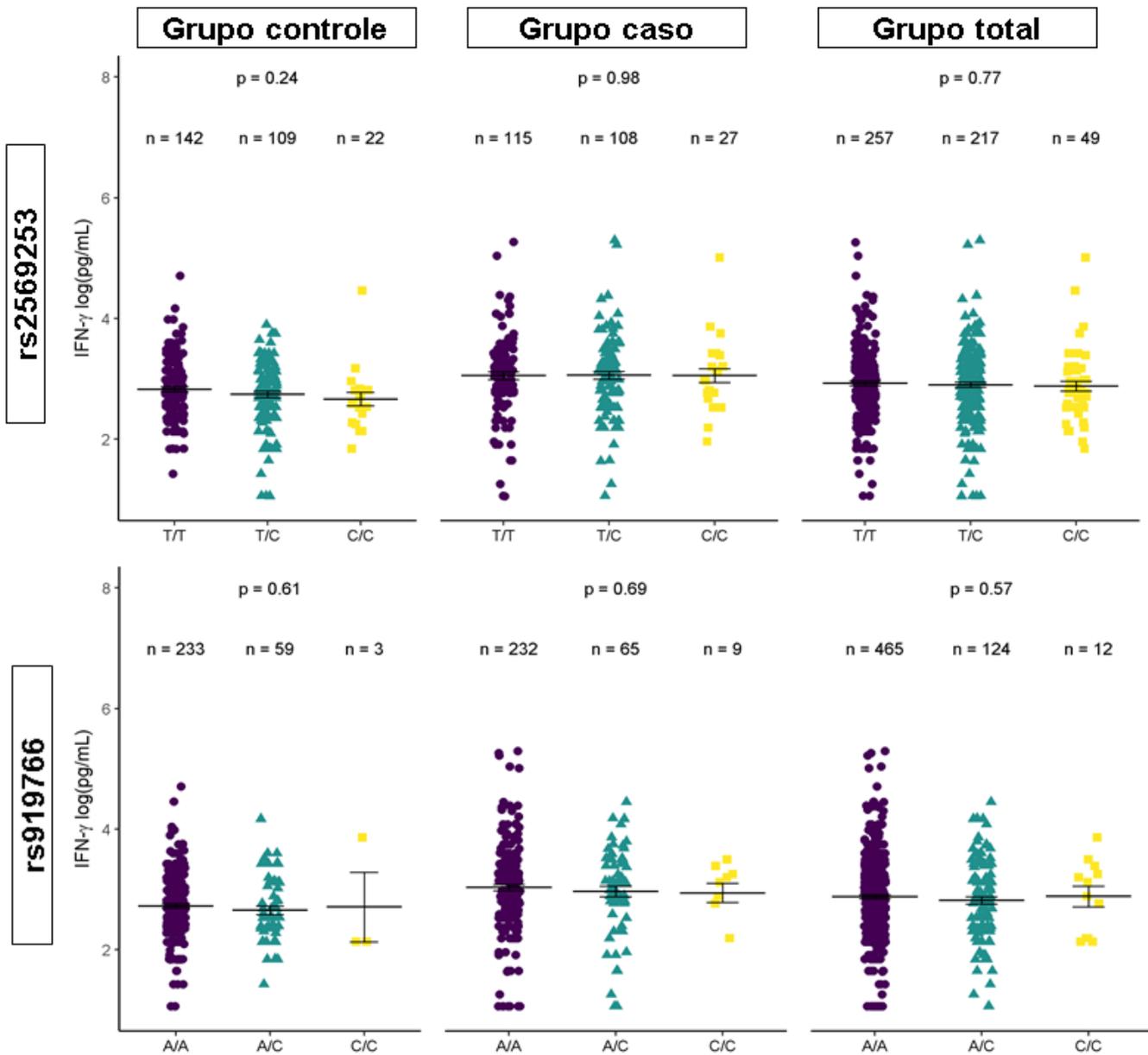


Figura 19. Correlação dos genótipos das variantes rs2569253 e rs919766, com nível plasmático da citocina IFN- γ , grupo caso, controle e total, 2022.

