Daise Damaris Carnietto de Hippólito

Estudo dos genes codificadores de citocinas implicadas na modulação da
leishmaniose tegumentar americana e interação com os achados clínico-laboratoriais
da doença.

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

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Pereira-Chioccola

São Paulo

2017

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Hippólito, Daise Damaris Carnietto de

Estudo dos genes codificadores de citocinas implicadas na modulação da leishmaniose tegumentar americana e correlação com os achados clínico-laboratoriais da doença / Daise Damaris Carnietto de Hippólito – São Paulo, 2017.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientador: Vera Lúcia Pereira Chioccola

Descritores: 1. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA. 2. BIOPSIA. 3. CITOCINAS. 4. GENES DE RESPOSTA IMUNE. 5. RNA MENSAGEIRO.

USP/IMTSP/BIB-11/2017.

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Carlos e Nilva**, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Obrigada por terem dado tudo de si pela minha formação, sempre acreditando e apoiando as minhas escolhas. Desejo poder ter sido merecedora do esforço dedicado por vocês em todos os aspectos. Essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Agradeço com todo o meu amor e gratidão. Amo vocês!*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço a minha orientadora **Dr^a Vera Lucia Pereira-Chiocola**, por aceitar me orientar, por acreditar em mim e por transmitir seu conhecimento nesses anos, com muita paciência e carinho. Obrigada por estar sempre presente quando precisei, por deixar transparecer a sua paixão pela pesquisa (me contagiando com isso), por ser um exemplo de pessoa e por ser um ponto de referência no meu caminhar. Não tenho palavras para mensurar a minha gratidão!

AGRADECIMENTOS

A DEUS, que me carregou quando faltaram forças e sem Ele, não poderia estar aqui agradecendo a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus irmãos, **Daher e Dyogines**, pelo amor, carinho e apoio. Sou muito feliz pela família que somos. *“Quando não souberes para onde ir, olha para trás e saiba pelo menos de onde vens”*. (Provérbio africano). Às minhas cunhadas e cunhado, **Marianna, Michele, Simone e Rafael**, minha sogra, **Maria** e minhas sobrinhas, **Júlia e Manuela**, pelo carinho, apoio e incentivo.

Ao meu namorado, **Manuel (Gal)**, por ser tão importante na minha vida. Obrigada por todo apoio, por sempre me incentivar a continuar e por torcer pelo meu sucesso profissional, me fazendo acreditar que posso mais que imagino. E graças à nossa união, os obstáculos foram ultrapassados, vitórias foram conquistadas e alegrias compartilhadas. Agradeço pela paciência e compreensão com minha ausência durante essa longa jornada. MUITÍSSIMO obrigada. Amo demais você! *“Mas você - eu não posso e nem quero explicar, eu agradeço.”* (Clarice Lispector)

A gratidão é a memória do coração (Antístenes). Por isso venho aqui expressar meus sinceros agradecimentos, pois sem vocês meu objetivo seria difícil de alcançar ou até mesmo inatingível:

À pesquisadora **Dr^a. Cristina da Silva Meira-Strejevitch**, por todos os ensinamentos, incentivos e por acreditar em mim. Talvez não existam palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer você com justiça, com o devido merecimento. Sua ajuda e seu apoio foram para mim de valor inestimável. Muito obrigada, agradeço de coração!

Aos meus amigos, alunos de mestrado, do laboratório: **Kate, Lilian, Luiz, Marta e Valéria** por terem tornado o dia a dia no lab. tão prazeroso! Agradeço pelas ajudas, ensinamentos, empenho e solidariedade de todos. Foi extremamente enriquecedor conviver com vocês. Sou torcedora do sucesso de cada um.

Aos funcionários do laboratório de biologia molecular e parasitologia, **Cida Perez, Jefferson Rodrigues, Gabriela Motoie, Margarete Pereira e Ricardo Gava** pela amizade e momentos de descontração.

Aos meus amigos **Juliana Takahashi, Lidiane de Oliveira e Thiago Roberto** por todos esses anos de amizade, pelo apoio, carinho e compreensão. Obrigada por festejar as minhas conquistas, pelos conselhos, por ouvir meus desabafos, pelos momentos de alegrias. Tenham a certeza de que vocês estão no meu coração. Amo vocês.

Às pesquisadoras **Sandra Pukinskas, Márcia Melhem, Walderez Szeszs**, e em especial à **Marilena Martins** por acreditarem no meu potencial durante Programa de Aprimoramento Profissional (PAP), onde meu interesse pela pesquisa começou. Agradeço também, a toda a equipe da micologia: **Andres, Dulce, Dayane, Lindete, Lucas e Miriam**, pela convivência, amizade e carinho que começaram nos primeiros anos de Lutz e perduram até hoje.

Aos colaboradores desse projeto: **Cida Helena** (IAL-Sorocaba), **Cristina Kanamura** (IAL), **Kátia Oliveira** (UNIFESP), **José Ângelo Lauletta Lindoso** (IMT-USP) pelas amostras e apoio técnico.

A banca de qualificação, **Prof^a Dra. Clara Lúcia Barbiéri Mestriner** e **José Ângelo Lauletta Lindoso**, pela disponibilidade de participar e pelas contribuições acerca da dissertação.

Aos funcionários e aprimorandos do Centro de Parasitologia e Micologia do 8º andar do Instituto Adolfo Lutz, pela ajuda e incentivo. E às demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho ou participaram da minha vida, e que, por ventura, eu tenha me esquecido de agradecer.

“Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão. Sonhem com as estrelas para que vocês possam pisar pelo menos na Lua. Sonhem com a Lua para que vocês possam pisar pelo menos nos altos montes. Sonhem com os altos montes para que vocês possam ter dignidade quando atravessarem os vales das perdas e das frustrações. Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão além, aprendem a matemática da emoção, que não tem conta exata e que rompe a regra da lógica. Nessa matemática você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar. “

Augusto Cury

Daise Damaris Carnietto de Hippólito teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2015/04803-6).

RESUMO

Estudo dos genes codificadores de citocinas implicadas na modulação da leishmaniose tegumentar americana e interação com os achados clínico-laboratoriais da doença (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017.

A resposta imune desencadeada em pacientes com leishmaniose tegumentar Americana (LTA) é predominantemente celular. Assim, o estudo dos mecanismos imunológicos responsáveis pela formação, progressão e cura desta infecção é de grande importância, considerando a deformação que ela pode causar em indivíduos infectados. Este estudo investigou a expressão de mRNA de IFN- γ , IL-10, IL-27, TNF- γ , TGF- β e IL-6 em 40 biópsias de parafina (FFPE) fixadas em formalina de pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial para LTA. Um grupo de 10 biópsias FFPE coletadas de pacientes com diagnóstico clínico de leishmaniose mucosa (LM) foi utilizado para o controle da evolução da infecção. Inicialmente, foi padronizado a extração de RNA, a síntese de cDNA e a escolha do gene endógeno em 9 biópsias frescas e 8 FFPE. Após essas padronizações, as moléculas de RNA de fragmentos de biópsias parafinadas, foram extraídas com kit específico, tratadas com DNase, quantificadas por fluorimetria e sintetizadas para cDNA. A expressão relativa de cada citocina foi determinada (em duplicata) por PCR em tempo real. As reações foram normalizadas frente ao padrão de expressão do gene endógeno GAPDH, que foi previamente padronizado. O padrão de expressão de cada gene alvo foram determinados segundo a fórmula do “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta CT}$), na qual calcula-se quantas vezes mais ocorre a expressão do gene alvo em relação a indivíduos normais. Também incluído nesse estudo 5 amostras de biópsia de pele de indivíduos normais (grupo IV). Os resultados foram expressos em média de quantificação relativa, a análise estatística foi realizada utilizando foi determinada por Teste t não pareado e teste F para comparação de variâncias, onde três grupos de pacientes foram formados. Grupo I, 35 pacientes com LTA, cuja expressão relativa de IFN- γ foi inferior a 100. Grupo II, 5 pacientes com LTA cuja expressão relativa de IFN- γ foi

superior a 100. Grupo III, 10 pacientes com leishmaniose mucosa. Os níveis de expressão para IFN- γ foram 33,34; 214,1 e 129,6 vezes maiores para os Grupos I, II e III, respectivamente do que as amostras do controle normal. Para o TNF- α foram 11,22; 2,37 e 4,59 vezes superiores ao normal nos Grupos I, II e III, respectivamente. Para IL-10 foram 5,14; 11,54 e 2,51 vezes superiores aos valores normais nos Grupos I, II e III, respectivamente. Para IL-27 foram 15,81; 85,29 e 17,29 vezes superiores ao normal nos Grupos I, II e III, respectivamente. Para o TGF- β foram 5,38; 4,33 e 4,72 vezes superiores ao normal nos Grupos I, II e III, respectivamente. Para a IL-6 foram 5,92; 5,69 e 2,09 vezes superiores aos valores normais nos Grupos I, II e III, respectivamente. Estes resultados foram semelhantes a resultados de estudos que analisam a expressão de citocinas já sintetizadas. No geral, os resultados de expressão gênica das citocinas estudadas sugerem que a exacerbação da resposta imune do perfil Th1 (IFN- γ) poderia levar ao surgimento de lesões mais graves nos pacientes dos Grupos II e III. Os níveis elevados de mRNA de IL-10, observado nos pacientes do Grupo II podem promover baixa ativação macrofágica, colaborando com a replicação do parasita e assim culminar com a progressão da doença. A expressão de mRNA de IL-27 não interferiu na expressão de mRNA de IFN- γ nas células dos pacientes com leishmaniose tegumentar ou leishmaniose mucocutânea. Em conclusão, estes resultados podem sugerir que os pacientes do Grupo II podem desenvolver formas mais graves de LTA quando comparados aos do Grupo I.

Descritores: Leishmaniose tegumentar americana. Biopsia. Citocinas. Genes de Resposta Imune. RNA Mensageiro.

ABSTRACT

Study of genes encoding cytokines involved in the modulation of American cutaneous leishmaniasis and interaction with the clinical-laboratory findings of the disease (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017.

The immune response triggered in patients with American cutaneous leishmaniasis (ACL) is predominantly cellular. Thus, the study of the immunological mechanisms responsible for the formation, progression and cure of this infection is of great importance, considering the deformation that it can cause in infected individuals. This study investigated the expression of IFN- γ , IL-10, IL-27, TNF- γ , TGF- β and IL-6 mRNA in 40 formalin-fixed paraffin-embedded paraffin biopsies (FFPE) from patients with clinical and laboratory diagnosis for LTA. A group of 10 FFPE biopsies collected from patients with clinical diagnosis of mucosal leishmaniasis (MCL) was used to control the evolution of the infection. Initially, RNA extraction, cDNA synthesis and the choice of the endogenous gene were standardized in 9 fresh biopsies and 8 FFPE. After these standardizations, the RNA molecules of fragments of paraffin-shaped biopsies were extracted with a specific kit, treated with DNase, quantified by fluorimetry and synthesized for cDNA. The relative expression of each cytokine was determined (in duplicate) by real-time PCR. Reactions were normalized against the expression pattern of the endogenous GAPDH gene, which was previously standardized. The expression pattern results for each target gene were determined by the "comparative C_T" ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) formula, in which it is calculated how many times more the expression of the target gene occurs in relation to normal individuals. Also included in this study 5 skin biopsy samples from normal subjects (group IV). The results were expressed as mean relative quantification, statistical analysis was performed using was determined by unpaired t test and F test for comparison of variances, where three groups of patients were formed. Group I, 35 patients with ACL, whose relative expression of IFN- γ was less than 100. Group II, 5 patients with ACL whose relative expression of IFN- γ was greater than 100. Group III, 10 patients with mucosal

leishmaniasis. The expression levels for IFN- γ were 33,34; 214,1 and 129,6 times higher for Groups I, II and III, respectively than the samples from the normal control. For TNF- α were 11,22; 2,37 and 4,59 times higher than normal in Groups I, II and III, respectively. For IL-10 were 5,14; 11,54 and 2,51 times higher than the normal values in Groups I, II and III, respectively. For IL-27, 15,81; 85,29 and 17,29 times higher than normal in Groups I, II and III, respectively. For TGF- β were 5,38; 4,33 and 4,72 times higher than normal in Groups I, II and III, respectively. For IL-6 were 5,92; 5,69 and 2,09 times higher than the normal values in Groups I, II and III, respectively. These results were similar to the results of studies that analyze the expression of cytokines already synthesized. In general, the gene expression results of the cytokines studied suggest that the exacerbation of the Th1 profile (IFN- γ) immune response could lead to more serious lesions in patients in Groups II and III. Elevated levels of IL-10 mRNA observed in Group II patients may promote low macrophage activation, assisting in the replication of the parasite and thus culminating in the progression of the disease. Expression of IL-27 mRNA did not interfere in the expression of IFN- γ mRNA in the cells of patients with tegumentary leishmaniasis or mucocutaneous leishmaniasis. In conclusion, these results may suggest that patients in Group II may develop more severe forms of ACL when compared to those in Group I.

Descriptors: American cutaneous leishmaniasis. Biopsy. Cytokines. Immune Response Genes. Messenger RNA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(L.)	<i>Leishmania</i>
(V.)	<i>Viannia</i>
18S	Subunidade do RNA ribossomal
B2M	Beta-2-microglobulina
cDNA	DNA complementar
cPCR	PCR convencional
C _T	' <i>Cycle threshold</i> ' – Limiar do ciclo
D.O.	Densidade ótica
DEPC	' <i>Diethylpyrocarbonate</i> ' - Pirocarbonato de dietila
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	' <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ' - ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	' <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> ' - Ensaio imunoenzimático
et al.	e colaboradores
FFPE	' <i>Formalin-fixed, paraffin-embedded</i> ' - Fixados em formalina e embebidos em parafina
GAPDH	Gliceraldeído-3-fostato-desidrogenase
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> - Vírus da Imunodeficiência Humana
IFI	testes de imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina da classe G
IHC	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon gamma
LC	leishmaniose cutânea
LCD	leishmaniose cutânea difusa
LM	leishmaniose mucocutânea
LPG	lipofosfoglicano
LPs	lipofosfossacarídeos
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
MT-ATP	ATP mitocondrial
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde

pb	Pares de bases
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
qPCR	PCR em tempo real (quantitativa)
RIN	'RNA <i>integrity number</i> ' - Número de integridade do RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-later	Solução para estabilizar o RNA
SDS	Dodecilsulfato de sódio
Taq	<i>Thermophillus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borato/EDTA
TBP	TATA box-binding protein
TGF- β	Fator de Crescimento e Transformação Beta
Th1	Resposta celular do tipo 1
Th2	Resposta celular do tipo 2
TNF- α	" <i>Tumor necrosis factor-alpha</i> " - Fator de necrose tumoral alfa
UBC	Ubiquitina C

LISTA DE SÍMBOLOS OU FÓRMULAS

°C	grau Celsius
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	Micrometros
µM	Micromolar
UV	Ultravioleta
pg	picogramas
pH	potencial Hidrogeniônico
pmol	picomol
mL	mililitro(s)
mm	milímetro
mM	milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
g	Aceleração da gravidade terrestre (9,8m/s ²)
g	grama(s)
Δ	delta

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i>	25
Figura 2 - Distribuição e endemicidade da leishmaniose tegumentar Americana	26
Figura 3 - Leishmaniose cutânea e mucosa em países endêmicos das Américas, 2001-2015.....	27
Figura 4 - Número e percentual de casos de LTA, segundo as região de residência do Brasil- 2000 a 2008	28
Figura 5 - Formas evolutivas de <i>L. (V.) braziliensis</i> , em que (A) apresenta a forma promastigota do parasita em meio extracelular e (B) sua forma amastigota no interior de macrófagos	29
Figura 6 - Representação esquemática do ciclo de vida do parasita <i>Leishmania</i> spp...32	
Figura 7 - Manifestações clínicas das diferentes formas da leishmaniose tegumentar Americana	34
Figura 8 - PCR em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Coluna 1, Marcador molecular de 100 pb; Coluna 2, Produto de 146/149pb de <i>L. (V.) braziliensis</i> amplificado pelo marcador molecular LB-3C/LU-5A	62
Figura 9- Características histopatológicas de biopsias de LTA. As amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. (setas) são realçadas por coloração com Hematoxilina-Eosina com um anticorpo policlonal de camundongo anti- <i>Leishmania</i> spp. Ampliação original: X 100. Barra de escala: 10 µm.....	62
Figura 10 - Apresentação gráfica no programa Agilent 2100 Bioanalyzer de uma amostra de RNA com RIN de 2.1 (A) e outra de 5.1 (B)	66
Figura 11 - Padronização da concentração de RNA total para a síntese de cDNA	67
Figura 12- Análise dos níveis de expressão dos genes endógenos de fragmento de lesões fresca de pacientes com LTA. Média de estabilidade de expressão (Índice M) dos genes testados, sendo mais estável o gene quanto menor o valor de M.....	68
Figura 13 - Análise dos níveis de expressão dos genes endógenos de fragmento de lesões cutâneas FFPE de pacientes com LTA. Média de estabilidade de expressão (Índice M) dos genes testados, sendo mais estável o gene quanto menor o valor de M.....	69

Figura 14 - Expressão relativa de IFN- γ dos fragmentos de lesão obtidos por biopsia (em FFPE) de pacientes com LTA, Grupos I (vermelho) e II (azul); com LM, Grupo III (verde); e controles negativo, Grupo IV (lilas). Após o isolamento de RNA e síntese de cDNA, a expressão gênica de IFN- γ foi determinada por qPCR. Os resultados foram expressos em RQ após o cálculo determinado por “C_Tcomparativo” ($2^{-\Delta\Delta CT}$), descrito no item 3.11.2 de Material e Métodos. As linhas horizontais indicam as médias. Comparação de expressão entre grupos dos pacientes com leishmaniose foi determinado por teste t não pareado com base em um valor crítico de $p \leq 0,05$ e teste F para comparar variâncias, por a análise da variância unidirecional. As diferenças significativas entre os grupos são mostradas em linhas horizontais.....71

Figura 15 - Expressão relativa de IL-6 dos fragmentos de lesão obtidos por biopsia (em FFPE) de pacientes com LTA, Grupos I (vermelho) e II (azul); com LM, Grupo III (verde); e controles negativo, Grupo IV (lilas). Após o isolamento de RNA e síntese de cDNA, a expressão gênica de IL-6 foi determinada por qPCR. Os resultados foram expressos em RQ após o cálculo determinado por “C_Tcomparativo” ($2^{-\Delta\Delta CT}$), descrito no item 3.11.2 de Material e Métodos. As linhas horizontais indicam as médias. Comparação de expressão entre grupos dos pacientes com leishmaniose foi determinado por teste t não pareado com base em um valor crítico de $p \leq 0,05$ e teste F para comparar variâncias, por a análise da variância unidirecional. As diferenças significativas entre os grupos são mostradas em linhas horizontais.....72

Figura 16 - Expressão relativa de IL-27 dos fragmentos de lesão obtidos por biopsia (em FFPE) de pacientes com LTA, Grupos I (vermelho) e II (azul); com LM, Grupo III (verde); e controles negativo, Grupo IV (lilas). Após o isolamento de RNA e síntese de cDNA, a expressão gênica de IL-27 foi determinada por qPCR. Os resultados foram expressos em RQ após o cálculo determinado por “C_Tcomparativo” ($2^{-\Delta\Delta CT}$), descrito no item 3.11.2 de Material e Métodos. As linhas horizontais indicam as médias. Comparação de expressão entre grupos dos pacientes com leishmaniose foi determinado por teste t não pareado com base em um valor crítico de $p \leq 0,05$ e teste F para comparar variâncias, por a

análise da variância unidirecional. As diferenças significativas entre os grupos são mostradas em linhas horizontais.....73

Figura 17 - Expressão relativa de TGF- β dos fragmentos de lesão obtidos por biopsia (em FFPE) de pacientes com LTA, Grupos I (vermelho) e II (azul); com LM, Grupo III (verde); e controles negativo, Grupo IV (lilas). Após o isolamento de RNA e síntese de cDNA, a expressão gênica de TGF- β foi determinada por qPCR. Os resultados foram expressos em RQ após o cálculo determinado por “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), descrito no item 3.11.2 de Material e Métodos. As linhas horizontais indicam as médias. Comparação de expressão entre grupos dos pacientes com leishmaniose foi determinado por teste t não pareado com base em um valor crítico de $p \leq 0,05$ e teste F para comparar variâncias, por a análise da variância unidirecional. As diferenças significativas entre os grupos são mostradas em linhas horizontais.....74

