

**Gabriela Fernandes Rodrigues**

**Expressão *in situ* de mediadores imunológicos do perfil Th17 na Leishmaniose Tegumentar Americana causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Dra. Cláudia Maria de Castro Gomes

**São Paulo**

**2021**

**Gabriela Fernandes Rodrigues**

**Expressão *in situ* de mediadores imunológicos do perfil Th17 na Leishmaniose Tegumentar Americana causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Dra. Cláudia Maria de Castro Gomes

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 03 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo**

**2021**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rodrigues, Gabriela Fernandes

Expressão in situ de mediadores imunológicos do perfil Th17 na leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* / Gabriela Fernandes Rodrigues. -- São Paulo, 2021.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Cláudia Maria de Castro Gomes.

Descritores: 1.Leishmaniose cutânea 2.*Leishmania (Leishmania) amazonensis* 3.*Leishmania (Viannia) braziliensis* 4.Imunidade celular 5.Células Th17 6.Imuno-histoquímica

USP/FM/DBD-431/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus pais, Francisco e Solange, e à minha irmã Esther, com carinho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por ser o meu farol e me permitir chegar até aqui.

Agradeço à minha querida orientadora, Dra. Cláudia Gomes, pela oportunidade e confiança de desenvolver o presente trabalho, por me incentivar e por toda a troca de conhecimento, conselhos e experiências desde a Iniciação Científica. Obrigada por me guiar na vida acadêmica.

À Profa. Márcia Dalastra Laurenti e Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett, por confiarem em mim e abrirem as portas do LIM-50/HCFMUSP para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

À Larissa dos Santos Alcântara, cujo suporte foi essencial para a realização deste trabalho. Obrigada pelo apoio, amizade, risadas e momentos de café!

Ao Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira e à Dra. Marliane Batista Campos, do IEC-Pará, por atenderem e acolherem os pacientes acometidos com LTA e por contribuírem para a realização deste trabalho.

Agradeço também aos meus amigos do LIM-50, em especial à Carmen Sandoval, Gabriela Araújo e Kadir González, pela convivência e dicas preciosas para realizar os experimentos.

À Thaíse Tomokane, por todo apoio experimental e nas análises estatísticas, e pela amizade sincera.

Ao César Moraes, pelo suporte na realização das análises e dicas estatísticas.

À Lia Negrão e Edson Tadeu, por toda ajuda e convivência no laboratório.

Às minhas amigas/irmãs Adriana Bezerra e Paula Dantas, me faltam palavras para agradecer tudo que vocês fazem por mim. Obrigada, de coração.

Aos meus pais, Francisco e Solange, e à minha irmã Esther, pela compreensão, carinho e incentivo. Amo vocês.

À CAPES (proc. 8888.377397/2019) e à FAPESP (2014/50315-0), pelo fomento à pesquisa.

Aos pacientes que concordaram em participar deste trabalho, espero que possam ter uma qualidade de vida digna.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

## Normatização adotada

Esta dissertação foi escrita de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. INTRODUÇÃO .....	2
1.2. Aspectos Gerais e Epidemiológicos .....	3
1.3. Agente Etiológico .....	3
1.4. Ciclo Biológico.....	5
1.5. Patogenia.....	6
1.5.1. Imunidade Inata.....	6
1.5.2. Imunidade Adaptativa.....	8
1.5.3. Espectro clínico da LTA causada por <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	10
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1. Objetivo geral .....	19
2.2. Objetivos específicos .....	19
<b>3.MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
3.1. Amostragem.....	21
3.2. Análise Histopatológica da lesão.....	22
3.3. Reação de Imunoistoquímica .....	22
3.4. Análise morfométrica das células imunomarcadas .....	26
3.5. Análise estatística de dados .....	26



3.5.1. Análise descritiva e estatística dos dados .....	26
3.5.2. Análise estatística de covariação (ANCOVA) .....	27
3.6. Aspectos éticos .....	28
<b>4.RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
4.1. Descrição dos aspectos sociais e clínico-epidemiológicos dos pacientes....	30
4.2. Análise histopatológica .....	34
4.3. Análise imunopatológica da lesão .....	35
4.3.1. Fator de transcrição ROR $\gamma$ t.....	37
4.3.2. Interleucina 17.....	39
4.3.3. Interleucina 6.....	41
4.3.4. Fator de Crescimento Transformante $\beta$ .....	43
4.3.5. Interleucina 1 $\beta$ .....	45
4.3.6. Interleucina 23.....	47
4.4. Análise de variância com adição de covariável (ANCOVA) Tempo de Evolução da Doença sobre as formas clínicas da LTA.....	50
4.4.1. Padronização dos dados.....	51
4.4.2. Análise de variância com adição da covariável Tempo de Evolução da Doença .....	53
4.5. Análise do efeito de TED sobre mediadores imunológicos nas alterações histopatológicas.....	56
4.5.1. Padronização das variáveis histopatológicas .....	56
<b>5.DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>6.CONCLUSÕES .....</b>	<b>72</b>
<b>7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>
<b>APÊNDICES</b>	

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
°C	graus Celsius
μm	micrômetro
mm	milímetro
±	desvio
α	alfa
β	beta
η	eta
γ	gama

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(L.)	<i>Leishmania</i>
(V.)	<i>Viannia</i>
APC	Células apresentadoras de antígeno
BSA	Albumina sérica bovina
DAB	Diaminobenzidina
DNA	ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
HE	Hematoxilina e eosina
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL	Interleucina
LCAD	Leishmaniose cutânea anérgica difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCM	Leishmaniose cutâneo-mucosa
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
<i>Lu.</i>	<i>Lutzomyia</i>
LV	Leishmaniose visceral
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
ROR $\gamma$ t	receptor órfão relacionado ao ácido retinóico
SFB	soro fetal bovino
<i>sp</i>	espécie

STAT	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TCR	Receptores do tipo Toll
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformante $\beta$
Th	células T helper
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
Treg	células T regulatórias

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1**-Ilustrações das formas promastigota (A) e amastigota (B) de *Leishmania* sp. ....4
- Figura 2** - Ciclo biológico de parasitos de *Leishmania* sp.....6
- Figura 3** - Espectro clínico e imunopatológico da LTA mostrando as espécies causadoras e os principais mediadores imunológicos envolvidos em cada forma clínica.....11
- Figura 4** - Distribuição geográfica dos casos das diferentes formas clínicas de LTA causados por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* por mesorregião do Estado do Pará, evidenciando as seis mesorregiões. ....33
- Figura 5**- Fotomicrografias de cortes histológicos de amostras de lesão de pacientes com diferentes formas de Leishmaniose Tegumentar Americana.....35
- Figura 6**- Fotomicrografias de cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana mostrando imunomarcação de células ROR $\gamma$ t+.....38
- Figura 7**- Gráfico de barras mostrando as densidades médias de células que expressaram ROR $\gamma$ t (média + erro padrão) em cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana.....39
- Figura 8**- Fotomicrografias de cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana mostrando imunomarcação de células IL-17+.....40
- Figura 9**- Gráfico de barras mostrando as densidades médias de células que expressaram IL-17 (média+erro padrão) em cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana.....41
- Figura 10**- Fotomicrografias de cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana mostrando imunomarcação de células IL-6+ .....42
- Figura 11**- Gráfico de barras mostrando as densidades médias de células que expressaram IL-6 (média+erro padrão) em cortes histológicos de

lesões de pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana.....	43
<b>Figura 12</b> - Fotomicrografias de cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana mostrando imunomarcacão de células TGF- $\beta$ +.....	44
<b>Figura 13</b> - Gráfico de barras mostrando as densidades médias de células que expressaram TGF- $\beta$ (média+erro padrão) em cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana.....	45
<b>Figura 14</b> - Fotomicrografias de cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana mostrando imunomarcacão de células IL-1 $\beta$ +.....	46
<b>Figura 15</b> - Gráfico de barras mostrando as densidades médias de células que expressaram IL-1 $\beta$ (média+erro padrão) em cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana.....	47
<b>Figura 16</b> - Fotomicrografias de cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana mostrando imunomarcacão de células IL-23+.....	48
<b>Figura 17</b> - Gráfico de barras mostrando as densidades médias de células que expressaram IL-23 (média+erro padrão) em cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana.....	49
<b>Figura 18</b> - Gráficos de barras de erro mostrando as médias em z-score de células positivas para os marcadores imunológicos do perfil Th17 nas diferentes formas clínicas da LTA (Intervalos de confiança 95%). .....	52
<b>Figura 19</b> - Participação das células Th17 na imunopatogenia da LTA causada por <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Parâmetros específicos para cada marcador imunológico empregados nas reações de imunoistoquímica .....	25
<b>Tabela 2-</b> Indicadores sociais e demográficos dos pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana causadas por <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	31
<b>Tabela 3-</b> Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana causada por <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> .. .....	32
<b>Tabela 4-</b> Análise semiquantitativa das alterações histopatológicas e parasitismo em lesões cutâneas e mucosa do espectro da LTA. ....	36
<b>Tabela 5-</b> Densidades médias de células ROR $\gamma$ t+, IL-17+, IL-6+, TGF- $\beta$ +, IL-1 $\beta$ + e IL-23+ nas diferentes formas clínicas do espectro da LTA e nas amostras de pele normal. ....	51
<b>Tabela 6-</b> Estatística descritiva das médias (padronizadas em z-score) das densidades de células imunomarcadas com ROR $\gamma$ t, IL-17, IL-6, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , e IL-23, segundo formas clínicas do espectro da LTA.....	51
<b>Tabela 7-</b> Densidades médias em z-score dos mediadores imunológicos do perfil Th17 de acordo com as categorias de alterações histopatológicas observadas no espectro da LTA.....	57

## Resumo

Rodrigues GF. Expressão *in situ* de mediadores imunológicos do perfil Th17 na Leishmaniose Tegumentar Americana causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas e imunopatológicas resultantes da interação entre as diferentes espécies de *Leishmania* e os mecanismos da resposta imune do hospedeiro. No Brasil, *Leishmania (Viannia) braziliensis* [Lb] e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* [La] são as espécies que apresentam o maior potencial patogênico para o homem, sendo responsáveis pelas formas clínicas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD) e leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM). As formas clínicas LCAD [La] e LCM [Lb] são as formas mais severas e ocupam os polos de hipo e hiperreatividade da resposta imune celular, caracterizadas pelos perfis preferencialmente Th2 e Th1, respectivamente. Outras células podem participar da patogenia da LTA, como as células Th17, que são resultantes de células TCD4+ naïve reguladas pelo fator de transcrição ROR $\gamma$ t e se diferenciam na presença de IL-6, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , e IL-23, expressando principalmente IL-17. Trabalhos na literatura sobre a participação das células Th17 na patogênese das principais formas clínicas da LTA, ainda permanecem escassos. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar a resposta imune celular mediada por células do perfil Th17, através da determinação da expressão *in situ* de mediadores imunológicos das células Th17 (ROR $\gamma$ t, IL-17, IL-6, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , e IL-23), no espectro clínico e imunopatológico da LTA causada por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Foram incluídas neste estudo, 40 biópsias de casos do espectro da LTA: LCAD (n=8), LCL [La] (n=17), LCL [Lb] (n=9) e LCM [Lb] (n=6), que foram processadas pela reação de imunoistoquímica. A densidade células imunomarcadas (células/mm<sup>2</sup>) foi determinada em sistema de análise de imagem utilizando software AxioVision 4.8 (Zeiss). Foi avaliado o efeito do Tempo de Evolução da Doença (TED) sobre a expressão de marcadores imunológicos do perfil Th17, nas diferentes formas clínicas de LTA e nas alterações histopatológicas, empregando-se a Análise de Variância com Adição de Variável Controle (ANCOVA) em software SPSS. Nossos resultados mostraram uma expressão significativamente aumentada para os marcadores ROR $\gamma$ t, IL-17, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-23, nas formas polares (LCAD e LCM); uma maior densidade de células que expressavam TGF- $\beta$  foi vista na LCAD. Quando se avaliou o efeito do TED sobre a expressão dos mediadores imunológicos no espectro da LTA, foi observado que o TED interfere na maior expressão de ROR $\gamma$ t entre as formas clínicas LCAD e LCM, e de IL-6 entre LCAD e LCL [Lb] e entre LCAD e LCM. Esse efeito do TED também foi demonstrado sobre uma maior expressão de ROR $\gamma$ t, IL-17, TGF- $\beta$  e IL-23 nos achados histopatológicos e sobre ROR $\gamma$ t e IL-6 no parasitismo. Em conjunto, a expressão dos mediadores imunológicos do perfil Th17 nas diferentes formas clínicas do espectro da LTA, bem como o efeito do TED sobre os mesmos, demonstram a participação dessa linhagem celular na imunopatogenia da LTA e na modulação das alterações histopatológicas. Deste modo, nossos achados mostram a participação de uma resposta do tipo Th17, especialmente nas formas polares e mais graves do espectro da LTA. O papel dúbio apresentado pelas células Th17 possivelmente favorece uma supressão de resposta imune e persistência parasitária na LCAD; enquanto que na LCM contribui para uma resposta imune exacerbada e escassez parasitária.



Descritores: Leishmaniose Cutânea; *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*; *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*; Imunidade Celular; Células Th17; Imunoistoquímica.

## Abstract

*In situ* expression of immunologic mediators of Th17 profile in American Tegumentary Leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

American cutaneous leishmaniasis (ACL) presents a wide spectrum of clinical manifestations and immunopathological resulting from the interaction between the different species of *Leishmania* and the mechanisms of the host immune response. In Brazil, *Leishmania (Viannia) braziliensis* [Lb] and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* [La] show the highest pathogenic potential for humans, being responsible for different clinical forms, including: localized cutaneous leishmaniasis (LCL), anergic diffuse cutaneous leishmaniasis (ADCL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL). The clinical forms ADCL [La] and MCL [Lb] are the most severe forms and represent the immune cellular response in hyposensitivity and hypersensitivity pole, characterized by Th2 and Th1 profiles, respectively. Besides, other different cells type probably are involved in the pathogenesis of ACL, such as Th17 cells, which result from naïve TCD4<sup>+</sup> cells regulated by the transcription factor ROR $\gamma$ t and differentiate in the presence of IL-6, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-23 and express mainly IL-17. However, studies on the participation of Th17 cells in the immunopathogenesis of the main clinical forms of ACL remain scarce. Therefore, the aim of this study was to characterize the cellular immune response mediated by Th17 cells profile through determination of the expression of immunological mediators (ROR $\gamma$ t, IL-17, IL-6, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , and IL-23) *in situ*, in the clinical and immunopathological spectrum of ACL caused by *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis*. Biopsies of skin and mucosal lesions from 40 ACL patients were examined: ADCL (n=8), LCL [La] (n=17), LCL [Lb] (n=9) and MCL [Lb] (n=6), by immunohistochemistry reaction. The density of immunostained cells (cells/mm<sup>2</sup>) was determined in image analysis system by using software AxionVision 4.8 (Zeiss). The effect of Disease Evolution Time (DET) on the expression of immunological markers was also evaluated in different clinical forms and histopathological changes, using Analysis of Covariance (ANCOVA) in SPSS software. Our results showed a significantly increased expression for the markers ROR $\gamma$ t, IL-17, IL-6, IL-1 $\beta$  and IL-23 in patients with the ACL polar forms (ADCL and MCL); a higher expression of TGF- $\beta$  in the form ADCL was found. It was observed that DET interferes in the higher expression of ROR $\gamma$ t between the clinical forms ADCL and MCL, and of IL-6 between ADCL and LCL [Lb] and between ADCL and MCL. The effect of DET was also demonstrated on higher expression of ROR $\gamma$ t, IL-17, TGF- $\beta$  and IL-23 in histopathological findings and on expression of ROR $\gamma$ t and IL-6 in parasitism. Together, the expression of immunological mediators of the Th17 profile in the different clinical forms of ACL spectrum, as well as the effect of DET on them, demonstrate the participation of this cell lineage in the immunopathogenesis of ACL and in the modulation of histopathological alterations. Thus, our findings show the participation of Th17-type response, especially in the polar and more severe forms of the ACL spectrum. The dubious role played by Th17 cells possibly favors a suppression of immune response and parasitic persistence in ADCL; while in MCL it contributes to an exacerbated immune response and parasite scarcity.

Descriptors: American Cutaneous Leishmaniasis; *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*; *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*; Cell immunity; Th17 cells; immunohistochemistry reaction.

# **1.INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma zoonose não contagiosa que apresenta um amplo espectro clínico e imunopatológico. É causada por protozoários da subfamília *Leishmaniinae* (JIRKŮ et al., 2012), que são transmitidos aos hospedeiros vertebrados por fêmeas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo e do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (LAURENTI, 2010; ABDELADHIM et al., 2016), afetando o homem, animais domésticos (cães e gatos) e animais silvestres (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; HEADLEY et al., 2019).

São conhecidos pelo menos quinze parasitos dessa subfamília *Leishmaniinae* causadores da LTA, amplamente distribuídos nas Américas (BASANO; CAMARGO, 2004; LAINSON, 2010). Dependendo da espécie de parasita e do perfil imunológico do hospedeiro, a leishmaniose tegumentar pode apresentar um amplo espectro clínico partindo de uma resposta imune celular equilibrada, com o desenvolvimento de lesões únicas ulceradas ou não, ou para formas mais graves.

Quando há um desequilíbrio da resposta imune celular, que pode resultar no desenvolvimento da leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD), na qual o paciente apresenta uma resposta hiporreativa frente à infecção, ou na leishmaniose cutânea mucosa (LCM), na qual há uma hiperreatividade de resposta para combater os parasitos (SILVEIRA, 2019).

Para o melhor entendimento dos mecanismos imunológicos do hospedeiro envolvidos na polarização do espectro de doença ao longo do processo de inflamação, muitos trabalhos da literatura descrevem o papel dos linfócitos Th1 e Th2, mostrando que as citocinas relacionadas a esses perfis celulares estão em desequilíbrio nas formas polares LCAD e LCM da LTA (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Contudo, novos achados mostram que outros grupos celulares também podem estar envolvidos na imunopatogenia dessa doença, como por exemplo, as células Th17 (MENEZES, 2013; ARAUJO FLORES et al.; GONZALEZ et al.; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017), tema do presente estudo.

Diante disto, fez-se necessário abordar os principais aspectos da LTA para uma breve contextualização.

### 1.1. Aspectos Gerais e Epidemiológicos

No Brasil, a LTA pode ser causada por sete espécies de *Leishmania*, seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*, sendo as duas espécies de maior interesse médico e mais frequentes: *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis* (CAMPOS et al., 2008; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; SILVEIRA, 2019).

De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS, 2020) a Leishmaniose Tegumentar é endêmica em 18 países nas Américas, com média de 54.108 novos casos por ano, sendo que o Brasil reporta o maior número de casos, seguido por Colômbia, Peru e Nicarágua.

O diagnóstico da LTA é feito a partir dos exames clínicos (caracterização da lesão e anamnese); testes sorológicos e imunológicos (reação de imunofluorescência indireta/RIFI; ensaio imunoenzimático/ELISA; Intradermorreação de Montenegro/IDRM; ou reação de imunoistoquímica); exames parasitológicos (exame direto, com visualização do parasito em esfregaço; ou isolamento em meio de cultura/animais suscetíveis); além de exames histopatológicos (a partir de biópsias, com a realização da histopatologia e imunoistoquímica). Também são realizados testes moleculares como reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir da extração de DNA para caracterização de cepas, quando possível (BRASIL, 2017; SILVEIRA, 2019).

### 1.2. Agente Etiológico

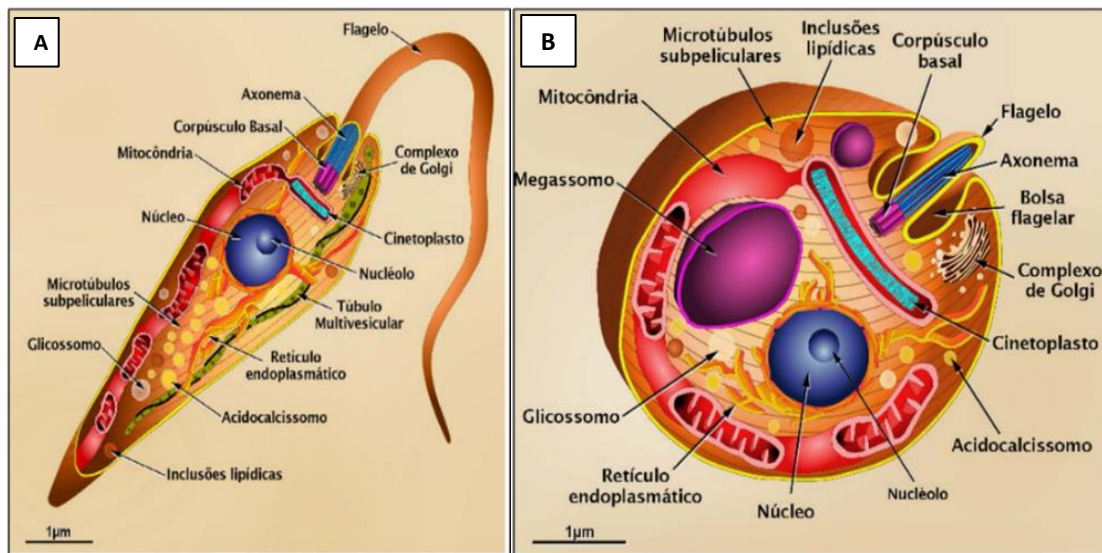
O agente causador das leishmanioses é o protozoário do gênero *Leishmania*, pertencente à subfamília *Leishmaniinae*, família *Trypanosomatidae*, ordem Trypanosomatida, classe Kinetoplastea, filo Euglenozoa (ESPINOSA et al., 2018; SILVEIRA, 2019).

Esses parasitos são caracterizados pela presença de uma mitocôndria rica em DNA, denominada cinetoplasto (SIMPSON, 1987). O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros, levando em consideração o local de desenvolvimento

do parasito no tubo digestório do flebotomíneo, sendo: subgênero *Leishmania*, que são os parasitas que colonizam apenas o intestino médio e anterior do inseto; e *Viannia*, aqueles parasitas que podem colonizar todo o intestino do inseto vetor (LAINSON E SHAW, 1987).

Entre as espécies causadoras de LTA, sete são responsáveis pela doença no Brasil, sendo que seis pertencem ao subgênero *Viannia*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiff*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) lindenbergi* e apenas uma, *L. (L.) amazonensis*, pertencente ao subgênero *Leishmania* (GONTIJO, 2003; CAMPOS et al., 2008; SILVEIRA, 2019).

O parasito apresenta duas formas de vida: uma forma promastigota (Figura 1A) que é flagelada, extracelular, de corpo alongado, com 14 a 20  $\mu\text{m}$  de comprimento, livre nos invertebrados; e outra forma amastigota (Figura 1B), de corpo ovoide, intracelular obrigatória, sem movimentos, com flagelo interno e 2,1 a 3,2  $\mu\text{m}$  de comprimento, intracelular de fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos de vertebrados (BASANO E CAMARGO, 2004).



**Figura 1** - Ilustrações das formas promastigota (A) e amastigota (B) de *Leishmania* sp. Fonte: Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania* (TEIXEIRA et al., 2013).

Esses protozoários se reproduzem, tanto dentro do vetor quanto nas células hospedeiras, por divisão binária, por mitose, gerando descendentes idênticos, embora já existam cepas híbridas causadoras de leishmanioses descritas na

literatura (JENNINGS et al., 2014; AKOPYANTS et al., 2009; ROUGERON et al., 2011; LIMA, 2016).

Esses parasitos infectam mamíferos desdentados, roedores e canídeos, sendo o homem um hospedeiro acidental, que adquire a infecção ao entrar em contato com áreas periurbanas, onde o ciclo está estabelecido (FERREIRA, 2012).

O crescente desmatamento, crescimento populacional, falta de saneamento básico, migração da população para periferias e mudanças climáticas, são alguns dos fatores que potencializam o contato do homem com áreas onde existe transmissão (BASANO; CAMARGO, 2004; VALE; FURTADO, 2005).

### **1.3. Ciclo Biológico**

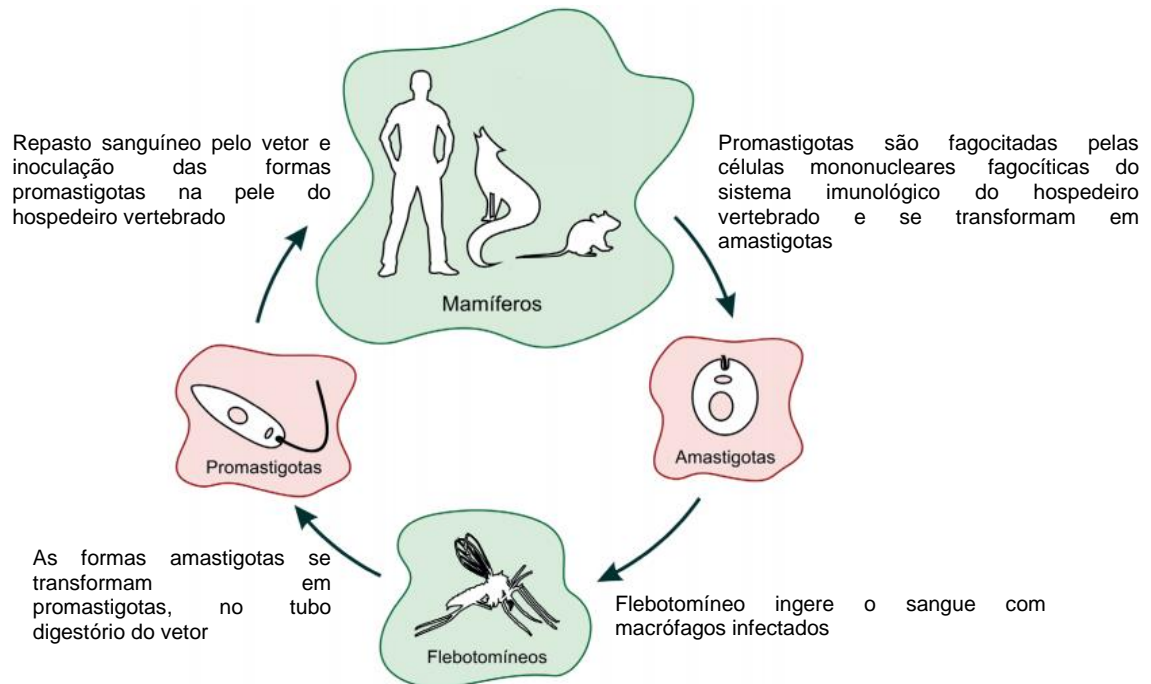
O ciclo de vida desses parasitos (Figura 2) inicia-se quando a fêmea do flebotomíneo infectada regurgita as formas promastigotas metacíclicas durante o hematofagismo em mamíferos, os quais podem ser silvestres, domésticos ou, ainda, o homem. Os protozoários, então, sofrem ação lítica do sistema complemento e são fagocitadas pelas células mononucleares fagocíticas do sistema imunológico do hospedeiro, processo que ativa a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como peróxido de hidrogênio, superóxido de hidrogênio e óxido nítrico, toxinas das quais os parasitos podem escapar ou não. Para escaparem, modificam-se em formas amastigotas nos vacúolos parasitóforos, que se fundem com grânulos lisossomais formando assim os fagolisossomos, e resistindo ao *burst* oxidativo, podem se multiplicar (SILVEIRA, et al., 2008).

Após a multiplicação das formas amastigotas, os macrófagos rompem-se e liberam as formas amastigotas, que podem, então, infectar outras células, como células de Langerhans ou macrófagos (SILVEIRA, et al., 2008).

Em um novo repasto, a fêmea do vetor pode ingerir as formas amastigotas, que vão para seu sistema digestório, e desenvolvem-se em diferentes áreas do tubo digestório.

Depois de se multiplicarem, os parasitos migram para a probóscide, bloqueando o proventrículo e podendo ser inoculadas, juntamente com a saliva, na pele do hospedeiro vertebrado (BASANO; CAMARGO, 2004), reiniciando o ciclo.





**Figura 2** - Ciclo biológico de parasitos de *Leishmania* sp. FONTE: Adaptado de: CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014.

## 1.4. Patogenia

### 1.4.1. Imunidade Inata

Após a inoculação das formas promastigostas na pele do hospedeiro vertebrado, ocorre a ativação da resposta imunológica frente ao parasito. Inicialmente, a resposta imune inata é ativada. Esta é composta por elementos humorais, como o sistema complemento (envolvido na ativação de opsoninas, formação do complexo de ataque à membrana – MAC, etc) e grupos celulares, como neutrófilos e macrófagos residentes, que são as primeiras células a migrarem para o sítio de infecção (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017; GABRIEL et al., 2019).

As formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* produzem em suas membranas moléculas de lipofosfoglicano (LPG) e de glicoproteína de 63 kDa (gp63), que podem clivar elementos do complexo de ataque à membrana (MAC) como C3b em sua forma inativa iC3b, evitando a formação desse complexo que

forma canais transmembrana cuja função é romper a membrana da célula-alvo. Além disso, a forma inativa iC3b opsoniza os parasitos, promovendo o reconhecimento pelos receptores de complemento CR3 dos macrófagos, permitindo a adesão e internalização do parasito nessas células (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998).