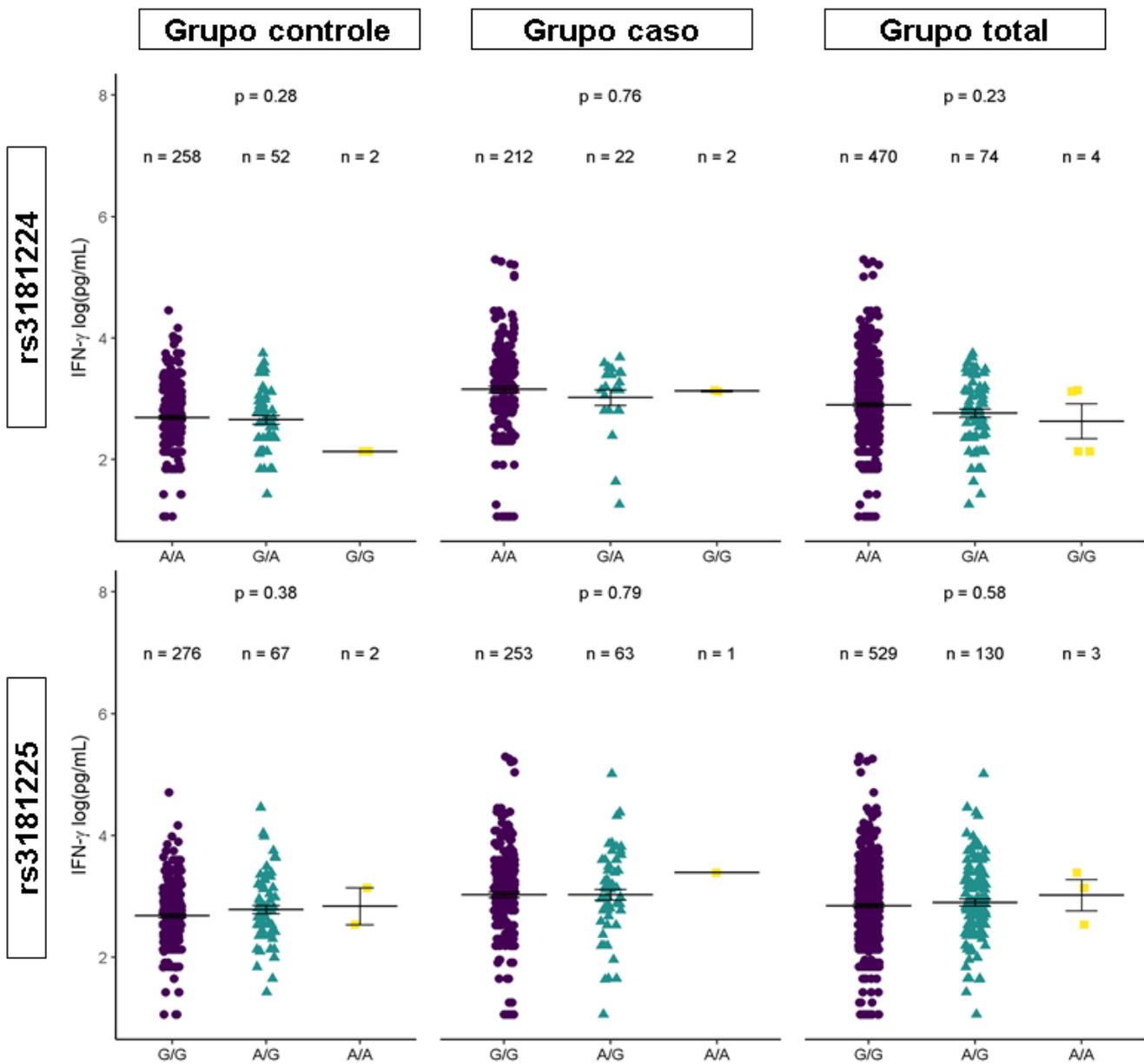


Figura 20. Correlação dos genótipos das variantes rs3181224 e rs3181225, com nível plasmático da citocina IFN- γ , grupo caso, controle e total, 2022.

Quando comparado apenas o genótipo homozigoto C/C vs T/T é visto uma influência do genótipo C/C ($p=0.05$) no grupo controle. Mostrando que indivíduos do grupo controle têm baixa produção de IL-12 quando comparado com o genótipo T/T, o que acontece inversamente no grupo caso, conforme a **fig.21**.

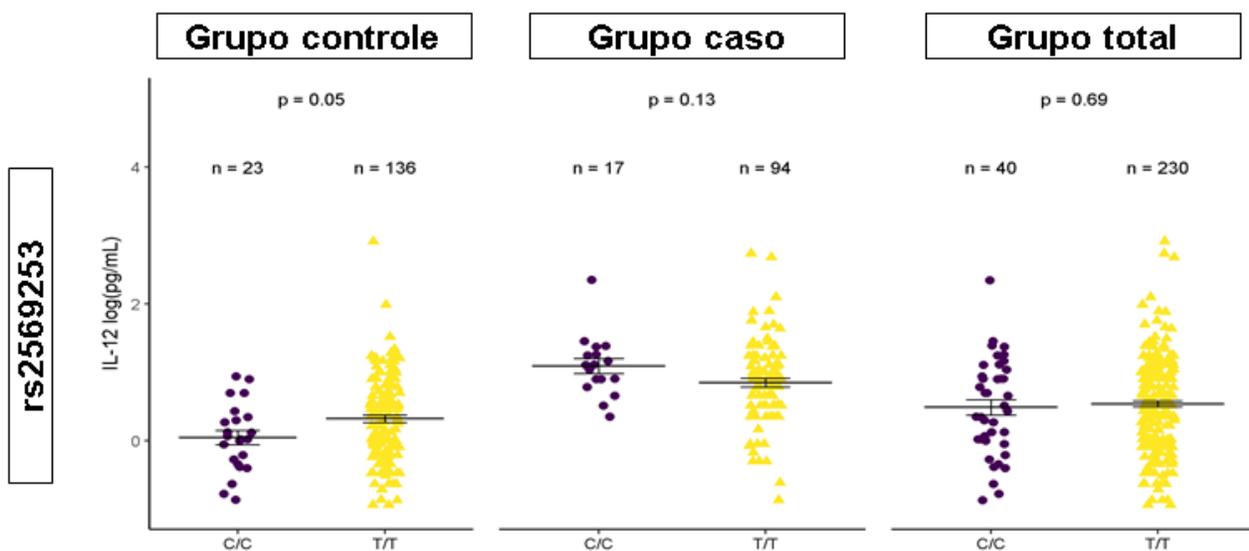


Figura 21. Correlação dos genótipos da variante rs2569253 com nível plasmático da citocina IL-12 grupo controle, caso e total, 2022.

7. DISCUSSÃO

Somente no Brasil, no período de 15 anos (2003-2018) foi registrado mais de 300.000 novos casos de Leishmaniose Tegumentar (LT), sendo a Leishmaniose Cutânea (LC) responsável pela maioria dos casos de LT. LC é uma doença infecciosa crônica dependente de diversos fatores, como ambientais, nutricionais, genéticos, para o seu desfecho clínico (SINAN/MS, 2019). Diversos estudos mostram que fatores genéticos exercem grande influência no desfecho clínico da LC.

A compreensão da LC teve grande avanço nos últimos anos, mas os mecanismos moleculares da doença ainda não são bem compreendidos. Ao pensar numa população endêmica, aleatoriamente, é possível observar apenas uma fração de indivíduos que desenvolve a LC, enquanto uma fração ainda menor desenvolve a Leishmaniose Mucocutânea (LM), forma mais agressiva da LC. Neste contexto, os mecanismos estão envolvidos nessa proteção ou suscetibilidade que faz apenas alguns indivíduos desenvolverem lesões e outros se curarem sem desenvolver lesões. Diversos estudos foram direcionados para relação entre a imunogenética do hospedeiro e desfecho clínico da doença, buscando identificar genes envolvidos na suscetibilidade frente a infecção LC (BLACKWELL et al., 2020).

Identificar os genes envolvidos na resposta do hospedeiro contra infecção por *Leishmania* ajudará na compreensão dos mecanismos de desenvolvimento da LC e outras doenças de caráter inflamatório, contribuindo na produção de novos tratamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais.

A classificação de resistência ou proteção frente a infecção a *Leishmania* é atribuída ao fato do hospedeiro ser capaz de eliminar parasitos via produção de IFN- γ , IL-12 e Óxido Nítrico (NO), que são produzidos por macrófagos (M1), esses M1 são polarizados na presença de IFN- γ que é produzido pela interação entre células Th1/M1. Em contraste, a suscetibilidade é determinada pela ausência da produção NO que acontece devido a interação entre células Th2/M2 (SOUSA et al., 2006). Essa interação resulta em produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL13 que polarizam os macrófagos pela via alternativa M2.

Vários estudos relataram associações de variantes genéticas presente no gene *IL12B* com doença inflamatória, como é caso da resistência em infecção congênita por citomegalovírus (DOMINIKA et al., 2020), por infecção *T. cruzi* (AMANDA et al., 2020).