Figura 18 - Expressão relativa de IL-10 dos fragmentos de lesão obtidos por biopsia (em FFPE) de pacientes com LTA, Grupos I (vermelho) e II (azul); com LM, Grupo III (verde); e controles negativo, Grupo IV (lilas). Após o isolamento de RNA e síntese de cDNA, a expressão gênica de IL-10 foi determinada por qPCR. Os resultados foram expressos em RQ após o cálculo determinado por “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), descrito no item 3.11.2 de Material e Métodos. As linhas horizontais indicam as médias. Comparação de expressão entre grupos dos pacientes com leishmaniose foi determinado por teste t não pareado com base em um valor crítico de $p \leq 0,05$ e teste F para comparar variâncias, por a análise da variância unidirecional. As diferenças significativas entre os grupos são mostradas em linhas horizontais.....75

Figura 19 - Expressão relativa de TNF- α dos fragmentos de lesão obtidos por biopsia (em FFPE) de pacientes com LTA, Grupos I (vermelho) e II (azul); com LM, Grupo III (verde); e controles negativo, Grupo IV (lilas). Após o isolamento de RNA e síntese de cDNA, a expressão gênica de TNF- α foi determinada por qPCR. Os resultados foram expressos em RQ após o cálculo determinado por “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), descrito no item 3.11.2 de Material e Métodos. As linhas horizontais indicam as médias. Comparação de expressão entre grupos dos pacientes com leishmaniose foi determinado por teste t não pareado com

base em um valor crítico de $p \leq 0,05$ e teste F para comparar variâncias, por a análise da variância unidirecional. As diferenças significativas entre os grupos são mostradas em linhas horizontais.....76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes endógenos humanos utilizados para a análises de expressão gênica.....	57
Tabela 2 - Genes codificadores de citocinas humanas utilizadas para a expressão gênica relativa dos pacientes com leishmaniose cutânea e mucocutânea	60
Tabela 3 - Características clínicas, laboratoriais e epidemiológica dos 40 pacientes com LTA	64
Tabela 4 - Padronização de extração de RNA de fragmentos de lesões cutâneas obtidos por biopsia (frescas e FFPE)	65
Tabela 5 – Valores de C _T das concentrações testadas para a padronização da síntese do cDNA.....	67

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Esquema terapêutico do fármaco antimoniato-N-metil-glucamina (Glucantime®) preconizado para as diversas formas clínicas de LTA.....	36
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Classificação taxonômica.....	24
1.2 Distribuição geográfica	26
1.3 Morfologia	28
1.4 Hospedeiro, reservatórios e vetores.....	29
1.5 Transmissão e ciclo biológico	30
1.6 Estratégias de evasão do parasita	32
1.7 Formas clínicas	33
1.8 Profilaxia e tratamento	36
1.9 Diagnóstico	37
1.9.1 Critério clínico-epidemiológico	37
1.9.2 Diagnóstico Laboratorial	38
1.9.2.1 Método parasitológico direto	38
1.9.2.2 Cultura.....	38
1.9.2.3 Método imunológico - Intradermoreação de Montenegro (IDRM)	39
1.9.2.4 Métodos sorológicos	39
1.9.2.5 Imuno-histoquímica	40
1.9.2.6 Métodos moleculares	40
1.10 Aspectos imunológicos da LTA	40
1.10.1 Imunidade Inata	41
1.10.2 Imunidade adaptativa	42
1.11 Expressão gênica	44
1.12 Justificativa	45
2 OBJETIVO GERAL	46
2.1 Objetivos específicos.....	46
3 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 Considerações éticas	47
3.2 Delineamento experimental	47
3.3 Pacientes e amostras clínicas	48
3.3.1 Fragmentos de lesões cutâneas frescas.....	48
3.3.2 Fragmentos de lesões cutâneas FFPE	49

3.3.3 Fragmentos de lesões de mucosa FFPE	49
3.3.4 Fragmentos de pele de indivíduos sem lesão.....	49
3.4 Diagnóstico laboratorial	50
3.4.1 Histológico e imunohistoquímico	50
3.4.2 Diagnóstico molecular	50
3.4.3 Diagnóstico parasitológico	52
3.5 Padronização da extração de RNA de fragmento de lesão cutânea fresca e FFPE de pacientes com LTA	52
3.5.1 Protocolo 1: Extração de RNA de fragmento de lesão cutânea fresca sem Proteinase K.....	52
3.5.2 Protocolo 2: Extração de RNA de fragmento de lesão cutânea fresca com Proteinase K.....	53
3.5.3 Protocolo 3: Extração de RNA de fragmento de lesão cutânea FFPE com Proteinase K.....	54
3.6 Concentração de RNA total	55
3.7 Análise da integridade de RNA total extraído de fragmento de lesão FFPE e frescas.....	55
3.8 Padronização da síntese e concentração do cDNA para uso na qPCR	55
3.9 Padronização da estabilidade de expressão dos genes endógenos	56
3.10 Análise da expressão dos genes codificadores das citocinas	58
3.11 Análise dos dados	58
3.11.1 Estabilidade de expressão dos genes endógenos	58
3.11.2 Expressão dos genes codificadores das citocinas.....	59
3.11.3 Análise estatística.....	59
4 RESULTADOS	61
4.1 Caracterização da população de estudo	61
4.1.1 Pacientes com LTA	61
4.1.2 Pacientes com LM	63
4.2 Quantificação de RNA total	65
4.3 Análise da integridade do RNA extraído de biopsias FFPE	65
4.3.1 Quantificação e qualidade do RNA total	65
4.3.2 Padronização da síntese e concentração do cDNA para uso na qPCR	67

4.4 Padronização e análise dos níveis de expressão de 6 genes endógenos em biopsias frescas e FFPE de pacientes com LTA	68
4.4.1 Genes endógenos em biopsia fresca.....	68
4.4.2 Genes endógenos em biopsia FFPE	69
4.5 Análise da expressão de genes codificadores de citocinas relacionadas às respostas Th1 e Th2 (IFN- γ , IL-10, IL-6, TGF- β , IL-27 e TNF- α) em amostras FFPE de pacientes com LTA	70
5 DISCUSSÃO	77
6 CONCLUSÃO	84
7 REFERÊNCIAS.....	85
8 ANEXOS	103
Anexo 1 - Parecer consubstanciado do Comitê de ética e pesquisa.....	105
Anexo 2 - Meira-Strejevitch CS, Pereira-Chiocola VL, Maia MM, Hippolito DDC, Wang HTL, Motoie G, Gomes AHS, Kanamura CT, Martines RB, de Mattos CCB, Frederico FB, de Mattos LC. Reference genes for studies in infectious parasitic diseases in five types of human tissues. Gene Reports. 2017 June;7:98–105.....	109

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença de distribuição mundial e de grande importância em saúde pública. É causada por protozoários flagelados unicelulares pertencentes ao gênero *Leishmania*. São parasitas com várias espécies e transmitidas ao homem pela picada de flebotomíneos. Acometem pele, mucosas, e cartilagens do homem, de animais domésticos e silvestres em regiões quentes do Velho e Novo Mundo.^{1, 2}

A LTA é classificada como doença não contagiosa negligenciada ocupando o quarto lugar em morbidade entre as infecções tropicais.³ A carga global da LTA é subestimada, porque muitos casos são mal diagnosticados.^{4, 5}

Estima-se que cerca de 0,7 milhões a 1 milhão de novos casos de LTA ocorram anualmente no mundo todo e cerca de 12 milhões de indivíduos estão infectados e 350 milhões de indivíduos estão expostos às leishmanioses.⁶ Mais de dois terços dos novos casos de LTA ocorrem em 6 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e Síria.^{7,8}

O Brasil figura como um dos dez países que possuem aproximadamente 75% dos casos da LTA, registrando uma média de 26 mil casos por ano, entre os anos de 2003 e 2007, com uma incidência de casos estimada entre 72.800 a 119.600 casos por ano.^{9,10} Está amplamente distribuída em quase todas as regiões brasileiras e os dados oficiais apontam que de 2000 a 2008 foram notificados 238 749 casos de LTA, com média de 26 528 novos casos/ano.¹¹

A evolução da LTA depende da resposta do hospedeiro a partir do local da picada do vetor, da localização das lesões e da evolução clínica. A mais comum é a infecção cutânea, que se caracteriza pelo aparecimento de uma única ou algumas lesões cutâneas ulceradas. Cerca de 3% dos pacientes desenvolvem doença mucosa, que é caracterizada por lesões desfigurantes, preferencialmente em mucosa nasal ou orofaríngea. A resposta celular dos hospedeiros determina a evolução da doença.^{12,13}

1.1 Classificação taxonômica

Leishmania são protozoários unicelulares nucleados, digenéticos (heteroxenos) de grande importância médica e veterinária¹⁴, que pertencem ao reino *Protista* e sub-Reino *Protozoa*. São organismos que se locomovem por meio de flagelos ou cílios, pertencentes ao filo *Sarcomastigophora* e ao subfilo *Mastigophora*. Incluem-se na classe *Zoomastigophora*, ordem *Kinetoplastida* que se caracterizam por apresentar uma mitocôndria única (denominada cinetoplasto) rica em DNA mitocondrial, o kDNA.^{15,16,17,18}

As características morfológicas dos gêneros que compõem a família *Trypanosomatidae* (Figura 1) são bem homogêneas. São parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania*, subdivididos em dois subgêneros, de acordo com o local do desenvolvimento das formas promastigotas: no sub-gênero *Leishmania*, as formas promastigotas multiplicam-se nas regiões média e anterior do intestino de flebotomíneos; enquanto que o sub-gênero *Viannia*, as formas promastigotas migram para as regiões anterior, média e posterior do intestino do vetor.^{16,17,18}

No Brasil, pelo menos sete espécies de *Leishmania* causadoras da doença foram identificadas, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*.¹⁹ A *L. (L.) amazonensis* e a *L. (V.) braziliensis* são as espécies cutâneas de maior interesse médico no Brasil, devido à gravidade e alta incidência, respectivamente.²⁰ *L. (V.) braziliensis* é a espécie responsável pela forma clínica localizada, que pode evoluir para a forma severa de leishmaniose cutâneo-mucosa que ocorre comumente na forma de recidiva da doença após a cura da lesão primária.²¹

Figura 1 - Taxonomia do gênero *Leishmania*.

Fonte: Brasil, 2006 ²²

1.2 Distribuição geográfica

A LTA é endêmica em aproximadamente 102 países tropicais e subtropicais distribuídos na África, Ásia, Europa e América Latina.^{6,10} (Figura 2) Em diferentes formas clínicas, a LTA afeta cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo e 350 milhões de pessoas estão sob o risco de contrair esta enfermidade. Apresenta incidência anual de 1,5-2 milhões de novos casos diagnosticados, porém se desconhece o aumento efetivo de casos, sendo somente 19% a 37% deles notificados às autoridades de saúde.^{6,22,23,24,25}

Figura 2 - Distribuição e endemecidade da leishmaniose tegumentar americana.
Fonte: WHO, 2013²⁶

A leishmaniose é considerada pela Organização Mundial da Saúde, como a segunda entre as seis infecções parasitárias mais importantes e frequentes no mundo, devido à ampla distribuição geográfica, o alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades, afetando assim a área social e psicológica do indivíduo.^{27,28}

Nas Américas, a LTA e a leishmaniose mucosa (LM) ocorre em 20 países, sendo endêmica em 18 deles. No período de 2001 a 2015 foram reportados a OPAS/OMS, 843.931 casos novos de LTA e LM com uma média anual de 56.262 casos, distribuídos em 17 dos 18 países endêmicos. Nos últimos cinco anos ocorreu redução de casos, sendo que em 2015 foi registrado o menor número de casos para todo o período analisado, com um decréscimo de 10% em relação ao ano de 2014 (Figura 3).²⁹

Figura 3 - Leishmaniose cutânea e mucosa em países endêmicos das Américas, 2001-2015.

Fonte: SisLeish-OPAS/OMS: Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses/Vigilância. Dados disponíveis em 05 de maio de 2017³⁰

Nos últimos anos, o Ministério da Saúde registrou média anual de 35 mil novos casos de LTA no país e os dados oficiais apontam que de 2000 a 2008 foram notificados 238.749 casos somente da LTA, com uma média de 26.528 novos casos/ano.¹¹ As regiões Norte e Nordeste vêm contribuindo, ao longo dos anos, com os maiores percentuais de casos do país, de modo que, do total confirmado no período de 2000 a 2008, 39,4% (94.169/238.749) ocorreram na região Norte; 31,7% (75.657/238.749), na região Nordeste; 15,9% (37.853/238.749), na região Centro-

Oeste; 9,6% (22.903/238.749), no Sudeste; e 2,6% (6.161/238.749), na região Sul (Figura 4).²⁸

Figura 4 - Número e percentual de casos de LTA, segundo as região de residência do Brasil- 2000 a 2008

Fonte: SINAN/SVS/MS.³¹

No Estado de São Paulo a LTA foi descrita pela primeira vez no final do século passado com ocorrência de grande número de casos.³² De 1975 a 2008 a LTA no Estado de São Paulo apresentou notável aumento de disseminação na transmissão nos municípios acompanhado de um número crescente de casos autóctones, apresentando importante alterações em seus níveis de transmissão, com picos quinquenais.³³

Na região de Sorocaba, local de estudo, registram-se cerca de 80 novos casos por ano, sendo que a incidência de casos ocorridos em regiões peri-urbanas e urbanas tem sido crescente.³⁴ Nos últimos anos, a LTA também foi considerada uma das síndromes dermatológicas mais diagnosticadas em viajantes/ turistas que vão para áreas endêmicas.³⁵

1.3 Morfologia

Leishmania apresenta duas formas evolutivas em seu ciclo de vida: a forma promastigota e a amastigota (Figura 5). A forma promastigota é encontrada no tubo digestivo de insetos vetores, que possui morfologia alongada, medindo de 10-15 µm

de comprimento, sendo móvel e com um único flagelo anterior. O núcleo é arredondado ou oval e está situado na região mediana ou ligeiramente na porção anterior do corpo. O cinetoplasto, apresenta-se em forma de bastão, localizado na posição mediana entre a extremidade anterior e o núcleo.³⁶

Já as formas amastigotas, apresentam morfologia arredondada, medindo cerca de 2-5 μm , sem flagelos exteriorizados e são imóveis. São encontradas no sistema linfomonocitário, alojando-se nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos dos hospedeiros vertebrados. Multiplicam-se por divisão assexuada, até romperem a célula parasitada, disseminando-se pela via hematogênica e linfática.³⁷ O núcleo é grande, arredondado, com localização central e anterior ao cinetoplasto, que é uma parte da mitocôndria onde o DNA mitocondrial está organizado juntamente com uma matriz de fibras finas.³⁶

Figura 5 - Formas evolutivas de *L. (V.) braziliensis*, em que (A) apresenta a forma promastigota do parasita em meio extracelular e (B) sua forma amastigota, indicado por setas, no interior de macrófagos.

Fonte: (A) Gontijo e Carvalho, (2003)²; (B) DPDx- Centers for disease Control and Prevention, (2013).³⁸

1.4 Hospedeiro, reservatórios e vetores

No Brasil, a LTA é uma doença com grande diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores que apresentam diferentes padrões de transmissão (área silvestre e fronteira agrícola). São considerados reservatórios da LTA as espécies de

animais que garantam a circulação de *Leishmania* na natureza.³⁹ Várias espécies de mamíferos silvestres e domésticos são considerados reservatórios e entre eles destacam-se a preguiça (*Choleopus didactylus*), tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), marsupiais do gênero *Didelphis*, roedores dos gêneros *Akodon*, *Oryzomys*, *Proechimys*, *Rattus*, *Rhipidomys* e *Sigmodon*^{40,41}, cães (*Canis familiaris*)^{42,43}, cavalos (*Equus caballus*) e jumentos (*Equus asinus*).⁴⁴

A LTA em animais domésticos pode apresentar-se como uma doença crônica com manifestações semelhantes às da doença humana, acometendo preferencialmente mucosas das vias aero digestivas superiores. O homem representa hospedeiro acidental e parece não ter um papel importante na manutenção dos parasitas na natureza.^{20,45}

Um grande número de espécies de flebotomíneos estão envolvidas na transmissão das leishmanioses. Estes insetos possuem peculiaridades em seu ciclo biológico que garantem a preservação e reprodução do parasita em questão. Nas Américas, estão envolvidos os flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, subgêneros *Nyssomyia* e *Psychodopygus*. Em todo mundo são conhecidos, cerca de 800 espécies de flebotomíneos, sendo 60% na região Neotropical. No Brasil, tem-se conhecimento, de 229 espécies, representando 28,6% do total e 47,7% das espécies que ocorrem na região Neotropical.⁴⁶ Cerca de 20 espécies de flebotomíneos são incriminadas na veiculação de *Leishmania* ao homem e animais no Brasil, representando 8,4% do total.⁴⁷ *Lu. intermedia*, *Lu. migonei* e *Lu. whitmani* possuem ampla distribuição, sendo capturadas nas cinco regiões brasileiras.⁴⁶

As diferentes espécies de flebotomíneos possuem habitats preferenciais, onde algumas possuem ecologia arbórea definida, vivendo nas partes altas das árvores e outras espécies estão mais presentes ao nível do solo. Evidentemente, em cada um desses níveis temos faunas de mamíferos diferentes que vão servir como fonte alimentar do inseto.⁴⁶

1.5 Transmissão e ciclo biológico

Leishmania mantém seu ciclo de vida (Figura 6) através da transmissão entre os flebotomíneos (vetores) e os mamíferos (hospedeiros definitivos). O ciclo varia de

acordo com a região geográfica, a diversidade da espécie do parasita, dos vetores, dos reservatórios e dos hospedeiros.²⁰

O ciclo da doença começa através da picada de dípteros, infectados com *Leishmania*, pertencentes tanto ao gênero *Phlebotomus*, que estão associadas às espécies do Velho Mundo, como ao gênero *Lutzomyia*, que hospeda as espécies do Novo Mundo. Somente as fêmeas são hematófagas, sendo, portanto, vetores capazes de transmitir o parasita para o hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo.⁴⁸

Ao realizar o repasto sanguíneo, o flebotomíneo infectado, regurgita as formas promastigotas metacíclicas na corrente sanguínea do hospedeiro.^{49,50} O parasita ao entrar na pele dos mamíferos, é fagocitado pelos macrófagos que são atraídos pela reação inflamatória formada no local da picada.⁵¹ Depois de se estabelecer no meio intracelular, a forma promastigota se transforma em amastigota, que dentro do vacúolo fagocitário, se multiplica por divisão binária até ocupar todo o citoplasma do macrófago, onde posteriormente a membrana se rompe mecanicamente liberando os amastigotas no tecido onde são novamente fagocitadas. Um flebotomíneo não infectado, ao realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, ingere células fagocíticas parasitadas com as formas amastigotas. No trato digestivo do inseto, o parasita transforma-se e se replica na forma promastigota procíclica. As formas promastigotas procíclicas, sofrem um processo de metaciclogênese e transformam-se em promastigotas metacíclicas (formas infectivas) e migram para a porção anterior do tubo digestivo do vetor. Quando esse flebotomíneo fizer um novo repasto sanguíneo, essas formas infectantes serão inoculadas no hospedeiro vertebrado sadio, dando continuidade ao ciclo.^{50,52}

Figura 6 - Representação esquemática do ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Fonte: Adaptado de Lipoldová e Demant, 2006.⁵³

1.6 Estratégias de evasão do parasita

Leishmania apresenta habilidade de evadir-se da destruição extracelular e penetrar em células fagocíticas, onde vão resistir ao ataque antimicrobiano, persistindo mesmo com a resposta imune celular do hospedeiro.^{48,52} O primeiro mecanismo de escape dos promastigotas é evitar a lise pelo sistema complemento. Este mecanismo ocorre com a participação de glicoproteínas e açúcares da membrana do parasita, do LPG e da metaloproteinase gp63. Esses fatores, atuam por fosforilação, inativando a cascata do sistema complemento impedindo o ataque à membrana.^{54,55}

Outro mecanismo auxiliar nas estratégias de escape da defesa do hospedeiro é a modulação de citocinas. Essa modulação pode ocorrer através da inibição/desativação de macrófagos; pela inibição da apresentação de antígeno e da estimulação de células T e pela alteração da função/diferenciação de células T.^{48,56}

Outra estratégia é a capacidade de modular ou interferir no reconhecimento de padrões mediados pelos TLRs e usando esses mecanismos de escape do hospedeiro.⁵⁷ Os TLRs reconhecem PAMPs e isso induz à produção de sinais responsáveis pela ativação de genes importantes para uma defesa imune do hospedeiro, especialmente

de citocinas pró-inflamatórias. A ausência de sinalização intracelular sobre a ligação de PAMPs com TLRs resulta no aumento da susceptibilidade a parasitos.⁵⁸

A *Leishmania*, também é capaz de interferir na atividade funcional dos macrófagos⁵⁹ e mimetizar o processo de morte celular programada, onde os macrófagos não reconheceriam o parasita como uma ameaça ao hospedeiro, diminuindo a resposta imune inflamatória.⁶⁰

Na última década foi demonstrado que a via de desativação do macrófago induzida pela fagocitose de células apoptóticas é utilizada por diversos patógenos intracelulares como estratégia de replicação por vias dependentes da produção de mediadores antiinflamatórios. As formas promastigotas infectam neutrófilos que, por sua vez, entram em apoptose e são fagocitados por macrófagos. A internalização através do reconhecimento do neutrófilo apoptótico evita o contato direto do parasita com receptores macrofágicos e induz a produção de TGF- β 1. Desta forma, a entrada do parasita no macrófago é facilitada e a ativação desta célula inibida, resultando no estabelecimento da infecção.⁶¹

1.7 Formas clínicas

A LTA é um grupo de doenças de evolução crônica e no Brasil, apresentam peculiaridades clínicas segundo a área geográfica, a espécie do parasita, do vetor, do reservatório, da constituição genética e imunológica do hospedeiro e as características dos ecossistemas.^{62,63}

De acordo com a localização das lesões e aspectos clínicos, a LTA se classifica das seguintes formas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose disseminada (LD) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (Figura 7).