Após fagocitar os parasitos, na presença de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , os macrófagos podem se diferenciar pela via clássica em células M1, que são capazes de expressar espécies reativas de oxigênio como superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Também produzem a enzima óxido nítrico sintase, que é capaz de catalisar a L-arginina em óxido nítrico (NO), que também promove a eliminação dos parasitos. Além dessas moléculas, os macrófagos M1 são capazes de produzirem citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23, contribuindo para um perfil de resistência a infecções (ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018; SHEN et al., 2018).

Por outro lado, quando o microambiente inflamatório expressa citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , acontece a ativação de macrófagos alternativos, do tipo M2. Essa linhagem possui baixa capacidade de apresentar antígenos, e tem função imunoregulatória e de reparo tecidual, expressando fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), Arginase I, etc. A enzima arginase catalisa a L-arginina em uréia e L-ornitina, que são produtos importantes para a ativação da via das poliaminas, que são nutrientes essenciais para a sobrevivência e multiplicação dos parasitos de *Leishmania*, permitindo que a infecção se estabeleça. (SPILLER et al., 2016; MUXEL et al., 2017; SHEN et al., 2018).

### 1.4.2. Imunidade Adaptativa

Uma vez vencidas as barreiras de defesa inatas, acontece a ativação da resposta imune adaptativa, com a produção de mediadores imunológicos específicos contra o parasito. Essa ativação ocorre da seguinte forma: as células apresentadoras de antígeno (APC), que geralmente são células de Langerhans, dendríticas e macrófagos, processam os antígenos obtidos no local da infecção, e os expõe em sua membrana juntamente com moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). Ao migrarem para os linfonodos, as APCs entram em contato com os linfócitos T *naïve*. Quando o receptor de célula T (TCR) reconhece um antígeno de MHC, forma-se uma ligação célula-célula denominada sinapse imune, gerando assim uma cascata de ativação que, juntamente com moléculas co-estimulatórias e citocinas pró-inflamatórias, resulta na diferenciação de linfócitos T *naïve* em subpopulações ativas, que vão atuar combatendo a infecção de forma específica (WOLFRAM et al., 1996; ZUTSHI et al., 2019).

Dependendo das condições e estímulos produzidos no microambiente de inflamação, os linfócitos T *naïve* podem se diferenciar em sublinhagens celulares, como: linfócitos T citotóxicos, linfócitos T auxiliares/T helper (Th), células de memória e células T regulatórias (Treg) (MONTROYA; VELILLA; RUGELES, 2012).

Ao reconhecerem peptídeos do tipo MHC classe 1, linfócitos imaturos que apresentam moléculas de CD8 são ativados e proliferam. Essa linhagem celular atua destruindo parasitos intracelulares e também células infectadas, através de perforinas, além de produzirem altos níveis de IFN- $\gamma$ , estando associada a um perfil de proteção antiparasitária (DOBRZANSKI et al., 2004; NOVAIS; SCOTT, 2015). Contudo, as células TCD8+ podem apresentar um papel *dúbio* frente ao combate à doença, pois está associada à progressão da doença e desenvolvimento de lesões mais graves em pacientes infectados por *L.(V.) braziliensis*, resultando na forma mucosa da LTA (FARIA et al., 2009; MARETTI-MIRA et al., 2012).

Por outro lado, ao serem apresentados peptídeos do tipo MHC classe 2, os linfócitos CD4+ são estimulados e podem se diferenciar em células T helper e T regulatórias. Nos estudos iniciais sobre a imunopatogenia na infecção por parasitas

do gênero *Leishmania* no Brasil, estudos apresentaram a atividade de duas linhagens de células Thelper: T helper 1 (Th1) ou T helper 2 (Th2) (PIRMEZ et al., 1993; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

A interleucina-12, que pode ser produzida por monócitos, macrófagos, células dendríticas e células B, promove a ativação do fator STAT 1, específico da diferenciação de células Th1 (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016). Classicamente, essa subfamília de células tem sido associada a proteção à infecção por parasitos do gênero *Leishmania*, por produzir citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IFN- $\gamma$  e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que participam da ativação de macrófagos resultando na produção de óxido nítrico e consequente eliminação do parasito (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998).

A interleucina-4, produzida por basófilos e eosinófilos, auxilia a reduzir a produção de citocinas que participam da ativação da resposta Th1. Além disso, promove a ativação do fator de transcrição STAT6, específico de diferenciação da linhagem celular do tipo Th2 (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016). Uma vez ativadas, as células Th2 promovem a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 e TGF- $\beta$ , que atuam inibindo a produção de IFN- $\gamma$  e a consequente inibição de macrófagos, resultando na persistência do parasito (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

Trabalhos mais recentes descreveram a presença de outros grupos celulares na imunopatogenia da LT, evidenciando que outras células além da Th1 e Th2 podem contribuir para diferentes manifestações clínicas, como por exemplo, a influência das células T regulatórias e Th17 (BOAVENTURA et al., 2010; KATARA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014).

Para controlar a resposta inflamatória das células T e manter o equilíbrio da resposta imune celular no combate ao parasitismo, mecanismos reguladores são necessários. Uma linhagem específica de células T, as T-regulatórias (Treg), que podem ser do tipo Foxp3+ naturais (CD4+CD25+) ou induzíveis (CD4+CD25-), atuam na produção de citocinas regulatórias como IL-10 e TGF- $\beta$ , controlando assim a proliferação de células T e a produção de citocinas (RODRIGUES et al., 2014; MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016).

A IL-10, que pode ser produzida por macrófagos, eosinófilos, células Treg e Th2, limita a resposta imune do tipo Th1, pela supressão de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , além de

diminuir a capacidade de apresentação de antígenos e conseqüentemente está associada à persistência do parasito (Maspi et al., 2016). Atua também na ativação de macrófagos pela via alternativa, levando à diferenciação de macrófagos do tipo M2, que apresentam baixa capacidade leishmanicida (ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018).

O TGF- $\beta$  afeta a expressão de IFN- $\gamma$ , IL-12 e de outras citocinas pró-inflamatórias, limitando a atividade de células fagocíticas que eliminam patógenos intracelulares. Portanto, em conjunto com a IL-10, esta citocina inibe a atividade antiparasitária. Por outro lado, esses fatores imunológicos são cruciais para minimizar os danos teciduais provocados pela resposta Th1 exacerbada (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016; MONTOYA; VELILLA; RUGELES, 2012).

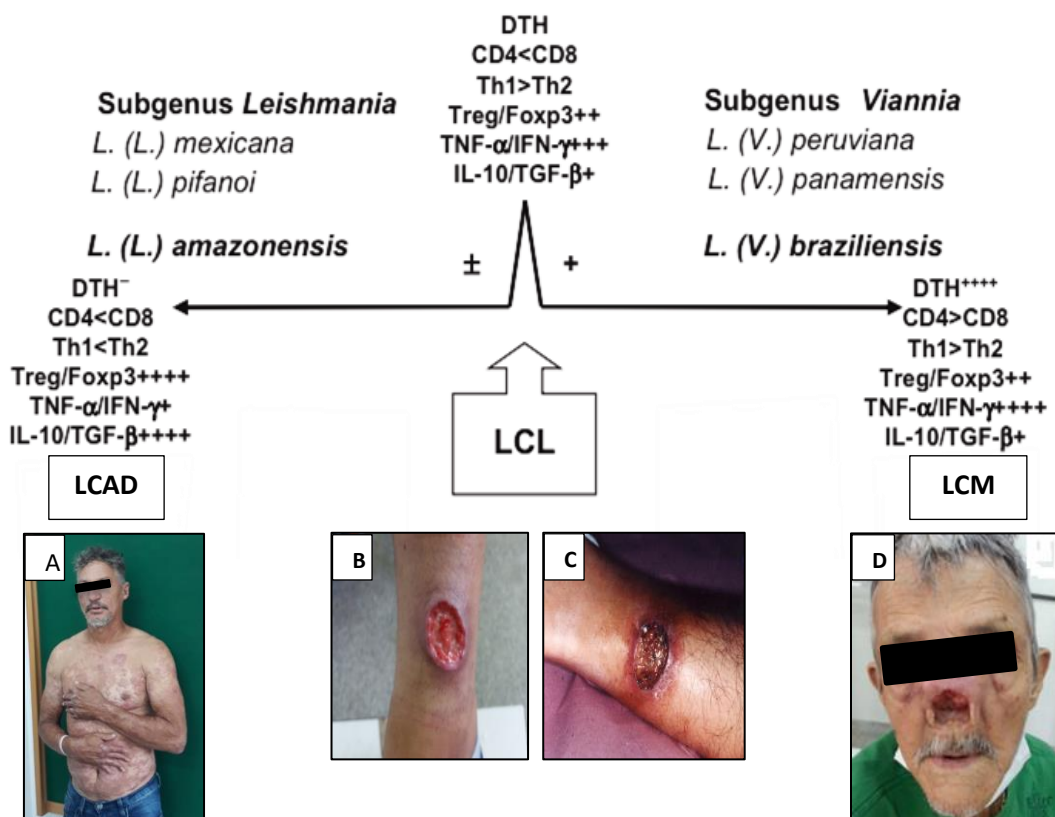
Outra linhagem de células T descrita e que pode estar presente no processo infamatório na infecção causada por *Leishmania*, são as células Th17. As células Th17 (CD4+ROR $\gamma$ t+IL17+) são a principal fonte de produção de IL-17, que será abordada a seguir com mais detalhes.

Portanto, a dicotomia de resposta celular (Th1 e Th2) tem sido questionada na LTA, uma vez que em estudos clínicos e experimentais o que se observa é uma mistura de respostas celulares Th1, Th2 Th17 e Treg, e o desequilíbrio dessas respostas pode resultar em diferentes formas clínicas da doença (SACKS; NOBENTRAUTH, 2002; GONZALEZ, 2020b).

#### **1.4.3. Espectro clínico da LTA causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis***

Dependendo dos mecanismos de escape da espécie inoculada e do perfil imunológico do paciente, podem ocorrer diferentes manifestações clínicas da doença, ou seja, quando há um desequilíbrio da resposta imune celular, pode ocorrer um agravamento da doença, levando à diferentes formas clínicas. A LTA apresenta amplo espectro de manifestações (descrito por SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004), conforme esquematizado na (Figura 3) variando de infecção assintomática e/ou subclínica em indivíduos naturalmente resistentes, até formas sintomáticas em indivíduos susceptíveis, podendo acometer a pele e/ou mucosa, sendo classificadas em: *leishmaniose cutânea localizada* (LCL), de perfil imune

celular bem equilibrado no centro do espectro, com hipersensibilidade moderada (Reação Intradérmica de Montenegro positiva/IDRM+), mas também, pelas formas graves, *leishmaniose cutaneomucosa* (LCM) causada pela *L. (V.) braziliensis* e a *leishmaniose cutânea anérgica difusa* (LCAD) causada por *L. (L.) amazonensis*. A LCM, ligada ao pólo imune celular hiperreativo, com forte hipersensibilidade (IDRM++++) e, a LCAD, ao pólo imune celular hiporreativo, com fraca ou ausente hipersensibilidade (IDRM-).



**Figura 3** - Espectro clínico e imunopatológico da LTA mostrando as espécies causadoras e os principais mediadores imunológicos envolvidos em cada forma clínica. **LCAD**: leishmaniose anérgica cutânea difusa; **LCL [La]**: leishmaniose cutânea localizada causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; **LCL [Lb]**: leishmaniose cutânea localizada causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e **LCM**: leishmaniose cutâneo mucosa. Fonte: espectro, LCL [Lb] e LCM: adaptado de Silveira et al., 2004, 2019; Imagens LCAD e LCL [La] gentilmente cedidas pela Dra. Marliane Campos e editadas pelo autor.

A leishmaniose cutânea localizada (LCL): causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, é forma central do espectro que histologicamente apresenta, dependendo da espécie do parasito, infiltrado rico em macrófagos vacuolizados e

bastante parasitados (SILVEIRA et al., 2008; SILVEIRA, 2019). O paciente apresenta lesões cutâneas “com bordas elevadas e infiltradas, com fundo granular, indolor e não pruriginosas [...] podem ocorrer também outras apresentações, como lesões polipoides, nodulares, verrucoides e impetigoides” (FERREIRA, 2012), que aumentam de diâmetro com a progressão da doença, podendo haver linfadenopatia regional. A resposta imune é equilibrada entre Th1 e Th2, caracterizada pela presença de linfócitos T CD8+, expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , e pouca expressão de citocinas imunorregulatórias como TGF- $\beta$  e IL-10 (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

A leishmaniose mucocutânea, causada por *L. (V.) braziliensis*, corresponde ao polo hiperreativo, com alta produção de linfócitos (principalmente TCD4+) e infiltrado denso e difuso, cuja forma clínica é representada pela necrose do tecido mucoso. Apresenta uma resposta imune celular exacerbada de linfócitos Th1, com alta expressão de mediadores pró-inflamatórios como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , o que pode contribuir para o dano tecidual observado. Alguns estudos demonstram a presença de células TregFoxp3 e pouca expressão de citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; SILVEIRA et al., 2008).

A forma cutânea anérgica difusa (LCAD), causada por *L. (L.) amazonensis*, corresponde ao polo oposto à LCM, isto é, representa uma resposta imunológica hiporreativa, na qual o sistema imune demonstra fragilidade de controle da infecção; o tecido é caracterizado por um infiltrado macrofágico vacuolizado, bastante parasitado, com baixa reação linfoplasmocitária. A forma clínica é representada por nódulos não ulcerosos disseminados principalmente na face e nas extremidades superiores e inferiores. Apresenta aumento de produção de citocinas imunorregulatórias como TGF- $\beta$  e IL-10, e baixa ou nenhuma expressão de citocinas pro-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Alguns estudos têm demonstrado a presença de linfócitos regulatórios TregFoxp3 (COSTA et al., 2009; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; SILVEIRA et al., 2008).

#### **1.4.4. O papel das células Th17**

As células do tipo Th17 são resultantes de células TCD4+ *naïve* que expressam o fator de transcrição ROR $\gamma$ t (receptor nuclear associado ao ácido

retinóico  $\gamma$ t). Sua diferenciação clássica é estimulada por IL-6 e TGF- $\beta$ , que estão associadas à fase inicial da diferenciação, e IL-1 $\beta$  e IL-23, que estão associadas à manutenção e expansão das células Th17. Uma vez diferenciadas, essas células expressam principalmente IL-17 e IL-22 (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017).

O fator de transcrição ROR $\gamma$ t é uma isoforma do ROR $\gamma$ , pertencente à família do receptor órfão relacionado ao ácido retinóico (que inclui ROR $\alpha$  e ROR $\gamma$ ). Esse fator é expresso em células da resposta imune, como tímócitos e células Th17, por exemplo. A expressão desses receptores é estimulada pela ativação da proteína STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription) (DONG, 2008; DONG, 2009; CASTRO et al., 2017).

A interleucina 6, induz a translocação de STAT3 e de ROR $\gamma$ t para o núcleo, resultando na diferenciação de células Th17. Mediadores imunológicos como TGF- $\beta$  e IL-21 induzem a produção de IL-23 e do receptor de IL-23, que atuam na manutenção, expansão e sobrevivência dessas células, resultando na diferenciação de células Th17 pela via clássica (BUNTE; BEIKLER, 2019; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017).

Porém, na ausência de TGF- $\beta$ , a combinação de mediadores como IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-23 também podem induzir à produção de precursores de diferenciação desse tipo celular, pela via alternativa, que possivelmente tem um caráter mais patogênico que a via clássica, mostrando uma plasticidade funcional dessas células dependendo do ambiente inflamatório (GHORESCHI et al., 2010; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017; BUNTE; BEIKLER, 2019).

A interleucina-17 é produzida principalmente por células Th17, e por outras populações celulares, como: células TCD8+; linfócitos T $\gamma\delta$  e células NKT. Essa citocina participa da regulação positiva/negativa de citocinas pró e anti-inflamatórias, dependendo do microambiente inflamatório, apresentando assim um papel complexo em diferentes doenças autoimunes e infecciosas. A IL-17 também atrai neutrófilos para o local da infecção, pela estimulação da G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos), promovendo a eliminação do patógeno (HU et al., 2010; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017; KUWABARA et al., 2017; QUARESMA, 2019; BERNARDINI et al., 2020).



Essa citocina pertence a uma família composta por IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (também denominada IL-25) e IL-17F, que podem apresentar diferentes funções, ainda não totalmente esclarecidas. Sugere-se que IL-17A e IL-17F tenham papéis inflamatórios e uma sobreposição de funções. IL-17E está envolvida com a resposta de células do tipo Th2, e os demais membros dessa família (IL-17B, IL-17C e IL-17D) ainda permanecem com a função desconhecida (DONG, 2009; BERNADINI et al., 2020).

Vários estudos indicam que a IL-17 apresenta um papel importante na patogênese de diversas doenças, desde autoimunes, como: esclerose múltipla, artrite reumatoide, psoríase, etc (SHABGAH; FATTAHI; SHAHNEH, 2014) e em doenças inflamatórias: como tuberculose e leishmaniose.

Na psoríase, doença caracterizada pela hiperplasia de queratinócitos na pele, a IL-17 está associada à exacerbação da doença, por promover a expansão de queratinócitos e acantose, além do recrutamento de células Th17 e células dendríticas, que expressam IL-23, o que promove um feedback positivo na produção de células Th17. Além disso, promove a redução de moléculas de adesão celular, associando essa citocina à patogênese da doença (DENG; CHANG; LU, 2016; KUWABARA et al., 2017; BERNARDINI et al., 2020).

A IL-17 também tem sido associada a doenças infecciosas causadas por bactérias como: comprometimento gastrointestinal por *Citrobacter rodentium* e *Salmonella typhimurium*, tuberculose por *Mycobacterium tuberculosis*, hanseníase por *Mycobacterium leprae*, etc (JIN; DONG, 2013; COULTER et al., 2017; TARIQUE et al., 2018).

À semelhança da LTA, a Hanseníase, é uma doença espectral causada por *Mycobacterium leprae*, que pode apresentar as diferentes formas clínicas: indeterminada e dimórfica (formas centrais do espectro) ou as formas polares e mais graves: Tuberculóide, caracterizada por um perfil de resposta imune celular do tipo Th1, com baixo parasitismo; e a forma Virchowiana/Lepromatosa caracterizada por uma resposta do tipo Th2, com alta carga bacilar (FONSECA et al., 2017).

Ao analisar amostras de pele de pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase por imunohistoquímica para os marcadores IL-17, fator de crescimento do

nervo (NGF) e receptor do fator de crescimento do nervo (NGFR), Aarão et al. (2016), encontraram uma maior expressão de IL-17 nos casos com a forma tuberculóide, mostrando que essa citocina apresenta uma ação pró-inflamatória, associada à mediadores como TNF- $\alpha$  e IL-6, levando à resistência à infecção. Por outro lado, encontraram uma baixa expressão de IL-17 na forma virchowiana, o que pode estar associado à baixa expressão de mediadores pró-inflamatórios desse perfil de susceptibilidade à infecção. Também encontraram uma relação negativa entre IL-17 e NGF e entre IL-17 e NGFR, sugerindo que essa citocina regula a expressão desses fatores, participando do dano neural observado nessas formas clínicas.

Foi demonstrado, em estudo com pacientes com a doença de Jorge Lobo, o aumento da expressão de citocinas envolvidas na diferenciação de células Th17, como: IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-23, bem como a produção de IL-17. Porém, a participação dessas células em desequilíbrio com outras linhagens como as células TregFoxp3 pode ocasionar numa resposta imune menos efetiva contra o agente etiológico (KANASHIRO-GALO et al., 2016). Além disso, como demonstrado por Azevedo et al. (2015), mesmo na presença de produtos da Th17, IL-17 e IL-17F, não houve controle dos fungos de *Lacazia loboi*, o que pode ser associado a uma fraca resposta do tipo Th1, que corrobora para a eliminação do agente etiológico.

O papel da IL-17 também tem sido associada à patogênese Leishmanioses. Estudos utilizando amostras de soro de pacientes com Leishmaniose Visceral (LV) apontam para uma maior expressão de IL-17 nesses pacientes e, experimentalmente, sugere-se um papel protetor dessa citocina frente à infecção, sendo um possível alvo terapêutico para o tratamento da LV (BABALOO et al., 2020).

Kumar et al., (2019), trataram profilaticamente camundongos Balb/c com IL-17A e IFN- $\gamma$  recombinantes, sozinhos ou em conjunto, e os infectaram com *L. donovani*. Após 45 dias de infecção, foram observadas cargas parasitárias menores no fígado, baço e medula dos camundongos tratados apenas com IL-17 e com IL-17 e IFN- $\gamma$  combinados, comparados ao grupo controle (sem tratamento profilático). Além disso, ao analisar a expressão de citocinas por PCR tempo real, encontraram uma regulação positiva da expressão de citocinas do perfil Th1 (iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-12

e IL-2) nos grupos que receberam o tratamento, sugerindo assim, um papel protetor da IL-17A na LV, e também que a ativação de macrófagos por  $\text{INF-}\gamma$  seja facilitada por ela.

No que se refere à LTA, estudos com modelos experimentais mostraram que a IL-17 pode estar associada à susceptibilidade à infecção.

Lopez et al. (2009), ao infectarem com *L. major* camundongos BALB/c deficientes de IL-17, observaram que os animais deficientes apresentaram lesões menores comparados ao grupo controle, e também uma diminuição no infiltrado de neutrófilos, mostrando o possível envolvimento da IL-17 com a gravidade da doença.

Gonzalez-Lombana et al., (2013), a fim de identificar citocinas envolvidas na patogenia da leishmaniose, infectaram camundongos depletados de IL-10 com *L. major*, e encontraram níveis elevados de IL-17 associados à indução da patologia, demonstrando assim uma participação da IL-17 na patogenia da LTA, abrindo a possibilidade de ser um alvo terapêutico.

Martins et al (2020) estimularam *in vitro* macrófagos provenientes de camundongos C57BL/6 com IL-17, e posteriormente os infectou com promastigotas de *L. major*. Encontraram que a IL-17 favoreceu a sobrevivência do parasita nas células hospedeiras e que está associada ao desenvolvimento de lesões. Ao estimular macrófagos com IL-17 e infectá-los com parasitas de *L. (L.) amazonensis*, Sousa et al. (2014) encontraram que essa citocina aumentou a atividade da arginase e aumentou a carga parasitária. Esses dados corroboram estudos que mostram que a IL-17 pode estar induzindo a polarização de macrófagos do tipo M2, que têm função imunorregulatória e de reparo tecidual, como descrito por Shen et al. (2018), ao demonstrar que a IL-17 induz à diferenciação dessas células pela ativação da  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ .

Em humanos, um estudo utilizando amostras de soro de 33 pacientes provenientes do estado do Amazonas, infectados com diferentes espécies e subgêneros de *Leishmania* [*L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) naiffi* ou *L. (V.) guyanensis* e de *Leishmania* sp], mostrou níveis diferentes de IL-2,  $\text{TNF-}\beta$ ,  $\text{INF-}\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17, por citometria de fluxo, sendo que a IL-17 estava mais expressa em amostras de LT causada por *L. (V.) guyanensis* do que em amostras causadas por *L. (L.) amazonensis* (ESPIR et al., 2014).

Bacellar et al. (2009) coletaram células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes acometidos com LCL e LCM causadas por *L. (V.) braziliensis*, e as estimularam com antígeno solúvel anti-*Leishmania*. Ao analisar a expressão de citocinas como IL-17, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , encontraram altas concentrações de IL-17 nos pacientes com as diferentes formas da LT comparados ao grupo controle, e uma correlação positiva entre IL-17 e TNF- $\alpha$ , sugerindo que a IL-17 pode estar contribuindo para o dano tecidual e severidade da doença.

Portanto, as células Th17 estão envolvidas na patogênica da LTA, e têm como função primária a eliminação de microrganismos que não são adequadamente destruídos pelas células Th1 ou Th2 (BANERJEE et al., 2016), no entanto, podem ter um papel ambíguo, como demonstrado acima.

O entendimento da patogênica da LTA, principalmente, no que diz respeito ao desenvolvimento dessas diferentes formas clínicas, representa um grande desafio no sentido de aprimorar o conhecimento sobre essa protozoose, em razão da complexa interação entre as várias espécies de *Leishmania* causadoras da doença e a resposta imune do homem.

Diante do exposto e da necessidade de uma melhor compreensão acerca da participação das células do perfil Th17 na imunopatogênese no amplo espectro da LTA, no presente estudo foi avaliada a expressão de mediadores imunológicos envolvidos na diferenciação de células Th17, caracterizando a participação desse grupo celular no espectro da doença, visando aprimorar nosso conhecimento a respeito dos fatores imunológicos que podem estar modulando o perfil de resposta imune do hospedeiro frente às espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* no espectro clínico e imunopatológico da LTA.

## **2.OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Caracterizar a expressão de mediadores imunológicos do perfil Th17 em lesão de pacientes com diferentes formas clínicas de Leishmaniose Tegumentar Americana causadas por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Analisar os aspectos histopatológicos das lesões de pacientes com diferentes formas clínicas de LTA por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*;
- Determinar a densidade de células que expressam ROR $\gamma$ t, IL-17, IL-6, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  e IL-23 no amplo espectro clínico-imunológico da LTA causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*;
- Avaliar o efeito do tempo de evolução da doença sobre a expressão de citocinas nas diferentes formas clínicas da LTA causadas por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*;
- Avaliar o efeito do tempo de evolução da doença sobre a produção dos mediadores imunológicos do perfil Th17 de acordo com os parâmetros histopatológicos (tipo de infiltrado inflamatório, distribuição do infiltrado inflamatório, granuloma e parasitismo).

### **3.MATERIAL E MÉTODOS**

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Amostragem

Foram realizadas biópsias e coletados fragmentos de lesão de 40 pacientes acometidos com diferentes formas clínicas de LTA, sendo: oito com LCAD [*L.(L.) amazonensis*]; 17 com LCL [*L.(L.) amazonensis*]; nove com LCL [*L.(V.) braziliensis*]; e seis com LCM [*L.(V.) braziliensis*] no Ambulatório do Laboratório de Leishmanioses “Prof. Dr. Ralph Lainson”, Instituto Evandro Chagas-Pará. Foi preenchida uma ficha clínico-epidemiológica para cada paciente, com dados referentes à idade, sexo, raça/etnia, escolaridade, ocupação, provável local de infecção e tempo de evolução da doença. Todos os pacientes com diagnóstico de LTA confirmado receberam tratamento. Esta etapa foi realizada pelo Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira e equipe.

Além disso, foram coletadas amostras de retalho cirúrgico de cirurgia plástica de indivíduos não infectados, para controle - pele normal, e doados pelo Laboratório de Microcirurgia e Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM-04/HCFMUSP);

As amostras dos pacientes foram divididas em dois fragmentos:

- 1) Um fragmento foi usado para a identificação molecular das espécies de *Leishmania*, usando a técnica de análise do polimorfismo pela clivagem do produto da reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP) tendo com alvo o gene codificador da proteína de choque térmico de 70kD (hsp70), e as amostras foram comparadas com cepas de referência dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* para a identificação da espécie infectante (GRAÇA et al., 2012; ZAMPIERI et al., 2016). Essa identificação específica foi realizada no Setor de Biologia Molecular do Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas LIM-50/HCFMUSP pela Dra. Ana Carolina Stocco de Lima.
- 2) Outro fragmento foi usado para as análises histopatológica e imunopatológica, sendo fixado em solução de formaldeído tamponado a 10%. Em seguida foi desidratado e emblocado em parafina, e posteriormente foram



feitos cortes de 4-5  $\mu\text{m}$ , que foram colocados em lâminas silanizadas e processado pelas técnicas usuais de histologia. As lâminas com cortes histológicos de fragmento de pele de cada paciente foram divididas em dois grupos: um para a análise histopatológica e outro para a análise imunopatológica.

### **3.2. Análise Histopatológica da lesão**

Uma lâmina com cortes histológicos de fragmento de pele de cada paciente acometido com LTA foi processada e corada com Hematoxilina-Eosina (HE). Em seguida as lâminas foram observadas em microscópio ótico Axioskop 2 Plus Zeiss e realizada análise histopatológica descritiva das alterações histológicas na epiderme e derme, caracterizando-se o tipo e distribuição do infiltrado inflamatório, tipos celulares encontrados no infiltrado inflamatório, presença/ausência de granuloma e parasitismo. Além disso, foi feita uma análise semi-quantitativa das características da resposta inflamatória tecidual, atribuindo-se cruzes de acordo com a intensidade observada, variando de: (-) negativo/ausente, (+) leve/discreto, (++) moderado e (+++) intenso (RIDLEY; RIDLEY, 1983).

### **3.3. Reação de Imunoistoquímica**

As demais lâminas com cortes histológicos de fragmentos de pele de indivíduos saudáveis e acometidos com LTA foram utilizadas para a análise imunopatológica. A avaliação da resposta imune celular nas lesões baseou-se na análise morfométrica de células imunomarcadas a partir da reação de imunoistoquímica, realizadas no laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50).