Na presença de infecção bacteriana causada por *Listeria*, a interleucina IL-12 atua na diferenciação de linfócitos naive (Th0) em linfócitos Th1, além de promover a manutenção do fenótipo Th1 (HSIEH et al., 1993). Em cultura de células humanas e murinos a IL-12 facilitou a resposta Th1, além de aumentar a produção de IFN- γ , a presença de IL-12 em clones de CD4⁺ e CD8⁺ aumentou consideravelmente a produção de IFN- γ , quando comparado com clones sem a presença de IL-12 (MANETTI et al., 1994). A IL-12 atua como uma citocina chave na diferenciação em Th1 da resposta imune adaptativa, além da indução de citocinas pró-inflamatória como IL-12 e IFN- γ (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018). O desfecho clínico da LC é associado a uma resposta imunológica equilibrada entre subconjuntos Th1 e Th2, principalmente. A lesão da LC é associada principalmente a uma resposta predominante de Th1 (TNF- α , IFN- γ , IL-1b), (SCORZA et al., 2017). Qualquer fator que cause uma regulação positiva ou negativa no balanço da resposta Th1 e Th2, principalmente, pode levar ao desenvolvimento da lesão que é característica da LC.

O controle da leishmaniose cutânea causada por *L. mexicana* é associado ao eixo IL-12/IFN- γ /iNOS; camundongos deficiente em STAT-4 e/ou IFN- γ são altamente suscetíveis a desenvolverem a doença. Camundongos deficientes em IL-12p40 apresentaram crescimento rápido da lesão, carga parasitária alta e forte resposta Th2 (BUXBAUM et al., 2002). Doença de Chagas causada pelo *T. cruzi*, também é associada ao eixo IL-12/IFN- γ /iNOS; camundongos nocaute de IL-12 e/ou IFN- γ são altamente suscetíveis a doença (MICHAILOWSKY et al., 2001). O estudo de Amanda e colaboradores correlacionaram variantes genéticas presente ao longo gene *IL12* com doença de Chagas, em populações brasileiras (São Paulo, Minas Gerais e Bahia), o presente estudo mostrou correlação de duas variantes com suscetibilidade a doença, a variante rs2569253 (comparação T/T + T/C vs. C/C; p = 0.039; OR = 1.371; 95%CI: 1.015–1.852) e rs919766 (A/A vs. A/C + C/C; p = 0.001; OR = 1.653; 95%CI: 1.241–2.198), as frequências MAF(C) CT = 40.7%; CS = 35.3% e MAF(C) CT = 8.9%; CS = 19.3%, das variantes rs2569253 e rs919766, respectivamente. (FRADE-BARROS et al.,

2020). Nosso trabalho desenvolvido no Amazonas, estado do norte do Brasil, mostrou que indivíduos portadores do alelo C apresentam risco de desenvolver LC (comparação C/T+C/C vs. T/T; $p = 0.021$; OR = 1.28; 95%IC: 1.04-1.58), e frequência do MAF (C) CS 33%; CT 28,3% da variante rs2569253. Em contraste, a variante rs919766 não está associada com desenvolvimento da doença LC no nosso estudo, essa divergência pode estar relacionada a diferença da frequência do menor alelo apresentado por cada região. Amazonas, a população do nosso estudo apresentou MAF (C), da variante rs919766, CS=12,5% e CT=11,9% vs MAF (C) CS = 19.3% e CT = 8.9% Amanda e colaboradores), (AMANDA et al., 2020).

Na LC, a célula dendrítica (DC) inicia a resposta imune específica com apresentação do antígeno da *Leishmania* para a célula T e é tida como a principal fonte de produção de IL-12. A maioria das DCs que migram para os linfonodos são de origem de monócitos inflamatórios que migraram para o local da infecção e posteriormente se diferenciaram em DCs (LEZZI et al., 2006). DC internaliza parasito da *L. major* na forma amastigota, e induz a apresentação dos antígenos para célula Th0 via de Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classes 1 e 2 em sua superfície junto com aumento de moléculas coestimuladoras (CD40, CD54, CD80 e CD86), nas primeiras 18h de infecção a DC libera IL-12p40 e após 72h de infecção passa a liberar IL-12p70 sendo a principal fonte para célula Th1 CD4⁺ (VON et al., 1998). Tratamento com IL-12 recombinante curou em 89% dos camundongos BALB/c, que são normalmente suscetíveis, com tratamento houve diminuição da carga parasitária, patas infectadas, mostrando o papel protetor de células Th1 CD4⁺ (HEINZEL et al., 1993). A IL-12 é capaz de aumentar significativamente a produção de IFN- γ durante uma resposta imune (MANETTI et al., 1994).

O fato da IL-12 ser uma citocina chave no desenvolvimento de Th1, sua produção precisa possuir uma regulação da sua expressão. Os microRNAs (miRNAs) têm importante papel na regulação da transcrição e tradução de genes por isso têm sido amplamente implicados na regulação da resposta imune. Camundongos nocaute para miR-21 apresentaram alto nível de IL-12 e conseqüentemente alto nível de IFN- γ , além de diminuir a expressão de marcadores de macrófagos M2 favorecendo a polarização para M1 (LEE et al., 2021). Em infecção por *Toxoplasma gondii* o padrão de expressão

de miR-187 foi semelhante ao de produção de IL-12 (JIANG et al., 2020). Em 2021, Varikuti mostrou que camundongo nocaute para miRNA-155, infectados por *L. major*, tem elevados níveis de IL-12 e IFN- γ o que contribui para uma rápida resolução da doença (VARIKUTI et al., 2021). Nosso trabalho observou que os genótipos das variantes estudadas não possuem influências direta sobre os níveis de citocinas circulantes IL-12 e IFN- γ , figuras 17, 18,19 e 20, entretanto não se pode descartar que essas variantes estejam influenciando indiretamente nos níveis das citocinas, pois é notado que a presença do alelo C, da variante rs2569253 (Fig. 21), causa uma baixa na média de IL-12 no grupo controle e um aumento no grupo caso ou que essas variantes podem estar em DL com outras variantes e/ou formando haplótipos que influenciem nos níveis de citocinas circulantes e conseqüentemente no desfecho clínico da LC.