A LC é a manifestação mais comum. É definida pela presença de lesões exclusivamente na pele, que se iniciam no ponto de inoculação das promastigotas infectantes.^{2,28,63} Apresenta lesões únicas ou múltiplas, após um período de incubação de 2 semanas a 3 meses, geralmente ulceradas, de bordas elevadas com um fundo geralmente granuloso, acompanhada de prurido e linfonodomegalia local, que podem curar espontaneamente após algumas semanas ou meses.^{4,25} Em área de transmissão

de *L. (V.) braziliensis*, a doença acomete, predominantemente, os membros inferiores em adultos do sexo masculino.⁶⁴ Contudo, está surgindo cada vez um maior número de casos com lesão em tórax, face e membros superiores; fato que está associado com uma mudança no padrão de transmissão, que antigamente ocorria na zona rural e mais recentemente passou a ocorrer nas áreas peri-domiciliares ou intradomiciliares.⁶⁵

Figura 7 - Manifestações clínicas das diferentes formas da LTA. (A) leishmaniose cutânea, (B) leishmaniose mucocutânea, (C) leishmaniose disseminada, (D) leishmaniose cutânea difusa.

Fonte: Figura A e D: Brasil. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana (2007)²⁰ MSB 2007; Figura B: Atlas LTA (2006)⁶⁶; Figura C: Guimarães (2005)⁶⁷

Estima-se que de 3 a 5% das formas cutâneas vão desenvolver lesões na mucosa, que é causada pela disseminação hematogênica dos parasitas. Normalmente ocorre meses ou anos após a lesão primária devido a evolução crônica ou tratamento inadequado da LC.⁶⁸ A LM é a forma mais desfigurante, caracterizada clinicamente por lesões destrutivas ulcerativas da mucosa naso-faríngea com perfuração do septo nasal.^{69,70} Embora a LC em suas diversas subclassificações e a LM não sejam fatais, as cicatrizes causam estigma e morbidade, afetando a qualidade de vida do indivíduo acometido.⁶³

A leishmaniose disseminada é caracterizada por lesões cutâneas múltiplas, podendo ser acneiformes, papulares e menos comumente ulceradas. As lesões são localizadas na face, tronco e membros, distantes do sítio de inoculação primária. Essas lesões podem ser muito numerosas, podendo chegar a centenas, mas respondem ao tratamento medicamentoso habitual.^{2,4,28}

A leishmaniose cutânea difusa caracteriza-se por apresentar anergia celular e está associada à acentuada proliferação de parasitas e disseminação da doença. Ocorre aparecimento de lesões nodulares não ulceradas por toda superfície corporal e infiltrações cutâneas pronunciadas. As lesões, de maneira geral, não cicatrizam espontaneamente e são resistentes ao tratamento.^{2,4,28}

1.8 Profilaxia e tratamento

Para a prevenção e controle da leishmaniose deve-se evitar a exposição ao vetor mediante a proteção individual ou coletiva; realizar o diagnóstico precoce; o tratamento deve ser eficaz para redução da transmissão da doença prevenindo incapacidades e morte e controle vetorial que ajuda a reduzir ou interromper a transmissão da doença.⁷¹

A escolha terapêutica da leishmaniose é baseada na apresentação clínica, a espécie do parasita, localização das lesões, localização geográfica e co-infecções tais como a infecção por HIV.⁷²

Para o tratamento da LTA, os antimoniais pentavalentes; N-metil-glucamina (antimoniato de meglumina) e o estibogluconato de sódio permanecem como drogas de primeira escolha, com exceção dos pacientes coinfectados com HIV e gestantes.²⁸ Este antimonial está indicado para todas as formas de LTA, embora as formas mucosas exijam maior atenção, já que os pacientes podem apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de resistência.¹ Seu mecanismo de ação ainda não está elucidado, mas sabe-se que atua nas formas amastigotas do parasita, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos, reduzindo a produção de ATP, GTP e CO₂, eliminando essas formas.^{73,74}

Apesar do tratamento com antimonial ter se mostrado eficaz, existem desvantagens como a necessidade de várias aplicações por um longo período de tempo, que leva muitas vezes ao abandono, o alto custo, o aparecimento de resistência e o alto grau de toxicidade. O surgimento de resistência ao antimônio está relacionado com a exposição inadequada à droga, aumentando a tolerância de parasitas frente a mesma.^{75,76}

Outras drogas foram introduzidas na terapia medicamentosa das leishmanioses, quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial, ou este não demonstra resultado satisfatório, ou ainda na impossibilidade de seu uso, sendo drogas de segunda escolha: a anfotericina B e as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina).⁷⁷ A anfotericina B, sendo a melhor opção para os pacientes com LM não responsivos à terapia convencional, atua no ergosterol presente na membrana da *Leishmania*, aumentando a permeabilidade que promove o fluxo de íons, tanto para promastigotas como amastigotas, levando à sua morte.^{78,79}

No Brasil, o Ministério da Saúde distribui gratuitamente o antimoniato-N-metil-glucamina (Glucantime®) na rede pública de saúde que adota o esquema terapêutico preconizado pela Organização Mundial da Saúde (Quadro 1).²²

Forma Clínica	Dose	Tempo de Duração
Leishmaniose cutânea	10-20 mg/Sb ⁺⁵ /kg/dia (recomenda-se 15 mg/Sb ⁺⁵ /kg/dia)	20 dias
Leishmaniose cutânea difusa	20 mg/Sb ⁺⁵ /kg/dia	20 dias
Leishmaniose mucosa	20 mg/Sb ⁺⁵ /kg/dia	30 dias

Quadro 1 - Esquema terapêutico do fármaco antimoniato-N-metil-glucamina (Glucantime®) preconizado para as diversas formas clínicas de LTA.

Fonte: (MSB, 2006).²²

De acordo com a forma clínica e a resposta terapêutica, o esquema de tratamento pode ser modificado em relação à dose e à duração.²²

O critério de cura é clínico, na forma cutânea, o paciente é considerado curado quando ocorre a reepitelização das lesões ulceradas ou não-ulceradas e regressão total da infiltração e eritema até 3 meses após a conclusão do tratamento. Já na forma

mucocutânea, a cura, é definida pela regressão de todos os sinais, e comprovado pelo exame otorrinolaringológico, até 6 meses após a conclusão do tratamento.^{20,80}

Recomenda-se acompanhamento mensal por 3 meses consecutivo após a cura clínica, seguido de pelo menos 1 vez ao ano durante o período de 5 anos, pois este período, parece ser o que ocorre o maior número de casos de reativação da doença.²²

1.9 Diagnóstico

O diagnóstico da LTA pode ser feito com base nas características da lesão associada à anamnese, métodos laboratoriais e pelos dados epidemiológicos, que são de grande importância. Portanto, para conclusão diagnóstica, é necessário realizar a associação entre os dados clínicos e epidemiológicos combinados com pelo menos um teste laboratorial.^{2,81,82}

1.9.1 Critério clínico-epidemiológico

No diagnóstico clínico-epidemiológico, a anamnese é importante para verificar o local de residência do paciente e regiões por ele frequentadas nos últimos 6 meses, avaliar as características morfológicas, a quantidade e os locais de distribuição das lesões.²²

As características clínicas da LTA são diversas, dependendo da espécie de *Leishmania*, dos fatores do hospedeiro e do estado imunológico do paciente.³⁵

A evolução da lesão inicial é semelhante a picada de um inseto. Após um período de incubação de 2 semanas a 3 meses, uma pequena pápula eritematosa ou nódulo aparece. Esta lesão inicial pode curar espontaneamente ou evoluem, com diferentes características clínicas.⁸³ Porém, o ideal é que o diagnóstico clínico-epidemiológico seja confirmado por métodos laboratoriais. No entanto, carcinomas epidermóides, paracoccidiodomicose, tuberculose, sífilis e hanseníase, que são relativamente comuns no Brasil, devem ser consideradas no diagnóstico diferencial.^{2,63}

1.9.2 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial baseia-se na realização de vários exames como pesquisa de parasitas em esfregaço de lesões, cultura, avaliação da resposta imune celular, histopatológico, sorológicos (ensaio imunoenzimático - ELISA ou teste de imunofluorescência indireta - IFI) e molecular (cPCR ou qPCR).^{2,37,84,85} A sensibilidade de cada método pode variar de acordo com a experiência do profissional, a qualidade do equipamento e dos insumos, o tempo de evolução das lesões, as formas clínicas e as diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas.²⁰

1.9.2.1 Método parasitológico direto

O exame parasitológico direto investiga a presença das formas amastigotas do parasita que pode ser realizada em biopsia, impressão ou esfregaço. As amostras são colocadas em lâminas, submetidas a fixação em metanol e coloração pelo método de *Giemsa* ou *Leishman*. As leituras são realizadas em microscopia óptica.^{86,87} A sensibilidade do método depende da carga parasitária na amostra clínica, da qualidade do esfregaço e das habilidades do observador. A positividade desse método pode chegar a 98,5% em área de maior endemicidade, principalmente em lesões recentes. Possui vantagens como a simplicidade e a rapidez na sua execução.⁸⁸

1.9.2.2 Cultura

O ministério da saúde²⁸ preconiza o isolamento do parasito por meio de cultura, sendo um método de confirmação do agente etiológico e permite a identificação da espécie de *Leishmania* envolvida no processo infeccioso. O parasita cresce relativamente bem em diversos meios de cultura à 24°C a 26°C. Os fragmentos obtidos da lesão cutânea por procedimento de biópsia da borda da úlcera devem ser inoculados em meios de cultivo NNN – Novy MacNeal, e Nicolle (Ágar sangue modificado) e

LIT (Liver Infusion Triptose) ou Schneider acrescido de 10% de soro fetal bovino. A sensibilidade global do método está em torno de 50% para *L. braziliensis*.⁸⁹

1.9.2.3 Método imunológico - Intradermoreação de Montenegro (IDRM)

O IDRM é uma reação do tipo hipersensibilidade tardia, refletindo a reposta imune mediada por células. É realizada com antígeno de promastigotas mortas, utilizando geralmente *L. (V.) brasiliensis*.^{90,91} É usado em estudos epidemiológicos para determinar a prevalência da infecção, baseado na visualização da resposta de hipersensibilidade celular. Entretanto, não faz distinção entre infecção recente e tardia. É seguro e especialmente valioso nas áreas de prevalência da *L. (V.) brasiliensis*. É administrado 0,1 ml do antígeno de *Leishmania* a 3 cm da dobra cubital no antebraço do paciente, sendo a induração mensurada após 48 horas. O teste considerado positivo quando a induração for maior ou igual a 5 mm.⁹²

1.9.2.4 Métodos sorológicos

Os testes de imunofluorescência indireta (IFI) e imunoenzimático (ELISA) são métodos utilizados para detectar anticorpos anti-*Leishmania*. Esses testes usam promastigotas ou proteínas solúveis do parasita como fonte de antígeno. As reações sorológicas não devem ser utilizadas como critério isolado para diagnóstico de LTA, pois podem apresentar reação cruzada com outros Tripanosomatídeos.⁹³ Pode, entretanto, ser considerada como critério adicional no diagnóstico diferencial com outras doenças. Após o tratamento e cura em ambas as formas de doença, os títulos podem cair ou desaparecer em alguns meses.²²

1.9.2.5 Imuno-histoquímica

A utilização da técnica de imuno-histoquímica tem mostrado sucesso no diagnóstico de LTA.^{94,95} A detecção de amastigotas de *Leishmania*, em cortes fixados por formalina tamponada e incluídos em parafina, tanto de tecidos humanos como em cães, tornou-se rotina, pela sua simplicidade, por não necessitar de equipamentos especiais, e ser altamente sensível e específico.^{96,97} A sensibilidade dos testes de imuno-histoquímica depende principalmente do sistema de detecção utilizado, que se baseia na mudança de cor induzida pela enzima ligada a imuno-complexos, vinculados a uma secção de tecido, depois de reagir com seu substrato e o cromógeno.^{98,99}

1.9.2.6 Métodos moleculares

As técnicas moleculares, como a PCR, são consideradas boas para diagnóstico e pesquisa, onde, amplificam seletivamente sequências de DNA do parasita. Algumas das vantagens quando comparada com outros métodos parasitológicos são: a possibilidade de detecção de DNA de *Leishmania*, mesmo com baixa carga parasitária; especificidade; disponibilidade rápida de resultados; possibilidade da utilização de diferentes materiais biológicos; a possibilidade de detectar o DNA de amastigotas e promastigotas e determinar a espécie de *Leishmania*.^{84,85,88,100}

1.10 Aspectos imunológicos da LTA

O sistema imunitário apresenta funcionamento complexo e envolve interações específicas entre os seus componentes, desempenhando um papel fundamental na defesa do organismo e na manutenção da homeostase, conferindo imunidade inata e adquirida ao indivíduo. Em humanos, a resposta imune à infecção por *Leishmania* não é tão bem caracterizada como a resposta em murinos, em virtude de sua complexidade. Esta resposta envolve a ação das citocinas, das moléculas co-estimulatórias, da ativação de linfócitos T auxiliares e da saliva do flebotomíneo.^{55,101} Participam ainda

da resposta inflamatória local, o sistema complemento e mediadores pró-inflamatórios, assim como os macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e células apresentadoras de antígenos. Decorrido o encontro destes componentes com os parasitas, ocorrerá a produção de uma resposta específica e geração de resistência ou susceptibilidade à infecção.^{55,101}

1.10.1 Imunidade Inata

A resposta imune a *Leishmania* é iniciada no local de entrada do parasita, e envolve as células sentinelas, incluindo as células dendríticas, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e células “natural killer” (NK), o sistema complemento e fatores de crescimento.¹⁰² No hospedeiro vertebrado, após a introdução das formas promastigotas pelo vetor, ocorre a ativação do sistema complemento, que liga covalentemente proteínas específicas à superfície de diferentes organismos invasores promovendo a fagocitose e/ou a lise desses organismos. O complemento pode ser ativado pela via clássica, via das lectinas ou via alternativa.^{103,104}

A fase final efetora da cascata do complemento será sempre a mesma independente da via inicial de ativação, e culminará com a formação do complexo de ataque à membrana C5b-9 ou MAC. O potencial lítico do MAC depende de C9 produzir poros grandes suficientes para levar à lise da célula infectada.¹⁰⁵

Uma outra consequência da ativação do complemento é a geração de fragmentos C3a e C5a, quimiotáticos, que promovem inflamação tecidual. As células atraídas para o local da infecção, principalmente fagócitos polimorfonucleares neutrófilos e monócitos/macrófagos, fagocitam *Leishmania* com interação direta de ligantes do parasita, entre eles LPG e gp63, ou parasitas opsonizados por fragmentos do complemento e receptores de macrófagos.¹⁰⁶

Os “toll-like receptors” (TLRs) são uma família de receptores, codificados em linhagem germinativa, responsáveis pelo reconhecimento de diversos padrões moleculares, que patrulham a superfície celular, assim como o ambiente endossomal.^{107,108,109} Os “(NOD)-like receptors” (NLRs), por sua vez são receptores de reconhecimento padrão (PRRs) citoplasmáticos que reconhecem os padrões

moleculares associados à patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs).¹¹⁰

Uma vez ativados, os NLRs desencadeiam diversas vias de sinalização que podem promover respostas inflamatórias, atividade transcricional e montagem do inflamassoma.¹¹¹ O inflamassoma é definido como um complexo de alto peso molecular que ativa caspases inflamatórias e leva ao processamento da citocina IL-1 β .^{112,113} Essa é uma importante molécula do sistema imunológico que funciona como uma mensageira imunológica, já que sai da célula e circula até encontrar outra célula que esteja infectada, em cuja superfície se liga a receptores que desencadeiam a sinalização para a síntese de óxido nítrico, causando uma rápida morte celular pró-inflamatória chamada de piroptose.^{114,115}

Além de ser uma estratégia de defesa natural, a resposta inata é fundamental para o desenvolvimento da resposta adquirida, principalmente, através das células apresentadoras de antígeno que por seus PRRs reconhecem os PAMPs. A interação entre PAMPs e TLRs promove o recrutamento de fagócitos para o tecido infectado, estimula macrófagos e células NK e induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF e IL-1.¹¹⁶ As interações hospedeiro-parasita durante as respostas imunes inatas determinam o destino da imunidade adaptativa, contribuindo para a cura ou persistência do parasita na leishmaniose.¹¹⁷

1.10.2 Imunidade adaptativa

A resposta imune adaptativa desenvolve estratégias de defesa específicas e é fundamental para o controle das infecções parasitárias, quando a imunidade inata não consegue eliminar o agente invasor. Os elementos principais desta resposta são as células B e T, os anticorpos, as quimiocinas e as citocinas. A resposta imune adaptativa é iniciada nos tecidos linfóides como o baço e os gânglios e é dividida em resposta humoral (produção de anticorpos) e resposta celular (células T).¹¹⁸

A resposta imune humoral envolve o reconhecimento de um agente invasor pelas células B. As células B diferenciam-se em plasmócitos que por sua vez produzem as imunoglobulinas (Ig). As imunoglobulinas dividem-se em cinco classes, IgA, IgD,

IgE, IgG e IgM e ligam-se especificamente a diferentes antígenos.^{119,120,121} A predominância de isotipos IgG1, IgG2 e IgG3 nas LC e LM estão associadas ao perfil Th1.¹¹⁹ Já, o isotipo IgG4 relaciona-se às manifestações da leishmaniose cutânea difusa, associado ao perfil Th2 da resposta imune.¹²² A resposta imune humoral em pacientes com LC é complexa e não há correlação entre maturação e mensuração de anticorpos, em termos de avidade, com a evolução da doença.¹¹⁹

A imunidade celular envolve as células T que interagem com os macrófagos infectados e com outras células do sistema imune através da produção e liberação de diferentes tipos de citocinas, que controlam a proliferação, diferenciação e função das células do sistema imune.¹²⁰ Observa-se, em protozoários intracelulares, uma forte resposta de linfócito TCD4⁺ do perfil Th1, linfócitos TCD8⁺ e substâncias citotóxicas e produção de IFN- γ , que induz a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos, potencializando a resposta inata.¹²³

A resposta imune Th1, com produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12 é associada ao controle da infecção pela ativação de macrófagos e destruição dos parasitas. Reithinger⁴ Por outro lado, as citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β , considerados do tipo 2, favorecem a multiplicação dos parasitas inibindo a produção de óxido nítrico por IFN- γ dos macrófagos ativados.^{24,124} Contudo, a resposta imune exacerbada é incapaz de controlar a doença e pode contribuir para a destruição dos tecidos.^{125,126,127,128}