Foram realizadas as reações para anticorpos contra: ROR $\gamma$ t (policlonal, ab78007), IL-17 (policlonal, sc7927), IL-6 (monoclonal SC-130326), TGF- $\beta$  (policlonal SC-146), IL-1 $\beta$  (policlonal, ab2105) e IL-23 (monoclonal C-3, SC-271279), seguindo as recomendações dos fabricantes adequadas aos protocolos

desenvolvidos no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas do LIM-50/HCFMUSP, descritos a seguir:

As lâminas com os cortes foram colocadas em um banho de xilol à temperatura ambiente, por quinze minutos para desparafinização, e em seguida foi realizada a hidratação seriada em banhos de álcool com concentração decrescente (100°, 70°).

Depois, para minimizar a reação de fundo e marcações inespecíficas, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena utilizando peróxido de hidrogênio (10V), em dez banhos de três minutos cada.

Em seguida, fez-se a recuperação antigênica específica para cada anticorpo, utilizando as seguintes soluções-tampão: citrato à concentração 10mM pH6 para os protocolos de ROR $\gamma$ t, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-23; EDTA 0,5M pH8 para o protocolo de IL-17; e Tris-EDTA 1mM pH9 para o protocolo de TGF- $\beta$ . Para a recuperação, as lâminas foram mergulhadas nas soluções-tampão correspondentes em panela de pressão, no caso de ROR $\gamma$ t, e em panela à vapor, para os demais marcadores (Tabela 1).

Após a recuperação antigênica, quando as lâminas resfriaram e chegaram à temperatura de 55°C, foi feito mais um bloqueio dos sítios inespecíficos, desta vez utilizando leite desnatado Molico a 6% em câmara úmida a 37°C nos seguintes tempos: 1 hora para os marcadores ROR $\gamma$ t e TGF- $\beta$ ; e 40 minutos para IL-17, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-23. Em seguida realizou-se outro bloqueio, utilizando-se soro fetal bovino (SFB) a 10% em câmara úmida a 37°C por trinta minutos para todos os marcadores.

A próxima etapa foi a incubação dos cortes com os anticorpos primários. As lâminas foram secas ao redor dos cortes histológicos e foram pipetados os anticorpos primários anti-ROR $\gamma$ t, anti-IL-17, anti-IL-6, anti-IL-23, anti-IL-1 $\beta$  e anti-TGF- $\beta$  previamente diluídos em BSA. A incubação se deu overnight a 4°C em câmara úmida (sumarizados na Tabela 1).

Na etapa seguinte, as lâminas foram lavadas com solução tampão salina PBS Tween e utilizou-se o sistema de amplificação e revelação NOVOLINK™ polymer detection systems (RE7280-K—Leica Biosystems, Newcastle, UK), para detectar a presença das citocinas investigadas. Para isso, as lâminas foram

incubadas com o anticorpo secundário em câmara úmida a 37°C nos seguintes tempos: 1 hora para ROR $\gamma$ t, IL-1 $\beta$  e TGF- $\beta$ ; e 30 minutos para IL-17, IL-6 e IL-23.

Depois os cortes foram incubados com o polímero (NOVOLINK<sup>TM</sup>) em câmara úmida a 37°C durante 45 minutos para todos os marcadores. Para revelar a reação, foi adicionado as amostras o substrato cromogênico DAB + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (diaminobenzidine with hydrogen peroxide—K3468—DakoCytomation) por 5 minutos, conferindo uma coloração castanho/marrom às amostras de tecido imunomarcadas.

Após a revelação, as lâminas foram lavadas em água destilada e contra coradas com hematoxilina de Harris no caso de marcadores presentes no citoplasma (IL-17, IL-6, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  e IL-23) ou eosina no caso de ROR $\gamma$ t, cuja imunomarcação é nuclear. As lâminas foram desidratadas em banhos seriados com concentração de álcool crescente (70°, 100°) e depois em xilol, e montadas com lamínula e resina sintética.

**Tabela 1-** Parâmetros específicos para cada marcador imunológico empregados nas reações de imunistoquímica

<b>Anticorpo</b>	<b>Recuperação Antigênica</b>	<b>Incubação Anticorpo</b>	<b>Sistema de Revelação</b>
Anti-ROR $\gamma$ t (policlonal, ab78007)	Tampão citrato 10mM pH6; panela de pressão; 4 minutos	Diluição [1:250], incubação em geladeira por 15-18 horas a 4°C	Novolink  (RE7280-K—Leica Biosystems, Newcastle, UK)
Anti-IL-17 (policlonal, sc7927)	Tampão EDTA 0,5mM pH8; panela à vapor (96-99°C); 30 minutos	Diluição [1:200], incubação em geladeira por 15-18 horas a 4°C	Novolink  (RE7280-K—Leica Biosystems, Newcastle, UK)
Anti-IL-6 (Monoclonal SC-130326)	Tampão citrato 10mM pH6; panela à vapor (96-99°C); 30 minutos	Diluição [1:200], incubação em geladeira por 15-18 horas a 4°C	Novolink  (RE7280-K—Leica Biosystems, Newcastle, UK)
Anti-TGF- $\beta$ (Policlonal SC-146)	Tampão Tris-EDTA 1mM pH9; panela à vapor (96-99°C); 35 minutos	Diluição [1:100], incubação em geladeira por 15-18 horas a 4°C	Novolink  (RE7280-K—Leica Biosystems, Newcastle, UK)
Anti-IL-1 $\beta$ (Policlonal, ab2105)	Tampão citrato 10mM pH6; panela à vapor (96-99°C); 30 minutos	Diluição [1:800], incubação em geladeira por 15-18 horas a 4°C	Novolink  (RE7280-K—Leica Biosystems, Newcastle, UK)
Anti-IL-23 (monoclonal C-3, SC-271279)	Tampão citrato 10mM pH6; panela à vapor (96-99°C); 30 minutos	Diluição [1:500], incubação em geladeira por 15-18 horas a 4°C	Novolink  (RE7280-K—Leica Biosystems, Newcastle, UK)

### **3.4. Análise morfométrica das células imunomarcadas**

A avaliação da resposta imune celular se deu a partir da análise morfométrica quantitativa de células imunomarcadas na reação de imunohistoquímica, com detecção de coloração castanho/marrom no núcleo (depósito do DAB), no caso das células positivas para ROR $\gamma$ t, e a eosina que tem afinidade com elementos básicos do citoplasma, corou em cor-de-rosa. Nos demais marcadores, foi detectada coloração castanho/marrom no citoplasma das células positivas. O material processado nas reações de IHQ foi analisado em microscópio Axioskop 2 Plus Zeiss, em aumento de 400x, acoplado a um microcomputador e fotografados cerca de dez campos por caso utilizando o software AxioVision 4.8. As células imunomarcadas foram quantificadas utilizando o software Image J, e então foi feito o cálculo da densidade de células positivas, que foi resultante da média de células imunomarcadas dividida pela área da foto (0,03536412 mm<sup>2</sup>).

### **3.5. Análise estatística de dados**

#### **3.5.1. Análise descritiva e estatística dos dados**

Para os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes (idade, sexo, tempo de evolução da doença), bem como para as alterações histopatológicas da lesão (infiltrado inflamatório, formação de granuloma), foi realizada uma análise descritiva e são apresentados em forma de tabelas.

Para os dados obtidos a partir das reações de imunohistoquímica, foram determinadas as densidades médias de células imunomarcadas (células/ mm<sup>2</sup>) por citocina e por paciente e foram armazenadas em banco de dados e submetidas à análise estatística utilizando o programa GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para cumprir os pré-requisitos de normalidade necessários para realizar a Análise de Variância (ANOVA), testes de normalidade Shapiro-Wilk foram aplicados, para determinar a distribuição dos dados. Após a determinação da normalidade, utilizou-se como pós-teste para identificar possíveis diferenças

estatisticamente significantes o Teste Tukey para grupos com distribuição normal, e o Teste Dunn para grupos com distribuição assimétrica, adotando-se nível de significância  $p \leq 0,05$  (NORMANDO; TJÄDERHANE; QUINTÃO, 2010). As densidades médias de células imunomarcadas com cada marcador imunológico por forma clínica estão apresentadas em gráficos de barras, apresentando medidas de tendência central (média) e de dispersão (erro padrão), construídos também no programa GraphPad Prisma 5.0.

### **3.5.2. Análise estatística de covariação (ANCOVA)**

Foi feita a Análise de Covariância (ANCOVA), utilizando o software SPSS, para avaliar se a forma clínica da LTA influenciava na expressão dos mediadores imunológicos do perfil Th17 quando se covariava para Tempo de Evolução da Doença (TED), ou seja, se avaliou a magnitude do efeito do TED sobre a expressão dos marcadores imunológicos.

A ANCOVA verifica o efeito de uma ou mais variáveis independentes sobre uma variável contínua controlando uma ou mais covariantes contínuas. No presente trabalho, adotou-se como variável independente categórica as formas clínicas da LTA (LCAD, LCL[La], LCL[Lb] e LCM); como variáveis dependentes: as densidades de células positivas para cada marcador imunológico (ROR $\gamma$ t, IL-17, IL-6, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  e IL-23), testadas individualmente); e como covariável: TED (dado em meses).

Além disso, utilizou-se a ANCOVA para avaliar o efeito do TED sobre as variáveis histopatológicas: “tipo de infiltrado inflamatório”, “distribuição do infiltrado inflamatório”, “granuloma” e “parasitismo”.

Para fins de correção da normalidade e homogeneidade (pré-requisitos estatísticos da ANCOVA), as densidades de células imunomarcadas obtidas por campo fotografado foram transformadas em z-score, e submetidas aos testes de normalidade por Kolmogorov-Sminorv e Shapiro-Wilk, adotando valor de significância 0,005. As densidades médias de células imunomarcadas transformadas em z-score foram apresentadas em gráfico de barras de erro, mostrando os intervalos de confiança (IC) de 95%, distribuídas por forma clínica.

A partir da análise de covariação, o tamanho do efeito da covariável TED sobre as variáveis: “expressão de citocinas”, “tipo de infiltrado inflamatório”, “distribuição do infiltrado inflamatório”, “granuloma” e “parasitismo” foi dado em  $\eta$  (eta) parcial quadrado, cujo tamanho varia de 0 a 1, na qual são considerados de maior magnitude efeitos maiores ou iguais a 0,3. Devido à raridade de casos de LCAD [La] e LCM [Lb], foram considerados como impactantes todos os valores de  $\eta$  que apresentassem um valor de “p” significativo ( $p=0,000$ ).

Como os dados foram padronizados em z-score, adotou-se como pós-teste o Post-hoc Bonferroni, teste considerado mais rígido, para se verificar possíveis diferenças estatisticamente significantes entre a expressão dos mediadores imunológicos nas diferentes formas clínicas, após a ANCOVA.

### **3.6. Aspectos éticos**

Os pacientes participantes da pesquisa foram incluídos no estudo após discutirem, responderem e concordarem com Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TLCE). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP, CAAE 25714814.0.0000.0065 e CAPPESQ CAAE: 03952418.3.0000.0065.

## **4. RESULTADOS**



## 4. Resultados

### 4.1. Descrição dos aspectos sociais e clínico-epidemiológicos dos pacientes

Para a realização do presente trabalho foram coletadas amostras de lesões ativas de 40 (quarenta) pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana causada por *L. (L.) amazonensis* [La] e *L.(V.) braziliensis* [Lb], que buscaram atendimento no Ambulatório do Instituto Evandro Chagas-Pará (Laboratório de Leishmanioses “Prof. Dr. Ralph Lainson”), centro de referência em Leishmanioses.

Ao todo, trinta e seis pacientes eram do sexo masculino (90%) e quatro do sexo feminino (10%), quanto à raça, cinco pacientes se autodeclararam pretos (12,5%), vinte e seis pardos (65%) e nove não responderam (22,5%). No que diz respeito aos indicadores sociais (IBGE), 19 tinham como profissão desenvolvimento de trabalho manual e eram autônomos (47,5%), cinco eram aposentados (12,5%), cinco realizavam trabalho técnico (12,5%), três não exerciam atividade remunerada (7,5%) e oito não responderam (20%). Quanto à escolaridade, 19 pacientes declararam não ter cursado o Ensino Fundamental completo (47,5%), oito tinham o Ensino Fundamental completo (20%), três cursaram o Ensino Médio completo (7,5%), dois possuíam o Ensino Superior (5%) e oito não responderam (20%). Os dados sociais dos pacientes estão apresentados na Tabela 2, a seguir.

**Tabela 2-** Indicadores sociais e demográficos dos pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana causadas por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

Indicadores sociodemográficos					
Cor ou Raça autodeclarada					
Branca	Preta	Parda	Amarela	Indígena	N.R.
-	5 (12,5%)	26 (65%)	-	-	9 (22,5%)
Profissão					
Trabalho Manual	Trabalho Técnico	Trabalho Intelectual	Aposentado	Não exerce atividade remunerada	N.R.
19 (47,5%)	5 (12,5%)	-	5 (12,5%)	3 (7,5%)	8 (20%)
Escolaridade					
EF incompleto	EF completo	EM incompleto	EM completo	Superior	N.R.
19 (47,5%)	8 (20%)	-	3 (7,5%)	2 (5%)	8 (20%)

Dados apresentados em número absoluto e relativo (%) de pacientes que responderam a cada uma das perguntas sobre aspectos socioeconômicos. **N.R.:** Não responderam; **EF:** Ensino Fundamental; **EM:** Ensino Médio.

Dos pacientes infectados com *L. (L.) amazonensis*, oito apresentaram a forma clínica anérgica difusa, sendo seis do sexo masculino (75%) e dois do feminino (25%), com tempo de evolução da doença variando de um a 35 anos, e todos apresentaram reação negativa ao teste de Intradermorreação de Montenegro (IDRM). Dos dezessete pacientes infectados por parasitos de *L. (L.) amazonensis* que estavam acometidos com a forma clínica localizada, 16 destes eram do sexo masculino (94%) e um do sexo feminino (6%). O tempo de evolução desses casos variou de 30 dias a nove meses. A IDRM foi positiva em seis pacientes (35,3%) e 11 apresentaram IDRM negativa (64,7%).

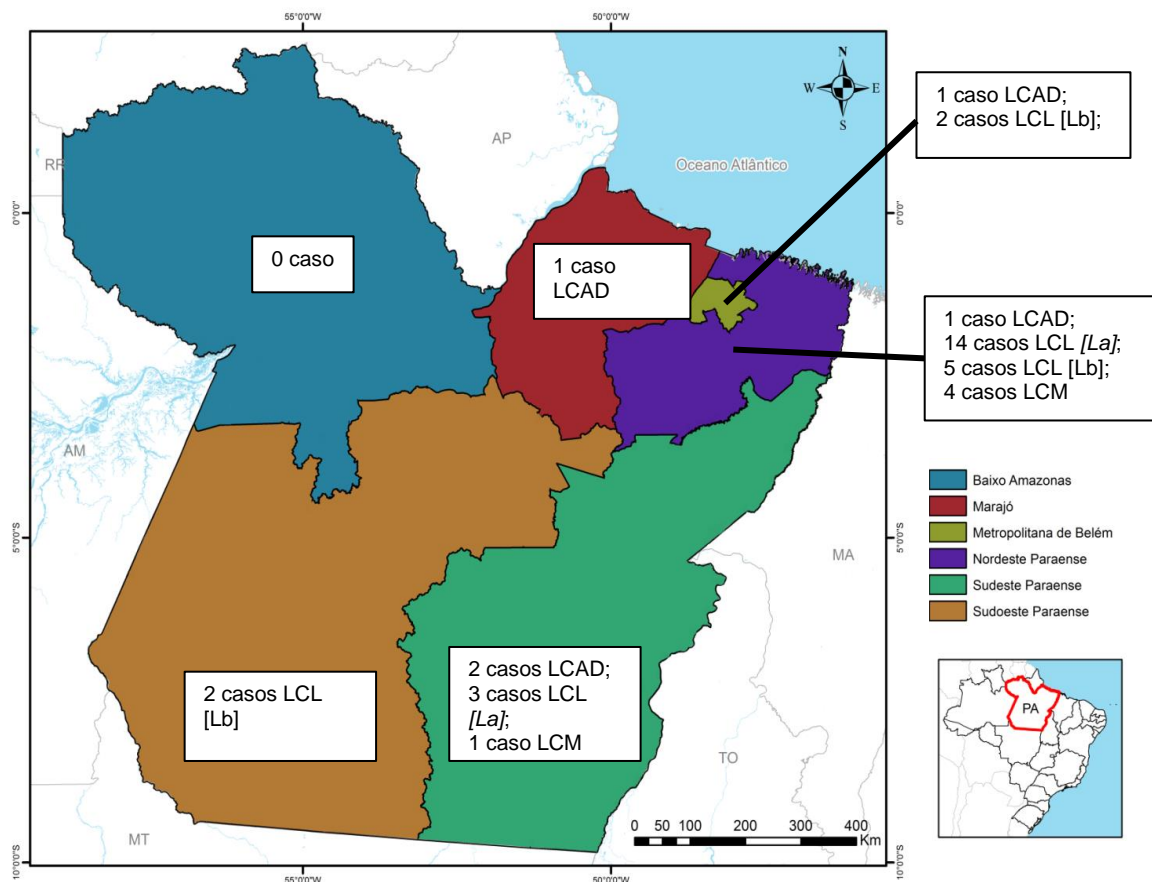
Nos casos de infecção por parasitos de *L. (V.) braziliensis*, seis apresentaram a forma hiperreativa leishmaniose cutâneo mucosa (LCM), e todos eram homens (100%), com tempo de evolução da doença variando de um a 10 anos. A IDRM foi positiva para todos os casos LCM (100%). Nove pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* estavam acometidos com a forma clínica localizada (LCL), sendo oito do sexo masculino (88,9%) e um do sexo feminino (11,1%), com tempo de evolução da doença variando entre dois meses a um ano e 6 meses. Destes, um paciente não realizou a IDRM (11,1%) e oito apresentaram reação positiva à IDRM (88,9%) (Tabela 3).

**Tabela 3-** Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

Forma Clínica	Indivíduos n (% do n total)	Sexo		Faixa etária	Tempo de evolução da doença Min-Máx (meses)	IDRM (%)Positivo/Negativo
		Masculino n(%)	Feminino n(%)			
LCAD [La]	8 (20%)	6 (75%)	2 (25%)	09-59 anos	12-420 meses	100% negativos
LCL [La]	17 (42,5%)	16 (94%)	1 (6%)	10-53 anos	1-9 meses	35,3% positivos; 64,7% negativos
LCL [Lb]	9 (22,5%)	8 (88,8%)	1 (11,1%)	20-63 anos	2 meses – 18 meses	88,8% positivos; 11,1% negativos
LCM [Lb]	6 (15%)	6 (100%)	-	27-81 anos	1-120 meses	100% positivos
TOTAL:	40 (100%)	36 (90%)	4 (10%)	-	-	-

**LCAD:** leishmaniose cutânea anérgica; **LCL:** leishmaniose cutânea localizada; e **LCM:** leishmaniose cutâneo-mucosa. **IDRM:** Intradermorreação de Montenegro.

Com relação à origem geográfica e provável local de infecção dos pacientes, utilizou-se a categorização de “Mesorregiões do Pará”, feita pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), que divide o estado do Pará em seis mesorregiões que guardam características geográficas e socioeconômicas semelhantes. São elas: Baixo Amazonas, Marajó, Metropolitana de Belém, Nordeste Paraense, Sudeste Paraense e Sudoeste Paraense (disponível em: <[www.pa.gov.br/pagina54/subdivisões](http://www.pa.gov.br/pagina54/subdivisões)>). A distribuição dos casos das diferentes formas clínicas de LTA causados por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* por mesorregião do Estado do Pará, está apresentada na Figura 4.



**Figura 4** - Distribuição geográfica dos casos das diferentes formas clínicas de LTA causados por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* por mesorregião do Estado do Pará, evidenciando as seis mesorregiões. FONTE: extraído e adaptado de Mapas-Fapespa, disponível em (<[http://www.fapespa.pa.gov.br/sistemas/anuario2017/mapas/territorio/ter3\\_mesorregioes\\_paraenses.png](http://www.fapespa.pa.gov.br/sistemas/anuario2017/mapas/territorio/ter3_mesorregioes_paraenses.png)>, acesso em: 22/10/2021), mostrando o número de pacientes com cada forma clínica da LTA oriundos dessas regiões. LCAD: leishmaniose cutânea anérgica difusa; LCL [La]: leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (L.) amazonensis*; LCL [Lb]: leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) braziliensis*; LCM: leishmaniose cutâneo mucosa.

Quando questionados sobre o provável local de infecção, os pacientes com a forma clínica LCAD eram oriundos das seguintes mesorregiões: um de Marajó; um da região Metropolitana de Belém; um do Nordeste Paraense; dois do Sudeste Paraense; e três oriundos de outros estados da região Norte e Nordeste do Brasil, sendo: um do estado do Amapá e dois do estado do Maranhão (não mostrado na Figura 4).

Com relação aos pacientes com a forma LCL [La], 14 eram oriundos da mesorregião Nordeste Paraense e três do Sudeste Paraense. Os pacientes com a forma LCL [Lb]: dois eram oriundos da mesorregião Metropolitana de Belém; cinco do Nordeste Paraense e dois do Sudoeste Paraense.

Com relação aos pacientes acometidos com a forma LCM, quatro eram oriundos do Nordeste Paraense, um do Sudeste Paraense e um do Amapá, também região Norte do Brasil (não mostrado na Figura 4).

Não houve casos reportados da mesorregião Baixo Amazonas.

#### 4.2. Análise histopatológica

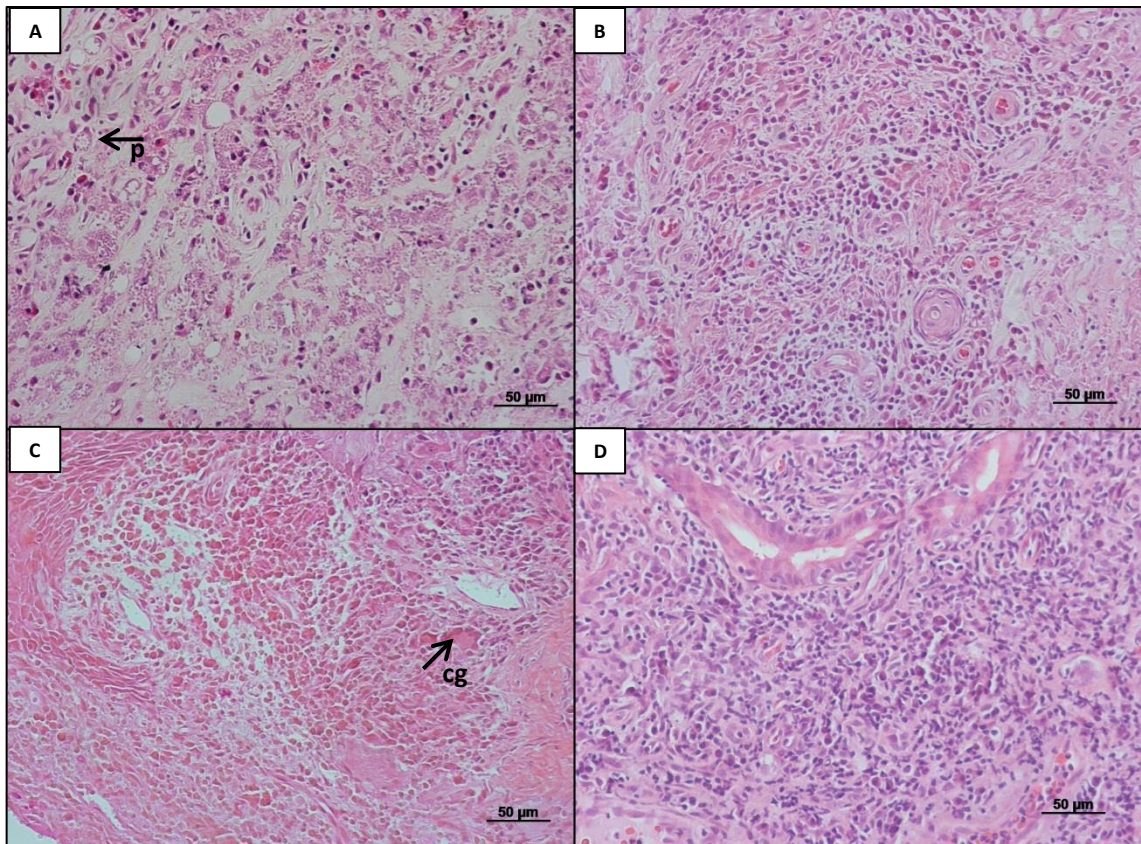
O material histopatológico dos 40 pacientes com diferentes formas clínicas de leishmaniose tegumentar americana (LTA) foi processado na técnica de coloração por H&E e então observado e submetido à análise descritiva das características histopatológicas das lesões da pele. Foram encontradas alterações morfológicas na epiderme e na derme, apresentadas a seguir.

Nos pacientes acometidos com a LCAD [*La*], a análise histopatológica da lesão mostrou intenso infiltrado inflamatório mononuclear, constituído basicamente de macrófagos vacuolizados, com grande quantidade de formas sugestivas de amastigotas de *Leishmania* sp em seu interior; raros linfócitos e plasmócitos (Figura 5A). Nas lesões de pacientes com LCL [*La*] observou-se na derme, infiltrado inflamatório mononuclear de discreto a moderado, predominantemente macrofágico com macrófagos vacuolizados e moderado parasitismo e em raros casos observou-se esboço de granuloma, fibrose e células gigantes (Figura 5B).

Por outro lado, na análise histopatológica da lesão de pacientes com formas clínicas causadas por *L. (V.) braziliensis*, observou-se, na forma cutâneo localizada, um moderado infiltrado inflamatório linfoplasmocitário, rico em plasmócitos, e contendo linfócitos e macrófagos em números variáveis. Foi detectado baixo parasitismo (Figura 5C). Observou-se também esboço granulomatoso ou granulomas epitelióides bem formados, frequentemente com presença de células gigantes. Foi observado também espessamento de epiderme e acantose irregular.

Em pacientes com a leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM), a histopatologia foi caracterizada por um intenso infiltrado linfoplasmocitário difuso, contendo poucos macrófagos e escassez de parasitos. Foi identificado na maioria dos casos,

presença de esboço granulomatoso ou de granuloma epitelióide bem constituído (Figura 5D).



**Figura 5-** Fotomicrografias de cortes histológicos de amostras de lesão de pacientes com diferentes formas de leishmaniose tegumentar americana causadas por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, mostrando as alterações histopatológicas da lesão na derme. A) Caso de LCAD [La]: leishmaniose cutânea anérgica difusa causada por *L. (L.) amazonensis*, evidenciando intenso infiltrado inflamatório mononuclear predominantemente de macrófagos vacuolizados e com parasitas no seu interior (seta) B) Caso de LCL [La]: leishmaniose cutânea localizada causada por *L.(L.) amazonensis*, mostrando um infiltrado mononuclear moderado, formado predominantemente por macrófagos parasitados e linfócitos. C) Caso de LCL [Lb]: leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) braziliensis*, mostrando intenso infiltrado inflamatório com plasmócitos, linfócitos e macrófagos, presença de granuloma contendo célula gigante (seta). Escassez parasitária. D) Caso de LCM [Lb]: leishmaniose cutâneo mucosa causada por *L. (V.) braziliensis*, evidenciando intenso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e escassez parasitária. **P**- parasita; **cg** - célula gigante (Técnica de coloração por Hematoxilina e Eosina, aumento de 200x).

Foi feita a análise semiquantitativa das características de resposta inflamatória tecidual, considerando-se: tipo de infiltrado inflamatório (discreto, moderado, intenso); distribuição do infiltrado (focal e difuso), tipo de granuloma (ausente, esboço, bem formado); e parasitismo (negativo, discreto, moderado, intenso) (Ridley e Ridley, 1983).