Células do sistema inato são as primeiras produtoras de IFN- γ , que antes do desenvolvimento da resposta Th1 contra *L. major*, células Natural Killer (NK) são recrutadas e começam a produzir IFN- γ (BAJÉNOFF et al., 2006). IFN- γ tem forte influência no desfecho clínico da LC, pelo importante papel desenvolvido na ativação de macrófagos M1 que são produtores de substâncias microbidas como óxido nítrico (NO) e espécie reativa de oxigênio (ROS), entretanto alta produção de IFN- γ pode acabar sendo prejudicial ao hospedeiro (SOUSA et al., 2006). Estudos mostraram que variantes genéticas presente no gene *IFNG* podem influenciar, para mais ou para menos, os níveis de IFN- γ circulantes (GUERRA et al., 2014, GONSKY et al., e 2014 SILVA et al., 2020). Guerra e colaboradores mostraram correlação de variantes genéticas com os níveis de IFN- γ em infecção por *T. gondii*, indivíduos heterozigotos do grupo controle AG (rs2069718) e CT (rs3181035) possuem alta produção de IFN- γ quando comparado com grupo de pacientes com lesões (GUERRA et al., 2014). Gonsky e colaboradores mostraram que pacientes (doença inflamatória intestinal) portadores do alelo T da variante rs1861494, localizada na região do 3 intron do gene *IFNG*, possuem maior secreção de IFN- γ (GONSKY et al., 2014). Nosso grupo mostrou uma correlação do haplótipo H1 G/G/T/T/A/T/G/C/G com baixos níveis IFN- γ circulantes em pacientes com LC causada por *L.guyanensis* (SILVA et al., 2020). Na linha de que a IL-12 influencia a produção de IFN- γ , nosso trabalho mostrou um risco de 62% de desenvolver LC para indivíduos que carregam o haplótipo H3 C/A/A/A no gene *IL12* (OR 1.6; IC 95% [1.20-

2.27]; $P=0.001$). Em contraste, não foi observado influência das variantes do gene *IL12B* sobre os níveis circulantes de IFN- γ . Essa citocina deve possuir uma fina regulação, pois uma baixa ou alta produção pode acarretar em aumento da carga parasitária ou dano ao tecido, respectivamente, uma vez que ela está diretamente ligada a ativação e polarização de macrófagos M1 que são células importantes para eliminação do parasito da LC.

8. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi estudado quatro variantes presente ao longo do gene *IL12B*, que codifica a subunidade p40 da IL-12. Os resultados gerados mostraram duas variantes associadas com LC causada por *L. guyanensis*, a variante rs2569253 mostrou que a presença do alelo C é associada com suscetibilidade frente à LC, enquanto que o genótipo G/G da variante rs3181224 é associada com resistência frente à LC.

É observado ainda que as variantes estudadas na população Amazonense não estão influenciando as concentrações das citocinas IL-12 e IFN- γ . Em contraste, é formado um haplótipo C/A/A/A, aqui denominado H3, que é correlacionado com suscetibilidade frente à LC causada por *L. guyanensis*.

O trabalho desenvolvido mostrou resultados interessantes, entretanto é necessário estudar outras variantes que estão distribuídas ao longo do gene *IL12B* para realizar uma cobertura maior do gene, gerando mais informações. Segundo dados do site SNPinfo a variante rs1368439 está numa região UTR' e recebe ligação do microRNA-220c (miR-220c), outra variante rs3212227 mostrou bons resultados como, correlação com a doença em diversos estudos genéticos.

É essencial verificar as informações que essas duas variantes carregam e somar com as informações que foram geradas neste trabalho para melhor inferir o papel das variantes genéticas presente ao longo do gene *IL12* com o desfecho clínico da LC na população estudada.

ANEXO

		Controle			Caso			Total		
rs2569253		n	Me ± SE	Valor- P	n	Me ± SE	Valor- P	n	Me ± SE	Valor- P
IL-12	T/T	136	0.31 ± 0.05	0.13	94	0.84 ± 0.06	0.31	230	0.53 ± 0.04	0.88
	T/C	100	0.31 ± 0.06		79	0.83 ± 0.07		179	0.54 ± 0.05	
	C/C	23	0.04 ± 0.10		17	1.08 ± 0.10		40	0.48 ± 0.11	
IFN.γ	T/T	142	2.82 ± 0.04	0.24	115	3.05 ± 0.06	0.98	257	2.92 ± 0.03	0.77
	T/C	109	2.72 ± 0.05		108	3.06 ± 0.06		217	2.90 ± 0.04	
	C/C	22	2.66 ± 0.10		27	3.05 ± 0.11		49	2.88 ± 0.08	
rs919766										
IL-12	A/A	221	0.22 ± 0.04	0.84	179	0.92 ± 0.05	0.16	400	0.53 ± 0.03	0.12
	A/C	56	0.27 ± 0.07		55	0.84 ± 0.06		111	0.55 ± 0.05	
	C/C	3	0.34 ± 0.28		5	1.42 ± 0.20		8	1.02 ± 0.24	
IFN.γ	A/A	233	2.72 ± 0.03	0.61	232	3.03 ± 0.04	0.69	465	2.87 ± 0.03	0.57
	A/C	59	2.65 ± 0.07		65	2.96 ± 0.09		124	2.81 ± 0.05	
	C/C	3	2.70 ± 0.57		9	2.94 ± 0.16		12	2.88 ± 0.17	

Tabela 08. Correlações dos genótipos das variantes rs2569253 e rs919766 com níveis plasmáticos das citocinas (IL-12 e IFN.γ), 2022.

		Controle			Caso			Total		
rs3181224		n	Me ± SE	Valor- P	n	Me ± SE	Valor- P	n	Me ± SE	Valor- P
IL-12	A/A	267	0.22 ± 0.03	0.96	222	0.92 ± 0.04	0.03	489	0.54 ± 0.03	0.10
	G/A	53	0.24 ± 0.07		24	0.82 ± 0.13		77	0.42 ± 0.07	
	G/G	2	0.16 ± 0.37		2	0.19 ± 0.14		4	0.01 ± 0.19	
IFN.γ	A/A	258	2.69 ± 0.03	0.28	212	3.15 ± 0.05	0.76	470	2.90 ± 0.03	0.23
	G/A	52	2.65 ± 0.07		22	3.02 ± 0.12		74	2.74 ± 0.06	
	G/G	2	2.13 ± 0.00		2	3.13 ± 0.01		4	2.63 ± 0.28	
rs3181225										
IL-12	G/G	266	0.23 ± 0.03	0.95	208	0.90 ± 0.04	0.68	474	0.52 ± 0.03	0.87
	A/G	63	0.24 ± 0.09		41	0.96 ± 0.10		104	0.52 ± 0.07	
	A/A	2	0.40 ± 0.38		1	1.37 ± 0.00		3	0.72 ± 0.39	
IFN.γ	G/G	276	2.86 ± 0.03	0.38	253	3.02 ± 0.04	0.79	529	2.84 ± 0.02	0.58
	A/G	67	2.78 ± 0.06		63	3.03 ± 0.08		130	2.90 ± 0.05	
	A/A	2	2.83 ± 0.12		1	3.39 ± 0.00		3	3.02 ± 0.25	

Tabela 09. Correlações dos genótipos das variantes rs3181224 e rs3181225 com níveis plasmáticos das citocinas (IL-12 e IFN.γ), 2022.