A evolução clínica e a resposta ao tratamento dependem de múltiplos fatores, sendo um deles o equilíbrio entre as citocinas Th1 e Th2, que acaba influenciando no controle parasitário e na extensão da lesão. Em todas as formas clínicas da LC, a resposta imune é dependente de células T e, de maneira geral, aceita-se que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania* está relacionada com o nível de expansão de células Th1 e Th2.^{129,130}

Pacientes que contraem a forma cutânea localizada desenvolvem uma resposta do tipo Th1 a nível das lesões. As lesões mucocutâneas, que constituem uma forma crônica associada à destruição de mucosas, caracterizam-se por uma mistura de resposta Th1 e Th2, enquanto pacientes com a forma difusa exibem uma resposta quase exclusivamente do tipo Th2.^{101,131}

As células T CD4⁺, quando ativadas por antígenos via MHC de classe II, podem se diferenciar em várias linhagens de células efectoras, em T “helper” 17 (Th17), além

da referidas acima (Th1 e Th2).¹³² A linhagem Th17, expressam altos níveis de IL-17 sob o fator de transcrição ROR γ T, que está envolvido em processos¹³², que levam à cronicidade da doença.^{133,134} A diferenciação de células T em Th17 é induzida mesmo na presença de níveis baixos de TGF- β , IL-23 ou IL-6.¹³⁵

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que estimula fibroblastos, células endoteliais, neutrófilo, macrófagos e células epiteliais a produzirem mediadores pró-inflamatórios como IL-1, IL-6, TNF- α , NOS-2 e quimiocinas.^{136,137} Essa citocina tem sido associada predominantemente à patogênese de doenças inflamatórias e autoimunes^{138,139} e também associada ao recrutamento e subsequente ativação de neutrófilos durante a inflamação.¹⁴⁰

1.11 Expressão gênica

O termo expressão gênica refere-se ao processo em que a informação codificada por um determinado gene é decodificada em uma proteína. Estudos de expressão gênica são realizados utilizando-se a PCR em tempo real (qPCR), método considerado ideal e comumente empregado para validar as técnicas com maior rendimento, mas menor sensibilidade em geral, como a análise por “microarray”.¹⁴¹ A qPCR permite então quantificar transcritos e observar mudanças na expressão gênica sendo de fácil execução fornecendo resultados rápidos, precisos e confiáveis.¹⁴² Estudos mostram a aplicação dessa técnica para quantificação da expressão de RNAm de citocinas como um parâmetro para observar a ativação da resposta imune celular.¹⁴³ No entanto, poucos estudos têm analisado a expressão de RNAm, por qPCR, para citocinas na LTA humana.¹⁴⁴

A quantificação relativa é a abordagem mais amplamente adotada, na qual a quantificação da expressão gênica é normalizada em relação a um gene endógeno, pois uma correta normalização torna-se pré-requisito para a confiabilidade dos resultados e na verificação da relevância de pequenas diferenças.^{145,146,147,148}

O objetivo da normalização é controlar variáveis tais como diferentes quantidades e qualidade do material inicial; a eficiência na retrotranscrição de RNA para cDNA, minimizando eventuais variações do procedimento experimental, a fim de

identificar a real variação do gene em questão.^{149,150} Uma vez que as sequências do gene endógeno e a sequência do gene de interesse estarão presentes na amostra testada, ambos apresentarão o mesmo padrão de variação dentro do experimento, exceto em relação ao nível de expressão.¹⁵¹

1.12 Justificativa

Como já dito na introdução, a LTA é uma das doenças negligenciadas e um problema prioritário de saúde pública mundial.¹⁵² O grande número de casos relatados durante os últimos anos no Brasil e a complexidade de fatores de riscos justificam o desenvolvimento de projetos que possam favorecer as condutas clínicas e laboratoriais para as populações de risco.

O Instituto Adolfo Lutz recebe amostras clínicas para realizar o diagnóstico laboratorial da LTA para a Rede de Saúde Pública. Além dos testes tradicionais recomendados pelo Ministério da Saúde, que inclui os métodos parasitológicos e moleculares, o nosso grupo ampliou o diagnóstico fornecendo a avaliação da resposta imune celular por métodos imunohistoquímicos.¹⁵³ Baseados nestes estudos, e diante da importância das citocinas na proteção ou não do hospedeiro, pretende-se avaliar a capacidade de pacientes expressar ou não os genes de RNAm das citocinas envolvidas no controle da LTA. Os dados fornecidos neste estudo poderão fornecer subsídios para avaliar o perfil imune de pacientes infectados e conjuntamente com os exames clínicos e laboratoriais favorecerão as condutas de tratamento e seguimento clínico.

2 OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão de genes codificadores de citocinas em fragmentos obtidos por biopsias de lesões de pacientes com leishmaniose tegumentar americana e relacionar com os achados clínicos e laboratoriais.

2.1 Objetivos específicos

- a) Padronizar a extração e analisar a integridade de RNA, bem como, a síntese e concentração de cDNA em biopsias de lesões de pele frescas e fixadas em formol e parafinadas (FFPE) de pacientes com LTA;
- b) Avaliar a expressão de 6 genes endógenos (GAPDH, 18S, B2M, MT-ATP, UBC, TBP) em fragmentos obtidos por biopsia de lesões frescas e FFPE de pacientes com LTA, visando determinar o gene endógeno ideal para normalizar os ensaios de expressão gênica;
- c) Avaliar a expressão dos genes codificadores das 6 citocinas (IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-27, TGF- β e TNF- α) relacionadas às respostas Th1 e/ou Th2 em fragmentos obtidos por biopsia de lesões de pele FFPE de pacientes com LTA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Os procedimentos foram realizados após os pacientes aceitarem, aprovarem e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido. O Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz aprovou o consentimento informado por escrito dos pacientes e todo o estudo, sendo realizado de acordo com as recomendações do mesmo (CONEP-IAL número: 424.827) (Anexo 1).

3.2 Delineamento experimental

3.3 Pacientes e amostras clínicas

As amostras clínicas utilizadas neste estudo foram 50 fragmentos de lesões cutâneas parafinadas e 17 fragmentos de lesões frescas, provenientes de pacientes com suspeita clínica de LTA que vivem em regiões endêmicas nas proximidades de Sorocaba. Os fragmentos foram coletados e encaminhados para o laboratório por médicos dermatologistas de Centros de Saúde para a realização do diagnóstico molecular e histopatológico. O local das lesões foi limpo com antissépticos e administrado anestésico local. A seguir, as bordas das lesões foram retiradas com auxílio de um “*punch*” dermatológico, imediatamente divididas em 2 pedaços. Uma parte dos fragmentos foi colocada em um tubo contendo 1-2 mL de NaCl 0.85% estéril, 200 µg/mL de gentamicina para a utilização na cPCR. A segunda foi fixada em formol para o exame histopatológico. A seguir, as amostras foram encaminhadas para o laboratório dentro de 48 horas. Pacientes tratados com fármacos para LTA foram excluídos do estudo.

Todos os participantes deste estudo foram avaliados por fichas clínico-epidemiológicas. Os itens avaliados foram: faixa etária, gênero, tempo de lesão, local da lesão, diagnósticos clínico e laboratorial (parasitológico, molecular, imunohistoquímico e histopatológico).

3.3.1 Fragmentos de lesões cutâneas frescas

Foram utilizados 9 fragmentos de lesões cutâneas frescas mantidos em 300 µL de RNA-later para as padronizações de extração de RNA e escolha do gene endógeno ideal para uso na qPCR. Estes fragmentos foram encaminhadas pra o laboratório para a realização do diagnóstico de LTA (imunohistoquímica, histopatológico e PCR). Como a extração de RNA de biopsias frescas exige um rápido processamento na coleta e transporte, incluindo a manutenção da biopsia em RNA-later, optamos em fazer os experimentos de expressão de citocinas somente com biopsias FFPE.

3.3.2 Fragmentos de lesões cutâneas FFPE

Foram utilizados 50 fragmentos FFPE obtidos por biopsia de lesões positivas na cPCR e/ou histopatológico/imunohistoquímica para *L. (V.) braziliensis*. Nestas amostras foram realizadas as padronizações de extração de RNA, escolha do gene endógeno ideal para uso na qPCR, quantificação de cDNA, integridade de RNA e expressão das citocinas.

Das 50 amostras, 40 foram provenientes de pacientes com LC e 10, de pacientes com LM.

3.3.3 Fragmentos de lesões de mucosa FFPE

Para o controle da evolução da infecção, foram utilizados 10 fragmentos obtidos por biópsias FFPE de pacientes com diagnóstico clínico de leishmaniose mucocutânea (LM). Estas biópsias foram coletadas de pacientes atendidos no Instituto de Infecologia Emilio Ribas, São Paulo, Brasil.

3.3.4 Fragmentos de pele de indivíduos sem lesão

Para o grupo controle negativo foram utilizados 5 fragmentos de pele FFPE provenientes de indivíduos sem lesão. Estas biópsias foram coletadas de mulheres que realizaram cirurgia de mamoplastia. Nessas amostras foram realizadas a expressão dos genes codificadores das 6 citocinas.

3.4 Diagnóstico laboratorial

3.4.1 Histológico e imunohistoquímico

As reações de imunohistoquímica e histopatológicas foram realizadas pelos pesquisadores do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz e que são colaboradores dessa dissertação, conforme descrito previamente.¹⁵³ Os fragmentos de lesões cutâneas foram fixados e emblocados em parafina e seccionados em cortes transversais, em micrótomo (3 mm de espessura) e colocados em lâminas. Para as reações, as secções foram desparafinadas em xileno e a reidratação dos tecidos em banhos com concentrações decrescentes de etanol e em água destilada, e, em seguida, submetidas a procedimento de recuperação de antígeno em tampão de citrato 10 mM, pH 6.0, sob pressão durante 3 minutos. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi feito com o tratamento com solução de peróxido de hidrogênio 6% (três banhos de 10 minutos). Para a detecção de *Leishmania* spp., as secções foram imediatamente incubadas com um anticorpo policlonal de camundongo anti-*Leishmania*. Adicionalmente, duas amostras de cada lâmina foram coradas com hematoxilina-eosina. As análises microscópicas foram realizadas em aumento de 1000x.

3.4.2 Diagnóstico molecular

As extrações de DNA dos fragmentos de lesões frescas obtido por biopsia e de cepa referência (MHOM/BR/1975/M2903) de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (controle positivo) foram realizadas pelo kit comercial QIAmp DNA mini Kit (QIAGEN®), de acordo com as instruções do fabricante.⁸⁵ Os fragmentos de lesões cutâneas FFPE foram previamente tratadas com xilol para a retirada da parafina. Os fragmentos foram colocados em tubos com 1 mL de xilol, agitados em vortex por 10 segundos e centrifugados a 13.000 g por 2 minutos. Os sobrenadantes foram removidos e os tubos contendo os sedimentos foram abertos e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos para que os resíduos de xilol evaporassem completamente.¹⁵⁴ Os

precipitados foram utilizados para a extração de DNA com o Kit extração de DNA QIAamp® DNA FFPE Tissue (QIAGEN®) conforme as instruções do fabricante.

Antes das extrações, os fragmentos de lesões cutâneas frescas, fixados e as promastigotas foram macerados e dissolvidos em tampão de lise (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 10mM; SDS 0,5%; N-laurilsarcozil 0,01%; proteinase K 100mg/mL) e incubados em banho-maria a 56°C de uma a quatro horas, até a digestão completa dos tecidos.

A seguir, as amostras de DNA foram quantificadas pelo espectrofotômetro Nanodrop modelo ND100 (Thermo Fischer Scientific®). As concentrações de DNA foram determinadas pelas leituras realizadas a 260 nm. A pureza das moléculas de DNA foi avaliada utilizando-se a razão de absorbância da amostra entre 260/280 nm e 260/230 nm. A proporção de 1.8 foi interpretada como DNA livre de impurezas. A seguir foram estocadas a -20°C até o momento de serem utilizadas.

As amplificações cPCR foram realizadas utilizando um kit comercial (Gotaq®green Master Mix - Promega). Cada 12,5 µL do “mix” contém uma unidade de Taq DNA polimerase em Tris-HCl 10mM, pH 8.5; KCl 50mM; MgCl₂ 1.5 mM e 200 mM de cada um dos desoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Cada reação foi realizada adicionando-se 5 µL do DNA das amostras clínicas e 1 µL de cada iniciador a 25 pmol totalizando um volume final de 25 µL. Para as amplificações foi utilizado o termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®). Em cada reação foram incluídos dois controles negativos, sendo um somente água ultrapura, que substituiu o DNA, e o outro DNA extraído de uma amostra sabidamente negativa para *Leishmania* spp. O controle positivo foi constituído de DNA extraído de promastigotas da cepa padrão de *L. (V.) braziliensis* mantidos em culturas axênicas. *L. (V.) braziliensis* foi detectada utilizando-se o marcador molecular LB-3C/LU-5A

5'CGTCGCCGAACCCCGTGTC3'/5'TTTATTGGTATGCGAAACTTC3') que amplifica um fragmento de 146-149 pb¹⁵⁵ utilizando-se protocolo de amplificação de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de uma segunda etapa composta de desnaturação (95°C por 45 segundos), anelamento (57.8°C por 45 segundos) e extensão (72°C por 45 segundos) repetida por 35 ciclos. A terceira e última etapa constituiu um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos. Para verificar

a integridade do DNA extraído das amostras foi realizada PCR utilizando o marcador molecular $\beta 1$ - $\beta 2$ (5'ACCACCAACTTCATCCACGTTTACC3'/5'CTTCTGACACAACTGTGTTCCTAGC3')¹⁵⁶ que amplifica um fragmento de 140 pb do gene β -globulina humana. Essas reações foram realizadas simultaneamente e com as mesmas condições do protocolo do marcador LB-3C/LU-5A.

Os produtos amplificados foram avaliados em gel de agarose 2% em TBE (Tris-Borato 0.045M; EDTA 0.001M) com 2 μ L brometo de etídio na concentração de 0,5ug/ml e separados por um sistema de eletroforese horizontal em cuba contendo o mesmo tampão. Os géis foram visualizados e fotografados por iluminação UV no transluminador (Mini Bis Pro, versão 4.5.3). Os tamanhos dos fragmentos foram comparados com o padrão de peso molecular de 100 pb utilizado no gel juntamente com as amostras.

3.4.3 Diagnóstico parasitológico

As amostras foram fixadas com metanol e coradas por *Giemsa*. As leituras foram realizadas no Instituto Adolfo Lutz de Sorocaba, pela Dra. Aparecida Helena Gomes, em microscopia óptica (1000x).^{28,86,87}

3.5 Padronização da extração de RNA de fragmento de lesão cutânea fresca e FFPE de pacientes com LTA

3.5.1 Protocolo 1: Extração de RNA de fragmento de lesão cutânea fresca sem Proteinase K

Para a padronização da extração de DNA em fragmentos de lesões cutâneas frescas, foram utilizadas 9 biopsias coletadas e preservadas em 300 μ L da solução RNA later (Ambion). Antes da extração, a solução de RNA later foi removida de cada amostra pela centrifugação por 5 minutos a 13.000 g. As extrações de RNA foram

realizadas com o kit RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA). Inicialmente os fragmentos de pele foram embebidos em 350 µL de tampão de lise RLT e agitadas no TissueLyser (QIAGEN) por 5 minutos à velocidade máxima (50 Hz). Após centrifugação por 3 minutos a 13.000 g, o sobrenadante foi coletado num novo tubo de 1,5 ml e o sedimento desprezado. Foram adicionados 350 µL etanol 70%. A seguir, foram transferidos 700 µL da amostra para uma coluna de centrifugação Rneasy, centrifugou-se por 15 s a 9.000 g e descartou-se o filtrado. Foram adicionados 700 µL do Buffer RW1 na coluna e centrifugado por 15 segundos a 9.000 g. Foram adicionados 500 µL do Buffer RPE na coluna e centrifugado por mais 15 segundos a 9.000 g. Adicionaram-se 500 µL de buffer RPE para a coluna e centrifugou-se por 2 minutos a 9.000 g. A mostra foi centrifugada por 1 minuto a 13.000 g. As moléculas de RNA foram eluídas em 30 µL de água DEPC. Para evitar possíveis contaminações com DNA genômico as amostras foram tratadas com DNase (Ambion) adicionando 3 µL de 10x Turbo DNase Buffer, 0,5 µL do Turbo DNase e misturado gentilmente. As amostras foram incubadas a 37°C por 20 minutos. A seguir foram adicionados 3 µL do Reagente de Inativação da DNase. Após agitação, as amostras foram incubadas por 2 minutos a temperatura ambiente. Por fim, as amostras de RNA foram centrifugadas a 9.000 g por 1,5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e armazenado a -70°C.

3.5.2 Protocolo 2: Extração de RNA de fragmento de lesão cutânea fresca com Proteinase K

O procedimento foi realizado exatamente como no protocolo descrito acima. A diferença é que foram incluídos ao tampão RLT, 10 µL de proteinase K (20mg/mL). Nesta etapa as amostras foram agitadas em TissueLyser e incubadas por 18 horas a 56°C e a 80°C por 15 minutos.

3.5.3 Protocolo 3: Extração de RNA de fragmento de lesão cutânea FFPE com Proteinase K

As extrações de RNA total de 10 fragmentos de lesões de pele FFPE foram realizadas pelo kit RNeasy FFPE (Qiagen, Valencia, CA). Previamente os fragmentos foram cortados com espessura de 8 µm com auxílio de micrótomo histológico e a cada troca de amostra, o mesmo foi limpo. Os tecidos foram tratados com 1 mL de xilol por 2 vezes para a desparafinação. A retirada do xilol foi realizada pela centrifugação a 13.000 g por 1 minuto e os sobrenadantes descartados. A seguir cada sedimento foi ressuspenso em 500 µL de etanol 100% e centrifugado a 13.000 g por 2 minutos para remoção do etanol. As amostras, então, foram colocadas num dessecador (speedvac) por 6 minutos. Após a adição de 240 µL de tampão PKD e 20 µL de proteinase K as amostras foram agitadas no TissueLyser por 5 minutos à velocidade máxima (50 Hz), incubadas a 56°C por 18 horas ou até a lise completa do tecido. A seguir foram incubadas a 80°C por 15 minutos e resfriadas rapidamente em banho de gelo por 2 minutos. Após a centrifugação a 13.000 g por 15 minutos, adicionaram-se 250 µL do tampão RBC e 720 µL de etanol 100%. Transferiram-se 600 µL de cada amostra para uma coluna de centrifugação Rneasy. Estas foram centrifugadas por 1 minuto a 13.000 g e os filtrados foram descartados (por duas vezes). A seguir, as colunas de centrifugação Rneasy receberam 250 µL de tampão RPE e foram centrifugadas por 1 minuto a 9.000 g. O procedimento foi repetido, mas com um ciclo de centrifugação por 5 minutos. A seguir, as colunas foram centrifugadas com a tampa aberta a 13.000 g por 1 minuto para secarem e transferidas para outros tubos de 1,5 ml para que as moléculas de RNA fossem eluídas com a adição de 30 µL de água DEPC. Para evitar possíveis contaminações com DNA genômico as amostras foram tratadas com DNase (Ambion) adicionando 3 µL do 10 x Turbo DNase Buffer, 0,5 µL do Turbo DNase e misturado gentilmente. As amostras foram incubadas a 37°C por 20 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 3 µL do Reagente de Inativação da DNase. E as amostras foram incubadas por 2 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, após centrifugação a 10.000 g por 90 segundos, as amostras contendo RNA (sobrenadante) foram transferidas para um novo tubo e armazenadas a -70°C.

3.6 Concentração de RNA total

O rendimento das extrações foi avaliado pela quantificação do RNA total no equipamento fluorímetro Quantus™ Fluorometer (Promega), padrão “*high standard*”. Primeiramente foi diluído o tampão TE 20x em 1x, onde foi adicionado 100 µL de tampão TE 20x e 1900 µL de água nuclease *free*. O Dye foi preparado com 199 µL do TE diluído mais 1 µL do Dye concentrado. A reação para a dosagem foi preparada num tubo não leitoso de 0,5 ml com 100 µL do Dye diluído, 98 µL do tampão TE 1x e 2 µL do RNA extraído. As amostras foram passadas no vórtex por 5 segundos e a leitura da quantificação foi realizada.