O material histopatológico de cada paciente foi processado na técnica de coloração por H&E e então observado em microscopia ótica e quantificado

utilizando-se escala de intensidade da seguinte forma: negativo (0); discreto (+); moderado (++); intenso (+++). Foram encontradas as seguintes variações histopatológicas em cada forma clínica (sintetizadas na Tabela 4):

**Tabela 4 –** Análise semiquantitativa das alterações histopatológicas e parasitismo em lesões cutâneas e mucosa do espectro da LTA

Forma clínica (n)	Características histopatológicas/ n relativo à forma clínica			
<b>Tipo de Infiltrado</b>				
	Discreto n(%)	Moderado n(%)	Intenso n(%)	
LCAD [La] (n=8)	1 (12,5%)	0 (0%)	7 (87,5%)	
LCL [La] (n=17)	0 (0%)	11 (64,70%)	6 (35,30%)	
LCL [Lb] (n=9)	0 (0%)	4 (44,4%)	5 (55,6%)	
LCM [Lb] (n=6)	0 (0%)	0 (0%)	6 (100%)	
<b>Distribuição do Infiltrado</b>				
	Focal n(%)		Difuso n(%)	
LCAD [La] (n=8)	2 (25%)		6 (75%)	
LCL [La] (n=17)	8 (47,06%)		9 (52,94%)	
LCL [Lb] (n=9)	3 (33,3%)		6 (66,6%)	
LCM [Lb] (n=6)	0 (0%)		6 (100%)	
<b>Granuloma</b>				
	Ausente n(%)	Esboço n(%)	Bem formado n(%)	
LCAD [La] (n=8)	7 (87,5%)	1 (12,5%)	0 (0%)	
LCL [La] (n=17)	11 (64,71%)	4 (23,53%)	2 (11,76%)	
LCL [Lb] (n=9)	2 (22,2%)	3 (33,3%)	4 (44,4%)	
LCM [Lb] (n=6)	0 (0%)	2 (33,3%)	4 (66,6%)	
<b>Parasitismo</b>				
	Negativo n(%)	Discreto n(%)	Moderado n(%)	Intenso n(%)
LCAD [La] (n=8)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (100%)
LCL [La] (n=17)	1 (5,9%)	8 (47,1%)	6 (35,3%)	2 (11,8%)
LCL [Lb] (n=9)	3 (33,3%)	5 (55,5%)	1 (11,1%)	0 (0%)
LCM [Lb] (n=6)	4 (66,6%)	2 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)

**LCAD [La]:** leishmaniose cutânea anérgica difusa causada por *L. (L.) amazonensis*; **LCL [La]:** leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (L.) amazonensis*; **LCL [Lb]:** leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) braziliensis*; **LCM [Lb]:** leishmaniose cutâneo mucosa causada por *L. (V.) braziliensis*; **controle:** pele normal/sem lesão; **n:** número de pacientes por forma clínica.

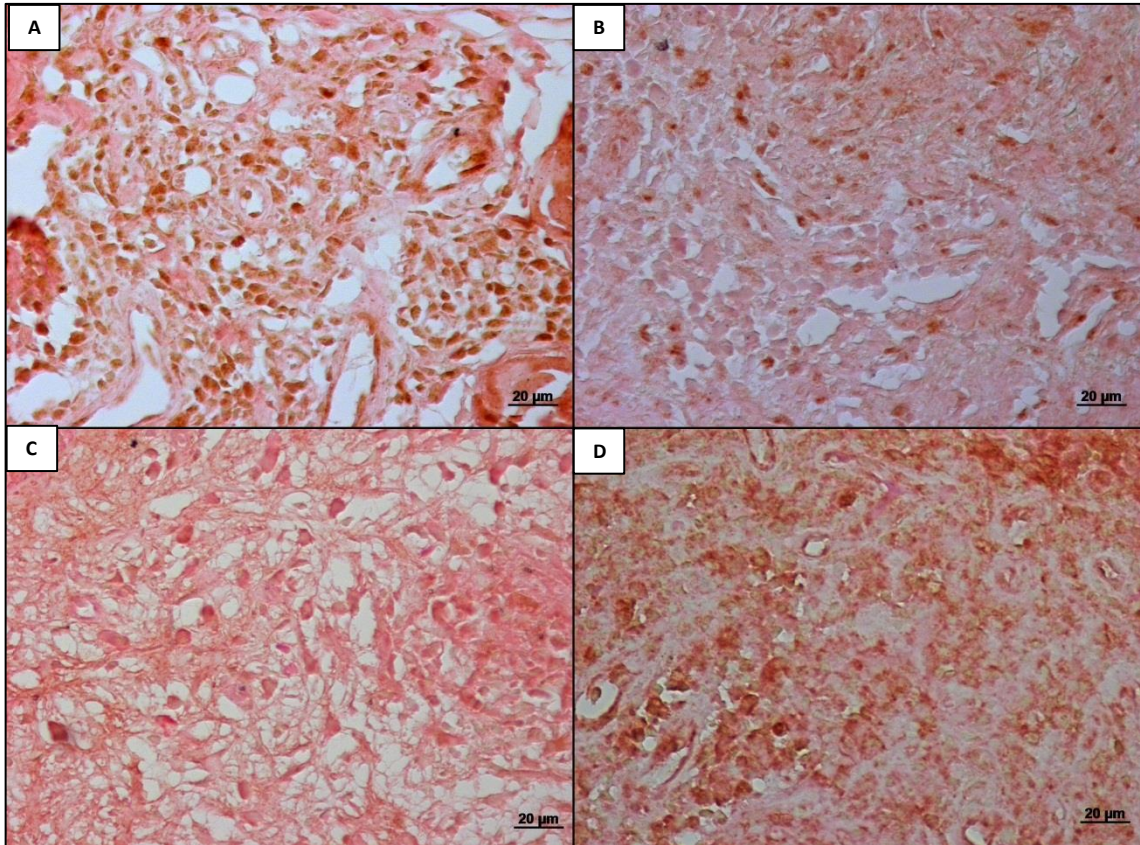
### 4.3. Análise imunopatológica da lesão

Para o estudo da resposta imune celular do tipo Th17 nas lesões de pacientes acometidos com as diferentes formas da LTA, foi feita a análise imunopatológica dos cortes histológicos de lesões ativas da doença utilizando-se os marcadores ROR $\gamma$ t, IL-17, IL-6, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  e IL-23 por reação de imunohistoquímica. Todos os casos analisados do espectro da doença mostraram células imunomarcadas para os seis anticorpos. A densidade de células imunomarcadas (células/mm<sup>2</sup>) determinada nos campos fotografados dos cortes histológicos para os diferentes marcadores será apresentada a seguir. Foram feitas também análises em fragmentos de pele normal (controle) para cada marcador.

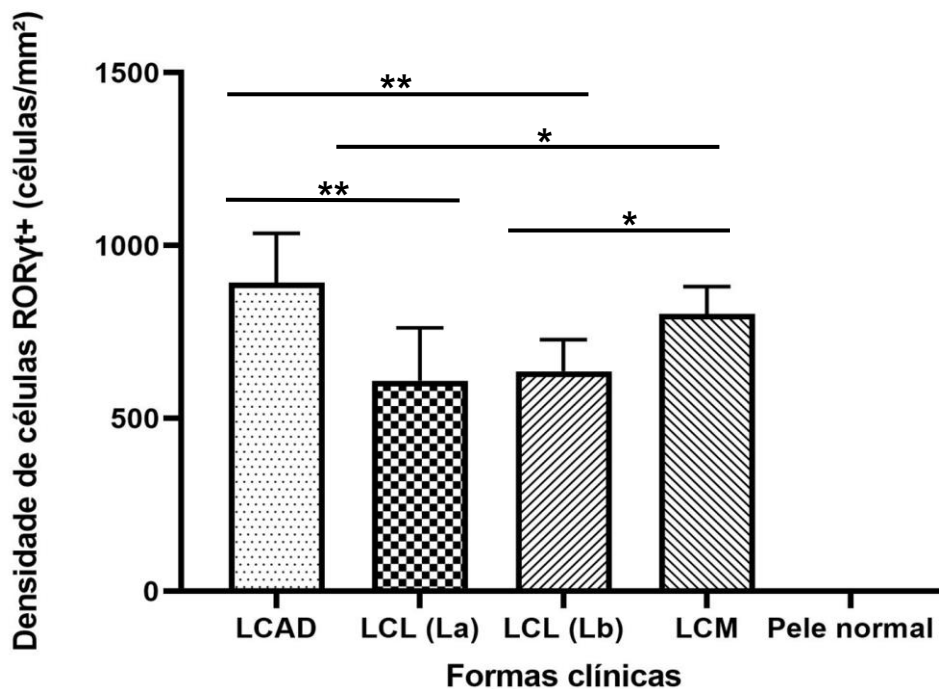
#### 4.3.1. Fator de transcrição ROR $\gamma$ t

Na análise morfométrica quantitativa de células imunomarcadas presentes nos cortes histológicos de lesões utilizando-se o anticorpo anti-ROR $\gamma$ t, observou-se uma maior densidade de células ROR $\gamma$ t+ nas formas polares do espectro: LCAD [La]: 908,02 $\pm$ 36,85 células/mm<sup>2</sup> e LCM [Lb]: 802,76 $\pm$ 29,34 células/mm<sup>2</sup>, quando comparado às formas centrais, que apresentaram menor produção do fator de transcrição ROR $\gamma$ t células marcadas: LCL [La]: 610,55 $\pm$ 29,74 células/mm<sup>2</sup> e LCL [Lb]: 628,13 $\pm$  26,69 células/mm<sup>2</sup>. Nas amostras de pele sem lesão (controles) a densidade média de células ROR $\gamma$ t+ foi de 1,13 $\pm$ 1,06 células/mm<sup>2</sup>. A partir dos campos fotografados (Figura 6) e do cálculo da densidade média, foi possível montar o gráfico que mostra o perfil de células que expressaram ROR $\gamma$ t no espectro da LTA (Figura 7).





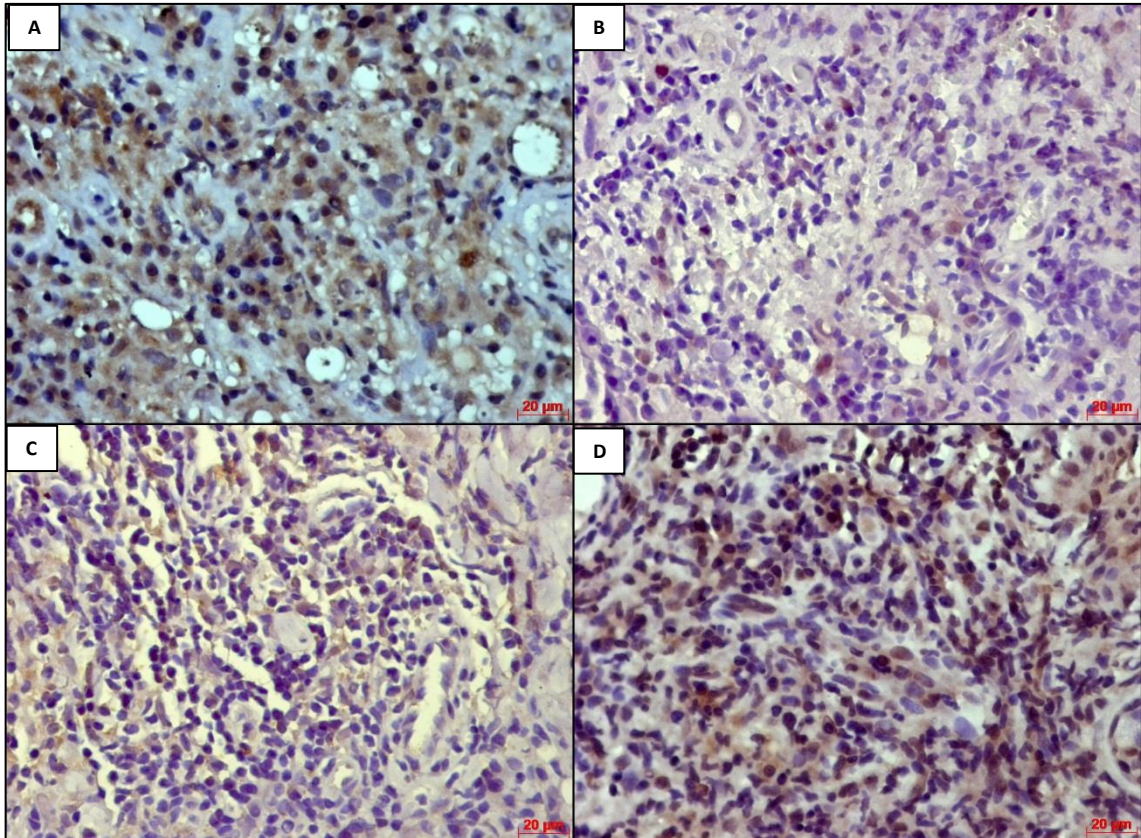
**Figura 6-** Fotomicrografias de cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com diferentes formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, mostrando imunomarcagem de células ROR $\gamma$ t+ (coloração marrom-castanho no núcleo das células) nas diferentes formas clínicas da LTA. A) leishmaniose cutânea anérgica difusa causada por *L. (L.) amazonensis*; B) leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (L.) amazonensis*; C) leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) braziliensis*; e D) leishmaniose cutânea mucosa causada por *L. (V.) braziliensis* (Técnica de imunohistoquímica por imunoperoxidase, aumento de 400x).



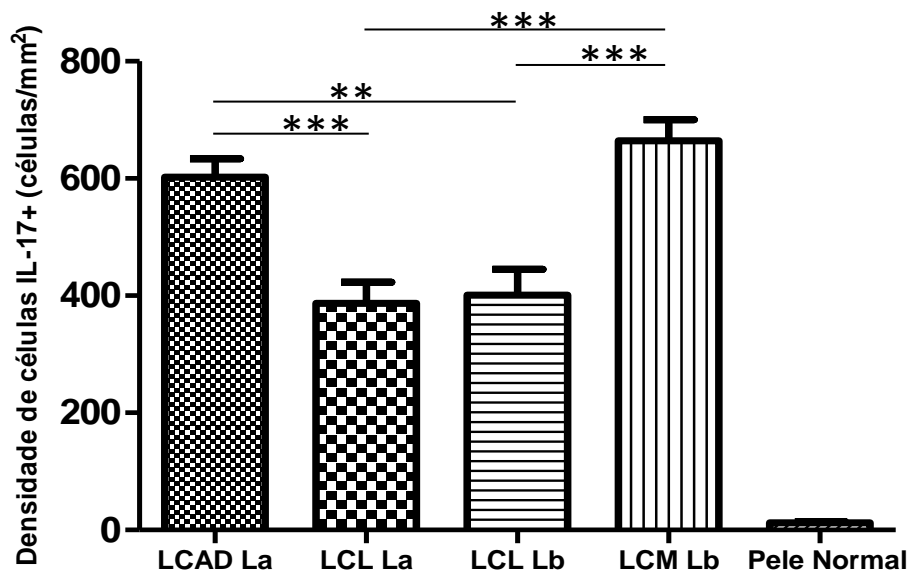
**Figura 7-** Gráfico de barras mostrando as densidades médias de células que expressaram ROR $\gamma$ t (média + erro padrão) em cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana causada por *L.(L.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis* e em amostras de pele normal. LCAD: leishmaniose cutânea anérgica difusa causada por *L. (L.) amazonensis*; LCL [La]: leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (L.) amazonensis*; LCL [Lb]: leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) braziliensis*; LCM: leishmaniose cutâneo mucosa causada por *L. (V.) braziliensis*; e pele normal: controle. Significância estatística: \* = p<0,05 e \*\*=p<0,001.

#### 4.3.2. Interleucina 17

A partir da reação de imunistoquímica, usando anticorpo anti-IL-17, obteve-se também um perfil de densidade de células imunomarcadas aumentado nas formas clínicas polares e mais graves da LTA: LCAD [La]: 611,09 $\pm$ 24,40 células/mm<sup>2</sup> e LCM [Lb]: 700,98 $\pm$ 32,34 células/mm<sup>2</sup>, enquanto que as formas centrais: LCL [La]: 431,86 $\pm$ 17,63 células/mm<sup>2</sup> e LCL [Lb]: 494,74 $\pm$ 8,61 células/mm<sup>2</sup>, conforme demonstrado na Figura 8 (prancha de cortes histológicos com imunomarcção) e Figura 9 (gráfico de barras com as densidades médias de células IL-17+). Na amostra de pele normal, a densidade de células que expressam IL-17 foi 12,59 $\pm$ 3,23 células/mm<sup>2</sup>.



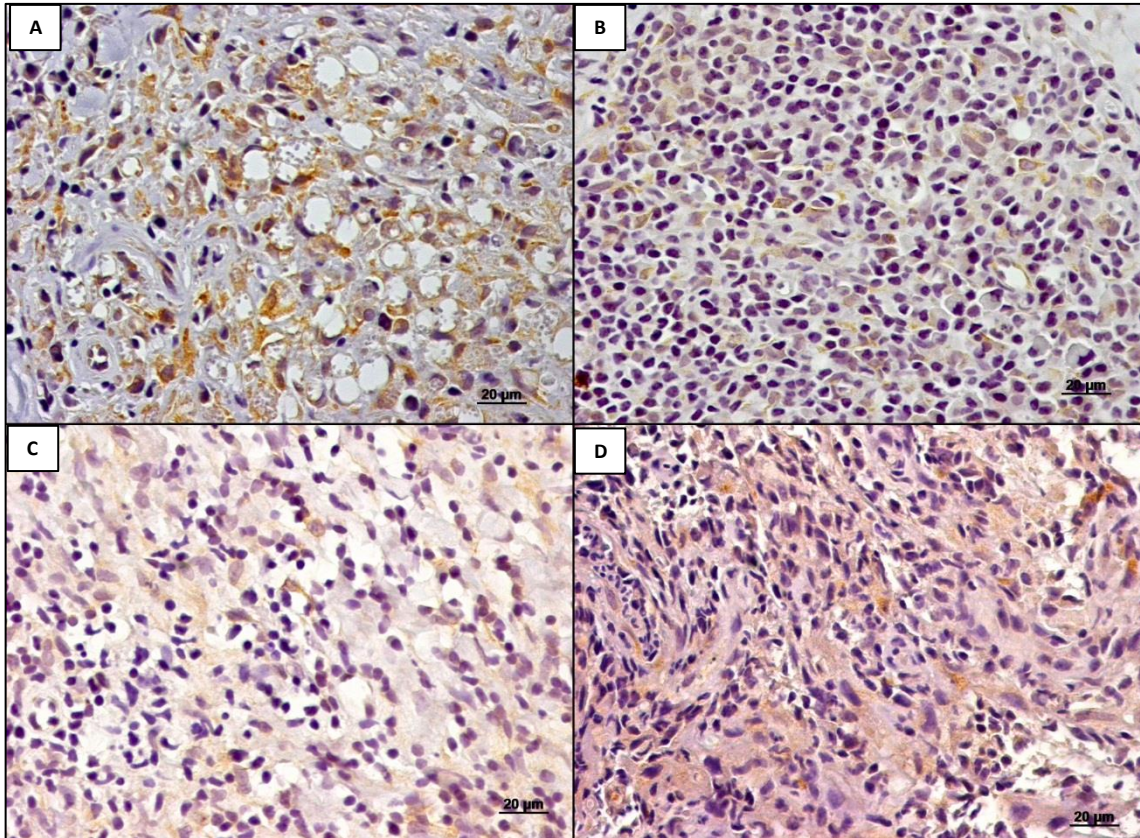
**Figura 8-** Fotomicrografias de cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, mostrando imunomarcagem de células IL-17+ (coloração marrom-castanho no citoplasma celular) nas diferentes formas clínicas da LTA. A) leishmaniose cutânea anérgica difusa causada por *L. (L.) amazonensis*; B) leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (L.) amazonensis*; C) leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) braziliensis*; e D) leishmaniose cutânea mucosa causada por *L. (V.) braziliensis* (Técnica de imunistoquímica por imunoperoxidase, aumento de 400x).



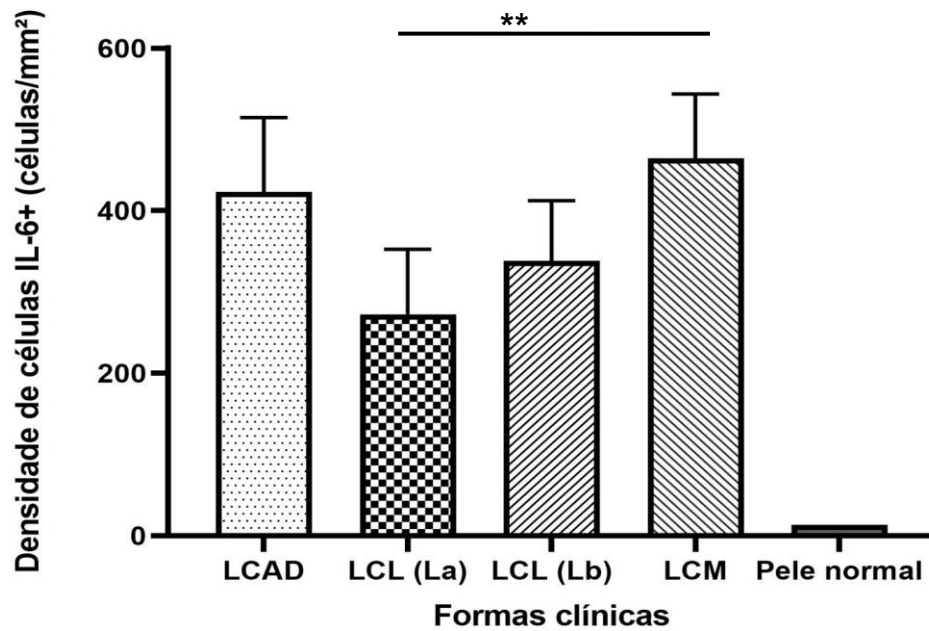
**Figura 9-** Gráfico de barras mostrando as densidades médias de células que expressaram IL-17 (média+erro padrão) em cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* e em amostras de pele normal. LCAD: leishmaniose cutânea anérgica difusa causada por *L. (L.) amazonensis*; LCL [La]: leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (L.) amazonensis*; LCL [Lb]: leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) braziliensis*; LCM: leishmaniose cutâneo mucosa causada por *L. (V.) braziliensis*; e pele normal: controle. Significância estatística: \*\*= $p < 0,05$  e \*\*\*= $p < 0,001$

#### 4.3.3. Interleucina 6

A análise morfométrica quantitativa de células imunomarcadas presentes nos cortes histológicos de lesões de pacientes com diferentes formas clínicas de LTA utilizando o anticorpo anti-IL-6 (Figura 10), mostrou uma tendência de aumento da expressão desta citocina partindo das formas centrais do espectro da doença: LCL [La]:  $260,66 \pm 16,17$  células/mm<sup>2</sup>, LCL [Lb]:  $300,22 \pm 15,18$  células/mm<sup>2</sup> em direção as formas mais graves e polares - LCAD [La]:  $418,51 \pm 35,22$  células/mm<sup>2</sup> e LCM [Lb]:  $466,54 \pm 32,16$  células/mm<sup>2</sup> (Figura 11). Nas amostras de pele normal (controle), a densidade média de células IL-6+ foi de  $5,42 \pm 2,24$  células/mm<sup>2</sup>.



**Figura 10-** Fotomicrografias de cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com diferentes formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, mostrando imunomarcagem de células IL-6+ (coloração marrom-castanho no citoplasma celular) nas diferentes formas clínicas da LTA. A) leishmaniose cutânea anérgica difusa causada por *L. (L.) amazonensis*; B) leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (L.) amazonensis*; C) leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) braziliensis*; e D) leishmaniose cutânea mucosa causada por *L. (V.) braziliensis* (Técnica de imunistoquímica por imunoperoxidase, aumento de 400x).



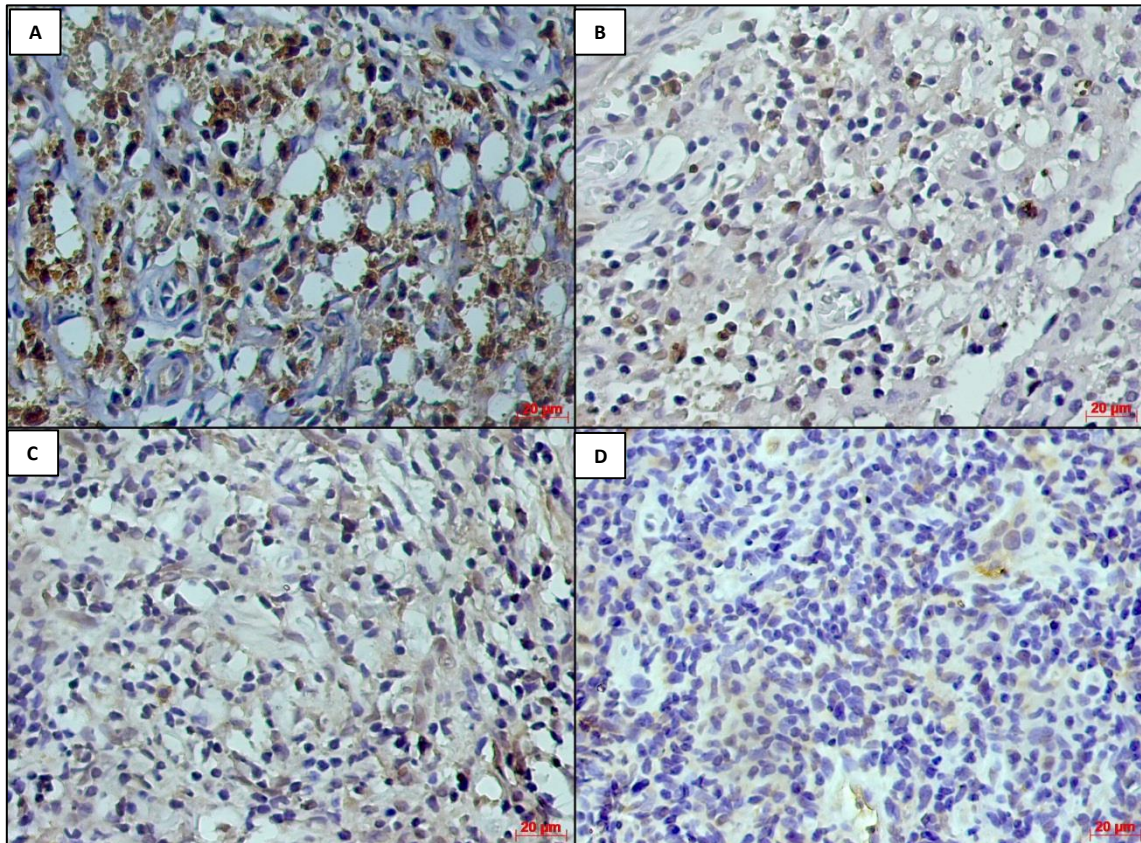
**Figura 11-** Gráfico de barras mostrando as densidades médias de células que expressaram IL-6 (média+erro padrão) em cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana causada por *L.(L.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis* e em amostras de pele normal. LCAD: leishmaniose cutânea anérgica difusa causada por *L. (L.) amazonensis*; LCL (La): leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (L.) amazonensis*; LCL (Lb): leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) braziliensis*; LCM: leishmaniose cutânea Mucosa causada por *L. (V.) braziliensis*; e pele normal: controle. Significância estatística: \*\*= $p < 0,0001$ .

#### 4.3.4. Fator de Crescimento Transformante $\beta$

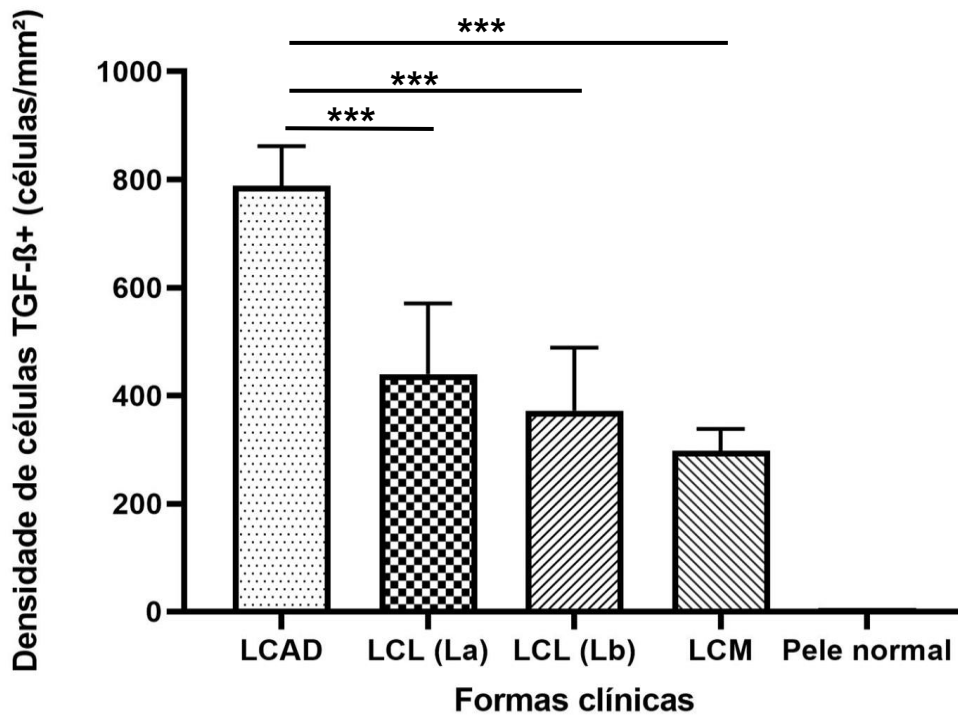
Na determinação da densidade de células que expressaram TGF- $\beta$ , a partir da análise morfométrica quantitativa de células imunomarcadas presentes nos cortes histológicos de lesões de pacientes com diferentes formas clínicas da LTA, observou-se que a densidade média está significativamente aumentada no polo hiporreativo de resposta imune celular da LTA, LCAD [La]:  $806,22 \pm 22,59$  células/mm<sup>2</sup>, decrescendo em direção à forma polar hiperreativa, que apresentou a menor expressão desse marcador, LCM [Lb]:  $234,45 \pm 20,10$  células/mm<sup>2</sup>. As formas centrais do espectro mostraram densidades intermediárias LCL [La]:  $358,23 \pm 19,25$  células/mm<sup>2</sup> e LCL [Lb]:  $317,97 \pm 18,65$  células/mm<sup>2</sup>. As amostras de pele normal apresentaram densidade média de células TGF- $\beta$ + de  $2,26 \pm 1,53$  células/mm<sup>2</sup>.