		Controle			Caso			Total		
rs2569253		n	Me ± SE	Valor- <i>p</i>	n	Me ± SE	Valor- <i>p</i>	n	Me ± SE	Valor- <i>p</i>
IL-12	C/C	23	0.04 ± 0.10	0.05	17	1.08 ± 0.10	0.13	40	0.48 ± 0.11	0.69
	T/T	136	0.31 ± 0.05		94	0.84 ± 0.06		230	0.53 ± 0.04	

Tabela 10. Correlações dos genótipos (sem a presença do C/T) da variante rs2569253 com níveis plasmáticos da citocina IL-12, 2022.

9. REFERÊNCIAS

Abbas, a. K.; lichtman, a. H.; pillai, s. *Imunologia celular e molecular*. Rio de janeiro: elsevier, 2018.

Afkarian, m., sedy, j., yang, j. Et al. T-bet is a stat1-induced regulator of il-12r expression in naïve cd4+ t cells. *Nat immunol* 3, 549–557 (2002).

Akuffo, h.; maasho, k.; howe, r. Natural and acquired resistance to leishmania: cellular activation by leishmania aethiopica of mononuclear cells from unexposed individuals is through the stimulation of natural killer (nk) cells. *Clin. Exp. Immunol.* 1993; 94:516-21.

Alvar, j.; vélez, i.d.; bern, c.; herrero, m.; desjeux, p.; cano, j.; jannin, j.; boer, m. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos one* 2012; 7:e35671.
Ameen, m. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin. Exp. Dermatol.* 2010; 35:699-705.

Antoine jc, prina e, courret n, lang t. Leishmania spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. *Adv parasitol.* 2004;58:1-68. Doi: 10.1016/s0065-308x(04)58001-6. Pmid: 15603761.

Aziz a, soucie e, sarrazin s, sieweke mh. Mafb/c-maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages. *Science.* 2009 nov 6;326(5954):867-71. Doi: 10.1126/science.1176056. Pmid: 19892988.

Bacellar o, lessa h, schriefer a, machado p, ribeiro de jesus a, dutra wo, gollob kj, carvalho em. Up-regulation of th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect immun.* 2002 dec;70(12):6734-40. Doi: 10.1128/iai.70.12.6734-6740.2002. Pmid: 12438348; pmcid: pmc132996.

Bajénoff, Marc et al. "Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging." *The Journal of experimental medicine* vol. 203,3 (2006): 619-31. doi:10.1084/jem.20051474.

Barbosa m.g., fé n.f., marcião a.h., silva a.p., monteiro w.m., guerra j.a.. Sandfly fauna (diptera: psychodidae) in a focus of american cutaneous leishmaniasis on the urban periphery of manaus, state of amazonas. *Rev soc bras med trop* 2008; 41(5):485-91.

Barrie, a. M. E plevy, s. E. The interleukin-12 family of cytokines: therapeutic targets for inflammatory disease mediation. *Clin. App. Imm. Rev.* 2005; 5:225-240.

Bates p.a. Transmission of leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int j parasitol* 2007; 37:1097-106.

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. Doi: 10.1590/s0074-02762007005000069. Pmid: 17710308.

Blackwell, Jenefer M et al. "Human genetics of leishmania infections." *Human genetics* vol. 139,6-7 (2020): 813-819. doi:10.1007/s00439-020-02130-w.

Blank, c.; fuchs, h.; rappersberger, k.; rollinghoff, m.; moll, h. Parasitism of epidermal langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with leishmania major. *J. Infect. Dis.* 1993; 167:418-25.

Boletim epidemiológico secretaria de vigilância em saúde | ministério da saúde número especial | set. 2019. Issn 9352-7864.

Brasil ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde departamento de vigilância epidemiológica. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Brasília. Editora ministério da saúde, 2007.

Breanna m. Scorza , edgar m. Carvalho , mary e. Wilson. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. J. Mol. Sci. 2017, 18, 1296; doi:10.3390.

Buxbaum, Laurence U et al. "Control of New World cutaneous leishmaniasis is IL-12 independent but STAT4 dependent." European journal of immunology vol. 32,11 (2002): 3206-15. doi:10.1002/1521-4141(200211)32:11<3206::AID-IMMU3206>3.0.CO;2-J.

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. Doi: 10.1371/journal.pone.0013815. Pmid: 21082032; pmcid: pmc2972777.

Chang, k.p.; fong, d.; bray, r.s. Biology of leishmania and leishmaniasis. Leishmaniasis elsevier 1985; 1-30.

Charmoy m, brunner-agten s, aebischer d, auderset f, launois p, milon g, proudfoot ae, tacchini-cottier f. Neutrophil-derived ccl3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of leishmania major inoculation in resistant mice. Plos pathog. 2010 feb 5;6(2):e1000755. Doi: 10.1371/journal.ppat.1000755. Pmid: 20140197; pmcid: pmc2816696.

Chua ao, chizzonite r, desai bb, truitt tp, nunes p, minetti lj, warrier rr, presky dh, levine jf, gately mk, et al. Expression cloning of a human il-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. J immunol. 1994 jul 1;153(1):128-36. Pmid: 7911493.

Convit, j.; ulrich, m.; fernandez, c.t.; tapia, f.j.; caceres-dittmar, g.; castes, m.; rondon, a.j. The clinical and immunological spectrum of american cutaneous leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1993; 87:444-8.

Cunningham a.c. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. Exp mol pathol 2002; 72:132-41.

da Silva, George A V 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*." *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* vol. 71,2 (2020): 274-281. doi:10.1093/cid/ciz810.

E e zijlstra, a m musa, e a g khalil, i m el hassan, and a m el-hassan. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Infectious diseases* vol 3 february 2003.

Epidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis and phlebotomine sandfly population, in the municipality of monte negro, state of rondonia, brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2013; 46:60-6.

F. T. Silveira, r. Lainson, and c. E. P. Corbett, "clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in amazonian brazil—a review," *memorias do instituto oswaldo cruz*, vol. 99, no. 3, pp. 239–251, 2004.