3.7 Análise da integridade de RNA total extraído de fragmento de lesão FFPE e frescas

Para a determinação do chip a ser utilizado no Bioanalyzer, as concentrações e a pureza do RNA extraído foram avaliadas no NanoDrop (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE).

A qualidade do RNA foi analisada no Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) por eletroforese capilar, utilizando o kit RNA 6000 PICO Agilent LabChip® conforme as instruções do fabricante. Quando as amostras estavam muito concentradas foi necessário diluí-las de acordo com a faixa de trabalho do kit de 500 – 5000 pg/µL. A integridade do RNA é expressa em número de integridade de RNA (RIN- *RNA Integrity Number*), que variada de 1 a 10, onde o 1 representa um alto grau de degradação e um RIN de 10, representa RNA íntegro.¹⁵⁷

3.8 Padronização da síntese e concentração do cDNA para uso na qPCR

As fitas de DNA complementar (cDNA) foram sintetizadas a partir de 100 ng/µL de RNA total utilizando o Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kits (Life Technologies) conforme as instruções do fabricante. A cada 10 µL da amostra de RNA

à concentração de 100 ng/μL foram adicionados 10 μL do mix do fabricante. As condições de ciclagem foram: Etapa 1: 25°C por 10 minutos; Etapa 2: 37°C por 120 minutos; Etapa 3: 85°C por 5 minutos.

A concentração ideal de RNA utilizada na síntese de cDNA foi previamente padronizada testando-se quatro concentrações (em duplicata) 25; 50; 100 e 200 ng/μL de RNA total.

3.9 Padronização da estabilidade de expressão dos genes endógenos

Para determinar o gene endógeno ideal a ser utilizado como “normalizador” nos ensaios de expressão gênica de citocinas foram utilizadas 17 amostras de RNA extraídas dos pacientes, sendo 8 biopsias FFPE positivas para LTA e 9 biopsias frescas.

Como não há um gene endógeno universal para todos os tipos celulares, foi avaliado a expressão de 6 genes constitutivos: GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase), 18S (subunidade do RNA ribossomal), B2M (beta-2 microglobulina), MT-ATP (ATP mitocondrial), UBC (Ubiquitina C), TBP (TATA Box Binding Protein). As características dos genes e marcadores moleculares estão descritas na Tabela 1.

Após a síntese de cDNA, a expressão dos genes endógenos foi determinada (em triplicata) por qPCR em ensaio customizado e produzido pela Applied Biosystems®. O mix de amplificação de qPCR continha 10 μL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix e 1 μL TaqMan® Gene Expression Assays (ambos Applied Biosystems) para os genes descritos na tabela 1. O cDNA (4 μL) e 5 μL de água livre de RNase foram adicionados ao máster mix totalizando num volume final de 20 μL. As amostras foram amplificadas e detectadas usando um sistema de PCR em tempo real StepOne™ (Applied Biosystems) usando a seguinte ciclagem: 2 min, 50 ° C e 95 ° C durante 10 min, seguido de 40 ciclos realizados a 95 ° C durante 15 s e 60 ° C durante 1 min.

Tabela 1 - Genes endógenos humanos utilizados para a análises de expressão gênica

<i>Gene</i>	<i>Nome do gene</i>	<i>Número de acesso</i>	<i>Função biológica</i>	<i>Ensaio ID^a</i>	<i>Tamanho do produto</i>
18S rRNA	Subunidade do RNA ribossomal	[GenBank: X03205.1]	Formação do ribossomo	Hs99999901_s1	187
GAPDH	Gliceraldeído-3-fostato-desidrogenase	[RefSeq: NM002046.4]	Envolvido na glicólise	Hs02758991_g1	93
TBP	TATA box-binding protein	[RefSeq: NM003194.3]	Fator de transcrição	Hs00427620_m1	91
B2M	Beta-2-microglobulina	[RefSeq: NM004048.2]	Ligação de proteína	Hs00984230_m1	81
UBC	Ubiquitina C	[RefSeq: NM021009.5]	Envolvido na degradação de proteínas	Hs00824723_m1	71
MT-ATP6	ATP mitocondrial	[GenBank: NC_012920.ATP6.0]	Participação na fosforilação oxidativa	Hs02596862_g1	150

Fonte: Adaptado de Meira-Strejevitch et al. 2017.¹⁵⁸

3.10 Análise da expressão dos genes codificadores das citocinas

Para a análise da expressão dos genes codificadores das citocinas foram utilizados os marcadores moleculares descritos na Tabela 2. Foram analisados 50 fragmentos FFPE de lesão.

A expressão relativa de IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-27, TGF- β e TNF- α foi determinada (em duplicata) por qPCR em ensaio customizado e produzido pela Applied Biosystems ®. Os controles utilizados foram o gene endógeno e 5 amostras negativas para LTA.

3.11 Análise dos dados

3.11.1 Estabilidade de expressão dos genes endógenos

Os resultados gerados na qPCR foram analisados no programa geNorm (versão 3.5, <http://genorm.cmgg.be>) que permite a comparação aos pares da expressão dos genes testados e pelo programa NormFinder (versão 0.953) acessado em <http://moma.Dk/normfinder-software> para confirmar os dados.

Para ambos os programas, os valores de C_T foram transformados em dados de quantificação relativa usando o "método delta C_T ". Para cada gene medido, o valor de C_T mais elevado foi subtraído dos demais valores de C_T . Em seguida, em cada ponto de dados foi aplicada a equação $2^{(-\Delta C_T)}$ e, com o resultado, plotado no programa geNorm e NormFinder. Para determinar a estabilidade de expressão dos genes endógenos estudados foi feita a comparação aos pares da expressão dos genes testados pelo programa geNorm. Desta forma, um índice M foi gerado para cada gene e este índice foi utilizado para a determinação do gene que apresenta expressão mais estável. O programa geNorm recomenda índice M abaixo do limite de 1.5 e quanto menor o índice M, mais estável é a expressão do gene.¹⁴⁵ Para confirmar os dados obtidos no geNorm, foi utilizado o algoritmo NormFinder, que avalia a variação de expressão de cada gene de referência, levando em consideração as variações intra e intergrupais ao

apontar o gene de referência mais estável. O menor valor de estabilidade, representa uma menor variação, sendo o gene mais estável.¹⁵⁹

3.11.2 Expressão dos genes codificadores das citocinas

A quantificação da expressão gênica das citocinas foi avaliada pelo método do “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), segundo Livak e Schmittgen (2001)¹⁶⁰, usando o gene de referência GAPDH para normalização dos dados. Os resultados foram descritos como quantificação relativa (RQ), ou seja, esse método expressa o número de vezes que determinado gene está mais ou menos expresso no grupo de estudo em relação ao calibrador. O calibrador para os cálculos de expressão de mRNA foi o grupo controle, pacientes soronegativos e sem lesão de LTA (grupo IV). Os valores de expressão deste grupo pelo método “C_T comparativo” assumem o valor de 1.0. Os resultados foram expressos em médias de RQ.

3.11.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA). A comparação da expressão entre grupos de pacientes com leishmaniose foi determinada por Teste t não pareado e teste F para comparação de variâncias, pela análise da variância unidirecional. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Tabela 2 - Genes codificadores de citocinas para a análise da expressão gênica de amostras clínicas de pacientes com LTA e LM.

<i>Gene</i>	<i>Nome do gene</i>	<i>Número de acesso</i>	<i>Função biológica</i>	<i>Ensaio ID^a</i>	<i>Tamanho do produto</i>	<i>Localização no cromossomo</i>
IFN- γ	Gamma Interferon	[GenBank: AB451324.1]	Codificação de proteína	Hs00989291_m1	73	12
IL-10	Interleucina 10	[GenBank: AF043333.1]	Codificação de proteína	Hs00961622_m1	74	1
IL-6	Interleucina 6	[GenBank: A09363.1]	Codificação de proteína	Hs00985639_m1	66	7
IL-27	Interleucina 27	[GenBank: AY099296.1]	Codificação de proteína	Hs00377366_m1	75	16
TGF- β	Fator de Crescimento Transformação Beta	[GenBank: AI304490.1]	Codificação de proteína	Hs00998133_m1	57	19
TNF	Fator de Necrose Tumoral	[GenBank: AK314960.1]	Codificação de proteína	Hs01113624_g1	143	6

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da população de estudo

4.1.1 Pacientes com LTA

De acordo com os parâmetros clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, todos os pacientes foram diagnosticados com LTA. Dos exames laboratoriais realizados, pelo menos dois foram positivos. Nesse estudo, os 40 pacientes apresentavam cPCR positiva para *L. (V.) braziliensis* (Figura 8).

O diagnóstico parasitológico foi realizado em 35 sendo positivo em 71.42% dos casos (25/35).

O diagnóstico histopatológico foi realizado em 37 dos 40 pacientes, sendo positiva em 70.27% dos casos (26/37). Os resultados incluíram a presença do parasita e/ou foram observadas alterações histológicas como infiltrado celular histiolinfoplasmocitário, geralmente acompanhado por reação granulomatosa, que comprometeu o derma ou o córion da mucosa. Também foram presentes células em porções variáveis como mastócitos e eosinófilos. Resultados inconclusivos foram vistos em 8% dos casos (3/37); 21.63% foram negativos (8/37) e (3/37) material inadequado para a análise.

A imuno-histoquímica foi realizada em 34 dos 40 pacientes. Com a marcação do anticorpo policlonal anti-*Leishmania* spp. foram observadas a distribuição de células inflamatórias em 64.70% dos casos (22/34); 23.52% foram negativos (8/34); e 11.76% dos casos foram inconclusivos (4/34) (Figura 9).

Figura 8 – Um exemplo de uma reação positiva na cPCR para amplificação de produtos de PCR de *L. (V.) braziliensis* em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. O resultado positivo é visto na coluna 2, produto de 146/149pb amplificado pelo marcador molecular LB-3C/LU-5A. Coluna 1, Marcador molecular de 100 pb.

Figura 9 - Características histopatológicas de biopsias de LTA. As amastigotas de *Leishmania* spp. (setas) são realçadas por coloração com Hematoxilina-Eosina com um anticorpo policlonal de camundongo anti-*Leishmania* spp. Ampliação original: X 100. Barra de escala: 10 μ m.

Dos 40 pacientes com LTA (Tabela 3) que obedeceram aos critérios de inclusão, 21 pacientes foram do sexo masculino (52,5%) e 19 do sexo feminino (47,5%). A faixa etária variou de 3 a 79 anos com uma média de 39.7 anos.

Quanto as procedências foram provenientes tanto da área urbana quanto da área rural dos municípios de Itaóca (n =14), de Sorocaba (n =13), de Ribeira (n = 06), de Capela do Alto (n = 01), de Riversul (n= 01), de Piedade (n=01), de Porto Feliz (n=01), de Guareí (n=01), Itapetininga (n=01) e de Iperó (n=01), que fazem parte da região de Sorocaba.

4.1.2 Pacientes com LM

As amostras dos 10 pacientes com diagnóstico clínico de LM foram provenientes do Ambulatório de Doenças Tropicais Negligenciadas do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, fornecidas pelo Dr. José Ângelo Lauletta Lindoso. Todos tiveram diagnóstico clínico de leishmaniose mucocutânea e cPCR positivas para *L. (V.) braziliensis*. Dos 10 pacientes, 4 foram do sexo masculino e 6 do sexo feminino e as idades variaram de 17 a 75 anos.

Tabela 3 - Características clínicas, laboratoriais e epidemiológica dos 40 pacientes com LTA.

<i>Característica dos pacientes</i>		<i>N=40</i>
<i>Duração da lesão (em meses)</i>	<i>1 -3</i>	17
	<i>4-24</i>	3
	<i>NI</i>	20
<i>Gênero</i>	<i>Masculino</i>	21
	<i>Feminino</i>	19
<i>Idade (anos)</i>	<i>≤ 15</i>	06
	<i>15-34</i>	09
	<i>35-54</i>	19
	<i>55-64</i>	04
	<i>≥65</i>	02
<i>Lesão</i>	<i>Pernas / pés</i>	12
	<i>Braços / mãos</i>	07
	<i>Peito</i>	03
	<i>Cabeça</i>	02
	<i>Múltiplas lesões</i>	04
	<i>NI</i>	12
<i>Parasitológico</i>	<i>Positivo</i>	25
	<i>Negativo</i>	10
	<i>NR</i>	5
<i>Imuno-histoquímica</i>	<i>Positivo</i>	22
	<i>Negativo</i>	08
	<i>RI</i>	04
	<i>NR</i>	06
<i>cPCR L. (V.) braziliensis</i>	<i>Positivo</i>	40
	<i>Negativo</i>	0

NI- Não informado; RI- Resultado inconclusivo; NR- Não realizado

4.2 Quantificação de RNA total

Como mostra a Tabela 4, nos fragmentos de lesões frescas (biopsias frescas), as médias de quantificação foram de 76.3 (49.9 a 101 ng/μL) (sem proteinase K) e de 145.83 (53.5 a 261 ng/μL) (com proteinase K). Nos fragmentos de lesões FFPE (biopsias FFPE), as médias de quantificação foram de 64.19 (25.8 a 197 ng/μL). Portanto, o protocolo utilizando a proteinase K foi mais efetivo. Assim, todas as extrações de RNA foram feitas incluindo a proteinase K.

Tabela 4 – Dados de quantificação de extração de RNA de fragmentos de lesões cutâneas obtidos por biopsia (frescas e FFPE).

Protocolo	Quantificação de RNA (ng/μL)*			
	Biopsias frescas (N=9)	Média	Biopsias FFPE (N=10)	Média
Sem proteinase K	49.9 – 101	76.3	NR	NR
Com proteinase K	53.5 – 261	145.83	25.8 – 197	64.19

*Realizadas no fluorímetro Quantus™ Fluorometer (Promega), NR: Não realizado

4.3 Análise da integridade do RNA extraído de biopsias FFPE

4.3.1 Quantificação e qualidade do RNA total

Foram extraídos 50 fragmentos de lesão cutânea FFPE (40 de pacientes com LTA e 10 de pacientes com LM) e 5 amostras de pele FFPE de indivíduos normais. As concentrações de RNA determinadas pelo NanoDrop variaram de 28.8 a 459 ng/μL e a relação de D.O. 260/280 foi de 1.71 a 1.99. Os RIN(s) determinados no Agilent 2100 Bioanalyzer variaram de 2.1 a 5.1, com média de 4.91. A Figura 10 mostra a quantificação de duas amostras de RNA com RIN(s) de 2.1 (A) e 5.1 (B).

A

Overall Results for sample 6 : Sample 6

RNA Area:	1,872.1	RNA Integrity Number (RIN):	2.1 (B.02.08)
RNA Concentration:	4,965 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0.9	Result Flagging Label:	RIN: 2.10

Fragment table for sample 6 : Sample 6

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.95	41.45	0.4	0.0
28S	49.25	49.83	0.4	0.0

B

Overall Results for sample 11 : Sample 11

RNA Area:	3,298.6	RNA Integrity Number (RIN):	5.1 (B.02.08)
RNA Concentration:	8,748 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0.0	Result Flagging Label:	RIN: 5.10

Fragment table for sample 11 : Sample 11

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	43.59	45.13	501.8	15.2
28S	50.03	51.18	2.8	0.1

Figura 10 – Representação gráfica do programa Agilent 2100 Bioanalyzer de uma amostra de RNA com RIN de 2.1 (A) e outra de 5.1 (B).

4.3.2 Padronização da síntese e concentração do cDNA para uso na qPCR

Como mostra a Figura 11 todas as concentrações (Tabela 5) foram suficientes para ocorrer as amplificações na qPCR. Os *Cycle threshold* (C_T) comparativos mostram que as concentrações de 100 ng/ μ L e 200 ng/ μ L variaram apenas 0.4 C_T , portanto a de menor concentração foi escolhida por utilizar menos RNA para a reação.

Figura 11 - Padronização da concentração de RNA total para a síntese de cDNA.

Tabela 5 – Valores de C_T das concentrações testadas para a padronização da síntese do cDNA.

	Concentração de cDNA ng/ μ l			
	25	50	100	200
C_T	30,86	30,09	29,58	29,18

4.4 Padronização e análise dos níveis de expressão de 6 genes endógenos em biopsias frescas e FFPE de pacientes com LTA.

4.4.1 Genes endógenos em biópsia fresca

A Figura 12 mostra os resultados do índice M dos 9 fragmentos de lesões frescas para: GAPDH, 0.155; B2M, 0.172; UBC, 0.126; TBP, 0.119; MT-ATP, 0.178. Os resultados mostraram que em todas as amostras o gene endógeno ideal foi o TBP por ser mais estável e menos variável. O gene MT-ATP foi altamente variável, não sendo um bom candidato a normalizador e não houve amplificação do gene 18S.

Figura 12 - Análise dos níveis de expressão dos genes endógenos de fragmento de lesões fresca de pacientes com LTA. Média de estabilidade de expressão (Índice M) dos genes testados, sendo mais estável o gene quanto menor o valor de M, utilizando o geNorm.

4.4.2 Genes endógenos em biopsia FFPE

A Figura 13 mostra os resultados do índice M dos genes endógenos de 8 fragmentos de lesões FFPE de LTA para: GAPDH, 0.058; B2M, 0.075; UBC, 0.076; 18S, 0.089.

Estes dados mostraram que em todas as amostras o gene endógeno ideal foi o GAPDH por ser mais estável e menos variável. O gene 18S foi altamente variável, não sendo um bom candidato a normalizador e não houve amplificação para os genes TBP e MT-ATP.

Figura 13 - Análise dos níveis de expressão dos genes endógenos de fragmento de lesões cutâneas FFPE de pacientes com LTA. Média de estabilidade de expressão (Índice M) dos genes testados, sendo mais estável o gene quanto menor o valor de M, utilizando o geNorm.

4.5 Análise da expressão de genes codificadores de citocinas relacionadas às respostas Th1 e Th2 (IFN- γ , IL-10, IL-6, TGF- β , IL-27 e TNF- α) em amostras FFPE de pacientes com LTA.

Os valores da expressão do gene GAPDH foram utilizados no estudo da expressão de genes codificadores de citocinas nos fragmentos de lesões cutâneas dos pacientes com LTA e LM.

Diante dos resultados da expressão de mRNA para INF- γ , que foram bem distintos, os 40 pacientes com LTA foram divididos em dois Grupos. O primeiro (Grupo I) foi constituído de 35 pacientes com expressão relativa de INF- γ abaixo de 100. O segundo (Grupo II) foi constituído de 5 pacientes com expressão relativa de INF- γ acima de 100. Os 10 pacientes com LM constituíram o Grupo III e as amostras de pele dos 5 indivíduos normais constituíram o Grupo IV.

As figuras 14 a 19 mostram a expressão de mRNA para as citocinas INF- γ , IL-6, IL-27, TGF- β , IL-10 e TNF- α , respectivamente de fragmentos de lesão obtidos por biopsia em FFPE dos pacientes dos Grupos I, II e III após normalização com o gene endógeno de referência GAPDH.

A Figura 14 mostra os níveis de expressão RNAm para INF- γ , que foram 33,34; 214,1 e 129,6 vezes maior do que os controles negativos para os grupos I, II e III, respectivamente. As diferenças entre o Grupo I e os demais (grupo II e III) foram estatisticamente significativo em $p < 0.0001$.

Figura 14 - Expressão relativa de IFN- γ dos fragmentos de lesão obtidos por biopsia (em FFPE) de pacientes com LTA, Grupos I (vermelho) e II (azul); com LM, Grupo III (verde); e controles negativo, Grupo IV (lilas). Após o isolamento de RNA e síntese de cDNA, a expressão gênica de IFN- γ foi determinada por qPCR. Os resultados foram expressos em RQ após o cálculo determinado por “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), descrito no item 3.11.2 de Material e Métodos. As linhas horizontais indicam as médias. Comparação de expressão entre grupos dos pacientes com leishmaniose foi determinado por teste t não pareado com base em um valor crítico de $p \leq 0,05$ e teste F para comparar variâncias, por a análise da variância unidirecional. As diferenças significativas entre os grupos são mostradas em linhas horizontais.

A Figura 15 mostra os níveis de expressão mRNA codificador de IL-6, que foram 5,92, 5,69 e 2,09 vezes maior do que os controles normais para os Grupos I, II e III, respectivamente. Contudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos de pacientes estudados.