Nas Figuras 12 e 13 estão apresentados respectivamente: uma prancha ilustrativa da reação de imunistoquímica mostrando a imunomarcagem de células

TGF- $\beta$ + em cortes histológicos de pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas da LTA; e gráfico comparando as densidades dentro do espectro clínico da LTA.



**Figura 12** - Fotomicrografias de cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com diferentes formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, mostrando imunomarcagem de células TGF- $\beta$ + (coloração marrom-castanho no citoplasma celular) nas diferentes formas clínicas da LTA. A) leishmaniose cutânea anérgica difusa causada por *L. (L.) amazonensis*; B) leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (L.) amazonensis*; C) leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) braziliensis*; e D) leishmaniose cutâneo mucosa causada por *L. (V.) braziliensis* (Técnica de imunohistoquímica por imunoperoxidase, aumento de 400x).

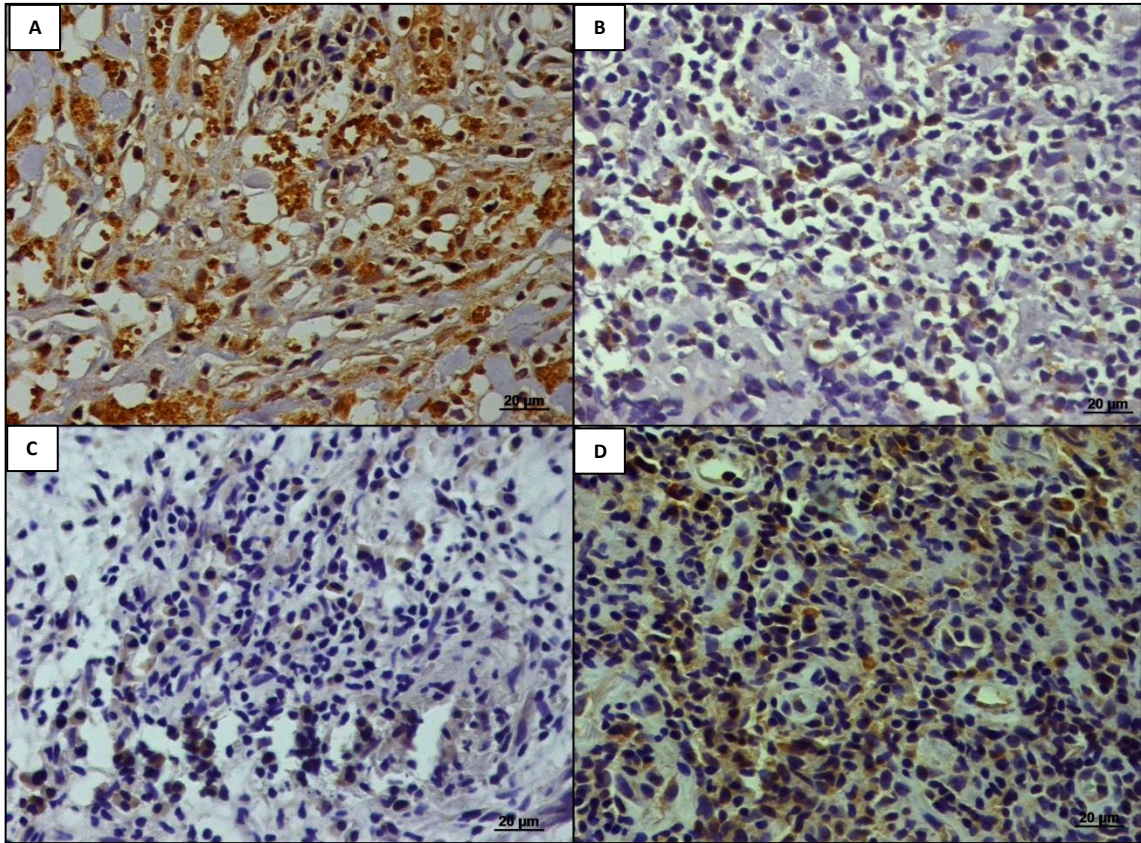


**Figura 13-** Gráfico de barras mostrando as densidades médias de células que expressaram TGF- $\beta$  (média+erro padrão) em cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana causada por *L.(L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* e em amostras de pele normal. LCAD: leishmaniose cutânea anérgica difusa causada por *L. (L.) amazonensis*; LCL [La]: leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (L.) amazonensis*; LCL [Lb]: leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) braziliensis*; LCM: leishmaniose cutâneo mucosa causada por *L. (V.) braziliensis*; e pele normal: controle. Significância estatística:\*\*\*=p<0,0001.

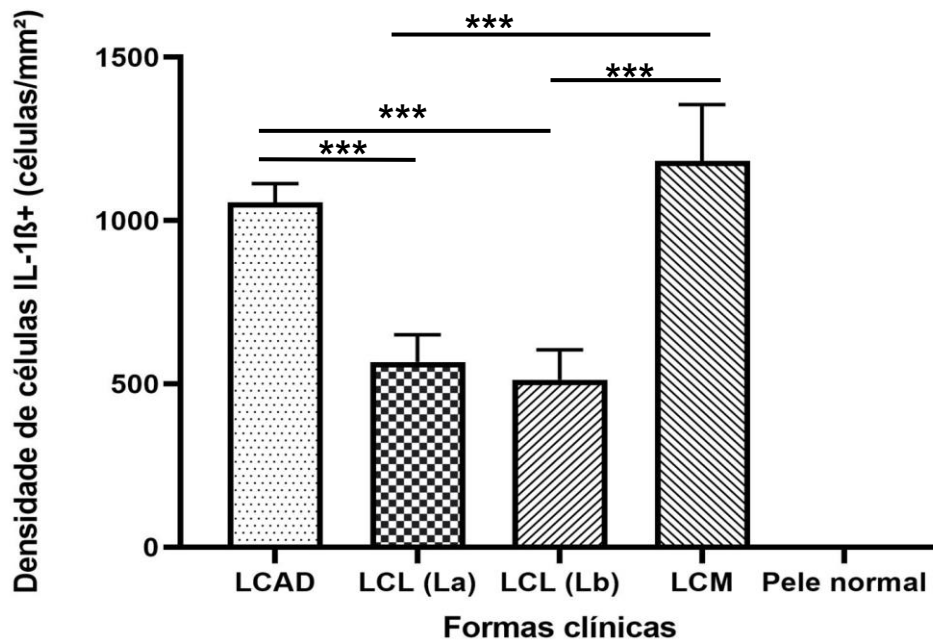
#### 4.3.5. Interleucina 1 $\beta$

A partir da reação de imunistoquímica, usando anticorpo anti-IL-1 $\beta$ , foi feita a análise morfométrica quantitativa de células imunomarcadas presentes nos cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com diferentes formas clínicas de LTA (Figura 14), na qual obteve-se também um perfil de densidade de células imunomarcadas aumentado nas formas clínicas polares e mais graves da LTA: LCAD [La]: 1135,35 $\pm$ 60,92 células/mm<sup>2</sup> e LCM [Lb]: 1290,51 $\pm$ 87,68 células/mm<sup>2</sup>, enquanto que as formas centrais: LCL [La]: 565,11 $\pm$ 19,90 células/mm<sup>2</sup> e LCL [Lb]: 528,68 $\pm$ 21,21, conforme demonstrado na Figura 15. Nas amostras de pele normal, a densidade de células que expressaram IL-1 $\beta$  foi 2,26 $\pm$ 1,53 células/mm<sup>2</sup>.





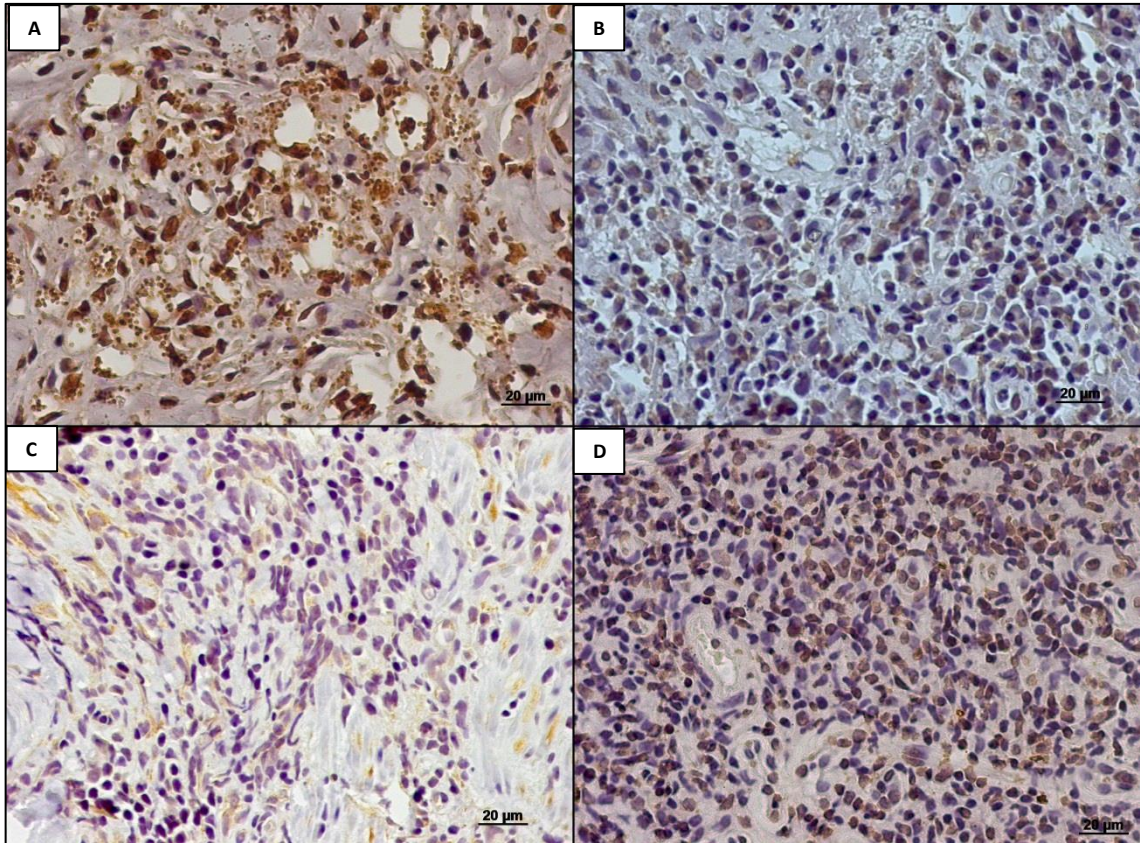
**Figura 14** - Fotomicrografias de cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com diferentes formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, mostrando imunomarcagem de células IL-1 $\beta$ + (coloração marrom-castanho no citoplasma celular) nas diferentes formas clínicas da LTA. A) leishmaniose cutânea anérgica difusa causada por *L. (L.) amazonensis*; B) leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (L.) amazonensis*; C) leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) braziliensis*; e D) leishmaniose cutâneo mucosa causada por *L. (V.) braziliensis* (Técnica de imunohistoquímica por imunoperoxidase, aumento de 400x).



**Figura 15-** Gráfico de barras mostrando as densidades médias de células que expressaram IL-1 $\beta$  (média+erro padrão) em cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* e em amostras de pele normal. LCAD: leishmaniose cutânea anérgica difusa causada por *L. (L.) amazonensis*; LCL [La]: leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (L.) amazonensis*; LCL [Lb]: leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) braziliensis*; LCM: leishmaniose cutâneo mucosa causada por *L. (V.) braziliensis*; e pele normal: controle. Significância estatística: \*\*\*= $p < 0,0001$ .

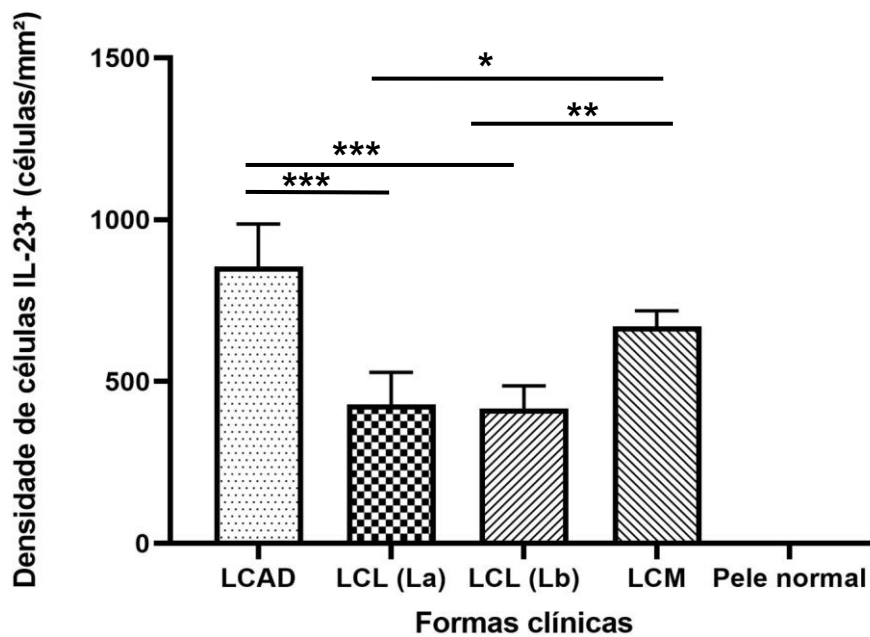
#### 4.3.6. Interleucina 23

A expressão da IL-23 também foi determinada a partir da análise morfométrica quantitativa de células imunomarcadas presentes nos cortes histológicos de lesões de pacientes com diferentes formas clínicas do espectro da LTA (Figura 16), e os resultados obtidos mostraram que as densidades das células imunomarcadas estão mais elevadas nos polos hiper e hiporreativo da LTA, como segue: LCAD [La]:  $846,22 \pm 12,41$  células/mm<sup>2</sup> e LCM [Lb]:  $599,31 \pm 50,38$  células/mm<sup>2</sup>, estando menos expressa nas formas centrais, sendo: LCL [La]:  $404,28 \pm 21,53$  células/mm<sup>2</sup> e LCL [Lb]:  $361,50 \pm 28,20$  células/mm<sup>2</sup>. Nas amostras de pele normal a densidade média de células IL-23+ foi  $2,26 \pm 1,53$  células/mm<sup>2</sup>.



**Figura 16-** Fotomicrografias de cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com diferentes formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, mostrando imunomarcagem de células IL-23+ (coloração marrom-castanho no citoplasma celular) nas diferentes formas clínicas da LTA. A) leishmaniose cutânea anérgica difusa causada por *L. (L.) amazonensis*; B) leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (L.) amazonensis*; C) leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) braziliensis*; e D) leishmaniose cutâneo mucosa causada por *L. (V.) braziliensis* (Técnica de imunohistoquímica por imunoperoxidase, aumento de 400x).

O gráfico comparativo obtido através do cálculo da densidade média de células IL-23+ está apresentado na Figura 17, a seguir:



**Figura 17-** Gráfico de barras mostrando as densidades médias de células que expressaram IL-23 (média+erro padrão) em cortes histológicos de lesões de pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* e em amostras de pele normal. LCAD: leishmaniose cutânea anérgica difusa causada por *L. (L.) amazonensis*; LCL [La]: leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (L.) amazonensis*; LCL [Lb]: leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) braziliensis*; LCM: leishmaniose cutâneo mucosa causada por *L. (V.) braziliensis*; e pele normal: controle. Significância estatística: \*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,001$  e \*\*\*= $p < 0,0001$ .

A seguir, na Tabela 5 estão sumarizadas as densidades médias de cada marcador imunológico nas diferentes formas clínicas da LTA:

**Tabela 5** - Densidades médias de células ROR $\gamma$ t+, IL-17+, IL-6+, TGF- $\beta$ +, IL-1 $\beta$ + e IL-23+ nas diferentes formas clínicas do espectro da LTA e nas amostras de pele normal.

Formas clínicas da LTA					
Marcadores imunológicos	LCAD [ <i>La</i> ] n= 8	LCL [ <i>La</i> ] n= 17	LCL [ <i>Lb</i> ] n= 9	LCM [ <i>Lb</i> ] n= 6	Controle n= 6
ROR $\gamma$ t	908,02±36, 85	610,55±29,7 4	628,13±26,69	802,76±29,34	1,13±1,06
IL-17	611,09±24, 40	431,86±17,6 3	494,38±8,61	700,98±32,34	12,59±3,23
IL-6	418,51±35, 21	260,66±16,1 7	300,22±15,18	466,54±32,16	5,42±2,24
TGF- $\beta$	806,22±22, 59	358,23±19,2 5	317,97±18,65	234,45±20,10	2,26±1,53
IL-1 $\beta$	1135,35±60 ,93	565,11±19,9 0	528,68±21,21	1290,51±87,68	2,26±1,53
IL-23	846,22±12, 41	404,28±21,5 3	361,50±28,21	599,31±50,38	2,26±1,53

**LCAD [*La*]**: leishmaniose cutânea anérgica difusa causada por *L. (L.) amazonensis*; **LCL [*La*]**: leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (L.) amazonensis*; **LCL [*Lb*]**: leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) braziliensis*; **LCM [*Lb*]**: leishmaniose cutânea mucosa causada por *L. (V.) braziliensis*; **controle**: pele normal/sem lesão; **n**: número de pacientes por forma clínica.

#### 4.4. Análise de variância com adição de covariável (ANCOVA) Tempo de Evolução da Doença sobre as formas clínicas da LTA

Dado que o tempo de evolução da doença (TED) era tão diferente nas formas polares (LCAD e LCM) em comparação centrais do espectro (LCL), foi necessário verificar se esse fator representava uma possível variável de confusão quando se avaliava diferenças na expressão de citocinas no espectro da LTA e a correlação entre essas citocinas. Para isso, foi empregado a ANCOVA, para avaliar se a forma clínica da LTA por si só influenciava na expressão dos marcadores imunológicos (fator de transcrição e citocinas inflamatórias) quando se covariava para tempo de evolução da doença (TED), e o efeito do TED sobre a expressão dos marcadores imunológicos.

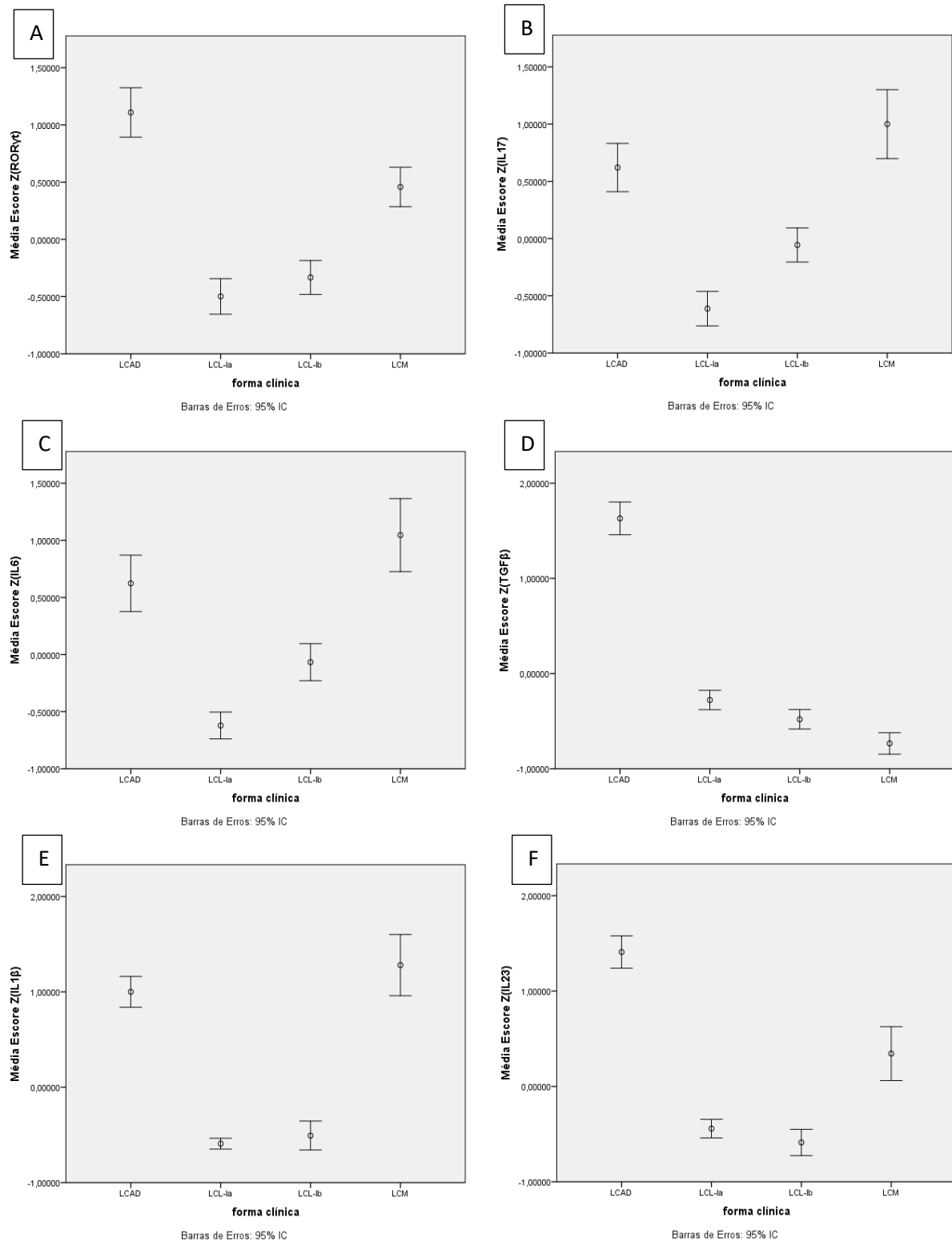
#### 4.4.1. Padronização dos dados

Para testar possíveis diferenças estatísticas entre as densidades médias de células que expressavam os marcadores imunológicos de diferentes formas clínicas da LTA com inclusão de covariável, é necessário que as amostras preencham os requisitos de normalidade e homogeneidade de distribuição. Para tanto, adotou-se como unidade de análise a densidade de células imunomarcadas por campo fotografado por paciente. Ao todo, foram usados 302 campos fotografados, sendo: 62 de LCAD, 119 de LCL [La], 82 de LCL [Lb] e 39 de LCM. Após os testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Levene), verificou-se que as amostras (densidade/marcador imunológico) não apresentavam distribuição normal e homogênea. Portanto, foi necessária a padronização das amostras em z-score, que está apresentada em forma de tabela (Tabela 6) e gráfico de barras de erros (Figura 18), com os intervalos de confiança de 95% (IC 95%).

**Tabela 6-** Estatística descritiva das médias (padronizadas em z-score) das densidades de células imunomarcadas com ROR $\gamma$ t, IL-17, IL-6, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , e IL-23, segundo formas clínicas do espectro da LTA.

Estatística descritiva						
Forma Clínica/ n amostral	Médias z-score por marcadores imunológicos (média $\pm$ erro padrão)					
	ROR $\gamma$ t	IL-17	IL-6	TGF- $\beta$	IL-1 $\beta$	IL-23
LCAD [La] n=62	1,11 $\pm$ 0,84	0,62 $\pm$ 0,83	0,62 $\pm$ 0,97	1,63 $\pm$ 0,68	1,00 $\pm$ 0,64	0,62 $\pm$ 0,83
LCL [La] n=119	-0,50 $\pm$ 0,85	-0,61 $\pm$ 0,83	-0,62 $\pm$ 0,65	-0,28 $\pm$ 0,56	-0,59 $\pm$ 0,31	-0,61 $\pm$ 0,83
LCL [Lb] n=82	-0,33 $\pm$ 0,67	-0,6 $\pm$ 0,68	-0,07 $\pm$ 0,74	-0,48 $\pm$ 0,47	-0,51 $\pm$ 0,69	-0,6 $\pm$ 0,68
LCM [Lb] n=39	0,46 $\pm$ 0,53	1,00 $\pm$ 0,93	1,04 $\pm$ 0,99	-0,73 $\pm$ 0,35	1,28 $\pm$ 0,99	1,00 $\pm$ 0,93

**LCAD [La]:** leishmaniose cutânea anérgica difusa causada por *L. (L.) amazonensis*; **LCL [La]:** leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (L.) amazonensis*; **LCL [Lb]:** leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) braziliensis*; **LCM [Lb]:** leishmaniose cutânea mucosa causada por *L. (V.) braziliensis*; **n:** número de campos fotografados e quantificados por forma clínica.



**Figura 18-** Gráficos de barras de erro mostrando as médias em z-score de células positivas para os marcadores imunológicos do perfil Th17 nas diferentes formas clínicas da LTA (Intervalos de confiança 95%) A) Média em z-score de células ROR $\gamma$ t+ B) Média em z-score de células IL-17+ C) Média em z-score de células IL-6+ D) Média em z-score de células TGF- $\beta$ + E) Média em z-score de células IL-1 $\beta$ + F) Média em z-score de células IL-23+. LCAD: leishmaniose cutânea anérgica difusa causada por *L. (L.) amazonensis*, LCL[La]: leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (L.) amazonensis*, LCL[Lb]: leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) braziliensis* e LCM: leishmaniose cutâneo mucosa causada por *L. (V.) braziliensis*. IC: Intervalo de confiança.

A partir da análise de variância, as diferenças com significância estatística observadas na expressão dos marcadores imunológicos do perfil Th17 entre formas clínicas, cujos resultados são ilustrados nos gráficos de barras de erros (IC 95%) na figura 18, mostraram perfil similar ao observado na tabela de densidades média das células imunomarcadas no espectro da LTA, confirmando uma expressão maior dos mediadores imunológicos do perfil Th17 nas formas polares e mais graves dessa endemia (Tabela 5).

#### **4.4.2. Análise de variância com adição da covariável tempo de evolução da doença**

Os valores amostrais de densidades de células positivas ( $n=302$ ) para os diferentes marcadores imunológicos do perfil Th17 (seis marcadores), nas quatro formas clínicas da LTA, foram submetidos à Análise de Covariância (ANCOVA), para avaliar as diferenças na expressão dos marcadores imunológicos nas diferentes formas clínicas do espectro da LTA covariando para o tempo de evolução da doença (TED). O tamanho do efeito da covariável TED foi dado em  $\eta$  (eta) parcial quadrado.

Para identificar possíveis diferenças estatísticas na expressão dos mediadores imunológicos entre as formas clínicas do espectro da LTA, neutralizando a covariável TED, os resultados da ANCOVA foram submetidos ao post-hoc Bonferroni.

A partir do pós-teste, se detectou diferenças estatísticas significantes na expressão de  $ROR\gamma_t$  entre: LCAD e LCL [La] ( $p=0,000$ ) e LCL [Lb] ( $p=0,000$ ); LCL [La] e LCM ( $p=0,000$ ); e entre LCL [Lb] e LCM ( $p=0,000$ ).

Portanto, ao se incluir o TED como covariável na análise de expressão de  $ROR\gamma_t$  no espectro da LTA, observou-se que entre as formas clínicas LCM e LCL [La] houve um efeito significativo do TED, confirmado pelo post-hoc Bonferroni, porém, esse efeito reproduz o padrão observado no gráfico de barras de erros, Figura 18 (sem covariação), validando assim, a diferença entre essas formas clínicas.

Ao se analisar a citocina IL-17, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre: LCAD e LCL [La] ( $p=0,000$ ) e LCL [Lb]



( $p=0,000$ ); LCL [*La*] e LCM ( $p=0,000$ ); e entre LCL [*Lb*] e LCM ( $p=0,000$ ). Não houve diferença com significância estatística entre LCAD e LCM ( $p=1,000$ ).

Desse modo, ao se incluir o TED como covariável na análise de expressão de IL-17 no espectro da LTA, observou-se que entre as formas clínicas LCM e as formas LCL [*La*] e LCL [*Lb*] houve um efeito significativo do TED, confirmado pelo post-hoc Bonferroni, mas tal efeito reproduz o padrão observado no gráfico de barra de erro (sem covariação), validando a diferença entre as formas clínicas.

As demais diferenças das densidades de células IL-17 entre as formas clínicas permaneceram significativas mesmo após a covariação com TED, mostrando que essas diferenças decorrem de uma idiosincrasia distinta de uma forma clínica em comparação com outra, independentemente do TED do paciente, assim como ocorreu em ROR $\gamma$ t.

Analisou-se as diferenças da produção de IL-6 e foram encontradas diferenças estatísticas significativas na produção de IL-6 entre: LCAD e LCM ( $p=0,000$ ); LCAD e LCL [*La*] ( $p=0,036$ ); LCL [*La*] e LCL [*Lb*] ( $p=0,000$ ); e entre LCM e as formas LCL [*La*] e LCL [*Lb*] ( $p=0,000$ ).