Farage Frade-Barros, Amanda et al. "Corrigendum: Polymorphisms in Genes Affecting Interferon- γ Production and Th1 T Cell Differentiation Are Associated With Progression to Chagas Disease Cardiomyopathy. " *Frontiers in immunology* vol. 11 593759. 10 Sep. 2020, doi:10.3389/fimmu.2020.593759.

Genaro, o. *Leishmaniose tegumentar america / leishmaniose visceral americana. Parasitologia humana.* 10ª edição, são paulo: atheneu, 2002, p. 36-72.

Gonsky, Rivkah et al. "IFNG rs1861494 polymorphism is associated with IBD disease severity and functional changes in both IFNG methylation and protein secretion." *Inflammatory bowel diseases* vol. 20,10 (2014): 1794-801. doi:10.1097/MIB.000000000000172.

Gordon s. Alternative activation of macrophages. *Nat rev immunol.* 2003 jan;3(1):23-35. Doi: 10.1038/nri978. Pmid: 12511873.

Goto, h.; lindoso, j.a. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert rev anti infect ther* 2010; 8:419- 33.

Grimaldi, g.; tesh, r.b. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.* 1993; 6:230-250.

Guerra jao, barros mlb, guerra mvf, talhari a, paes mg. Leishmaniose tegumentar no município de manaus – aspectos epidemiológicos. *Rev soc bras med trop* 1998; 31 (suppl):172.

Heinzel, F P et al. "Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*." *The Journal of experimental medicine* vol. 177,5 (1993): 1505-9. doi:10.1084/jem.177.5.1505.

Henry s, curtis j, hochrein h, vremec d, shortman k, handman e. Hierarchy of susceptibility of dendritic cell subsets to infection by *leishmania major*: inverse relationship to interleukin-12 production. *Infect immun.* 2002 jul;70(7):3874-80. Doi: 10.1128/iai.70.7.3874-3880.2002. Pmid: 12065531; pmcid: pmc128092.

Hsieh, C S et al. "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages." *Science (New York, N.Y.)* vol. 260,5107 (1993): 547-9. doi:10.1126/science.8097338.

Hu w, pasare c. Location, location, location: tissue-specific regulation of immune responses. *J leukoc biol.* 2013 sep;94(3):409-21. Doi: 10.1189/jlb.0413207. Epub 2013 jul 3. Pmid: 23825388; pmcid: pmc3747123.

Iezzi, Giandomenica et al. "Lymph node resident rather than skin-derived dendritic cells initiate specific T cell responses after *Leishmania major* infection." *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) vol. 177,2 (2006): 1250-6. doi:10.4049/jimmunol.177.2.1250.

Jankovic d, kullberg mc, noben-trauth n, caspar p, paul we, sher a. Single cell analysis reveals that il-4 receptor/stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of cd4+ lymphocytes with a th2 cytokine profile. *J immunol.* 2000 mar 15;164(6):3047-55. Doi: 10.4049/jimmunol.164.6.3047. Pmid: 10706693.

Jedlińska-Pijanowska, Dominika et al. "Association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of IL1, IL12, IL28 and TLR4 and symptoms of congenital cytomegalovirus infection." *PloS one* vol. 15,5 e0233096. 18 May. 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0233096.

Jenkins sj, ruckerl d, cook pc, jones lh, finkelman fd, van rooijen n, macdonald as, allen je. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of th2 inflammation. *Science.* 2011 jun 10;332(6035):1284-8. Doi: 10.1126/science.1204351. Epub 2011 may 12. Pmid: 21566158; pmcid: pmc3128495.

Jiang, Heng et al. "Delayed IL-12 production by macrophages during *Toxoplasma gondii* infection is regulated by miR-187." *Parasitology research* vol. 119,3 (2020): 1023-1033. doi:10.1007/s00436-019-06588-0.

Jones d, elloso mm, showe l, williams d, trinchieri g, scott p. Differential regulation of the interleukin-12 receptor during the innate immune response to *leishmania major*. *Infect immun.* 1998 aug;66(8):3818-24. Doi: 10.1128/iai.66.8.3818-3824.1998. Pmid: 9673267; pmcid: pmc108425.

Jones tc, johnson wd, barretto ac, lago e, badaro r, cerf b, et al. Epidemiology of american cutaneous leishmaniasis due to *leishmania braziliensis braziliensis*. *J. Infect. Dis.* 1987; 156:73-83.

Kopf m, le gros g, bachmann m, lamers mc, bluethmann h, köhler g. Disruption of the murine il-4 gene blocks th2 cytokine responses. *Nature*. 1993 mar 18;362(6417):245-8. Doi: 10.1038/362245a0. Pmid: 8384701.

Launois p, swihart kg, milon g, louis ja. Early production of il-4 in susceptible mice infected with leishmania major rapidly induces il-12 unresponsiveness. *J immunol*. 1997 apr 1;158(7):3317-24. Pmid: 9120289.

Lee, Hwa Young et al. "MicroRNA-21 Inhibition Suppresses Alveolar M2 Macrophages in an Ovalbumin-Induced Allergic Asthma Mice Model." *Allergy, asthma & immunology research* vol. 13,2 (2021): 312-329. doi:10.4168/aair.2021.13.2.312.

Li sn, wang w, fu sp, wang jf, liu hm, xie ss, liu br, li y, lv qk, li zq, xue wj, huang bx, chen w, liu jx. Il-21 modulates release of proinflammatory cytokines in lps-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. *Mediators inflamm*. 2013;2013:548073. Doi: 10.1155/2013/548073. Epub 2013 dec 26. Pmid: 24574581; pmcid: pmc3888770.

Liu j, cao s, herman lm, ma x. Differential regulation of interleukin (il)-12 p35 and p40 gene expression and interferon (ifn)-gamma-primed il-12 production by ifn regulatory factor 1. *J exp med*. 2003 oct 20;198(8):1265-76. Doi: 10.1084/jem.20030026. Pmid: 14568984; pmcid: pmc2194226.

Llanos-cuentas, e.a.; marsden, p.d.; cuba, c.c.; barreto, a.c.; campos, a.m. Possible risk factors in development of mucosal lesions in leishmaniasis. *Lancet* 1984; 2:295e.

Manetti, R et al. "Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones." *The Journal of experimental medicine* vol. 179,4 (1994): 1273-83. doi:10.1084/jem.179.4.1273.

Manolova i, ivanova m, vasilev g, stoilov r, miteva l, stanilova s. Impact of il12b polymorphisms on genetic susceptibility and il-12p40 and il-23 serum levels in rheumatoid arthritis. Immunol invest. 2020 feb;49(1-2):1-14. Doi: 10.1080/08820139.2019.1622561. Epub 2019 jun 4. Pmid: 31161840.