Figura 15- Expressão relativa de IL-6 dos fragmentos de lesão obtidos por biopsia (em FFPE) de pacientes com LTA, Grupos I (vermelho) e II (azul); com LM, Grupo III (verde); e controles negativo, Grupo IV (lilas). Após o isolamento de RNA e síntese de cDNA, a expressão gênica de IFN- γ foi determinada por qPCR. Os resultados foram expressos em RQ após o cálculo determinado por “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), descrito no item 3.11.2 de Material e Métodos. As linhas horizontais indicam as médias. Comparação de expressão entre grupos dos pacientes com leishmaniose foi determinado por teste t não pareado com base em um valor crítico de $p \leq 0,05$ e teste F para comparar variâncias, por a análise da variância unidirecional. As diferenças significativas entre os grupos são mostradas em linhas horizontais.

A Figura 16 mostra os níveis de expressão do gene codificador de IL-27, que foram 15,81, 85,29 e 17,29 vezes maior do que os normais nos Grupos I, II e III, respectivamente. As diferenças entre os grupos I, II e III foram estatisticamente significantes ($p < 0,0001$).

Figura 16 - Expressão relativa de IL-27 dos fragmentos de lesão obtidos por biopsia (em FFPE) de pacientes com LTA, Grupos I (vermelho) e II (azul); com LM, Grupo III (verde); e controles negativo, Grupo IV (lilas). Após o isolamento de RNA e síntese de cDNA, a expressão gênica de IFN- γ foi determinada por qPCR. Os resultados foram expressos em RQ após o cálculo determinado por “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), descrito no item 3.11.2 de Material e Métodos. As linhas horizontais indicam as médias. Comparação de expressão entre grupos dos pacientes com leishmaniose foi determinado por teste t não pareado com base em um valor crítico de $p \leq 0,05$ e teste F para comparar variâncias, por a análise da variância unidirecional. As diferenças significativas entre os grupos são mostradas em linhas horizontais.

Os níveis de expressão de mRNA de IL-10 foram 5,14; 11,54 e 2,51 vezes maior do que os negativos nos grupos I, II e III, respectivamente (Figura 18). As diferenças entre os resultados entre os Grupos I, II e III foram estatisticamente significantes ($p < 0,0001$).

Figura 18 - Expressão relativa de IL-10 dos fragmentos de lesão obtidos por biópsia (em FFPE) de pacientes com LTA, Grupos I (vermelho) e II (azul); com LM, Grupo III (verde); e controles negativo, Grupo IV (lilas). Após o isolamento de RNA e síntese de cDNA, a expressão gênica de IFN- γ foi determinada por qPCR. Os resultados foram expressos em RQ após o cálculo determinado por “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), descrito no item 3.11.2 de Material e Métodos. As linhas horizontais indicam as médias. Comparação de expressão entre grupos dos pacientes com leishmaniose foi determinado por teste t não pareado com base em um valor crítico de $p \leq 0,05$ e teste F para comparar variâncias, por a análise da variância unidirecional. As diferenças significativas entre os grupos são mostradas em linhas horizontais.

Os níveis do gene codificador do TNF- α foram de 11,22; 2,37 e 4,59 vezes maior do que os negativos nos grupos I, II e III, respectivamente (Figura 19). As diferenças entre os resultados do grupo I, dos grupos II e III foram estatisticamente significativas em $p < 0,0001$ e $p = 0,0005$, respectivamente.

Figura 19 – Expressão relativa de TNF- α dos fragmentos de lesão obtidos por biopsia (em FFPE) de pacientes com LTA, Grupos I (vermelho) e II (azul); com LM, Grupo III (verde); e controles negativo, Grupo IV (lilas). Após o isolamento de RNA e síntese de cDNA, a expressão gênica de IFN- γ foi determinada por qPCR. Os resultados foram expressos em RQ após o cálculo determinado por “C_T comparativo” ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), descrito no item 3.11.2 de Material e Métodos. As linhas horizontais indicam as médias. Comparação de expressão entre grupos dos pacientes com leishmaniose foi determinado por teste t não pareado com base em um valor crítico de $p \leq 0,05$ e teste F para comparar variâncias, por a análise da variância unidirecional. As diferenças significativas entre os grupos são mostradas em linhas horizontais.

5 DISCUSSÃO

A transmissão da LTA no estado de São Paulo é caracterizada em algumas regiões pela ocorrência de inúmeros microfocos, pelos casos esporádicos e surtos epidêmicos. Os casos de LTA da região de Sorocaba estão relacionados à ocupação do solo em novas áreas de plantio, atividades de exploração e desmatamentos, atividades agrícolas ou invasão de mata devido a extensão urbana.^{161,162,163}

Em estudos mais antigos, relata-se uma maior incidência da LTA em adultos jovens e do sexo masculino, porém, de acordo com o Ministério da Saúde, houve mudança do perfil. A doença passou a atingir homens e mulheres de maneira quase que uniforme.^{22,164} Nesse estudo, essa uniformidade foi observada, onde 52.5% dos indivíduos são do gênero masculino e 47.5% são do gênero feminino. Este dado está de acordo com outros trabalhos da literatura^{85,164,165,166,167}, que demonstram esse novo perfil da doença no país, ou seja, o acometimento de ambos os sexos, que pode estar associado às atividades ocupacionais e de lazer em áreas consideradas de risco.

Nesse estudo todos os casos de LTA foram causados por *L. (V.) braziliensis*, que é amplamente distribuída por todo território nacional, sendo considerada uma das espécies mais importantes para a saúde pública. Além de ser responsável pela maioria dos casos de LTA no país, tem a capacidade de causar desde a forma cutânea localizada até lesões mucocutâneas destrutivas.^{168,169}

Devido ao amplo espectro de manifestações clínicas, envolvendo diferentes espécies e a semelhança da leishmaniose com outras doenças, o diagnóstico é fundamental.^{4,170} Ele é baseado nos dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Assim, os pacientes que participaram deste estudo tiveram o diagnóstico confirmado, por pelo menos 2 exames laboratoriais positivos em conjunto com os critérios clínicos-epidemiológicos.

A presença do parasita no exame microscópico em amostras de biopsias com suspeita de LTA é uma das formas de confirmar o diagnóstico. Contudo, resultados positivos apresentam baixos percentuais como de 18% a 52%¹⁷¹; 51,85%¹⁷² e 54%-65%.¹⁷³ Neste estudo, a sensibilidade do exame direto foi de 71.42% dos pacientes com cPCR positivos. O baixo percentual encontrado em alguns estudos, pode ser explicado pela escassez parasitária na lesão causada por *L. (V.) braziliensis*, que é

característico da evolução da doença e tempo da lesão, pois quanto maior o tempo de duração, menor a probabilidade de encontrar o parasita, portanto a sensibilidade é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão.¹⁷⁴ A positividade desta técnica está em torno de 100% nos dois primeiros meses de evolução, 75% aos seis meses e 20% acima dos 12 meses.^{25,175}

Nos últimos anos, o estudo da resposta imune celular, bem como, a determinação do perfil de citocinas em modelos animais e humanos foram realizados por métodos quantitativos e semi-quantitativos. As metodologias mais utilizadas tem sido: i. ELISA, quantificando a secreção de citocinas em sobrenadantes de cultura celular; ii. citometria de fluxo, onde é possível detectar múltiplas citocinas em uma única amostra; e iii. qPCR, onde é possível quantificar a expressão gênica de citocinas.^{169,176} Neste caso, quando se busca a expressão de um gene codificador de uma dada citocina, busca-se o mRNA no tecido alvo de estudo.

Usualmente, o mRNA, obtido por extração de amostras FFPE encontra-se fragmentado, devido as condições de tempo, de temperatura e o tipo de fixador utilizado nessas amostras, influenciando na preservação do RNA. Fixações em formalina induzem ligações cruzadas entre ácidos nucleicos, proteínas e outros componentes teciduais, fragmentando os ácidos nucléicos e tornando-os resistentes à extração.^{177,178} Porém, estudos mostram que é possível extrair RNA de amostras armazenadas por longo tempo. Produtos de RNA com tamanhos de 60 a 300pb podem ser amplificadas adequadamente pela qPCR^{179,180}

A etapa de desparafinização com xilol é sugerida por vários autores e pela maioria dos kits comerciais de amostras parafinadas, pois a retirada incompleta da parafina pode resultar em RNA de qualidade inferior.¹⁷⁸ Em amostras frescas obtêm-se valores de RIN entre 8.5 a 9.5, entretanto, nas amostras fixadas em formalina, os valores são muito inferiores, pois normalmente as moléculas de RNA já estão fragmentadas. Ribeiro-Silva et al. (2008)¹⁷⁸ observaram que a integridade do RNA de amostra parafinadas depende do protocolo de extração e encontraram médias de RIN 1.4, 1.9 e 2.1. Nós obtivemos uma média superior a 2.91. De acordo com Madabusi et al. (2006)¹⁸¹, amostras de RNA com RIN de 1.4 são suficientes para a maioria dos testes moleculares, incluindo microarranjos de DNA complementar. Por esse motivo,

no presente trabalho, esse valor foi adotado como limite inferior de integridade, atendendo a faixa aceitável de qualidade de RNA para teste de expressão gênica.

A qPCR é um dos métodos de quantificação mais sensíveis e reprodutíveis para análise de expressão gênica. No entanto, muitos fatores podem afetar os resultados. Dentre eles destaca-se a seleção dos genes endógenos. Estudos recentes analisaram a adequação de alguns genes endógenos de referência e verificou-se que a estabilidade destes genes é variável.^{182,183,184} A questão da correta normalização dos dados de expressão gênica quantitativa é um ponto crucial na obtenção de resultados confiáveis e biologicamente significativos.¹⁸⁵ Dheda et al., 2004¹⁸⁶ mostraram que alguns genes de referência são altamente específicos para um determinado modelo e que a validação experimental para cada situação é um requisito essencial.

O gene endógeno "ideal" deve ser constantemente transcrito em todos os tipos de células e tecidos e permanecer estável entre amostras colhidas em diferentes momentos e em diferentes condições experimentais. No entanto, é impossível encontrar um gene endógeno universal tendo uma expressão estável sob todas estas condições.^{149,187} Estudos forneceram provas de que os níveis de transcrição variam consideravelmente entre diferentes indivíduos, diferentes tipos de células, diferentes fases de desenvolvimento e sob condições experimentais diferentes.^{188,189} Portanto, para uma análise precisa da expressão do gene, é de crucial importância a validação de genes endógenos candidatos. Os autores não defendem o uso de um único gene de referência e já foi demonstrado que a utilização de dois a quatro genes de referência melhora a precisão da quantificação.^{145,190,191} De acordo com as diretrizes MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments), o número de genes de referência rastreados para a normalização deve ser superior a três, a menos que um único gene de referência tenha sido totalmente validado. Além disso, a seleção deve ser confirmada em pelo menos dois algoritmos, tal como geNorm e Normfinder.¹⁹² Nesse estudo, o gene endógeno mais estável e que foi utilizado para normalizar a reação de expressão relativa foi o GAPDH.¹⁵⁸ A proteína GAPDH sempre foi conhecida pelo seu emprego como controle no estudo da expressão gênica devido ao seu padrão de expressão considerado constitutivo. Gouveia et al. (2011)¹⁹³ e Koppelkamm et al. (2010)¹⁸² utilizaram esse gene para analisar amostras FFPE de linfonodo; músculo cardíaco, esquelético e cerebral.

Alguns autores, como Koppelkamm et al.¹⁸², Tsaur et al., 2013¹⁹⁴; Xie et al., 2016¹⁸⁴ mostraram estabilidade variável entre diferentes tecidos de transcritos de GAPDH. Entretanto, Barber et al. (2005)¹⁹⁵ mostraram que a variação dentro do tecido dos níveis de expressão de mRNA de GAPDH é geralmente pequena, enquanto que a variação entre diferentes tecidos pode ser substancial, de acordo com o tipo de tecido.

Em adição, a resposta imune tem papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos e se institui no principal impedimento para a ocorrência de infecções disseminadas, habitualmente associadas com alto índice de mortalidade.¹⁹⁶ Infecções parasitárias podem levar a uma resposta imunológica específica por parte do hospedeiro, caracterizada pelo aumento de células T CD4+ e um perfil de citocinas Th1 e/ou Th2.^{197,198} Paralelamente a essa resposta, a sobrevivência da *Leishmania* depende da evasão do sistema imune do hospedeiro e esse parasita é altamente adaptado ao escape dos efeitos da imunidade humoral e da imunidade celular.^{199,200} As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico.²⁰¹ Elas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória. As citocinas, de acordo com o microambiente no qual estão localizadas, servem de mediadores para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, favorecendo a cicatrização apropriada da ferida.^{201,202}

Nos seres humanos, o espectro da doença pode variar de infecção subclínica a manifestações como lesões cutâneas localizadas, disseminadas ou difusas, ou mesmo o envolvimento da mucosa naso-faríngea. Em todas essas formas, a expansão das células T helper exerce uma influência fundamental¹⁶⁹ e a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção está relacionada com o nível de expansão de células Th1 e Th2.¹³⁰

O desenvolvimento de uma resposta imunológica protetora contra patógenos intracelulares requer a ação de células da imunidade inata e adaptativa. Após a infecção por *Leishmania* diferentes tipos de células da imunidade inata interagem com o parasita. Embora os macrófagos sejam as principais células hospedeiras de *Leishmania*, estudos utilizando modelos murinos demonstraram que neutrófilos e

células dendríticas também são capazes de fagocitar o parasita no início da infecção.^{203,204}

A produção de IFN- γ , é importante para o controle da infecção por *Leishmania*, pois ativam as células fagocíticas a matar o parasita, através da produção de óxido nítrico e superóxido.^{205,206,207,208}

TNF- α é a primeira citocina inflamatória a ser produzida em resposta às infecções, sendo considerada mediadora primária do sistema imune inato e crucial para promover a proteção local.²⁰⁹ Foi observado nesse estudo baixa expressão de mRNA em todos os grupos para TNF- α , porem, quantidades mínimas de TNF- α contribuem para a defesa do hospedeiro. Quando a produção é demasiada e prolongada, o TNF- α torna-se deletério ao organismo, acarretando na desregulação da resposta imune e promovendo a ativação de outras citocinas, como do sistema oxidativo celular, os quais geram inflamação e lesão tecidual.^{209,210,211}

Sabe-se da importância da resposta imunológica Th1 para o controle do crescimento do parasita e da disseminação da doença^{212,213}, mas na infecção por *L. (V.) braziliensis*, os parasitas persistem e a resposta exacerbada do tipo Th1 está relacionada com a patologia.^{122,214} Já foi documentado que existe uma correlação direta entre a frequência de células T CD4+ expressando IFN- γ e o tamanho da lesão¹²⁷ e pacientes com LC e LM apresentam produção elevada de IFN- γ , o que foi observado nos grupos II e III.^{215,216}

Embora a capacidade de desencadear resposta Th1, com produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12 esteja associada ao controle e cura da infecção, estudos realizados em humanos infectados por *L. (V.) braziliensis* demonstraram que o aparecimento de lesões agressivas e dano ao tecido estão associados à exacerbação da resposta imune.^{101,127,153,212,217,218,219,220} Os dados deste estudo sugerem que nos pacientes dos Grupos II e III a resposta de IFN- γ foi exacerbada. Eles expressaram altos níveis de mRNA de IFN- γ (pró-inflamatória), podendo ocorrer naqueles do Grupo II a mesma forma de evolução do que visto nos do Grupo III (LM) com severa destruição tecidual.

Para impedir a imunopatologia, é necessário que exista uma resposta imunossupressora com produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β).^{130,221,222} Essa resposta pode limitar os danos teciduais causado pelo processo inflamatório. Contudo, ela favorece a permanência do parasita no organismo do

hospedeiro.^{223,224} Embora os níveis elevados de mRNA de IL-10, observado nos pacientes do Grupo II possam ajudar a limitar as alterações imunomediadas, as atividades imunossupressoras da interleucina podem promover baixa ativação macrofágica, colaborando com a replicação do parasita e assim culminar com a progressão da doença.²²⁵ Os pacientes do Grupo III foram os que menos expressaram mRNA para IL-10. Gonzalez-Lombana et al. (2013)²²⁶, observaram que camundongos C57BL/6 que apresentavam LM causada por *L. (V.) major*, apresentaram baixos níveis de IL-10 e uma resposta inflamatória exagerada. Dessa forma, IL-10 pode contribuir para o aumento de neutrófilos e progressão da doença.

Um conjunto pró-inflamatório conhecido por ter um papel importante em algumas infecções intracelulares é o perfil Th17.²²⁷ A diferenciação desse padrão efetor requer a presença das citocinas IL-1 β , TGF- β , IL-6 e IL-23 no microambiente inflamatório durante processo infeccioso.²²⁸

IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que promove maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos e diferenciação/manutenção de linfócitos-T citotóxicos e células NK. Contudo, também exerce propriedades anti-inflamatórias durante a lesão.^{202,229,230} TGF- β e IL-6 auxiliam na produção de IL-10 e a regulação positiva de células Th17. Esse fato parece estar envolvido com a manutenção da homeostase, e sugere que IL-10 é dependente de TGF- β e IL-6.^{231,232}

Citocinas como IL-10 e TGF- β podem facilitar a proliferação do parasita^{233,234} que na sua forma promastigota estimula a produção de IFN- γ por NK.²³⁵ IFN- γ por sua vez, ativa os macrófagos que desempenham papel crucial na morte do parasita e resolução da infecção.²¹⁸ Em infecções causadas por *L. (V.) braziliensis*, a presença da IL-10 na fase inicial da infecção esta associada com a persistência parasitária.^{153,220} À medida que a infecção por *L. (V.) braziliensis* progride, os níveis de IFN- γ aumentam e predominam sobre os níveis de IL-10²³⁶, o que corrobora com os nossos achados. Então o sistema imune não consegue destruir completamente o parasita e essa forte resposta Th1 termina por levar a ocorrência de uma reação inflamatória muito intensa e a dano aos tecidos próprios, resultando no aparecimento de úlceras na pele e na mucosa.²³⁷

IL-27 tem atividade anti-inflamatória que exerce um efeito local e sistêmico sobre o crescimento e propagação de parasitas. Os primeiros estudos sobre a biologia

da IL-27 mostram evidências do papel desta citocina na iniciação da resposta imune do tipo Th1.^{238,239} Entretanto, estudos posteriores indicaram que IL-27 tem uma vasta ação inibitória em células Th1, prevenindo imunopatologia causada por essas células T.^{240,241} Apesar de uma ampla expressão de mRNA de IL-27 nos grupos, principalmente no grupo II, nossos resultados sugerem que a IL-27 não interferiu na expressão de RNAm de IFN- γ nas células de pacientes com LC e LM.

A complexidade da LTA causada por *L. (V.) braziliensis* está representada pelas diversas manifestações clínicas relacionadas a esta espécie, limitações de tratamento e pela diversidade de vetores e reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão o que torna esta endemia um desafio. No decorrer da infecção parasitária, embora exista uma polarização para um determinado perfil de resposta, levando em consideração o tipo de parasita e da genética do hospedeiro, a resposta final é constituída por um balanço entre mecanismos celulares, humorais e secreção de citocinas, representando uma evidência de co-evolução.²⁴² Bosque et al. (2000)²⁴³ e Bourreau et al. (2001)²⁴⁴, observaram que infecções do subgênero *Viannia* podem gerar uma resposta hiperinflamatória que não consegue se resolver com um único padrão de citocinas, provocando em seres humanos uma resposta mista de Th1/Th2 em infecções por *L. (V.) panamensis*. O mesmo parece ser observado na infecção por *L. (V.) brasiliensis* com os resultados verificados nesse trabalho. Neste sentido, os resultados obtidos, auxiliam na identificação da expressão de mRNA de citocinas envolvidas na resposta imunológica ao parasita.

6 CONCLUSÃO

- a) O protocolo ideal para extração de RNA tanto para biópsias frescas quanto as FFPE inclui a digestão proteica com Proteinase K. RIN's maiores que 2.1 em amostras de RNA são suficientes para realizar técnicas de biologia molecular. A concentração ideal de cDNA é de 100 ng/μL para estudos de expressão gênica em amostras de lesões parafinadas.
- b) O gene endógeno ideal a ser utilizado como normalizador em ensaios de expressão gênica de citocinas em biópsias frescas é TBP e para biopsias FFPE é o GAPDH, dentre os genes analisados neste estudo.
- c) Os resultados de expressão gênica das citocinas estudadas sugerem que:
 - A exacerbação da resposta imune do perfil Th1 (IFN- γ) poderia levar ao surgimento de lesões mais graves nos pacientes dos Grupos II e III;
 - Os níveis elevados de mRNA de IL-10, observado nos pacientes do Grupo II podem promover baixa ativação macrofágica, colaborando com a replicação do parasita e assim culminar com a progressão da doença;
 - A expressão de mRNA de IL-27 não interferiu na expressão de mRNA de IFN- γ nas células dos pacientes com LC e LM;
 - Os pacientes do Grupo II podem desenvolver uma forma mais grave de LTA quando comparados com os do Grupo I.