Assim, ao se incluir o TED como covariável na análise de expressão de IL-6 no espectro da LTA, observou-se que nas formas clínicas LCAD e LCL [*Lb*] houve influência do TED, pois sem covariar (gráfico de barra de erros) havia diferença na produção de IL-6 entre essas duas formas clínicas, porém, após a ANCOVA, o post-hoc Bonferroni mostrou um valor de  $p=1,00$  (sem diferenças), com isso, é possível se inferir que o elemento que gerava as diferenças anteriores à ANCOVA não é a idiosincrasia das formas clínicas LCAD e LCL [*Lb*], mas sim que, o TED exerceu interferência nessas duas formas clínicas.

Também foi observado que entre as formas clínicas LCAD e LCM não havia diferenças estatísticas na produção de IL-6 sem covariar com o TED (gráfico de barras de erros), porém, ao realizar a ANCOVA, foram obtidos valores de tamanho do efeito ( $\eta=0,074$ ,  $p=0,000$ ), com post-hoc Bonferroni ( $p=0,000$ ), que evidenciam diferenças estatísticas nas densidades de células IL-6+ em LCAD e LCM, o que significa que o TED é fator de interferência para a expressão de IL-6 nas formas LCAD e LCM.

Com isso, foi possível afirmar que o tempo de evolução da doença interfere no padrão da resposta imune celular de IL-6 de modo a gerar diferenças, com maior expressão desse marcador entre as formas clínicas LCAD e LCL [*Lb*] e entre LCAD e LCM.

As demais diferenças das densidades de células IL-6+ entre as formas clínicas permanecem significativa mesmo após a inclusão da covariável TED, mostrando que essas diferenças decorrem de uma idiosincrasia distinta de uma forma clínica em comparação com outra, independentemente do TED.

Ao se analisar a produção de TGF- $\beta$ , a partir do post-hoc Bonferroni, foi possível encontrar diferenças estatísticas significativas na produção desse marcador imunológico entre as formas clínicas: LCAD e LCL [*La*] ( $p=0,000$ ), LCAD e LCL [*Lb*] ( $p=0,000$ ), LCAD e LCM ( $p=0,000$ ), LCL [*La*] e LCL [*Lb*] ( $p=0,058$ ), LCM e LCL [*La*] ( $p=0,000$ ). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre LCM e LCL [*Lb*] ( $p=0,100$ ).

Portanto, ao se incluir o TED como covariável na análise de expressão de TGF- $\beta$  no espectro da LTA, observou-se que o padrão de expressão observada no gráfico de barras de erros desse fator se manteve, mostrando que as diferenças entre as formas clínicas são decorrentes de idiosincrasias distintas entre elas, e que não dependem do TED.

No que se refere à IL-1 $\beta$ , ao realizar o post-hoc Bonferroni, também foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na produção dessa citocina entre: LCAD e LCL [*La*] ( $p=0,000$ ) e LCL [*Lb*] ( $p=0,000$ ); LCM e LCL [*La*] ( $p=0,000$ ) e LCL [*Lb*] ( $p=0,000$ ). Não foram encontradas diferenças com significância estatística entre LCAD e LCM ( $p=1,000$ ).

As diferenças das densidades de células IL-1 $\beta$ + entre as formas clínicas foram: LCAD e LCL [*La*] e LCL [*Lb*]; LCM e LCL [*La*] e LCL [*Lb*] permanece significativa mesmo após a inclusão da covariável TED. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa entre as formas clínicas LCAD e LCM ( $p=1,000$ ) e entre as duas formas clínicas localizadas. A partir desses resultados é possível afirmar que as diferenças decorrem de uma idiosincrasia distinta de uma forma clínica em comparação com outra, independente do TED do paciente.

Por fim, ao se analisar a expressão de IL-23, o post-hoc Bonferroni mostrou diferenças estatisticamente significantes na produção desse marcador entre: LCAD e LCL [*La*] ( $p=0,000$ ) e LCL [*Lb*] ( $p=0,000$ ); LCAD e LCM ( $p=0,000$ ); e entre LCM e LCL [*La*] ( $p=0,000$ ) e LCL [*Lb*] ( $p=0,000$ ).

As diferenças das densidades de células IL-23+ entre as formas clínicas permanece significativa mesmo após a inclusão da covariável TED. Além disso, não houve diferenças estatísticas significativas entre as formas clínicas localizadas ( $p=0,697$ ). A partir desses resultados é possível afirmar que as diferenças decorrem de uma idiosincrasia distinta de uma forma clínica em comparação com outra, independentemente do TED do paciente.

#### **4.5. Análise do efeito de TED sobre mediadores imunológicos nas alterações histopatológicas**

##### **4.5.1. Padronização das variáveis histopatológicas**

Partindo-se da caracterização histopatológica (Tabela 4), foi possível transformar em z-score as médias de células imunomarcadas para os diferentes marcadores imunológicos do perfil Th17, de acordo com as categorias de alteração histopatológica observadas, que estão sumarizadas na Tabela 7, a seguir:

**Tabela 7** - Densidades médias em z-score dos mediadores imunológicos do perfil Th17 de acordo com as categorias de alterações histopatológicas observadas no espectro da LTA.

Estatística descritiva						
Tipo de infiltrado/ n amostral	Médias z-score por marcadores imunológicos (média±desvio padrão)					
	ROR $\gamma$ t	IL-17	IL-6	TGF- $\beta$	IL-1 $\beta$	IL-23
<b>Discreto (n=1)</b>	1,58±0,51	0,11±0,09	1,25±0,28	1,08±0,37	0,97±0,27	1,39±0,00
<b>Moderado (n=15)</b>	-0,43±0,78	-0,54±0,82	-0,45±0,69	-0,35±0,55	-0,63±0,34	-0,47±0,51
<b>Intenso (n=24)</b>	0,23±1,02	0,39±0,097	0,26±1,07	0,20±1,17	0,42±1,08	0,28±1,12
Distribuição do infiltrado/ n amostral	Médias z-score por marcadores imunológicos (média±desvio padrão)					
	ROR $\gamma$ t	IL-17	IL-6	TGF- $\beta$	IL-1 $\beta$	IL-23
<b>Focal (n=13)</b>	-0,13±0,94	-0,16±0,91	-0,18±0,68	-0,04±0,90	-0,34±1,07	-0,53±0,94
<b>Difuso (n=27)</b>	0,05±1,03	0,08±1,03	0,08±1,10	0,02±1,05	0,15±1,07	0,03±1,03
Granuloma/ n amostral	Médias z-score por marcadores imunológicos (média±desvio padrão)					
	ROR $\gamma$ t	IL-17	IL-6	TGF- $\beta$	IL-1 $\beta$	IL-23
<b>Ausente (n=27)</b>	-0,01±1,11	0,01±0,07	1,88±0,07	0,053±1,08	0,17±1,01	0,16±1,01
<b>Esboço (n=8)</b>	0,31±0,67	0,18±0,13	1,82±0,12	0,058±1,00	-0,09±1,09	-0,06±1,06
<b>Bem formado (n=5)</b>	-0,56±0,73	-0,34±0,08	1,28±0,16	-0,37±0,36	-0,60±0,19	-0,62±0,47
Parasitismo/ n amostral	Médias z-score por marcadores imunológicos (média±desvio padrão)					
	ROR $\gamma$ t	IL-17	IL-6	TGF- $\beta$	IL-1 $\beta$	IL-23
<b>Negativo (n=8)</b>	0,74±0,79	0,33±1,04	0,46±1,02	-0,55±0,06	0,10±1,13	-0,30±0,88
<b>Discreto (n=15)</b>	-0,40±0,83	-0,34±1,00	-0,29±0,88	-0,44±0,05	-0,17±0,94	-0,19±0,70
<b>Moderado (n=7)</b>	-0,24±0,79	-0,27±0,73	-0,76±0,48	-0,32±0,07	-0,75±0,26	-0,64±0,45
<b>Intenso (n=10)</b>	0,74±1,07	0,46±0,88	0,47±1,00	1,28±0,11	0,70±0,85	0,98±1,06

A seguir serão apresentados apenas os resultados mais relevantes obtidos nos testes da ANCOVA e post hoc Bonferroni. As análises mostraram um efeito da covariável TED ( $\eta=0,104$ ,  $p=0,000$ ) sobre a produção de IL-17 entre as categorias de granuloma - ausente e bem formado - e entre ausente e esboço. Também foi encontrado efeito do TED ( $\eta=0,432$ ,  $p=0,000$ ) sobre a produção de TGF- $\beta$  nas categorias: granuloma ausente e esboço e entre ausente e granuloma bem formado.

Quando se analisou a variável dependente parasitismo nas diferentes intensidades (1+ a 3+), usando ANCOVA e post hoc Bonferroni, foi observado efeito do TED ( $\eta=0,145$ ,  $p=0,000$ ) sobre a expressão de ROR $\gamma$ t, e de IL-6 (0,198,  $p=0,000$ ).

Com isso, foi possível afirmar que o TED interfere no padrão da resposta imune celular de IL-17 e TGF- $\beta$  de modo a gerar diferenças no padrão de formação de granulomas, e essa mesma covariável (TED) também interfere no padrão da resposta imune celular de ROR $\gamma$ t e IL-6 que reflete no parasitismo tecidual.

Também foram analisados o efeito do TED covariando sobre a expressão dos marcadores imunológicos nos diferentes tipos de infiltrados, porém não foram observados resultados significantes (dados não mostrados).

## **5.DISSCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

A leishmaniose tegumentar americana apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, desde a forma cutânea localizada, forma central do espectro, até as formas polares, a hiper-reativa (LCM), caracterizada pelo acometimento mucoso, e o polo de hiporreatividade, caracterizado por lesões nodulares não ulceradas disseminadas principalmente na face e extremidades de membros superiores e inferiores. Essa diversidade de manifestações clínicas é resultante da interação parasito-hospedeiro, ou seja, dependendo da espécie infectante e do background genético e imunológico do hospedeiro, este pode desenvolver formas distintas da LTA (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; SILVEIRA, 2019).

No Brasil, as espécies de *Leishmania* de maior importância clínica e epidemiológica são *L. (V.) braziliensis*, que pode causar a forma cutâneo localizada (LCL) e a mucosa (LCM); e a *L. (L.) amazonensis*, associada à forma cutâneo localizada e à anérgica difusa (LCAD) (Silveira, 2019).

No presente estudo, se trabalhou com uma amostragem que representa a diversidade de manifestações clínicas do espectro da LTA na região do Pará, em especial causadas pelas espécies de maior potencial patogênico no Brasil, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Todos os casos foram atendidos no centro de referência em Leishmanioses -Instituto Evandro Chagas – Pará.

Ao se analisar os dados epidemiológicos dos pacientes incluídos no presente estudo, observou-se que a maioria dos infectados eram do sexo masculino (90,3%), e em fase adulta. Porém, vale ressaltar que os casos das formas polares, principalmente LCAD, possuem tempo de evolução de doença bastante longos, adquirindo a doença quando criança ou em faixa etária jovem. Esses dados corroboram os achados de Gonçalves et al. (2019), que investigaram a relação entre a incidência de 234 casos de LT oriundos de três municípios do Pará/BR com fatores sociodemográficos e de desmatamento, e mostraram também uma maior frequência de casos de LCL em adultos do sexo masculino, provenientes de áreas rurais. Essa maior incidência em pacientes com essas características pode ser devida à realização de atividades laborais, desmatamento e ocupação desordenada

de áreas desmatadas, que colocam o homem em contato com áreas onde o ciclo da doença está estabelecido, tornando-o vulnerável à infecção.

No que diz respeito às formas polares do espectro da LTA, 14,6% dos pacientes apresentaram a forma LCM no presente estudo. Essa forma clínica rara manifesta-se após uma aparente cura de lesões cutâneas localizadas, evoluindo para o comprometimento mucoso, e pode estar relacionada à diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis*, interrupção do tratamento com a aparente melhora clínica da forma localizada, que pode evoluir para a forma mucosa (SILVEIRA, 2019) e um longo tempo de incubação, além de possivelmente uma faixa etária maior, como encontrado por Machado-Coelho (2005), ao identificar possíveis fatores de risco para o desenvolvimento da forma LCM em pacientes do sudeste do Brasil, no período de 1966 a 1999.

Ao analisar a forma anérgica da LTA, 19,5% dos pacientes do presente estudo apresentaram essa forma clínica, com tempo de evolução da doença bastante longo (9-35 anos). Como nessa forma clínica há uma hiporreatividade da resposta imune celular, o tratamento convencional pode resultar em recaídas e a doença apresenta-se de forma crônica e de longo tempo de evolução (SILVEIRA et al., 2008; SILVEIRA, 2019).

Vale ressaltar que a espécie de parasito infectante apresenta um papel importante na imunopatogenia da LTA. Alguns mecanismos de escape do parasito frente à resposta de defesa do hospedeiro têm sido descritos, mostrando que este possui a capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro frente à infecção (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998; BOGDAN, 2020; DE MENEZES et al., 2017; SEN et al., 2011).

Um desses mecanismos de sobrevivência dos parasitos nos macrófagos é a capacidade de utilizar L-arginina. Esse aminoácido pode reagir com a enzima óxido nítrico sintase (NOS), e essa reação resulta na produção de óxido nítrico, importante fator leishmanicida, principalmente das espécies tegumentares. Por outro lado, estudos demonstraram que parasitas de *L. (L.) amazonensis* podem utilizar L-arginina ativando a via das poliaminas (que são importantes para sua proliferação celular) por meio da arginase, resistindo assim, ao “burst” oxidativo das células



hospedeiras (ACUÑA et al., 2017; ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018; CASTILHO-MARTINS et al., 2011).

Trabalhos na literatura tem mostrado que os antígenos específicos da espécie infectante, podem desencadear dois tipos de resposta imune celular: na infecção por *L. (V.) braziliensis* há indução de perfil preferencialmente Th1 e *L. (L.) amazonensis*, por sua vez, induz uma resposta do tipo Th2 (SILVEIRA et al., 2008. Silveira (2019) a partir de análises de mRNA por RT-PCR e por imunistoquímica, evidenciou maior expressão de marcadores imunológicos como IL-10, TGF- $\beta$  e um perfil regulatório mais evidente na forma anérgica, LCAD, e marcadores de perfil inflamatório como TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  mais expressos na forma hiperérgica, LM, mostrando a capacidade destas diferentes espécies de modularem a resposta imune adaptativa, resultando nas diferentes formas clínicas descritas (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; SILVEIRA et al., 2008; CAMPOS et al. 2018; SILVEIRA, 2019).

Além dos perfis Th1 e Th2, a participação de outros tipos celulares na infecção por *Leishmania* também tem sido estudada, como as células Treg e Th17, afim de compreender o papel das citocinas produzidas nesses perfis de resposta frente à *Leishmania* sp (RODRIGUES et al., 2014; MENEZES, 2013; ARAUJO FLORES et al., 2020; GONZALEZ et al., 2020a), pois esse conhecimento poderá possibilitar identificação de marcadores de risco/severidade da LTA, além do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, visto que as formas de tratamento atuais, embora eficazes, podem levar a efeitos colaterais, resistência do parasito e possíveis recidivas (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016; BEZERRA-SOUZA et al., 2019).

As células Th17 têm sido associadas à imunopatogênese de diversas doenças inflamatórias, inclusive às leishmanioses (MENEZES, 2013; KUWABARA et al., 2017; ARAUJO-FLORES et al., 2020; GONZALEZ et al., 2020a; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017).

Foi demonstrada a participação dessas células na resposta imune contra a infecção por *Leishmania* sp, contribuindo na produção de citocinas pró-inflamatórias que favorecem uma resposta inflamatória no sítio da infecção (BACELLAR et al., 2009; ARAUJO-FLORES et al., 2020; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017). Dentre as citocinas pró-inflamatórias, a IL-1 $\beta$  está relacionada à diferenciação das Th17 (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002; ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007; WILSON et al., 2007). A IL-6 pode desempenhar um papel pró-inflamatório juntamente com IL-1 $\beta$  pela ativação de fagócitos (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR,

2016; QUARESMA, 2019) A IL-17 é a principal citocina produzida pelas células Th17 ROR $\gamma$ t+, e tem como função principal a indução da inflamação do tecido e proteção do hospedeiro contra patógenos (BETTELLI; KORN; KUCHROO, 2007).

Assim, neste estudo viu-se a necessidade de avaliar a real participação das células Th17 e seus mediadores imunológicos, envolvidos na diferenciação e manutenção das mesmas (ROR $\gamma$ t, IL-17, IL-6, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  e IL-23), no espectro clínico e imunológico da LTA, com ênfase nas formas polares e mais graves. Visando contribuir para o melhor entendimento da imunopatogenia dessa doença, que afeta boa parte da população brasileira e mundial (OPAS, 2020).

A diferenciação clássica de células TCD4<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> em células Th17 clássica é estimulada na presença de IL-6 e TGF- $\beta$ . A ativação do fator de transcrição ROR $\gamma$ t estimula a produção dos receptores de IL-1 e IL-23 (IL-23R e IL-1R1, respectivamente) e a produção de IL-21. Além disso, citocinas como IL-23 e IL-1 $\beta$  estão envolvidas na finalização e manutenção do processo de diferenciação da célula Th17 (BOAVENTURA et al., 2010; GHORESCHI et al., 2010; PETERS; LEE; KUCHROO, 2011).

Contudo, estudos demonstram a diferenciação de células Th17 na ausência de TGF- $\beta$ , mas na presença de IL-1 $\beta$  e IL-23, levando à sublinhagem Th17 “alternativa”, considerada mais patogênica que a Th17 clássica. Essas sublinhagens de células Th17 apresentam características efetoras distintas: enquanto as Th17 alternativas produzem IFN- $\gamma$  e estão associadas à eliminação de parasitos; as Th17 clássicas produzem IL-10 e estão associadas a um papel regulatório e de supressão da resposta do hospedeiro (BOAVENTURA et al., 2010; GHORESCHI et al., 2010; PETERS; LEE; KUCHROO, 2011).

No presente estudo, foram detectadas densidades médias maiores de células que expressavam ROR $\gamma$ t e IL-17 nas formas polares e mais graves do espectro da LTA causada por parasitos de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* (LCAD e LCM), corroborando estudos anteriores que demonstraram a participação da interleucina IL-17 na patogenia da LTA causada por parasitos dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, porém não no espectro clínico e imunopatológico da doença, causada pelas duas espécies de maior interesse clínico-epidemiológico no Brasil (BOAVENTURA et al., 2010; MENEZES, 2013; ARAUJO-FLORES et al., 2020; GONZALEZ et al., 2020a).

Boaventura et al. (2010), ao avaliar a expressão de citocinas relacionadas ao perfil Th17 em pacientes com LCM causada por *L. (V.) braziliensis* oriundos da Bahia, encontraram uma correlação positiva entre a expressão de mRNA de IL-17 e ROR $\gamma$ , assim como uma correlação positiva entre a expressão de mRNA de ROR $\gamma$ t e IL-23, vista por PCR em tempo real, mostrando uma associação entre esse fator de transcrição e citocinas envolvidas na diferenciação e manutenção das células do perfil Th17.

Em um estudo com pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* com as formas clínicas LCL e LCM, Bacellar et al. (2009) encontraram uma maior produção de IL-17 em LCM do que em LCL, além de uma associação positiva entre IL-17 e TNF- $\alpha$ , indicando um papel pró-inflamatório da IL-17 além de sua participação no dano tecidual dessa forma clínica. Em estudo mais recente, Campos et al. (2018) mostraram uma maior expressão de TNF- $\alpha$  na forma polar hiperérgica da LTA, possivelmente agindo em sinergia com IL-17.

Gonzalez et al. (2020) o avaliarem a expressão de células ROR $\gamma$ t+ e IL-17+ em lesões de pacientes infectados com *L. (V.) panamensis*, por imunistoquímica, encontraram uma correlação positiva entre esses mediadores imunológicos, mostrando a participação de células do perfil Th17 na patogenia de LTA em infecções por parasitos do subgênero *Viannia*. Ainda no mesmo estudo, foi identificada uma correlação inversa entre a densidade de células que expressaram o fator de transcrição ROR $\gamma$ t e a presença de formas amastigotas, sugerindo que as células Th17 podem contribuir para a eliminação dos parasitos, porém, sua contribuição para a manutenção do processo inflamatório não pode ser descartada.

Araujo-Flores et al. (2020) encontram em lesões de pacientes acometidos com leishmaniose cutânea atípica causada por *L. (L.) infantum chagasi*, correlações positivas entre células ROR $\gamma$ t+ e linfócitos TCD4+, e entre linfócitos TCD4+ e IL-17+, revelando a participação das células do perfil Th17 em infecções por parasitos do subgênero *Leishmania*.

Além da participação da IL-17 na patogenia da LTA demonstrada nas formas polares, também se avaliou *in situ* a expressão de outros mediadores imunológicos do perfil Th17 em pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas do espectro da doença.

A interleucina 6, produzida por macrófagos M1, mastócitos, células dendríticas e linfócitos T, pode desempenhar um papel pró-inflamatório juntamente com

citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  pela ativação de fagócitos (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016; QUARESMA, 2019), e ainda, induzir a produção de IL-17 quando associada à TGF- $\beta$ , pela ativação da STAT3 e diferenciação de células Th17. Neste estudo, pôde-se observar uma produção elevada nas formas clínicas polares e mais graves causadas por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, demonstrando assim, uma associação com a gravidade da doença, o que sugere que esta citocina pode ser um marcador de gravidade da LTA, como ocorre na leishmaniose visceral (COSTA et al., 2013; RAMOS et al., 2016).

O TGF- $\beta$  possui um papel importante nos estágios iniciais da infecção. É produzido por macrófagos, células dendríticas, fibrócitos e linfócitos. É capaz de inibir a proliferação de células efetoras Th1 e a produção de IFN- $\gamma$ , IL-12 e citocinas-chave no controle e eliminação do parasita (MONTROYA; VELILLA; RUGELES, 2012). Por ser uma citocina imunoregulatória, inibe algumas funções de células fagocíticas que participam na defesa contra parasitas intracelulares como *Leishmania*. Em conjunto com IL-10, suprime uma variedade de células e componentes de imunidade protetora, incluindo TCD4+, TCD8+, células B e APCs, NK, bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias que são necessárias para a proteção antiparasitária, portanto essas citocinas (IL-10 e TGF- $\beta$ ) limitam a resposta imune em pacientes com LC, contribuindo para a persistência do parasito pela inibição da ativação de macrófagos (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016).

No presente trabalho, pacientes acometidos com LCAD apresentaram maior densidade de células TGF- $\beta$ + do que os demais casos, além da detecção de uma riqueza de formas amastigotas em macrófagos vacuolizados, confirmando que o TGF- $\beta$ , possivelmente, está inibindo a ativação dessas células e favorecendo uma resposta imune ineficiente desses pacientes, o que levaria ao desenvolvimento de lesões típicas do polo hiporreativo da LTA.

Estudos sugerem que na presença de TGF- $\beta$  ocorre a geração de células Th17 clássicas, que em conjunto com células Th2 e TregFoxp3, produzem citocinas regulatórias, tais como IL-10, e podem estar associadas à macrófagos M2 que apresentam um papel regulatório e baixa apresentação de antígeno e arginase, resultando na sobrevivência do parasito (GHORESCHI et al., 2010; PETERS; LEE; KUCHROO, 2011).

Além disso, alguns estudos mostram que a IL-17 pode contribuir para a polarização de macrófagos do tipo M2 pela ativação da NF- $\kappa$ B, mostrando assim um papel amplo dessa citocina (SHEN et al., 2018).

Uma densidade significativamente maior de macrófagos do tipo M2 foram encontrados na forma LCAD em um estudo utilizando parte das amostras do presente trabalho, contribuindo para explicar a persistência da infecção nessa forma clínica (SANDOVAL PACHECO et al., 2021).

A expressão elevada de células TGF- $\beta$ + e de mediadores do perfil Th17 nos casos de LCAD, sugere que essas células apresentam um perfil anti-inflamatório corroborando o perfil de anergia observado nessa forma clínica.

Com relação à IL-1 $\beta$ , os resultados aqui obtidos mostrando uma expressão significativamente maior de células IL-1 $\beta$ + em pacientes com as formas polares e mais graves do espectro de doença causada por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, corroboram os achados da literatura.

A associação entre a severidade da doença e a expressão de IL-1 $\beta$  foi demonstrada em estudos com *L. (L.) mexicana*, espécie causadora das formas LCD e LCL, sugerindo que essa citocina apresenta um papel importante na polarização das formas clínicas (FERNÁNDEZ-FIGUEROA et al., 2012; NOVAIS et al., 2017).

Xin et al. (2007) ao infectarem camundongos com *L. (L.) amazonensis* e tratá-los com injeções de IL-1 $\beta$ , encontram níveis mais altos de IL-10, IL-17 e IL-6, além de uma expansão rápida da doença, com carga parasitária elevada. Ora, sabendo que a produção de IL-1 $\beta$  é dependente da ativação do inflamossoma NLRP3, Novais et al. (2017), utilizaram um inibidor para esse complexo, que resultou na baixa expressão de IL-1 $\beta$  e na redução da lesão de camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis*. Esses dados confirmam os achados de Gurung, et al. (2015) que testaram a resistência/susceptibilidade à infecção por *L. major* em camundongos NLRP3<sup>-/-</sup>, ASC<sup>-/-</sup>, e CASP1<sup>-/-</sup>, CASP11<sup>-/-</sup> ou seja, incapazes de produzirem inflamossomas funcionais, resultando na resistência do hospedeiro frente à infecção. Assim, é possível associar o papel de IL-1 $\beta$  à susceptibilidade e gravidade da LTA.

A expressão IL-23, assim como de IL-6 se mostrou aumentada nas formas polares (LCAD e LCM) do espectro causado por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Esses dados sugerem uma importante função dessas citocinas na

resposta imune da LTA, contribuindo assim, para a persistência da inflamação, estando associada à cronicidade da doença.

A interleucina-23, componente da família IL-12, é uma proteína heterodimérica secretada por diversos tipos celulares. Na infecção, desempenha um papel fundamental na diferenciação e manutenção da ação efetora de células Th17 e está envolvida na constituição de um ambiente pró-inflamatório (MENEZES, 2013; ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018 et al., 2018; DIETZE-SCHWONBERG et al., 2018).

A expressão de IL-23 em conjunto com a baixa expressão de TGF- $\beta$ + na forma LCM, sugere que as células Th17 observadas nessa forma clínica provavelmente correspondem a sublinhagem Th17 alternativas, consideradas mais patogênicas que as clássicas, que podem estar contribuindo para a exacerbação da resposta inflamatória do pólo hiperreativo do espectro da LTA, como demonstrado na literatura (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017).

Em conjunto, os mediadores imunológicos ROR $\gamma$ t, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-23, associados à diferenciação de células TCD4+ *naïve* em células do perfil Th17, apresentaram expressão elevada nas formas polares do espectro da LTA em infecções causadas por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

Nossos achados sugerem que a resposta imune relacionada ao perfil Th17 favorece a persistência da infecção e severidade da doença. A expressão aumentada de ROR $\gamma$ t, IL-17, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-23 e a baixa densidade de células TGF- $\beta$ + na forma LCM, sugere que as células Th17 “alternativas” estejam atuando nessa forma clínica; que também atraem neutrófilos para o sítio da infecção e em conjunto com células Th1 podem estar produzindo citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , participando da ativação de macrófagos M1, que produzem NO e outras espécies reativas de oxigênio, capazes de eliminar os parasitos, porém, podem contribuir também para o dano tecidual que ocorre na LCM.

Na LCAD, acredita-se que a IL-17 também esteja sendo produzida por outros tipos celulares, dado o predomínio de macrófagos no infiltrado inflamatório dessa forma clínica e a alta densidade de M2 nesses casos, cuja diferenciação pode ser induzida por essa citocina (SHEN et al., 2018; SANDOVAL-PACHECO et al., 2021). Além disso, a alta densidade de células ROR $\gamma$ t+, TGF- $\beta$ +, IL-6+, IL-1 $\beta$ + e IL-23+ sugere que as células Th17 “clássicas” possam estar atuando na lesão de LCAD,

juntamente com células T regulatórias (TregFoxp3, Tr1), que produzem altas concentrações de IL-10, levando à supressão da resposta imune celular (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017). Isto, somado aos mecanismos de escape da espécie *L. (L.) amazonensis* (desativação de macrófagos) e favorecimento do crescimento desse parasita pela arginase, também produzida por M2 na produção de arginase (ACUÑA et al., 2017), que ativa a via das poliaminas (produção de uréia+L-ornitina), culminará no pólo de anergia da LTA.

No presente estudo foi avaliado o efeito da covariável Tempo de Evolução da Doença (TED) sobre a expressão dos marcadores imunológicos do perfil Th17 nas diferentes formas clínicas da doença e nas alterações histopatológicas observadas.

O TED exerceu efeito sobre a expressão de ROR $\gamma$ t entre as formas clínicas LCAD e LCM; e na expressão de IL-6 entre as formas clínicas LCAD e LCM e entre LCAD e LCL [*Lb*]. Desse modo, o TED representa uma variável independente importante para a maior expressão desses mediadores imunológicos do perfil Th17 nas diferentes formas clínicas do espectro da LTA, exercendo influência significativa em alguns casos, onde a doença é grave e de maior cronicidade. Além disso, os marcadores ROR $\gamma$ t e IL-6 podem representar, aqui, fatores de gravidade, à semelhança do que ocorre na Leishmaniose Visceral (COSTA et al., 2013), uma vez que a maior densidade de células que expressaram ROR $\gamma$ t e IL-6, sob o efeito do TED, ocorreu principalmente nas formas polares.