Marzochi, m.c.; marzochi, k.b. Tegumentary and visceral leishmaniasis in brazil: emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. Cad. Saude publica 1994; 10:359-75.

Matta, n.e.; nogueira, r.s.; franco, a.m.; de-souza, e.s.i.; mattos, m.s.; oliveira-neto, m.p.; coutinho, s.g.; leon, l.l.; da-cruz, a.m. Leishmania (viannia) guyanensis induces low immunologic responsiveness in leishmaniasis patients from an endemic area of the brazilian amazon highland. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2009; 80:339-44.

Michailowsky, V et al. "Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during Trypanosoma cruzi infection." The American journal of pathology vol. 159,5 (2001): 1723-33. doi:10.1016/s0002-9440(10)63019-2.

Mosmann tr, cherwinski h, bond mw, giedlin ma, coffman rl. Two types of murine helper t cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J immunol. 1986 apr 1;136(7):2348-57. Pmid: 2419430.

Novais fo, nguyen bt, beiting dp, carvalho lp, glennie nd, passos s, carvalho em, scott p. Human classical monocytes control the intracellular stage of leishmania braziliensis by reactive oxygen species. J infect dis. 2014 apr 15;209(8):1288-96. Doi: 10.1093/infdis/jiu013. Epub 2014 jan 7. Pmid: 24403561; pmcid: pmc3969552.

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. Doi: 10.4049/jimmunol.0803720. Pmid: 19923470.

Nussbaum, r. L.; mcinnes, r. R.; willard, h. F. Thompson & thompson, genética médica. Rio de janeiro: elsevier, 2008.

Ouyang, w.; ranganath, s. H.; weindel, k. Bhattacharya, d.; murphy, t. L.; sha, w. C.; murphy, k. M. Inhibition of th1 development mediated by gata-3 through an il-4-independent mechanism. Imm., vol. 9, 1998, p. 745–755.

Pai sy, truit ml, ho ic. Gata-3 deficiency abrogates the development and maintenance of t helper type 2 cells. Proc natl acad sci u s a. 2004 feb 17;101(7):1993-8. Doi: 10.1073/pnas.0308697100. Epub 2004 feb 9. Pmid: 14769923; pmcid: pmc357040.

Peixe, Ricardo Guerra et al. “Single nucleotide polymorphisms in the interferon gamma gene are associated with distinct types of retinochoroidal scar lesions presumably caused by Toxoplasma gondii infection.” Memorias do Instituto Oswaldo Cruz vol. 109,1 (2014): 99-107. doi:10.1590/0074-0276140539.

Pigott dm, bhatt s, golding n, duda ka, battle ke, brady oj, et al. Global distribution maps of the leishmaniasis. Elife 2014; 3: e02851.

Presky dh, yang h, minetti lj, chua ao, nabavi n, wu cy, gately mk, gubler u. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. Proc natl acad sci u s a. 1996 nov 26;93(24):14002-7. Doi: 10.1073/pnas.93.24.14002. Pmid: 8943050; pmcid: pmc19484.

Purse, b. V, masante, d., golding, n., pigott, d., day, j. C., iba, s., ... jones, l. (2017). How will climate change pathways and mitigation options alter incidence of vector-borne diseases? A framework for leishmaniasis in south and meso-america, 1–22. <https://doi.org/10.1038/sdata.2014.36.funding>

Reis e Sousa C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*. 2004 Feb;16(1):21-5. Doi: 10.1016/j.coi.2003.11.007. Pmid: 14734106.

Ribeiro-Gomes FI, Peters NC, Debrabant A, Sacks DL. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *Plos Pathog*. 2012 Feb;8(2):e1002536. Doi: 10.1371/journal.ppat.1002536. Epub 2012 Feb 16. Pmid: 22359507; pmcid: pmc3280984.

Ribeiro-Gomes FI, Romano A, Lee S, Roffê E, Peters NC, Debrabant A, Sacks D. Apoptotic cell clearance of leishmania major-infected neutrophils by dendritic cells inhibits CD8⁺ T-cell priming in vitro by Mer tyrosine kinase-dependent signaling. *Cell Death Dis*. 2015 Dec 10;6(12):e2018. Doi: 10.1038/cddis.2015.351. Pmid: 26658192; pmcid: pmc4720886.

Rietschoten, J. G. I.; Westland, R.; Bogaard, R.; Nieste-Otter, M. A.; Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, de Jesus AR, Filho DC, Filho AC, Barral A, Coffman RL, Carvalho EM. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1999 Nov;180(5):1731-4. Doi: 10.1086/315071. Pmid: 10515843.

Rochael NC, Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Desouza-Vieira TS, Oliveira MP, Garcia E Souza LF, Oliveira MF, Saraiva EM. Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of neutrophil extracellular traps triggered by leishmania parasites. *Sci Rep*. 2015 Dec 17;5:18302. Doi: 10.1038/srep18302. Pmid: 26673780; pmcid: pmc4682131.

Ruiz-Linares, Andrés et al. "Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals." *PLoS genetics* vol. 10,9 e1004572. 25 Sep. 2014, doi: 10.1371/journal.pgen.1004572.

Sakai, t.; matsuoka, m.; aoki, m.; nosaka, k.; mitsuya, h. Missense mutation of the interleukin-12 receptor {beta}1 chain-encoding gene is associated with impaired immunity against mycobacterium avium complex infection. Blood, vol. 97, 2001, p. 2688-94.

Sampaio, r.n.r.; pires, j.a.; sampaio, j.h.d.; magalhães, a.v. Visceralização da leishmaniose cutaneomucosa disseminada causada pela leishmania braziliensis em paciente imunocompetente. An bras dermatol 1997; 72:579-582.

Scharton tm, scott p. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of cd4+ t cell subsets and induces early resistance to leishmania major in mice. J exp med. 1993 aug 1;178(2):567-77. Doi: 10.1084/jem.178.2.567. Pmid: 8101861; pmcid: pmc2191131.

Scott p, novais fo. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. Nat rev immunol. 2016 sep;16(9):581-92. Doi: 10.1038/nri.2016.72. Epub 2016 jul 18. Pmid: 27424773.

Silveira, f.t.; lainson, r.; corbett, c.e.p. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in amazonian brazil – a review. Mem. Inst. Oswaldo cruz 2004; 99:239-251.