7 REFERÊNCIAS

- 1 Grimaldi Jr G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for the future research. Clin Microbiol Rev. 1993;6:230-250.
- 2 Gontijo B, Carvalho MLR. American cutaneous leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36:71-80.
- 3 Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2:e313.
- 4 Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis. 2007;7(9):581–596.
- 5 González U, Pinart M, Rengifo-Pardo M, Macaya A, Alvar J, Tweed JA. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis Cochrane Database Syst Rev. 2009 Apr;15(2):CD004834
- 6 World health organization - WHO 2017. Leishmaniasis -Fact sheet, Updated. April, 2017. [citado em: 01 de set. 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
- 7 World Health Organization. Leishmaniasis -Fact sheet N°375, Updated. January 2014. [citado em 20 set. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/index.html>.
- 8 World Health Organization. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. 2016;22(91):285–296.
- 9 Gomes-Silva A, Souza MA, Afonso-Cardoso SR, Andrade LR, Dietze R, Lemos E, Belli A, Júnior SF, Ferreira MS. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41:135-141.
- 10 Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7:e35671.
- 11 Ministério da Saúde do Brasil. Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana. 2012. [citado em 11 abr. 2015]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/svs>.
- 12 Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1991;86:51–56.
- 13 Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil: As leishmanioses tegumentares. J Bras Med. 1992;63: 82- 104.

- 14 Dantas-Torres F. Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniasis and its potential as transmission blocking vaccine. *Vet Parasitol.* 2006;141:1-8.
- 15 Degraeve W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994;89:463-69.
- 16 Lainson R, Shaw JJ. New world leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In: Collier L, Ballows A, Sussman E, editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections.* 9th ed. London: Arnold; 1998. p.241-66.
- 17 Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101: 577-579.
- 18 Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol.* 2007;64:1-109.
- 19 Guedes ACM, Carvalho MLR, Melo MN. Leishmaniose tegumentar americana: apresentação pouco comum. *Anais Brasileiro Dermatologia.* 2008;83(5):445-449.
- 20 Ministério da Saúde do Brasil- MSB. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana, 2ªed. Brasília, 2007, 182p.
- 21 Lessa MM, Lessa HÁ, Castro TWN, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalho EM. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2007;73(6):843-7.
- 22 Ministério da Saúde do Brasil - MSB. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial. Editora do Ministério da Saúde, 2006. [citado em Abr. 2017. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/atlas_lta.pdf.
- 23 World Health Organization - WHO Report On Global Surveillance Of Epidemic-Prone Infections Diseases. Leishmaniasis and Leishmaniasis/HIV co-infection, 2004.
- 24 Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessein H, Prata A, Rodrigues V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum Immunol.* 2009;70:383–390.
- 25 Ameen M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin Exp Dermatol.* 2010 Oct;35(7):699-705.
- 26 World health organization – WHO. Status of endemicity of Cutaneous Leishmaniasis, Worldwide, 2013 [citado em: 30 de set. 2016. Disponível em:

http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis_Burden_distribution_VL_C_L_2013.pdf

27 Turetz ML, Machado PR, Alves F, Bittencourt Almeida RP, Mobashery N, Johnson Jr WD et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis*. 2002 Dec; 186:1829-1834.

28 Ministério da Saúde do Brasil. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Segunda Edição Atualizada Editora do Ministério da Saúde. Brasília: 2010. pp. 17–31.

29 Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS. Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2017. [citado em 5 abr 2016. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754

30 Sistema de Informação Regional de Leishmanioses - SisLeish. Pan American Health Organization / Organização Mundial de Saúde. [citado 05 de maio 2017]. Disponível em: <http://leishmaniasis.panaftosa.org.br/BRImport.aspx>

31 Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública. Brasília: Ministério da Saúde; 2010. [citado em 2016 Jun 18]. Disponível em: http://www.scalibor.com.br/downloads/Boletim_zoonoses_2008.pdf

32 Camargo-Neves VLF, Brasil Mitie Tada LRF. Leishmaniose Tegumentar Americana no estado de São Paulo: situação epidemiológica 2001 – 2002. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36:2.

33 da Silva RA, Mercado VT, Henriques Lde F, Ciaravolo RM, Wanderley DM. Magnitude and trend of american tegumentary leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil, 1975 to 2008. *Rev Bras Epidemiol*. 2012; 15:617-26.

34 Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo – CVE. 2012. [citado em agost. de 2016. Disponível em http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lta_dados.html.

35 Lederman ER, Weld LH, Elyazar IR, von Sonnenburg F, Loutan L, Schwartz E, Keystone JS. Dermatologic conditions of the ill returned traveler: an analysis from the GeoSentinel Surveillance Network. *Int J Infect Dis*. 2008 Nov;12(6):593-602.

36 Bari AU, Rahman SB. Cutaneous leishmaniasis: an overview of parasitology and host-parasite-vector inter relationship. *J of Pakistan Association of Dermatologists*. 2008;18(1):42-48.

37 Basano AS, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev Brasil de Epidemiol*, São Paulo. 2004;7:328-37.

- 38 DPDx/Centers For Disease Control And Prevention. Leishmaniasis. [citado em 21 jul. 2016. Disponível em: [://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Leishmaniasis_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Leishmaniasis_il.htm).
- 39 Grimaldi Jr G, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *Am J Trop Med Hyg* 1989;41(6):687-725.
- 40 Desjeux P. Leishmaniasis: public Health aspects and control. *Clin Dermatol*. 1996;14:417-23.
- 41 Lainson R, Shaw JJ. New world leishmaniasis. In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D. *Microbiology and microbial infections, parasitology*. Sidney: Aucklan; 2005. p313-49
- 42 Madeira MF, Schubachb A, Schubachb TMP, Pachecoc RS, Oliveirac FS, Pereirab FB et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg, Londres*. 2006 Mai;100(12):442-5.
- 43 Tolezano JE, Uliana SR, Taniguchi HH, Araújo MF, Barbosa JA, Barbosa JE et al. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol*. 2007 nov;10:149(3-4):280-4.
- 44 Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brasil, *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003 May-Jun;97(3):291-6.
- 45 Furtado T. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: MachadoPinto J(ed), *Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas*. Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, p.319-328,1994.
- 46 Rangel EF, Laison R. *Flebotomíneos do Brasil*, 1ª edição. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 2003.
- 47 Ready P. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annual Rev Entomology*. 2013;58:227-250.
- 48 Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by Leishmania. *Exp Mol Pathol*. 2002;72:132-141.
- 49 Bates PA. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. 2007;37:1097-1106.
- 50 Dostálová A, Volf P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors*, London. 2012;1:276-287.
- 51 Neuber H. Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2008;9:754-65.

- 52 Rogers ME, Chance ML, Bates PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania Mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*. 2002;124:495-507.
- 53 Lipoldová M, Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat Rev Genet*. 2006;7(4):294-305.
- 55 Rogers KA, Dekrey GK, Mbow ML, Gillespie RD, Brodskyn CI, Titus RG. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002b;209:1-7.
- 54 Bogdan C, Gessner A, Solbach W, Rollinghoff M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol*. 1996;8:517-525.
- 55 Bogdan C, Rollinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol*. 1998; 28:121-134.
- 56 Forget G. Étude des mécanismes de régulation négative utilisés par *Leishmania* *Leishmania* pour contrer pour contrer la réponse immunitaire innée. [tese]. République Algérienne Démocratique et Populaire: Faculte de Médecine, Université Mentouri Constantine; 2004.
- 57 Netea MG, Van der Meer JWM, Kullberg BJ. Toll-like receptors as an escape mechanism from the host defense. *Trends Microbiol*. 2004;12:484-488.
- 58 de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ et al. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol*. 2003;33:2822-2831.
- 59 Cunningham AC. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* 2001;72.
- 60 Barcinski MA, Dos Reis GA. Apoptosis in parasites and parasite-induced apoptosis in the host immune system: a new approach to parasitic diseases. *Braz J Med Biol Res*. 1999;32(4).
- 61 van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol*.2004; 173:6521-6525.
- 62 Choi BS, Kropf P. Evaluation of T cell responses in healing and nonhealing leishmaniasis reveals differences in T helper cell polarization ex vivo and in vitro. *Parasite Immunol*, Oxford. 2009;31(4):199-209.
- 63 Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, Londres. 2010;8:419-433.
- 64 Jones TC, Johnson WD Jr, Barreto AC, Lago E, Badaró R, Cerf B, et al. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis*. 1987;156:73-83.

- 65 Miranda JC, Reis E, Schrieffer A, Goncalves M, Reis MG, Carvalho L. et al. A. Frequency of infection of Lutzomyia phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97(2):185- 8.
- 66 Ministério da Saúde. Brasília – DF. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial /Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 136 p
- 67 Guimarães LH, Machado PRL, Lessa HA, Lessa M, D'Oliveira JrA, Carvalho EM. Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar. Gazeta Médica da Bahia. 2005;75(1):66-74.
- 68 Ura S. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). In: Farhat C K, Carvalho LHFR, Succi RCM. Infectologia Pediátrica. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. Capítulo 67, 871-888.
- 69 Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Amato Neto V. Treatment of Mucosal Leishmaniasis in Latin America: Systematic Review. Am J Trop Med Hyg. 2007;77(2):266-74.
- 70 Tuon FF, Gomes-Silva A, Da-Cruz AM, Duarte MIS, Amato Neto V, Amato VS. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. Clin Immunol. 2008;128(3):442-6.
- 71 World health organization – WHO (África). Manual for case management of cutaneous leishmaniasis in the WHO Eastern Mediterranean region, Cairo, Egito, 2014. [citado em 12 out. 2015. Disponível em: http://applications.emro.who.int/dsaf/EMROPUB_2013_EN_1590.pdf?ua=1.
- 72 Mahajan VK, Sharma NL. Therapeutic options for cutaneous leishmaniasis. J Dermatolog Treat. 2007;18(2):97-104.
- 73 Amato VS. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. Boletim epidemiológico Paulista, v.26, p.2-6. [citado em 16 jun. 2016. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa26_lta.htm
- 74 Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev. 2006; 19:111–126.
- 75 Mukherjee A, Boisvert S, Monte-Neto RL, Coelho AC, Raymond F, Mukhopadhyay R, et al. Telomeric gene deletion and intrachromosomal amplification in antimony-resistant *Leishmania*. Mol Microbiol. 2013;88:189–202.
- 76 Sundar S, Chakravarty J, Agarwal D, Rai M, Murray HW. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. N Engl J Med. 2010;362:504–512.
- 77 Croft SL, Olliaro P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. Clin Microbiol Infect. 2011 Oct;17(10):1878-83.

- 78 Choi CM, Lerner EA. Leishmaniasis as an emerging infection. J Invest Dermatol Symp Proc. 2001 Dec;6(3):175-82.
- 79 Ellis M, Bernsen R, Ali-Zadeh H, Kristensen J, Hedström U, Poughias L. et al. A safety and feasibility study comparing intermittent high dose with daily standard dose liposomal amphotericin B for persistent neutropenic fever amphotericin B: spectrum and resistance. J Med Microbiol. 2009;49(1):7–10
- 80 Mattos MS. O desafio para a realização de ensaios clínicos em leishmaniose tegumentar. Rev da Sociedade Brasil de Med Trop. 2006;30(3): 94-95.
- 81 Saravia NGL, Valderrama M, Labrada AF, Holguín C, Navas G, Palma A, et al. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. J Infect Dis. 1989;159:725-735.
- 82 Reed SG. Diagnosis of Leishmaniasis. Clin Dermatol. 1996;14:471-8.
- 83 Machado P, Araújo C, Da Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira Jr A, Bittencourt A, et al. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. 2002 Jun 15;34(12):E69-73.
- 84 Gomes AH, Ferreira IM, Lima ML, Cunha EA, Garcia AS, Araújo MF, Pereira-Chiocola VL. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. Vet Parasitol. 2007 Mar 31;144(3-4):234-41.
- 85 Gomes AH, Armelin IM, Menon SZ, Pereira-Chiocola VL. *Leishmania (V.) braziliensis*: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. Exp Parasitol. 2008;119:319–24.
- 86 Vega-Lopez F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis. 2003;16:97–101.
- 87 Al-Hucheimi SN, Sultan BA, AlDhalimi MA. A comparative study of the diagnosis of Old World cutaneous leishmaniasis in Iraq by polymerase chain reaction and microbiologic and histopathologic methods. Int J Dermatol. 2009;48:404–408.
- 88 Chatzis MK, Andreadou M, Leontides L, Kasabalis D, Mylonakis M, Koutinas AF, et al. Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats Vet Parasitol. 2014 May 28;202(3-4):217-25.
- 89 Montenegro J. A cutis-reação na leishmaniose. In: Anais da Faculdade de medicina de São Paulo. 1926; 1:323-330.
- 90 Festa Neto N, Sotto Mn, Cuce C. Intradermorreação de Montenegro: aspectos histopatológicos e imunológicos. Med Cut Ibero Lat Amer. 1991;19:293-301.
- 91 Silva AF. A Reação Intradérmica de Montenegro na clínica e na epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar. [tese] Rio de Janeiro:Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde, Vigilância Sanitária; 2007.

92 Batista Rd; Gomes Ap; Igreja Rp; Huggins Rp. Medicina tropical, abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias. 1ed. Ed.cultura Médica, 2001. V1. Cap15.p131-40.

93 Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of Visceral Leishmaniasis. Clin Diagn. Lab Immunol. 2002;9:951-958.

94 Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, de Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Araujo ML, Souza WJ, Haddad F, Perez Mde A, Pacheco RS, Momen H, Coutinho SG, de Almeida Marzochi MC, Marzochi KB, da Costa SC. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96:987-996.

95 Quintella LP, Cuzzi T, Madeira MF, Okamoto T, Schubach AO. Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2009;51(2):83-86.

96 Bourdoiseau G, Marchal T, Magnol JP. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. J Vet Diagn Invest. 1997; 9:439.

97 Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Gonçalves R, De Melo MN, Michalick MS, Tafuri WL. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. J Immunol Methods. 2004;292(1-2):17-23.

98 Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen B, Chelack B, Czub S, Del Piero F, Dial S, Ehrhart EJ, Graham T, Manning L, Paulsen D, Valli VE, West K. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. J Vet Diagn Invest. 2008 Jul;20(4):393-413.

99 Rocha RM, Miller K, Soares F, Vassallo J, Schenka N, Gobbi H. The use of the immunohistochemical biotin-free visualization systems for estrogen receptor evaluation of breast câncer. Applied Cancer Research. 2009;29(3):112-117.

100 Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola, J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. Vet Parasitol. 2006 Apr 30;137(3-4):214-21.

101 Reis LC, Brito MEF, Souza MA, Pereira VRA. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. Rev de Patologia Tropical, São Paulo. 2006;35(2):103-115.

102 Rittig MG, Bogdan C. *Leishmania* - Host-Cell interaction: Complexities and alternative views. Parasitol Today. 2000;16:292-297.

103 Navin TR, Krug EC, Pearson RD. Effect of immunoglobulin M from normal human serum on *Leishmania donovani* promastigote agglutination,

complement-mediated killing, and phagocytosis by human monocytes. *Infect Immun.* 1989;57:1343-1346.

104 Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell research.* 2010 Jan;20(1):34-50.

105 Ambrósio AR. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Ativação do sistema complemento e interação com a Lectina Ligante da Manose (MBL). [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2006.

106 Mosser DM, Brittingham A. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology.* 1997;115:09-23.

107 Kawai T, Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity.* 2011;34(5):637–650.

108 Singh R, Srivastava A. Toll-like receptor signaling: A perspective to develop vaccine against leishmaniasis. *Microbiological Research.* 2012;167(8):1–7.

109 Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell.* 2010;140(6):805–820.

110 Gurung P, Kanneganti TD. Innate immunity against *Leishmania* infections. *Cellular Microbiology.* 2015;17(9):1286–1294.

111 Motta V, Soares F, Sun T, Philpott DJ. NOD-Like Receptors: Versatile Cytosolic Sentinels. *Physiological Reviews.* 2015;95(1):149–178.

112 Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell.* 2002;10(2):417–426.

113 Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annual Review of Immunology.* 2009;27(1):229–265.

114 Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature reviews. Immunology.* 2013;13(6):397–411.

115 Miao EA, Rajan JV, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological reviews.* Set 2011;243(1):206–214.

116 Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:895–906.

117 Gollob KJ, Viana AG, Dutra WO. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite Immunol.* 2014;36:367–76.

- 118 Machado PRL, Araújo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. Immune response mechanisms to infections. *An bras Dermatol*, Rio de Janeiro. 2004 dec;79(6):647-664.
- 119 Souza MA, da Silva AG, Afonso-Cardoso SR, Favoreto Junior S, Ferreira MS. Immunoglobulin isotype and IgG subclass profiles in american tegumentary leishmaniasis. *Rev da Sociedade Brasil de Med Trop*. 2005;38(2):137-141.
- 120 Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*, 6^a ed, Editora Saunders 2007.
- 121 Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TT, de Souza AWS, Cruvinel WM, Andrade LEC et al. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reumatol*. 2010;50(5):552-80.
- 122 Sousa-Atta MLB, Salomé GS, D'Oliveira Jr A, Almeida RP, Atta AM, Carvalho EM. Immunoglobulin E antileishmanial antibody response in cutaneous leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9:101-104.
- 123 Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol*. 2006;28:51-60.
- 124 Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto MP et al. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:625–630.
- 125 Brandonisio O, Panaro MA, Fumarola I, Sisto M, Leogrande D, Acquafredda A, et al. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. *Clin Exp Med*. 2002;2:125-9.
- 126 Follador I, Araujo C, Bacellar O, Araujo CB, Carvalho LP, Almeida RP, et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis*. 2002;34 :E54–E58.
- 127 Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett*. 2005;101:226–230.
- 128 Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr, Schrieffer A, Machado PR, Lessa H, et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun*. 2005;73:7853–7859.
- 129 Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest*. 1993;91:1390-1395.

- 130 Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro De Jesus A, Dutra WO, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun*. 2002 Dec;70(12):6734-40.
- 131 Cáceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sánchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL, et al. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol*. 1993;91:500-505.
- 132 Chen Z, Lin F, Gao Y, Li Z, Zhang J, Xing Y, Deng Z, Yao Z, Tsun A, Li B. FOXP3 and ROR γ t: Transcriptional regulation of Treg and Th17. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(5):536-42.
- 133 Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO, Scott P, Carvalho EM. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2009 Jul 1;200(1):75-78.
- 134 Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*. 2008 Jun 19;453(7198):1051-1057.
- 135 Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation. *Immunity*. 2009 May;30(5):646-655.
- 136 Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, Ziegler SF, Littman DR. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature*. 2008 May 8;453(7192):236-240.
- 137 Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485-517.
- 138 Ruddy MJ, Shen F, Smith JB, Sharma A, Gaffen SL. Interleukin-17 regulates expression of the CXC chemokine LIX/CXCL5 in osteoblasts: implications for inflammation and neutrophil recruitment. *J Leukoc Biol*. 2004 Jul;76(1):135-144.
- 139 Shen F, Ruddy MJ, Plamondon P, Gaffen SL. Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17- and TNF-alpha-induced genes in bone cells. *J Leukoc Biol*. 2005 Mar;77(3):388-399.
- 140 Dong C. Differentiation and function of pro-inflammatory Th17 cells. *Microbes Infect*. 2009 Apr;11(5):584-588.
- 141 Walker CG, Meier S, Mitchell MD, Roche JR, Littlejohn M. Evaluation of real-time PCR endogenous control genes for analysis of gene expression in bovine endometrium. *BMC Mol Biol*. 2009 Nov 1;10:100.
- 142 Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.