Esse efeito do TED também foi visto sobre a maior expressão de ROR $\gamma$ t e de IL-6 quando se analisou a variável dependente parasitismo nas diferentes intensidades, especialmente no parasitismo intenso, que corresponde ao polo de anergia.

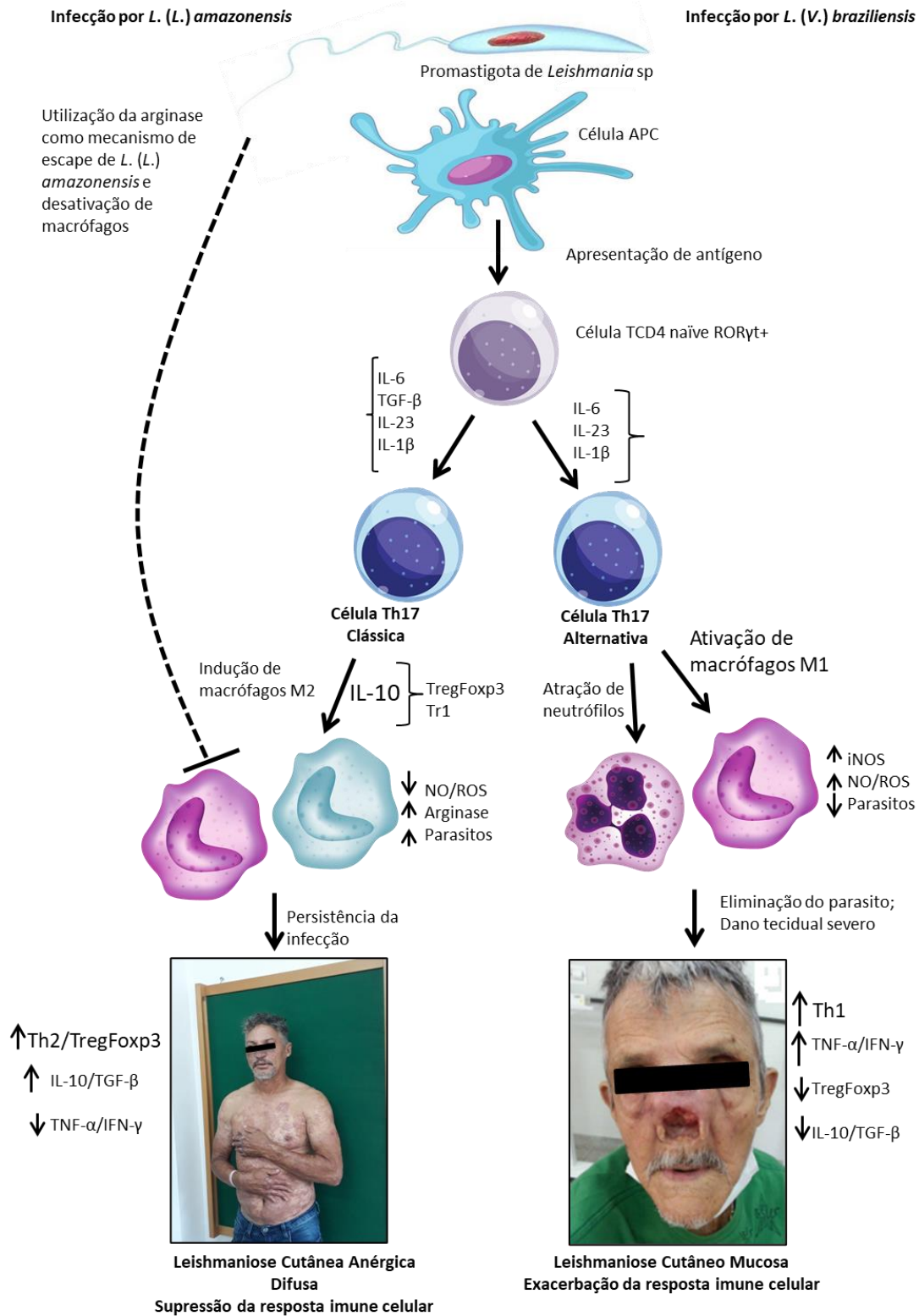
Ao se analisar se o TED interferiu no padrão da resposta imune celular (marcadores imunológicos) de modo a gerar diferenças no padrão de reação granulomatosa, se observou que essa covariável exerceu maior efeito sobre a expressão de IL-17 e TGF- $\beta$  nas diferentes categorias de reação granulomatosa. Esses achados podem estar relacionados com a participação da sublinhagem de células Th17 alternativas nas formas clínicas do polo de hiper-reatividade, onde ocorre hipersensibilidade granulomatosa, processo ocasionado pelo antígeno da espécie *L.(V.) braziliensis*.

Assim, os nossos achados mostram a participação de uma resposta do tipo Th17, especialmente nas formas polares e mais graves do espectro clínico e

imunopatológico da LTA. O papel dúbio apresentado pelas células Th17 possivelmente favorece uma supressão de resposta imune e persistência parasitária na forma clínica LCAD; enquanto que na LCM essas células contribuem para uma resposta imune exacerbada, escassez parasitária, mas também para o dano tecidual.

Diante do exposto, é possível propor um modelo do que pode estar acontecendo no espectro clínico e imunopatológico da LTA, baseado nos achados referentes aos marcadores imunológicos do perfil Th17 acima apresentados (Figura 19).





**Figura 19-** Participação das células Th17 na imunopatogenia da LTA causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Após a interação entre as formas promastigotas de *Leishmania* com as células hospedeiras, as células apresentadoras de antígeno processam os antígenos obtidos no local da infecção e os apresentam às células TCD4+ naíve. Dependendo dos mediadores imunológicos presentes no microambiente inflamatório, as células TCD4+ podem se diferenciar em vários grupos, como as Th1, Th2, Th17 e Treg. Na presença de citocinas como IL-6, TGF-β, IL-23 e IL-1β, ocorre a diferenciação de células Th17 clássicas, que produzem IL-10, além da IL-17, e somado aos mecanismos de escapes da espécie *L. (L.) amazonensis* (que são capazes de inibir a atividade macrófagica usando a arginase), pode culminar no pólo de anergia da LTA, levando à

LCAD, apresentando baixa expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e expressão aumentada de citocinas regulatórias (TGF- $\beta$  e IL-10), com presença de células Th2 e TregFoxp3 aumentada, além de um predomínio de macrófagos M2, que apresentam funções regulatórias. Por outro lado, na presença de citocinas como IL-6, IL-23 e IL-1 $\beta$  e baixa expressão de TGF- $\beta$ , como ocorre na LCM, pode ocorrer a diferenciação de células Th17 alternativas, que atraem neutrófilos e podem produzir citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , participando da ativação de macrófagos M1, que produzem NO e outras espécies reativas de oxigênio, que são moléculas leishmanicidas que eliminam os parasitos, porém, contribuindo para o dano tecidual da forma LCM, pela exacerbação da resposta imune celular, com presença de células Th1. **iNOS**: Óxido nítrico sintase indutível; **ROS**: espécies reativas de oxigênio; **NO**: óxido nítrico. Adaptado de: GHORESCHI et al., 2010; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, 2017. Dados complementares obtidos de MENEZES, 2013; CAMPOS et al., 2018; SILVEIRA, 2019.

## **6.CONCLUSÕES**

## 6. CONCLUSÕES

- A expressão dos mediadores imunológicos do perfil Th17 mostrou-se positiva em todas as lesões de pacientes com diferentes formas clínicas de LTA causadas por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*;
- A densidade de células TCD4+ROR $\gamma$ t+ foi significativamente maior nas formas polares, LCAD e LCM, do espectro da LTA causada por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*;
- A análise imunopatológica *in situ* dos mediadores imunológicos do perfil Th17, mostrou densidades significativamente maiores de células IL-17+, IL-6+, IL-1 $\beta$ + e IL-23+ nas formas polares (LCAD e LCM) do espectro da doença comparada às formas centrais (LCL[La] e LCL[Lb]);
- A densidade de células TGF- $\beta$ + foi significativamente maior no pólo hiporreativo do espectro da LTA (LCAD), comparado às demais formas clínicas da doença;
- A avaliação do efeito do tempo de evolução da doença sobre a expressão do fator de transcrição ROR $\gamma$ t e dos mediadores da resposta Th17 mostrou que TED interferiu no padrão de resposta inflamatória, apresentando efeito sobre a produção de ROR $\gamma$ t e IL-6 nas diferentes formas clínicas;
- A avaliação do efeito do tempo de evolução de doença sobre expressão dos mediadores imunológicos levou a uma maior expressão de ROR $\gamma$ t, IL-17, TGF- $\beta$  e IL-23 nos achados histopatológicos e sobre ROR $\gamma$ t e IL-6 no parasitismo;
- A análise do efeito do TED covariando sobre a expressão dos marcadores imunológicos nos diferentes tipos de infiltrados não mostraram resultados relevantes;
- A caracterização *in situ* das células do perfil Th17 no espectro da LTA, com maiores densidades de células imunomarcadas para ROR $\gamma$ t, IL-17, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-23 nas formas polares e mais graves da LTA, sugere uma importante participação dessas células na resposta imune celular e associação com a gravidade da doença;
- As células do perfil Th17 participam da imunopatogênese da LTA causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, mostrando um papel dúbio, tanto pró-

inflamatório, quanto anti-inflamatório, possivelmente favorecendo uma supressão de resposta imune e persistência parasitária na forma clínica LCAD; e contribuindo para uma resposta imune exacerbada e escassez parasitária na LCM.

## **7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARÃO, T. L. DE S. et al. Correlation between nerve growth factor and tissue expression of IL-17 in leprosy. **Microbial pathogenesis**, v. 90, p. 64–8, jan. 2016.

ABDELADHIM, M. et al. Molecular Diversity between Salivary Proteins from New World and Old World Sand Flies with Emphasis on *Bichromomyia olmeca*, the Sand Fly Vector of *Leishmania mexicana* in Mesoamerica. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 7, p. e0004771, 2016.

ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V et al. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. **Nature immunology**, v. 8, n. 9, p. 942–9, set. 2007.

ACUÑA, S. M. et al. Arginase expression modulates nitric oxide production in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **PloS one**, v. 12, n. 11, p. e0187186, 2017.

AKOPYANTS, N. S. et al. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5924, p. 265–8, 10 abr. 2009.

ARAUJO FLORES, G. V. et al. Th17 lymphocytes in atypical cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi* in Central America. **Parasite Immunology**, v. 42, n. 11, 2020.

ATRI, C.; GUERFALI, F. Z.; LAOUINI, D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, 2018.

BABALOO, Z. et al. Serum profile of IL-1 $\beta$  and IL-17 cytokines in patients with visceral leishmaniasis. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 69, p. 101431, abr. 2020.

BACELLAR, O. et al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 200, n. 1, p. 75–8, 1 jul. 2009.

BANERJEE, A. et al. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in *Leishmania* pathogenesis and in protective immunity by *Leishmania* vaccines. **Cellular Immunology**, v. 309, 2016.

BASANO, S. DE A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, 2004.

BERNARDINI, N. et al. IL-17 and its role in inflammatory, autoimmune, and oncological skin diseases: state of art. **International Journal of Dermatology**, 2020.

BETTELLI, E.; KORN, T.; KUCHROO, V. K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. **Current Opinion in Immunology**, 2007.

BEZERRA-SOUZA, A. et al. Repurposing butenafine as an oral nanomedicine for visceral leishmaniasis. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 7, 2019.

BOAVENTURA, V. S. et al. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. **European journal of immunology**, v. 40, n. 10, p. 2830–6, out. 2010.

BOGDAN, C. Macrophages as host, effector and immunoregulatory cells in leishmaniasis: Impact of tissue micro-environment and metabolism. **Cytokine: X**, v. 2, n. 4, 2020.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 1, p. 121–34, jan. 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. **Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis**. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BUNTE, K.; BEIKLER, T. Th17 cells and the IL-23/IL-17 axis in the pathogenesis of periodontitis and immune-mediated inflammatory diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019.

CAMPOS, M. B. et al. In vitro infectivity of species of Leishmania (Viannia) responsible for American cutaneous leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 103, n. 4, 2008.

CAMPOS, M. B. et al. Toll-like receptors 2, 4, and 9 expressions over the entire clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania(V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis*. **PloS one**, v. 13, n. 3, 2018.

CONCEIÇÃO-SILVA, F., ALVES, C.R.; Leishmanioses do continente americano. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, 2014, 511p

CASTRO, G. et al. ROR $\gamma$ t and ROR $\alpha$  signature genes in human Th17 cells. **PloS one**, v. 12, n. 8, p. e0181868, 2017.

COSTA, D. L. et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. **Pathogens and Global Health**, v. 107, n. 2, 2013.

COSTA, J. M. L. et al. Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. Supl. 3, 2009.



COULTER, F. et al. IL-17 Production from T Helper 17, Mucosal-Associated Invariant T, and  $\gamma\delta$  Cells in Tuberculosis Infection and Disease. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1252, 2017.

DE MENEZES, J. P. B. et al. Leishmania infection inhibits macrophage motility by altering F-actin dynamics and the expression of adhesion complex proteins. **Cellular microbiology**, v. 19, n. 3, 2017.

DENG, Y.; CHANG, C.; LU, Q. The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, 2016.

DIETZE-SCHWONBERG, K. et al. Insufficient generation of Th17 cells in IL-23p19-deficient BALB/c mice protects against progressive cutaneous leishmaniasis. **Experimental Dermatology**, 2018.

DOBRZANSKI, M. J. et al. Tc1 and Tc2 effector cell therapy elicit long-term tumor immunity by contrasting mechanisms that result in complementary endogenous type 1 antitumor responses. **Journal of immunology** (Baltimore, Md. : 1950), v. 172, n. 3, p. 1380–90, 1 fev. 2004.

DONG, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 5, p. 337–48, maio 2008.

DONG, C. Differentiation and function of pro-inflammatory Th17 cells. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 5, 2009.

ESPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as Leishmania and Endotrypanum. **Parasitology**, v. 145, n. 4, 2018.

ESPIR, T. T. et al. The Role of Inflammatory, Anti-Inflammatory, and Regulatory Cytokines in Patients Infected with Cutaneous Leishmaniasis in Amazonas State, Brazil. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, 2014.

FARIA, D. R. et al. Recruitment of CD8 + T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 432–439, ago. 2009.

FERNÁNDEZ-FIGUEROA, E. A. et al. Disease severity in patients infected with Leishmania mexicana relates to IL-1 $\beta$ . **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, 2012.

FERREIRA, M.U. Parasitologia contemporânea. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2012, pág. 54.

FRANCESQUINI, FC. Avaliação da especificidade do efeito da saliva do flebotômíneo vetor sobre a infectividade da espécie de Leishmania: infecção experimental de Leishmania (L.) amazonensis e Leishmania (V.) braziliensis com a saliva de Lutzomyia flaviscutellata e Lutzomyia (Psychodopygus) complexus em

camundongo Balb/c. [dissertação]. São Paulo: **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**; 2014.

FONSECA, A. B. DE L. et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infectious Diseases of Poverty**, 2017.

GABRIEL, Á. et al. Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, 2019.

GHORESCHI, K. et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- $\beta$  signalling. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 967–71, 21 out. 2010.

GONÇALVES, N. V. et al. Cutaneous leishmaniasis: Spatial distribution and environmental risk factors in the state of Pará, Brazilian Eastern Amazon. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 13, n. 10, 2019.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. DA C. et al. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, 2017.

GONTIJO, B. Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. **Medicina Tropical**, v. 36, n. 13, 2003.

GONZALEZ, K. et al. Involvement of the Inflammasome and Th17 Cells in Skin Lesions of Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) panamensis*. **Mediators of Inflammation**, v. 2020, 2020a.

GONZALEZ CARRION, KA. Caracterização das alterações histopatológicas e da resposta imune celular em lesões de pele de pacientes com leishmaniose cutânea no Panamá [tese]. **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, 2020b.

GONZALEZ-LOMBANA, C. et al. IL-17 Mediates Immunopathology in the Absence of IL-10 Following *Leishmania major* Infection. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 3, 2013.

GRAÇA, G. C. DA et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 664–74, ago. 2012.

GURUNG, P. et al. An NLRP3 inflammasome-triggered Th2-biased adaptive immune response promotes leishmaniasis. **The Journal of clinical investigation**, v. 125, n. 3, p. 1329–38, 2 mar. 2015.

HEADLEY, S. A. et al. Immunohistochemical characterization of cutaneous leishmaniasis in cats from Central-west Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 17, 2019.

HU, Y. et al. The IL-17 pathway as a major therapeutic target in autoimmune diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1217, n. 1, 2011.

JENNINGS, Y. L. et al. Phenotypic characterization of *Leishmania* spp. Causing cutaneous leishmaniasis in the lower Amazon region, western Pará state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* × *Leishmania* (*Viannia*) *shawi shawi*. **Parasite**, v. 21, 2014.

JIN, W.; DONG, C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. **Emerging Microbes and Infections**, 2013.

JIRKŮ, M. et al. New species of insect trypanosomatids from costa rica and the proposal for a new subfamily within the Trypanosomatidae. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 6, 2012.

KANASHIRO-GALO, L. et al. Th17 and regulatory T cells contribute to the in situ immune response in skin lesions of Jorge Lobo's disease. **Medical Mycology**, v. 54, n. 1, 2016.

KATARA, G. K. et al. Analysis of localized immune responses reveals presence of Th17 and Treg cells in cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. **BMC immunology**, v. 14, p. 52, 22 nov. 2013.

KUMAR, P. et al. Prophylactic interferon- $\gamma$  and interleukin-17 facilitate parasite clearance in experimental visceral leishmaniasis. **Tropical Parasitology**, v. 9, n. 1, 2019.

KUWABARA, T. et al. The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, 2017.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 25–33, jun. 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* species. In: Cox, FEG.; Kreier, JP.; Wakelin, D. (Ed.). **Topley & Wilson microbiology and microbial infections**. 9. ed. Arnold: Hodder Headline, PLC., v. 5, p. 241- 266, 1987.

LAURENTI, MD. Patologia e patogenia das leishmanioses [Tese livre-docência]. São Paulo: **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**; 2010.

LIMA, A.C.S. Caracterização biológica e molecular de cepas híbridas *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*/*Leishmania* (*Viannia*) *shawi* isoladas de pacientes com leishmaniose tegumentar oriundos da região amazônica, Santarém, PA-Brasil [tese]. **São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, 2016.

LOPEZ KOSTKA, S. et al. IL-17 Promotes Progression of Cutaneous Leishmaniasis in Susceptible Mice. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 5, 2009.

MACHADO-COELHO, G. L. L. et al. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 1, 2005.

MARETTI-MIRA, A. C. et al. Transcriptome Patterns from Primary Cutaneous Leishmania braziliensis Infections Associate with Eventual Development of Mucosal Disease in Humans. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, 2012.

MARTINS, V. D. et al. Obesity impairs resistance to leishmania major infection in c57bl/6 mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, 2020.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasome. **Molecular Cell**, v. 10, n. 2, p.417–426, ago. 2002.

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**, 2016.

MENEZES, JPB. Expressão de Foxp3, IL-17 e IL-23 na Leishmaniose Tegumentar Americana causada por Leishmania (Leishmania) amazonensis e Leishmania (Viannia) braziliensis [Dissertação]. **São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, 2013.

MONTOYA, C. J.; VELILLA, P. A.; RUGELES, M. T. Caracterización de las células T reguladoras por citometría de flujo: estado del arte y controversias. **Biomédica**, v. 30, n. 0, 2012.

MUXEL, S. M. et al. Leishmania (Leishmania) amazonensis induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

NORMANDO, D.; TJÄDERHANE, L.; QUINTÃO, C. C. A. A escolha do teste estatístico - um tutorial em forma de apresentação em PowerPoint. **Dental Press Journal of Orthodontics**, v. 15, n. 1, 2010.

NOVAIS, F. O. et al. CD8+T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 $\beta$  production. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 2, 2017.

NOVAIS, F. O.; SCOTT, P. CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. **Seminars in Immunopathology**, 2015.

PETERS, A.; LEE, Y.; KUCHROO, V. K. The many faces of Th17 cells. **Current Opinion in Immunology**, 2011.

PIRMEZ, C. et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human Leishmaniasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 4, 1993.

QUARESMA, J. A. S. Organization of the skin immune system and compartmentalized immune responses in infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, 2019.

RAMOS, P. K. et al. Serum cytokine responses over the entire clinical-immunological spectrum of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

RIDLEY, D. S.; RIDLEY, M. J. The evolution of the lesion in cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Pathology**, v. 141, n. 1, 1983.

RODRIGUES, F. M. D. et al. Expression of Foxp3, TGF- $\beta$  and IL-10 in American cutaneous leishmaniasis lesions. **Archives of Dermatological Research**, v. 306, n. 2, 2014.

ROUGERON, V. et al. Reproductive strategies and population structure in *Leishmania*: Substantial amount of sex in *Leishmania Viannia guyanensis*. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 15, 2011.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, 2002.

SANDOVAL PACHECO, C. M. et al. Macrophage Polarization in the Skin Lesion Caused by Neotropical Species of *Leishmania* sp. **Journal of Immunology Research**, v. 2021, 2021.

SEN, S. et al. Restoration of IFN $\gamma$ R subunit assembly, IFN $\gamma$  signaling and parasite clearance in *Leishmania donovani* infected macrophages: role of membrane cholesterol. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 9, p. e1002229, set. 2011.

SHABGAH, A. G.; FATTAHI, E.; SHAHNEH, F. Z. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. **Postepy dermatolog alergolog**, v. 31, n. 4, p. 256–61, ago. 2014.

SHEN, J. et al. IL-17 induces macrophages to M2-like phenotype via NF- $\kappa$ B. **Cancer management and research**, v. 10, p. 4217–4228, 2018.

SILVEIRA, F. et al. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, n. 1, 2008.

SILVEIRA, F. T. What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniasis so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2019.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2004.

SIMPSON, L. The Mitochondrial Genome of Kinetoplastid Protozoa: Genomic Organization, Transcription, Replication, and Evolution. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, n. 1, 1987.

SOUSA, L. M. A. et al. Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 1, 2014.

SPILLER, K. L. et al. Differential gene expression in human, murine, and cell line-derived macrophages upon polarization. **Experimental Cell Research**, v. 347, n. 1, 2016.

TARIQUE, M. et al. Fate of T Cells and their Secretory Proteins During the Progression of Leprosy. **Current Protein & Peptide Science**, v. 19, n. 9, 2017.

TEIXEIRA, DE., BENCHIMOL, M., RODRIGUES, JCF., CREPALDI, PH., PIMENTA, PFP., Souza, W. Atlas didático: ciclo de vida da *Leishmania*. Rio de Janeiro: **Fundação Cecierj, Consórcio Cederj**, 2013.

VALE, E. C. S., Furtado, T. Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Belo Horizonte: UFMG, v.80, p.421-428, jul. 2005.

WILSON, N. J. et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. **Nature Immunology**, v. 8, n. 9, 2007.

WOLFRAM, M. et al. Antigen presentation by *Leishmania mexicana*-infected macrophages: activation of helper T cells by a model parasite antigen secreted into the parasitophorous vacuole or expressed on the amastigote surface. **European journal of immunology**, v. 26, n. 12, p. 3153–62, dez. 1996.

XIN, L.; LI, Y.; SOONG, L. Role of interleukin-1beta in activating the CD11c(high) CD45RB- dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*-specific CD4+ T cells in vitro and in vivo. **Infection and immunity**, v. 75, n. 10, p. 5018–26, out. 2007.

ZAMPIERI, R. A. et al. High Resolution Melting Analysis Targeting hsp70 as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of *Leishmania* Species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, 2016.

ZUTSHI, S. et al. Anti-Leishmanial Vaccines: Assumptions, Approaches, and Annulments. **Vaccines**, v. 7, n. 4, 18 out. 2019.

# APÊNDICES

## Apêndice A

APÊNDICE A: PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PACIENTES  
LTA

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Expressão in situ de mediadores imunológicos dos perfil Th17 na Leishmaniose Tegumentar Americana causada por Leishmania (Leishmania) amazonensis e Leishmania (Viannia) braziliensis.

**Pesquisador:** Marcia Dalastra Laurenti

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 25714814.0.0000.0065

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.080.362

#### Apresentação do Projeto:

Emenda para substituição de pesquisador executante do projeto. O projeto será executado pela aluna de mestrado, Gabriela Fernandes Rodrigues, no programa de Fisiopatologia Experimental da FMUSP. Este projeto aprovado pelo CEP FMUSP sob número 003/14, é parte de um projeto temático que obteve aprovação do CEP FMUSP sob número 0493/07.

#### Objetivo da Pesquisa:

A emenda tem por objetivo informar a substituição de pesquisador executante e atualizar do cronograma de execução.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não se aplica

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica. Todos os termos e documentos pertinentes foram apresentados quando da aprovação do projeto.

#### Recomendações:

Não há recomendações

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

**Bairro:** PACAEMBU

**CEP:** 01.246-903

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3893-4401

**E-mail:** cep.fm@usp.br



**USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP**



Continuação do Parecer: 3.080.362

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não foram identificadas inadequações e possíveis pendências, assim considero a emenda apta a aprovação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1263504_E1.pdf	28/11/2018 21:50:25		Aceito
Outros	CartaSubstituicaoGabrielaRodriguesCEPFMUSP1PLATAFORMA.pdf	28/11/2018 21:35:05	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
Parecer Anterior	ParecerAnteriorCEPFMUSP.pdf	28/11/2018 21:29:35	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCompletoEmendaCEPFMUSP2018.pdf	28/11/2018 21:05:46	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
Cronograma	Cronograma_Projeto.pdf	27/11/2018 20:53:32	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
Folha de Rosto	plataformabrasildoutorado.pdf	07/01/2014 11:45:11		Aceito
Outros	cep doutorado.pdf	20/12/2013 13:29:03		Aceito
Outros	plataformabrasildoutorado.pdf	20/12/2013 13:27:57		Aceito
Declaração de Pesquisadores	ComiteDeEticaTematicoMestradoJoyceMenezes.docx	13/12/2013 13:04:34		Aceito
Outros	Anuencia CorbettCEPFMUSP.jpg	13/12/2013 12:51:56		Aceito
Outros	AnuenciaClaudiaBiopsiasCEPFMUSP.jpg	13/12/2013 12:51:17		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

**Bairro:** PACAEMBU

**CEP:** 01.246-903

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3893-4401

**E-mail:** cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 3.080.362

SAO PAULO, 13 de Dezembro de 2018

---

**Assinado por:**

**Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira  
(Coordenador(a))**

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

**Bairro:** PACAEMBU

**CEP:** 01.246-903

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3893-4401

**E-mail:** cep.fm@usp.br

## Apêndice B

APÊNDICE B - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PACIENTES PELE NORMAL



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Resposta imune inata e adaptativa na leishmaniose tegumentar americana, com ênfase na expressão gênica nas formas polares: mucosa hiperérgica por *L. (V.) braziliensis* e cutânea anérgica difusa por *L. (L.) amazonensis*

**Pesquisador:** Carlos Eduardo Pereira Corbett

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 03952418.3.0000.0065

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.950.475

#### Apresentação do Projeto:

As leishmanioses humanas, tanto a forma cutânea quanto a mucosa representam ainda hoje, importante problema de saúde pública mundial, em especial nas áreas tropicais e subtropicais do globo, onde fatores geográficos, climáticos e sócio-econômicos têm contribuído para a manutenção e dispersão dessas doenças. Nesse sentido, a América Latina aparece como uma das áreas de maior expressão desses agravos, onde o Brasil, na América do Sul, apresenta uma situação epidemiológica das mais importantes em razão de determinadas peculiaridades relacionadas não só à capacidade antigênica das espécies de *Leishmania*, como também à interação dessas espécies com a resposta imune do homem, resultando em processos imunopatogênicos que podem confluir para diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana (LTA). Nessa endemia,

chama atenção a complexidade do processo imune-biológico envolvendo nada menos que sete espécies de *Leishmania* atuando como agentes da doença no Brasil. Como resultado desse processo, observam-se cinco formas clínicas da LTA: cutânea localizada e cutânea disseminada borderline, ambas causadas pelas espécies acima mencionadas, além da mucosa, causada pela *L. (V.) braziliensis*, e a cutânea anérgica difusa causada por

*L. (L.) amazonensis* no Brasil, sendo as duas últimas formas clínicas de potencial patogênico mais grave para o homem, cujas bases imunopatogênicas constituem o alvo de interesse deste

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 3.950.475

projeto, e que serão investigadas através da expressão gênica e da marcação fenotípica in situ, buscando um melhor conhecimento dos fatores de sinalização celular e do perfil de citocinas da resposta imune do hospedeiro, tanto inata quanto adaptativa. Hipótese: Pacientes com as formas polares de Leishmaniose Tegumentar Americana, anérgica difusa e mucocutânea, provavelmente apresentam alterações no perfil imunogenético relacionado a genes das vias de reconhecimento do parasito pelo hospedeiro que levariam a maior gravidade e cronicidade das lesões.