Silveira, f.t.; muller, s.r.; souza, a.a.; lainson, r.l.; gomes, c.m.c.; laurenti, m.d.; corbett, c.e.p. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na amazônia, com ênfase à doença causada por leishmania (v.) Braziliensis e leishmania (l.) Amazonensis. Revista paraense de medicina 2008^a; 22:9-20.

Simpson, I. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. Annu. Rev. Microbiol. 1987; 41:363-382.

Sinan/svs/ms, boletim eletrônico epidemiológico, 2016.

Sinigaglia f, d'ambrosio d, panina-bordignon p, rogge l. Regulation of the il-12/il-12r axis: a critical step in t-helper cell differentiation and effector function. *Immunol rev.* 1999 aug;170:65-72. Doi: 10.1111/j.1600-065x.1999.tb01329.x. Pmid: 10566142.

Snijders a, hilkens cm, van der pouw kraan tc, engel m, aarden la, kapsenberg ml. Regulation of bioactive il-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit. *J immunol.* 1996 feb 1;156(3):1207-12. Pmid: 8557999.

SNPinfo. National Institute of Environmental Health Sciences. Ano 2022. Disponível em: <https://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/snptag.html>

Sousa-Franco, Junia et al. "Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis." *Microbes and infection* vol. 8,2 (2006): 390-400. doi: 10.1016/j.micinf.2005.07.007

Sutterwala fs, noel gj, salgame p, mosser dm. Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage fcγ receptor type i. *J exp med.* 1998 jul 6;188(1):217-22. Doi: 10.1084/jem.188.1.217. Pmid: 9653099; pmcid: pmc2525554.

Szabo sj, dighe as, gubler u, murphy km. Regulation of the interleukin (il)-12r beta 2 subunit expression in developing t helper 1 (th1) and th2 cells. *J exp med.* 1997 mar 3;185(5):817-24. Doi: 10.1084/jem.185.5.817. Pmid: 9120387; pmcid: pmc2196166.

Tait wojno ed, hunter ca, stumhofer js. The immunobiology of the interleukin-12 family: room for discovery. *Immunity.* 2019 apr 16;50(4):851-870. Doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.011. Pmid: 30995503; pmcid: pmc6472917.

Takeda k, akira s. Microbial recognition by toll-like receptors. *J dermatol sci.* 2004 apr;34(2):73-82. Doi: 10.1016/j.jdermsci.2003.10.002. Pmid: 15033189.

Takeda k, tanaka t, shi w, matsumoto m, minami m, kashiwamura s, nakanishi k, yoshida n, kishimoto t, akira s. Essential role of stat6 in il-4 signalling. *Nature.* 1996 apr 18;380(6575):627-30. Doi: 10.1038/380627a0. Pmid: 8602263.

Teles, c.b.; basano, s.a.; zagonel-oliveira, m.; campos, j.j.; oliveira, a.f.; freitas, r.a.; medeiros, j.f.; pessoa, f.a.; barral, a.; camargo, l.m.

Tomiotto-pellissier f, bortoleti bt ds, assolini jp, gonçaves md, carloto acm, miranda-sapla mm, conchon-costa i, bordignon j, pavanelli wr. Macrophage polarization in leishmaniasis: broadening horizons. *Front immunol.* 2018 oct 31;9:2529. Doi: 10.3389/fimmu.2018.02529. Pmid: 30429856; pmcid: pmc6220043.

Ullrich ka, schulze ll, paap em, müller tm, neurath mf, zundler s. Immunology of il-12: an update on functional activities and implications for disease. *Excli j.* 2020 dec 11;19:1563-1589. Doi: 10.17179/excli2020-3104. Pmid: 33408595; pmcid: pmc7783470.

Varikuti, Sanjay et al. "MicroRNA155 Plays a Critical Role in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmania major Infection by Promoting a Th2 Response and Attenuating Dendritic Cell Activity." *The American journal of pathology* vol. 191,5 (2021): 809-816. doi: 10.1016/j.ajpath.2021.01.012.

Veen, a.; jonkers, r. E.; pouwkrann, t. C. T. M.; hartog, m. T.; wierenga, e. A. A novel polymorphic gata site in the human il-12rb2 promoter region affects transcriptional activity. *Tiss. Ant.*, vol. 63, 2004, p. 538–546.

Veen, a.; jonkers, r. E.; pouwkrann, t. C. T. M.; hartog, m. T.; wierenga, e. A. A novel polymorphic gata site in the human il-12rb2 promoter region affects transcriptional activity. *Tiss. Ant.*, vol. 63, 2004, p. 538–546.

Veloza, d.; cabral, a.; ribeiro, m.c.m.; motta, j.o.c.; costa, i.m.c.; sampaio, r.n.r. Leishmaniose mucosa fatal em criança. *An. Bras. Dermatol.* 2006; 81:255-259.

von Stebut, E et al. "Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity." *The Journal of experimental medicine* vol. 188,8 (1998): 1547-52. doi:10.1084/jem.188.8.1547

Walters, I.I. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. *J. Euk. Microbiol.* 1993; 40:196-206.

Wang im, contursi c, masumi a, ma x, trinchieri g, ozato k. An IFN- γ -inducible transcription factor, ifn consensus sequence binding protein (icsbp), stimulates il-12 p40 expression in macrophages. *J immunol.* 2000 jul 1;165(1):271-9. Doi: 10.4049/jimmunol.165.1.271. Pmid: 10861061.

World health organization w. *Leishmaniasis*. World health organization, (who). 2021.

Xu, d.; liu, h.; koma, m. Direct and indirect role of toll-like receptors in t cell mediated immunity. *Cell. Mol. Immun.* 2004; 1:239-246.

Zheng w, flavell ra. The transcription factor gata-3 is necessary and sufficient for th2 cytokine gene expression in cd4 t cells. *Cell.* 1997 may 16;89(4):587-96. Doi: 10.1016/s0092-8674(00)80240-8. Pmid: 9160750.

Zhu j. T helper 2 (th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ilc2) development and regulation of interleukin-4 (il-4) and il-13 production. *Cytokine.* 2015 sep;75(1):14-

24. Doi: 10.1016/j.cyto.2015.05.010. Epub 2015 jun 1. Pmid: 26044597; pmcid: pmc4532589.

Davies, L., Jenkins, S., Allen, J. et al. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 14, 986–995 (2013). <https://doi.org/10.1038/ni.2705>.

Romani N, Clausen BE, Stoitzner P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol Rev.* 2010 Mar;234(1):120-41. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00886.x. PMID: 20193016; PMCID: PMC2907488.

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



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 PCACIENTES 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 dissecação 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, tomando 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

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 Telxela, 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 conveniente 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 Telxela, 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 Telxela, 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