- 143 Härtel C, Beins G, Muller-Steinhardt M, Kluter H. Ex vivo induction of cytokine mRNA expression in human blood samples. *J Immunol Methods*. 2001 Mar 1;249(1-2):63-71.
- 144 Ettinger NA, Wilson ME. Macrophage and T-cell gene expression in a model of early infection with the protozoan *Leishmania chagasi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008 Jun 25;2(6):e252.
- 145 Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034.
- 146 Hays JP. The evaluation of putative endogenous control housekeeping genes for real-time polymerase chain reaction expression studies in *Moraxella catarrhalis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;65:323-326.
- 147 Silveira ED, Alves-Ferreira M, Guimarães LA, Silva FR, Carneiro VTC. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual Grass *Brachiaria brizantha*. *BMC Plant Biol*. 2009 Jul 2;9:84.
- 148 Kheirelseid EAH, Chang KH, Newell J, Kerin MJ, Miller N. Identification of endogenous control genes for normalization of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer. *BMC Mol Biol*. 2010 Feb;11:12.
- 149 Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*. 1999;75:291–295.
- 150 Libus J, Štorchová H. Quantification of cDNA generated by reverse transcription of total RNA provides a simple alternative tool for quantitative RT-PCR normalization. *BioTechniques*. 2006;41:156–164.
- 151 Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Pérez A, Pérez JÁ. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biology* 2008;8:131.
- 152 Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. 2012 Dec 15;380(9859):2197-223.
- 153 Gomes AHS, Martines RB, Kanamura CT, Barbo MLP, Iglesias SD, Lauletta Lindoso JA, Pereira-Chiocola VL. American cutaneous leishmaniasis: In situ immune response of patients with recent and late lesions. *Parasite Immunol*. 2017 Apr;39(4).

- 154 Bastos da Silva I, Batista TP, Martines RB, Kanamura CT, Ferreira IM, Vidal JE, Pereira-Chiocola VL. Genotyping of *Toxoplasma gondii*: DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues from AIDS patients who died by severe disseminated toxoplasmosis. *Exp Parasitol*. 2016 Jun;165:16-21.
- 155 Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol*. 1998 Jul;36(7):1989-1995.
- 156 Lee CN, Cavanagh HM, Lo ST, Ng CS. Human papillomavirus infection in non-neoplastic uterine cervical disease in Hong Kong. *Br J Biomed Sci*. 2001;58(2):85-91.
- 157 Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*. 2006;7:3.
- 158 Meira-Strejevitch CS, Pereira-Chiocola VL, Maia MM, Hippolito DDC, Wang HTL, Motoie G, Gomes AHS, Kanamura CT, Martines RB, de Mattos CCB, Frederico FB, de Mattos LC. Reference genes for studies in infectious parasitic diseases in five types of human tissues. *Gene Reports*. 2017 June;7:98–105.
- 159 Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*. 2004;64:5245–5250.
- 160 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)). *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
- 161 Camargo-Neves VLF. Características da Transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo, Brasil. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1999.
- 162 Gomes AC, Camargo-Neves VLF. Estratégias e perspectivas de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo. *Rev da Sociedade Brasileira de Med Trop*. 1998;31(6):553-558.
- 163 Negrão GN, Ferreira MEMC. Considerações sobre a dispersão da leishmaniose tegumentar Americana nas Américas. *Revista Percorso - NEMO Maringá*. 2009;1(1):85-103.
- 164 Moura APV. Avaliação histomorfológica das lesões de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) atendidos no município de Montes Claros – Minas Gerais. [dissertação]. Montes Claros : Universidade Estadual de Montes Claros, 2009.

- 165 Gontijo CMF, Silva ES, Fuccio MD, Sousa MCA, Pacheco RS, Dias JD, et al. Epidemiological studies of outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Tropica*. 2002;81:143-150.
- 166 D'ávila SCGP, Silva J, Medola BO, Shibukawa RH. Estudo retrospectivo dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana diagnosticados no laboratório de patologia do Hospital de Base da FAMERP nos anos de 1995-2000, com enfoque clínico e anatomopatológico. *Arquivos Ciência e Saúde*. 2004;11(2): p.2-5.
- 167 Alves CF. Padronização de um método Imuno-histoquímico para confirmação da leishmaniose tegumentar. [dissertação]. Minas Gerais: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.
- 168 Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. 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.
- 169 Gollob KJ, Antonelli LR, Faria DR, Keesen TS, Dutra WO. Immunoregulatory mechanisms and CD4–CD8– (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: A balancing act between protection and pathology *Int Immunopharmacol*. 2008 Oct;8(10):1338-43.
- 170 Pourmohammadi B, Motazedian M, Hatam G, Kalantari M, Habibi P, Sarkari B. Comparasion of three methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Iran J Parasitol*. 2010 Dec;5(4):1-8.
- 171 Navin TR, Arana FE, Merida AM, Arana BA, Castilho AL, Silvers N. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: Comparison of diagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg*. 1990;42:36-42.
- 172 Almeida TM. Perfil de expressão gênica de mediadores da resposta imune celular de pacientes com leishmaniose tegumentar ativa. [dissertação]. Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- 173 Faber WR, Oskam L, van Gool T, Kroon NC, Kneegt-Junk KJ, Hofwegen H, et al. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*. 2003 Jul;49(1):70-4.
- 174 Motazedian H, Karamian M, Noyes HA, Ardehali S. DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. *Ann Trop Med Parasitol*. 2002 Jan;96(1):31-4.
- 175 Andrade MS, Brito MEF, da Silva ST, Ishikawa E, Carvalho SMS, Brandão-Filho SP. New outbrek of American tegumentar leishmaniasis in a military training center in the Zona da Mata region, in the north of the State of Pernambuco, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro. 2009;42(5):594-596.
- 176 Radke L, López Hemmerling DA, Lubitz A, Giese C, Frohme M.. Induced cytokine response of human PMBC-cultures: correlation of gene expression and

secretion profiling and the effect of cryopreservation. *Cell Immunol.* 2012;272(2):144-53.

177 Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon BD, Labourier E, Szafranska AE. Evaluation and validation of RNA extraction methods for MicroRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn.* 2008 May;10(3):203-11.

178 Ribeiro-Silva A, Garcia SB. Estudo comparativo de três diferentes procedimentos para extração de RNA a partir de amostras fixadas em parafina e embebidas em parafina. *J Bras Patol Med Lab.* 2008;44(2):123-30.

179 Hamatani K, Eguchi H, Takahashi K, Koyama K, Mukai M, Ito R, et al. Improved RT-PCR amplification for molecular analyses with long-term preserved formalin-fixed, paraffin-embedded tissues specimens. *J Histochem Cytochem.* 2006 Feb;54(7):773-80.

180 Li J, Smyth P, Cahill S, Denning K, Flavin R, Aherne S, et al. Improved RNA quality and TaqMan® Pre amplification method (PreAmp) to enhance expression analysis from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) materials. *BMC Biotechnology.* 2008 Feb;8:1-11.

181 Madabusi LV, Latham GJ, Andruss BF. RNA extraction for arrays. *Methods Enzymol.* 2006;411:1-14.

182 Koppelkamm A, Vennemann B, Fracasso T, Lutz-Bonengel S, Schmidt U, Heinrich M. Validation of adequate endogenous reference genes for the normalisation of qPCR gene expression data in human post mortem tissue. *Int J Legal Med.* 2010 Sep;124(5):371-80.

183 Stassen QE, Riemers FM, Reijmerink H, Leegwater PA, Penning LC. Reference genes for reverse transcription quantitative PCR in canine brain tissue. *BMC Res Notes.* 2015 Dec 9;8:761.

184 Xie J, Liu X, Li Y, Liu Y, Su G. Validation of RT-qPCR reference genes and determination of Robo4 expression levels in human retinal endothelial cells under hypoxia and/or hyperglycemia. *Gene.* 2016 Jul;1;585(1):135-42.

185 Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005 Jun;6(4):279-84.

186 Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques.* 2004;37:112–119.

187 Haberhausen G, Pinsl J, Kuhn CC, Markert-Hahn C: Comparative study of different standardization concepts in quantitative competitive reverse transcription-PCR assays. *J Clin Microbiol.* 1998;36:628-633.

- 188 Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*. 2000;29:332-337.
- 189 Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH. beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax*. 2002 Sep;57(9):765-70.
- 190 Brinkhof B, Spee B, Rothuizen J, Penning LC. Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. *Anal Biochem*. 2006;356:36-43.
- 191 Peters IR, Peeters D, Helps CR, Day MJ. Development and application of multiple internal reference (housekeeper) gene assays for accurate normalisation of canine gene expression studies. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007;117:55-66.
- 192 Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55:611-622.
- 193 Gouveia GR, Suzete Cleusa Ferreira C, Sabino EC, Siqueira SAC, Pereira J. Comparison of three different protocols for extracting RNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J Bras Patol Med Lab*. 2011 Dec;47(6).
- 194 Tsaor I, Renninger M, Hennenlotter J, Oppermann E, Munz M, Kuehs U, et al. Reliable housekeeping gene combination for quantitative PCR of lymph nodes in patients with prostate cancer. *Anticancer Res*. 2013 Dec;33(12):5243-8.
- 195 Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005;21:389-395.
- 196 Janeway CA Jr. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect*. 2001;3:1167-71
- 197 Kemp M. Regulator and effector functions of T-cell subsets in human *Leishmania* infections. *APMIS Suppl*. 1997;68:1-33.
- 199 Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med*. 2004 Jul 19;200(2):201-10.
- 199 Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):1041-1047.
- 200 Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol.* 2002 Jun;18(6):272-278.
- 201 Sommer C, White F. Cytokines, Chemokines, and Pain, ed: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F, Dickenson A. – Pharmacology of Pain. 1st Ed, Seattle, IASP Press, 2010;279-302.

- 202 Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10:742-780.
- 203 Pearson RD, Steigbigel RT. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol.* 1981 Oct;127(4):1438-43.
- 204 Gorak PM, Engwerda CR, Kaye PM. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol.* 1998 Feb;28(2):687-95.
- 205 Qi H, Ji J, Wanasen N, Soong L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 2004 Feb;72(2):988-95.
- 206 Remer KA, Roeger B, Hambrecht C, Moll H. Natural killer cells support the induction of protective immunity during dendritic cell-mediated vaccination against *Leishmania major*. *Immunology.* 2010 Dec;131(4):570-82.
- 207 Rasolzadeh S, Haji Fatahaliha M, Hosseini M, Jafari R, Miahipour A, Sadreddini S, et al. Recombinant LPG3 stimulates IFN- γ and TNF- α secretion by human NK cells. *Iran J Parasitol.* 2015 Jul-Sep;10(3):457-64.
- 208 Carneiro PP, Conceição J, Macedo M, Magalhães V, Carvalho EM, Bacellar O. The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. *PLoS One.* 2016 Feb 3;11(2):e0148084.
- 209 Ulloa L, Tracey KJ. The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends Mol Med.* 2005 Feb;11(2):56-63.
- 210 Netea MG, van der Meer JW, van Deuren M, Kullberg BJ. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? *Trends Immunol.* 2003 May;24(5):254-8.
- 211 Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):853-9.
- 212 Mougneau E, Bihl F, Glaichenhaus N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol Rev* 2011 Mar;240(1):286-96.
- 213 França-Costa J, Van Weyenbergh J, Boaventura VS, Luz NF, Malta-Santos H, Oliveira MC, et al. Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2015 Feb 1;211(3):426-35.
- 214 Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, Beiting DP, Ruthel G, Roos DS, et al. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Pathog.* 2013;9(7):e1003504.

- 215 Oliveira WN, Ribeiro LE, Schrieffer A, Machado P, Carvalho EM, Bacellar O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine*. 2014 Apr;66(2):127-32.
- 216 Cardoso TM, Machado Á, Costa DL, Carvalho LP, Queiroz A, Machado P, et al. Protective and pathological functions of CD8+ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. *Infect Immun*. 2015 Mar;83(3):898-906.
- 217 Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Aug;65(2):87-9.
- 218 Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, Lessa M, Almeida RP, Magalhães A, et al. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol*. 2007 May;29(5):251-8.
- 219 Gaze ST, Dutra WO, Lessa M, Lessa H, Guimarães LH, Jesus AR, et al. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand J Immunol*. 2006 Jan;63(1):70-8.
- 220 Salhi A1, Rodrigues V Jr, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, et al. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol*. 2008 May 1;180(9):6139-48.
- 221 Hölscher C, Mohrs M, Dai WJ, Köhler G, Ryffel B, Schaub GA, et al. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect Immun*. 2000 Jul;68(7):4075-83.
- 222 Amato VS, Andrade Jr HF, Duarte MIS. Mucosal leishmaniasis: in situ in situ characterization of the host characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop*. 2003; 85:39-49.
- 223 Reis LC, Ramos-Sanchez EM, Goto H. The interactions and essential effects of intrinsic insulin-like growth factor-I on *Leishmania (Leishmania) major* growth within macrophages. *Parasite Immunol*. 2013 Jul;35(7-8):239-44.
- 224 Rodrigues FM, Coelho Neto GT, Menezes JG, Gama ME, Gonçalves EG, Silva AR, et al. Expression of Foxp3, TGF- β and IL-10 in American cutaneous leishmaniasis lesions. *Arch Dermatol Res*. 2014 Mar;306(2):163-71.
- 225 Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol*. 2001 Jan;15;166(2):1141-7.
- 226 Gonzalez-Lombana C, Gimblet C, Bacellar O, Oliveira WW, Passos S, Carvalho LP, et al. IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. *PLoS Pathog*. 2013 Mar;9(3):e1003243.

- 227 van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Kullberg BJ, van der Meer JW, Joosten LA, Netea MG. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB Rep.* 2009 Dec 31;42(12):776-87.
- 228 Soumelis V, Volpe E. TH17 differentiation, a complex process in mouse and man. *Med Sci (Paris).* 2008 Nov;24(11):925-7.
- 229 Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery.* 2000 Feb;127(2):117-26.
- 230 Raeburn CD, Sheppard F, Barsness KA, Arya J, Harken AH. Cytokines for surgeons. *Am J Surg.* 2002 Mar;183(3):268-73.
- 231 McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol.* 2007 Dec;8(12):1390-7.
- 232 Diveu C, McGeachy MJ, Cua DJ. Cytokines that regulate autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2008 Dec;20(6):663-8.
- 233 Carvalho LP, Passos S, Schriefer A, Carvalho EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol.* 2012 Oct 4;3:301.
- 234 de Assis Souza M, de Castro MC, de Oliveira AP, de Almeida AF, de Almeida TM, Reis LC, et al. Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. *Microb Pathog.* 2013 Apr;57:27-32.
- 235 Nylén S, Maasho K, Söderstrom K, Ilg T, Akuffo H. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. *Clin Exp Immunol.* 2003 Mar;131(3):457-67.
- 236 Gomes-Silva A, de Cássia Bittar R, Dos Santos Nogueira R, Amato VS, da Silva Mattos M, Oliveira-Neto MP, et al. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol.* 2007 Sep;149(3):440-4.
- 237 Vieira ÉL, Keesen TS, Machado PR, Guimarães LH, Carvalho EM, Dutra WO, et al. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. *Parasite Immunol.* 2013 Feb;35(2):65-72.
- 238 Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity.* 2002 Jun;16(6):779-90.
- 239 Takeda A, Hamano S, Yamanaka A, Hanada T, Ishibashi T, Mak TW, et al. Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol.* 2003 May 15;170(10):4886-90.

- 240 Yoshimura T, Takeda A, Hamano S, Miyazaki Y, Kinjyo I, Ishibashi T, et al. Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4+ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4+ T cells partially through STAT3-dependent mechanism. *J Immunol*. 2006 Oct 15;177(8):5377-85.
- 241 Findlay EG, Greig R, Stumhofer JS, Hafalla JC, de Souza JB, Saris CJ, et al. Essential role for IL-27 receptor signaling in prevention of Th1-mediated immunopathology during malaria infection. *J Immunol*. 2010 Aug 15;185(4):2482-92.
- 242 Coelho-Castelo AAM, Trombone APF, Rocha CD, Lorenzi JCC. Resposta imune a doenças infecciosas. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2009;42(2): 127-42.
- 243 Bosque F, Saravia NG, Valderrama L, Milon G. Distinct innate and acquired immune responses to *Leishmania* in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to *L. (Viannia) panamensis* infection. *Scand J Immunol*. 2000 May;51(5):533-41.
- 244 Bourreau E, Prévot G, Pradinaud R, Launois P. Interleukin (IL)-13 is the predominant Th2 cytokine in localized cutaneous leishmaniasis lesions and renders specific CD4+ T cells unresponsive to IL-12. *J Infect Dis*. 2001 Mar;183(6):953-9.

8 ANEXOS

Anexo 1 – Parecer consubstanciado do CEP.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES
--

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da expressão de citocinas na modulação da leishmaniose tegumentar americana e a interação com os achados clínico-epidemiológicos e laboratoriais

Pesquisador: Vera Lucia Pereira Chioccola

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 17000213.2.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: Instituto Adolfo Lutz
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 424.827

Data da Relatoria: 16/10/2014

Apresentação do Projeto:

Idem ao parecer anterior.

Objetivo da Pesquisa:

Idem ao parecer anterior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**1. Riscos**

A pesquisadora responsável reiterou que os procedimentos de coleta, apesar de serem desconfortáveis para o paciente, não são considerados de alto risco e só causam o desconforto no momento de execução do procedimento.

2. Benefícios

Nada a acrescentar.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Idem ao parecer anterior.

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90			
Bairro: Carqueia César	CEP: 01.245-902		
UF: SP	Município: SÃO PAULO		
Telefone: (11)3068-2859	Fax: (11)3065-3505	E-mail: cepial@lal.sp.gov.br	

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES

Continuação do Parecer: 424.827

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1. Folha de rosto

Devidamente assinada, no entanto, a pesquisadora responsável mudou a área temática para a área 1- Genética Humana, a qual não se aplica neste caso.

2. TCLE

Após revisão do termo, a pesquisadora responsável realizou as modificações requeridas e esclareceu que a coleta de duas biópsias fazem parte da metodologia tradicional, sendo uma em solução salina para cultura e PCR, e outra em formol para exame histopatológico, não configurando, portanto, a segunda amostra exclusiva para o projeto.

3. Termo de Assentimento

Documento não apresentado.

A pesquisadora responsável justificou que os pacientes menores de 18 anos serão excluídos do estudo. No entanto, vale salientar que a Resolução CNS 466/2012 nos itens II.2 e II.24 estabelece que não somente os menores de 18 anos, mas também os legalmente incapazes devem ser devidamente esclarecidos sobre sua participação na pesquisa, explicitando sua anuência sem prejuízo do consentimento de seus responsáveis legais através do Termo de Assentimento, o qual deve ser de linguagem acessível àqueles a que se destina.

No TCLE apresentado há espaço para assinatura de responsável legal em caso de incapaz, fato este que se justificaria a apresentação do Termo de Assentimento.

4. Termo de responsabilidade/confidencialidade da pesquisadora responsável

Documento apresentado.

Recomendações:

1. Em edição futura do protocolo de pesquisa corrigir a área temática indicada na Folha de rosto.
2. Embora a pesquisadora responsável afirme que a pesquisa será feita apenas com maiores de 18 anos, vale lembrar o que diz a Resolução CNS 466/2012 no seu parágrafo IV item 6.a: "Em pesquisas cujos convidados sejam crianças, adolescentes, pessoas com transtorno ou doença mental ou em situação de substancial diminuição em sua capacidade de decisão, deverá haver justificativa clara de sua escolha, especificada no protocolo e aprovada pelo CEP, e pela CONEP,

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES

Continuação do Parecer: 424.827

quando pertinente. Nestes casos deverão ser cumpridas as etapas do esclarecimento e do consentimento livre e esclarecido, por meio dos representantes legais dos convidados a participar da pesquisa, preservado o direito de informação destes, no limite de sua capacidade".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As recomendações e pendências foram atendidas.

Protocolo aprovado à luz da Resolução CNS 466, de 12 de dezembro de 2012.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo colegiado do CEPIAL em reunião ordinária de 13 de novembro de 2014.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

IX - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 01.248-902

Telefone: (11)3088-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@lal.sp.gov.br

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES

Continuação do Parecer: 424.827

SAO PAULO, 08 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Luz Marina Trujillo
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-902
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3066-2859 Fax: (11)3065-3505 E-mail: cepial@lal.sp.gov.br

Anexo 2 - Meira-Strejevitch CS, Pereira-Chiocola VL, Maia MM, Hippolito DDC, Wang HTL, Motoie G, Gomes AHS, Kanamura CT, Martines RB, de Mattos CCB, Frederico FB, de Mattos LC. Reference genes for studies in infectious parasitic diseases in five types of human tissues. *Gene Reports*. 2017 June;7:98–105.