Desta forma a melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro auxiliariam no prognóstico e no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos e de prevenção.

**Objetivo da Pesquisa:**

Analisar a expressão de genes envolvidos na regulação e sinalização celular da resposta imune inata e adaptativa das diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana, em especial das formas polares e graves da doença, leishmaniose cutâneo mucosa por *L. (V.) braziliensis* e leishmaniose cutânea anérgica difusa por *L. (L.) amazonensis*.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O risco é relacionado à coleta de uma amostra de biópsia de pele. Inicialmente, será aplicado anestesia local com uma pomada que diminuirá a dor durante o procedimento.

Enquanto o local estiver anestesiado, serão retirados dois fragmentos muito pequenos (de aproximadamente 1,5 mm, cada um) de pele. Isso será feito com uma ferramenta redonda e afiada que corta a pele para retirada deste pequeno fragmento. Em seguida, será feito um curativo no local do corte. O procedimento acima descrito, poderá causar desconforto durante a coleta da biópsia, com dor e possível sangramento. Como haverá aplicação de anestesia local, a sensação de dor será minimizada no momento da coleta. Quando o efeito do anestésico passar haverá dor no local, com um pouco de inchaço e incômodo, que serão tratados pelo médico que realizou o procedimento.

Para os participantes do grupo controle, não haverá risco, pois os mesmos doarão pele que seria normalmente descartada após cirurgia.

**Benefícios:**

A pesquisa não trará benefícios diretos aos outros participantes, porém, seus resultados poderão aprimorar o conhecimento sobre a infecção humana por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e possíveis repercussões da mesma sobre a saúde humana.

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar

**CEP:** 05.403-010

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2661-7585

**Fax:** (11)2661-7585

**E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 3.950.475

Assim como, poderão subsidiar a adoção e introdução de condutas clínico-terapêuticas mais eficazes nas formas clínicas mais graves da LTA, que representam grande desafio no tocante ao manejo clínico dos pacientes; contribuindo deste modo, para políticas públicas no país.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de pesquisa que constitui um dos sete subprojetos que compõem o Projeto Temático intitulado "Leishmanioses na América Latina: uma perspectiva avançada sobre fatores imunopatogenéticos da infecção cutânea e visceral" (Proc. 2014/50315-0) aprovado pela FAPESP em outubro de 2016. O projeto foi bem fundamentado com bases em dados atualizados da literatura. O texto é apresentado de forma clara e objetiva. Tanto o delineamento experimental quanto a metodologia são adequados. O sequenciamento de RNA será realizado em sequenciador HiSeq 2500 (Illumina) do serviço de Sequenciamento em Larga Escala (SELA) que compõe a Rede PREMIUM de equipamentos multiusuários da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Essa emenda tem por finalidade a inclusão do Laboratório de Investigação Médica Microcirurgia e Cirurgia plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM-04) para a obtenção de pele normal oriunda de material de descarte após o procedimento de cirurgia plástica em parceria com a Dra. Cristina Pires Camargo e Dra. Julieta França Corbett. Contemplando assim a casuística do Grupo E.

O pesquisador encaminhou carta de anuência do referido Serviço.

O pesquisador Frederico Moraes Ferreira colaborará na análise dos dados obtidos do RNAseq.

**Recomendações:**

não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendência.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1518177_E2.pdf	10/03/2020 19:04:54		Aceito
Projeto Detalhado	ProjetoLTACompletoPlataformaContr	10/03/2020	Carlos Eduardo	Aceito

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar

**CEP:** 05.403-010

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2661-7585

**Fax:** (11)2661-7585

**E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 3.950.475

/ Brochura Investigador	oiPeleNormalMarco2020.pdf	18:59:13	Pereira Corbett	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_LTA_ControlPeNormalMarco2020.pdf	09/03/2020 18:25:07	Carlos Eduardo Pereira Corbett	Aceito
Outros	Emenda2CAPPESQFORMULARIO_SUBMISSAO_DE_EMENDASPlataformaBrasil.pdf	28/02/2020 18:46:07	Carlos Eduardo Pereira Corbett	Aceito
Outros	CartaAnuenciaCirurgiaPlasticaLIM04Plataforma.pdf	28/02/2020 18:42:36	Carlos Eduardo Pereira Corbett	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoProjetoLTA30nov2018Plataforma.pdf	30/11/2018 22:56:09	Carlos Eduardo Pereira Corbett	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 02 de Abril de 2020

---

**Assinado por:**  
**ALFREDO JOSE MANSUR**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

## Apêndice C

### APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



#### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE**

Você está sendo convidado para participar da pesquisa chamada “AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES TOLL-LIKE (TLR-2, TLR-4 E TLR-9) NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA”. Leia com atenção este documento, tenha certeza de que entendeu e esclareceu suas dúvidas antes de responder ao convite.

A Leishmaniose Tegumentar americana (LTA) é uma doença de pele, transmitida pela picada de um mosquito conhecido vulgarmente como “tatuquira” e “asa branca”. A doença pode se manifestar com uma ou várias lesões (ferida) na pele e mucosas e, que se não tratada pode levar a comprometimentos mais graves. As pesquisas mostram que ainda há pouco conhecimento de como o parasito age no organismo do homem fazendo-se então necessário mais estudos sobre o assunto. Desse modo, o presente projeto de pesquisa que você está convidado a participar tem por objetivo estudar e compreender melhor a leishmaniose da pele no que diz respeito a imunidade da doença (resposta do homem ao parasito) a fim de que medidas sejam tomadas para auxiliar melhor o diagnóstico e tratamento da doença.

Para realização do diagnóstico da LTA serão realizados os seguintes exames laboratoriais: Reação Intradérmica de Montenegro (IDRM); escarificação (raspado) da borda da lesão e biópsia de pele. A IDRM constitui de um teste em que se avalia a resposta do organismo do indivíduo frente ao contato com o parasito *Leishmania*. Consiste na injeção intradérmica de 0,1mL do microorganismo *Leishmania* (morto) na face interna do antebraço direito para avaliação após 48h.

O raspado da borda da lesão é feito com uma lâmina de bisturi para retirar material e preparar uma lâmina de microscopia para visualização (por meio de microscópio) do parasito.

Já a biopsia será feita mediante aplicação local de anestésico (com lidocaína a 2%,) para retirada de um fragmento (pedaço) da pele para diagnóstico da leishmaniose tegumentar e pesquisas. Os procedimentos acima descritos serão realizados com material absolutamente esterilizado e descartável. São procedimentos que poderão apresentar certo desconforto (picada da agulha, raspagem com bisturi), mas nada que venha representar risco e insegurança a você.

É importante ressaltar que se você aceitar ou não o convite, contará com os serviços do Ambulatório de Leishmaniose do Instituto Evandro Chagas da mesma maneira como se a pesquisa não existisse. Seus exames para diagnóstico e tratamento e acompanhamento da LTA serão feitos normalmente. Se por qualquer motivo mudar de idéia, poderá retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo a continuidade de seu acompanhamento na instituição.

Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Biomédica Pesquisadora do Instituto Evandro Chagas-IEC, MS/SVS Marliane Batista Campos que pode ser encontrada no Ambulatório de Leishmaniose do IEC e pelo telefone (91) 3214-2036. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)-Rodovia BR 316 Km7, S/N Bairro Levilândia, Ananindeua/PA, Fone/FAX: 3214-2237-E-mail:seac@iec.pa.gov.br

As informações obtidas serão analisadas e você poderá ter acesso às mesmas quando necessário. Os resultados dessa pesquisa serão publicados em revista científica, tese de doutorado e apresentado em congressos científicos, mas a identidade de cada um dos pacientes participantes será mantida em segredo e não será divulgada. Seus dados que foram informados e o material biológico coletado será utilizado somente para esta pesquisa.

---

Rubrica do sujeito da pesquisa  
ou seu responsável

---

Rubrica do pesquisador responsável

Por se tratar de uma pesquisa que terá um tempo de desfecho de 3 anos, você como os outros participantes, não terão benefícios diretos porém sua participação será de grande e



fundamental importância, pois os pesquisadores, após analisarem os resultados obtidos poderão aprimorar mais o conhecimento sobre LTA.

Não há despesas pessoais para você em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas e nem compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional neste estudo (nexo causal comprovado), você terá direito a tratamento médico na instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, sobre a “Avaliação da expressão dos receptores toll-like (TLR-2, TLR-4 e TLR-9) nas diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana”. Eu discuti com a pesquisadora Marliane Batista Campos sobre a minha decisão em participar nesse estudo ficando claro para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

\_\_\_\_\_

Assinatura do sujeito da pesquisa ou seu responsável

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura da testemunha

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.



Analfabetos

(Somente para o responsável pelo projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

\_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador responsável

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## Apêndice D

### APÊNDICE D: FICHA CLÍNICA EPIDEMIOLÓGICA

Número M : ..... Data ...../...../..... Número Original : .....

Preencher com Códigos que se encontram na pasta preta

Ordem ou Família/Sexo :...../..... Gênero (Mam) esp (Fle) / A ou J :...../.....:

País :..... Estado :..... Município :..... Localidade :.....:

Pesquisa :....., Número de lesões :....., e sua localização :.....:

#### RESULTADOS:

Leishmanina - Feito (F) :..... Sol. Controle :..... Antígeno :..... Lote :.....:

Sorologia (P ou N) :..... e título IgG :.....:

#### RESULTADOS: Exames Diretos (-VE 4, +Ve8)

Lâmina de lesão :..... e sangue :.....:

#### RESULTADOS: Exames Indiretos

Usar os seguintes códigos numéricos para os resultados :-

(Não foi feito = 0, Pendente = 1, contaminado = 2,

-VE : cultura = 3, hamster = 4, ambos = 5;

+VE : cultura = 6, cultura +VE/hamster? = 7; hamster = 8; ambos = 9)

Pele normal :....., Viscera :....., lesão :.....:

Sangue :....., Outro tecido (código) :..... Resultado :.....:

No CrioBanco (S ou N) Cultura :..... Forma de Mamífero

Gênero de Parasita - 1 :..... espécies :..... Gênero - 2 :..... Gênero - 3 :.....

Observações :.....:

#### FICHA GERAL

Nome completo :..... Idade :.....

Endereço :..... Tel :.....

Provável localidade de infecção :.....

Procedência da requisição :.....

Médico :..... Tel :.....

Histórico clínico :.....

.....

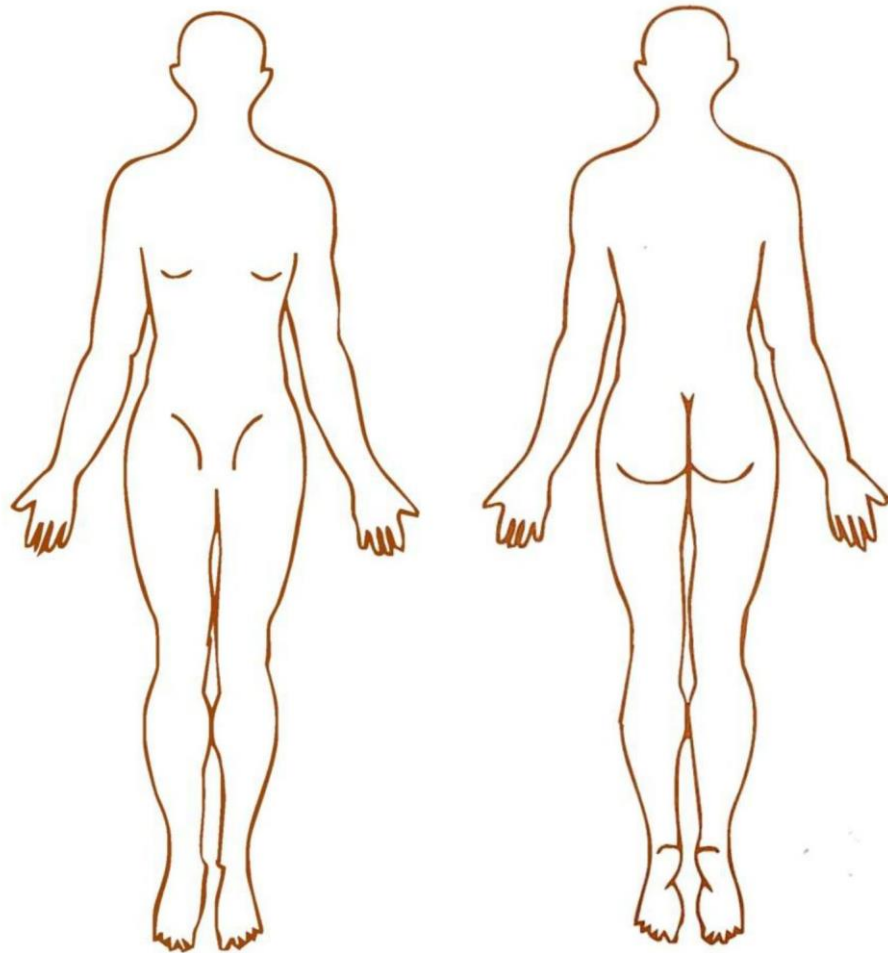
..... Tempo de doença :.....

#### Exames Realizados

Tecido	Resultado Lâmina	Data	Resultado Cultura	Data	Resultado Hamster	Data
Sangue	:	...../...../.....	.....	...../...../.....	.....	...../...../.....
Soro	:	...../...../.....	.....	...../...../.....	.....	...../...../.....
Pele	:	...../...../.....	.....	...../...../.....	.....	...../...../.....
Viscera	::	...../...../.....	.....	...../...../.....	.....	...../...../.....
Fezes	:	...../...../.....	.....	...../...../.....	.....	...../...../.....
.....	:	...../...../.....	.....	...../...../.....	.....	...../...../.....

Observações :

Tipos de lesões



Cutânea .... Ulcerosa ..... Impetiginóide :.....; Ectimatóide :.....; Úlcera franca :.....;  
.... Non Ulcerosa .... Nodular (frambuesóide) :.....; (keloidiana) :.....;  
Vegetante (verucosa) :.....;

Com adenitis :.....;  
Com adenolinfangitis :.....;

MUCOSA .... Nasal :.....; Bucal :.....; Faringe :.....;

## Apêndice A

APÊNDICE A: PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PACIENTES  
LTA

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Expressão in situ de mediadores imunológicos dos perfil Th17 na Leishmaniose Tegumentar Americana causada por Leishmania (Leishmania) amazonensis e Leishmania (Viannia) braziliensis.

**Pesquisador:** Marcia Dalastra Laurenti

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 25714814.0.0000.0065

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.080.362

#### Apresentação do Projeto:

Emenda para substituição de pesquisador executante do projeto. O projeto será executado pela aluna de mestrado, Gabriela Fernandes Rodrigues, no programa de Fisiopatologia Experimental da FMUSP. Este projeto aprovado pelo CEP FMUSP sob número 003/14, é parte de um projeto temático que obteve aprovação do CEP FMUSP sob número 0493/07.

#### Objetivo da Pesquisa:

A emenda tem por objetivo informar a substituição de pesquisador executante e atualizar do cronograma de execução.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não se aplica

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica. Todos os termos e documentos pertinentes foram apresentados quando da aprovação do projeto.

#### Recomendações:

Não há recomendações

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

**Bairro:** PACAEMBU

**CEP:** 01.246-903

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3893-4401

**E-mail:** cep.fm@usp.br

**USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP**



Continuação do Parecer: 3.080.362

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não foram identificadas inadequações e possíveis pendências, assim considero a emenda apta a aprovação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1263504_E1.pdf	28/11/2018 21:50:25		Aceito
Outros	CartaSubstituicaoGabrielaRodriguesCEPFMUSP1PLATAFORMA.pdf	28/11/2018 21:35:05	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
Parecer Anterior	ParecerAnteriorCEPFMUSP.pdf	28/11/2018 21:29:35	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCompletoEmendaCEPFMUSP2018.pdf	28/11/2018 21:05:46	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
Cronograma	Cronograma_Projeto.pdf	27/11/2018 20:53:32	Marcia Dalastra Laurenti	Aceito
Folha de Rosto	plataformabrasildoutorado.pdf	07/01/2014 11:45:11		Aceito
Outros	cep doutorado.pdf	20/12/2013 13:29:03		Aceito
Outros	plataformabrasildoutorado.pdf	20/12/2013 13:27:57		Aceito
Declaração de Pesquisadores	ComiteDeEticaTematicoMestradoJoyceMenezes.docx	13/12/2013 13:04:34		Aceito
Outros	Anuencia CorbettCEPFMUSP.jpg	13/12/2013 12:51:56		Aceito
Outros	AnuenciaClaudiaBiopsiasCEPFMUSP.jpg	13/12/2013 12:51:17		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

**Bairro:** PACAEMBU

**CEP:** 01.246-903

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3893-4401

**E-mail:** cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 3.080.362

SAO PAULO, 13 de Dezembro de 2018

---

**Assinado por:**

**Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira  
(Coordenador(a))**

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

**Bairro:** PACAEMBU

**CEP:** 01.246-903

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3893-4401

**E-mail:** cep.fm@usp.br

## Apêndice B

APÊNDICE B - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PACIENTES PELE NORMAL



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Resposta imune inata e adaptativa na leishmaniose tegumentar americana, com ênfase na expressão gênica nas formas polares: mucosa hiperérgica por *L. (V.) braziliensis* e cutânea anérgica difusa por *L. (L.) amazonensis*

**Pesquisador:** Carlos Eduardo Pereira Corbett

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 03952418.3.0000.0065

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.950.475

#### Apresentação do Projeto:

As leishmanioses humanas, tanto a forma cutânea quanto a mucosa representam ainda hoje, importante problema de saúde pública mundial, em especial nas áreas tropicais e subtropicais do globo, onde fatores geográficos, climáticos e sócio-econômicos têm contribuído para a manutenção e dispersão dessas doenças. Nesse sentido, a América Latina aparece como uma das áreas de maior expressão desses agravos, onde o Brasil, na América do Sul, apresenta uma situação epidemiológica das mais importantes em razão de determinadas peculiaridades relacionadas não só à capacidade antigênica das espécies de *Leishmania*, como também à interação dessas espécies com a resposta imune do homem, resultando em processos imunopatogenéticos que podem confluir para diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana (LTA). Nessa endemia,

chama atenção a complexidade do processo imune-biológico envolvendo nada menos que sete espécies de *Leishmania* atuando como agentes da doença no Brasil. Como resultado desse processo, observam-se cinco formas clínicas da LTA: cutânea localizada e cutânea disseminada borderline, ambas causadas pelas espécies acima mencionadas, além da mucosa, causada pela *L. (V.) braziliensis*, e a cutânea anérgica difusa causada por

*L. (L.) amazonensis* no Brasil, sendo as duas últimas formas clínicas de potencial patogênico mais grave para o homem, cujas bases imunopatogenéticas constituem o alvo de interesse deste

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 3.950.475

projeto, e que serão investigadas através da expressão gênica e da marcação fenotípica in situ, buscando um melhor conhecimento dos fatores de sinalização celular e do perfil de citocinas da resposta imune do hospedeiro, tanto inata quanto adaptativa. Hipótese: Pacientes com as formas polares de Leishmaniose Tegumentar Americana, anérgica difusa e mucocutânea, provavelmente apresentam alterações no perfil imunogenético relacionado a genes das vias de reconhecimento do parasito pelo hospedeiro que levariam a maior gravidade e cronicidade das lesões.

Desta forma a melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro auxiliariam no prognóstico e no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos e de prevenção.

**Objetivo da Pesquisa:**

Analisar a expressão de genes envolvidos na regulação e sinalização celular da resposta imune inata e adaptativa das diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana, em especial das formas polares e graves da doença, leishmaniose cutâneo mucosa por *L. (V.) braziliensis* e leishmaniose cutânea anérgica difusa por *L. (L.) amazonensis*.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O risco é relacionado à coleta de uma amostra de biópsia de pele. Inicialmente, será aplicado anestesia local com uma pomada que diminuirá a dor durante o procedimento.

Enquanto o local estiver anestesiado, serão retirados dois fragmentos muito pequenos (de aproximadamente 1,5 mm, cada um) de pele. Isso será feito com uma ferramenta redonda e afiada que corta a pele para retirada deste pequeno fragmento. Em seguida, será feito um curativo no local do corte. O procedimento acima descrito, poderá causar desconforto durante a coleta da biópsia, com dor e possível sangramento. Como haverá aplicação de anestesia local, a sensação de dor será minimizada no momento da coleta. Quando o efeito do anestésico passar haverá dor no local, com um pouco de inchaço e incômodo, que serão tratados pelo médico que realizou o procedimento.

Para os participantes do grupo controle, não haverá risco, pois os mesmos doarão pele que seria normalmente descartada após cirurgia.

**Benefícios:**

A pesquisa não trará benefícios diretos aos outros participantes, porém, seus resultados poderão aprimorar o conhecimento sobre a infecção humana por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e possíveis repercussões da mesma sobre a saúde humana.

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar

**CEP:** 05.403-010

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2661-7585

**Fax:** (11)2661-7585

**E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.950.475

Assim como, poderão subsidiar a adoção e introdução de condutas clínico-terapêuticas mais eficazes nas formas clínicas mais graves da LTA, que representam grande desafio no tocante ao manejo clínico dos pacientes; contribuindo deste modo, para políticas públicas no país.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de pesquisa que constitui um dos sete subprojetos que compõem o Projeto Temático intitulado "Leishmanioses na América Latina: uma perspectiva avançada sobre fatores imunopatogenéticos da infecção cutânea e visceral" (Proc. 2014/50315-0) aprovado pela FAPESP em outubro de 2016. O projeto foi bem fundamentado com bases em dados atualizados da literatura. O texto é apresentado de forma clara e objetiva. Tanto o delineamento experimental quanto a metodologia são adequados. O sequenciamento de RNA será realizado em sequenciador HiSeq 2500 (Illumina) do serviço de Sequenciamento em Larga Escala (SELA) que compõe a Rede PREMIUM de equipamentos multiusuários da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Essa emenda tem por finalidade a inclusão do Laboratório de Investigação Médica Microcirurgia e Cirurgia plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM-04) para a obtenção de pele normal oriunda de material de descarte após o procedimento de cirurgia plástica em parceria com a Dra. Cristina Pires Camargo e Dra. Julieta França Corbett. Contemplando assim a casuística do Grupo E.

O pesquisador encaminhou carta de anuência do referido Serviço.

O pesquisador Frederico Moraes Ferreira colaborará na análise dos dados obtidos do RNAseq.

**Recomendações:**

não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendência.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1518177_E2.pdf	10/03/2020 19:04:54		Aceito
Projeto Detalhado	ProjetoLTACompletoPlataformaContr	10/03/2020	Carlos Eduardo	Aceito

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 3.950.475

/ Brochura Investigador	oiPeleNormalMarco2020.pdf	18:59:13	Pereira Corbett	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_LTA_ControlePeleNormalMarco2020.pdf	09/03/2020 18:25:07	Carlos Eduardo Pereira Corbett	Aceito
Outros	Emenda2CAPPESQFORMULARIO_SUBMISSAO_DE_EMENDASPlataformaBrasil.pdf	28/02/2020 18:46:07	Carlos Eduardo Pereira Corbett	Aceito
Outros	CartaAnuenciaCirurgiaPlasticaLIM04Plataforma.pdf	28/02/2020 18:42:36	Carlos Eduardo Pereira Corbett	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoProjetoLTA30nov2018Plataforma.pdf	30/11/2018 22:56:09	Carlos Eduardo Pereira Corbett	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 02 de Abril de 2020

---

**Assinado por:**  
**ALFREDO JOSE MANSUR**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

## Apêndice C

### APÊNDICE C: FICHA CLÍNICA EPIDEMIOLÓGICA

Número M : ..... Data ...../...../..... Número Original : .....

Preencher com Códigos que se encontram na pasta preta

Ordem ou Família/Sexo :...../..... Gênero (Mam) esp (Fle) / A ou J :...../.....:

País :..... Estado :..... Município :..... Localidade :.....:

Pesquisa :....., Número de lesões :....., e sua localização :.....:

#### RESULTADOS:

Leishmanina - Feito (F) :..... Sol. Controle :..... Antígeno :..... Lote :.....:

Sorologia (P ou N) :..... e título IgG :.....:

#### RESULTADOS: Exames Diretos (-VE 4, +Ve8)

Lâmina de lesão :..... e sangue :.....:

#### RESULTADOS: Exames Indiretos

Usar os seguintes códigos numéricos para os resultados :-

(Não foi feito = 0, Pendente = 1, contaminado = 2,

-VE : cultura = 3, hamster = 4, ambos = 5;

+VE : cultura = 6, cultura +VE/hamster? = 7; hamster = 8; ambos = 9)

Pele normal :....., Viscera :....., lesão :.....:

Sangue :....., Outro tecido (código) :..... Resultado :.....:

No CrioBanco (S ou N) Cultura :..... Forma de Mamífero

Gênero de Parasita - 1 :..... espécies :..... Gênero - 2 :..... Gênero - 3 :.....

Observações :.....:

#### FICHA GERAL

Nome completo : ..... Idade : .....

Endereço : ..... Tel : .....

Provável localidade de infecção : .....

Procedência da requisição : .....

Médico : ..... Tel : .....

Histórico clínico : .....

.....

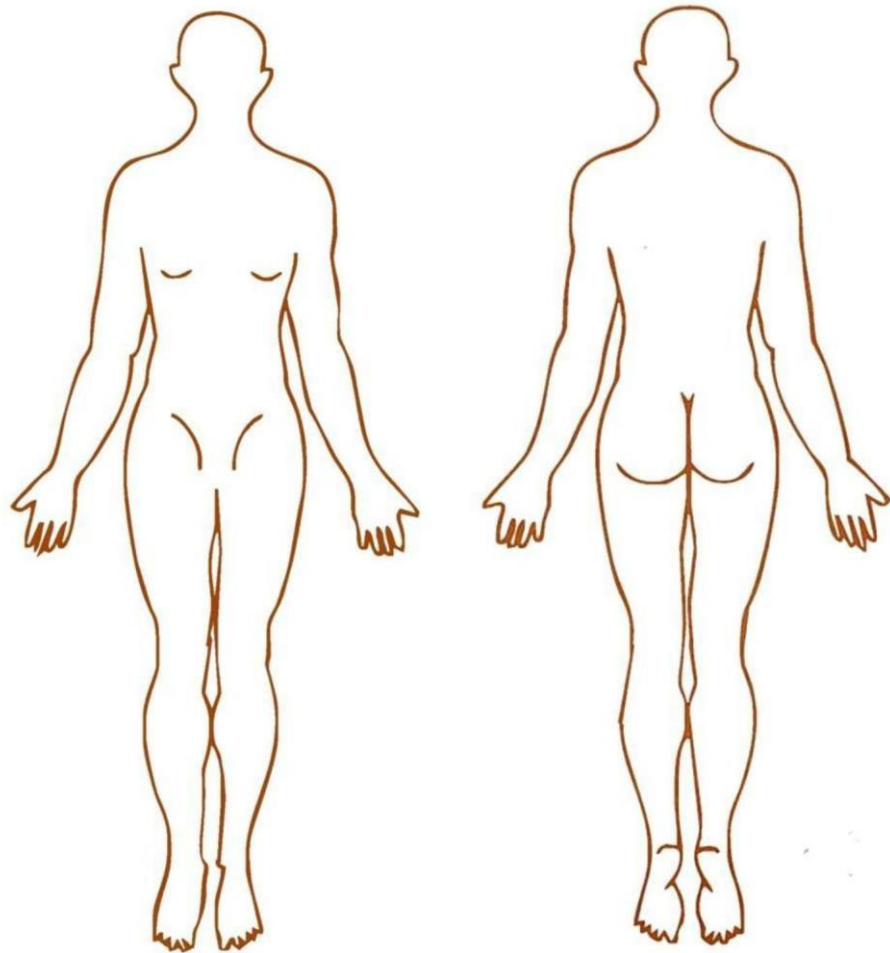
..... Tempo de doença : .....

#### Exames Realizados

Tecido	Resultado Lâmina	Data	Resultado Cultura	Data	Resultado Hamster	Data
Sangue	: .....	...../...../.....	.....	...../...../.....	.....	...../...../.....
Soro	: .....	...../...../.....	.....	...../...../.....	.....	...../...../.....
Pele	: .....	...../...../.....	.....	...../...../.....	.....	...../...../.....
Viscera	:: .....	...../...../.....	.....	...../...../.....	.....	...../...../.....
Fezes	: .....	...../...../.....	.....	...../...../.....	.....	...../...../.....
.....	: .....	...../...../.....	.....	...../...../.....	.....	...../...../.....

Observações :

Tipos de lesões



Cutânea .... Ulcerosa ..... Impetiginóide :.....; Ectimatóide :.....; Úlcera franca :.....;  
.... Non Ulcerosa .... Nodular (frambuesóide) :.....; (keloidiana) :.....;  
Vegetante (verucosa) :.....;

Com adenitis :.....;  
Com adenolinfangitis :.....;

MUCOSA .... Nasal :.....; Bucal :.....; Faringe :.....;