

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Suênia da Cunha Gonçalves de Albuquerque

Associação entre o SNP *IL-17A* -197 G/A (rs2275913) e a susceptibilidade à leishmaniose tegumentar Americana no Estado de Pernambuco, Brasil

Recife
2018

SUÊNIA DA CUNHA GONÇALVES DE ALBUQUERQUE

Associação entre o SNP *IL-17A -197 G/A (rs2275913)* e a susceptibilidade à leishmaniose tegumentar Americana no Estado de Pernambuco, Brasil

Tese apresentada ao programa de pós graduação em biociências e biotecnologia aplicada à saúde do Instituto Aggeu Magalhães, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Milena de Paiva Cavalcanti

Co-orientadora: Virgínia Maria Barros de Lorena

Recife

2018

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

A345a Albuquerque, Suênia da Cunha Gonçalves de
Associação entre o SNP IL-17A -197 G/A
(rs2275913) e a susceptibilidade à leishmaniose
tegumentar Americana no Estado de Pernambuco, Brasil
/ Suênia da Cunha Gonçalves de Albuquerque. – Recife:
[s.n.], 2018.
120 p. : ilus., graf., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia
em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz.

Orientadora: Milena de Paiva Cavalcanti;
coorientadora: Virgínia Maria Barros de Lorena.

1. Leishmaniose Cutânea – imunologia. 2.
Leishmaniose Cutânea - parasitologia. 3. Polimorfismo
de Nucleotídeo Único. 4. Interleucina-17. 5.
Interleucina-17. 6. Células Th17 – imunologia. 7. Testes
de Sensibilidade Parasitária. 8. Leishmania braziliensis
– imunologia. 9. Leishmania braziliensis -
patogenicidade. 10. Estudos de Casos e Controles. I.
Cavalcanti, Milena de Paiva. II. Lorena, Virginia Maria
Barros de. III. Título.

SUÊNIA DA CUNHA GONÇALVES DE ALBUQUERQUE

Associação entre o SNP *IL-17A* -197 G/A (rs2275913) e a susceptibilidade à leishmaniose tegumentar Americana no Estado de Pernambuco, Brasil

Tese apresentada ao programa de pós graduação em biociências e biotecnologia aplicada à saúde do Instituto Aggeu Magalhães, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 18 / 04 / 2018

Dr^a Maria Helena Neves Lobo Silva Filha
Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ

Dr Luydson Richardson Silva Vasconcelos
Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ

Dr^a Vlúdia Maria Assis Costa
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a Cristiane Moutinho Lagos de Melo
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a Milena de Paiva Cavalcanti
Instituto Aggeu Magalhães- FIOCRUZ

A quem que não me permitiu desistir.

Minha mãe, Ana Paula.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que agiu em favor deste sonho por meio de tudo que se segue:

Ao Instituto Aggeu Magalhães por acolher e fornecer o suporte e a estrutura necessários para o desenvolvimento deste estudo. À CAPES, pelo suporte financeiro ao meu aperfeiçoamento profissional. À FACEPE, FIOCRUZ e CNPq pelo financiamento dos projetos envolvidos.

A todos os colegas, que, de forma direta ou indireta somaram para a realização deste projeto.

Aos pacientes pela hospitalidade e compreensão durante as coletas em campo, bem como por fornecer as amostras utilizadas. A estas pessoas, também dedico este trabalho, e tudo que dele frutificar. Agradeço às equipes dos Postos de Saúde da Família e Secretarias de Saúde Municipais de Amaraji, Paudalho, Igarassu, Pesqueira, Abreu e Lima e ambulatório do Hospital Universitário Oswaldo Cruz - PE que permitiram e facilitaram o acesso aos casos e aos voluntários. De modo muito especial, cito Silvana Reis e toda equipe da unidade de saúde da família do distrito de Três Ladeiras, que contribuíram significativamente para o recrutamento dos pacientes na segunda fase deste estudo. Muito obrigada pela sua dedicação e sua confiança na ciência para a promoção de melhores condições de saúde.

À minha orientadora, Dra. Milena de Paiva Cavalcanti, pela confiança e paciência. Obrigada por ter aberto as portas do IAM desde a iniciação científica, por ter confiado no meu potencial e no meu trabalho, me dando todas as oportunidades que me transformaram na profissional que sou hoje. Mas, acima de tudo, por ter sido um modelo pessoal, que me permitiu acreditar que é possível ser mãe e mulher, e tornar-se uma pesquisadora brilhante. A gratidão por este exemplo é sincera e eterna.

Agradeço à Dr^a Virgínia Lorena, minha co-orientadora, por ter aceitado contribuir com este trabalho e abraçado comigo todas as responsabilidades. Obrigada pela sua empatia e pela sua disposição sem limites... Pelo seu ombro, e por ser um oásis de amizade e compreensão para mim e tantos outros estudantes desta casa.

À Dra. Valéria Pereira e Dra Carolina Brelaz, que inicialmente colaboraram com a construção deste projeto, fornecendo todo o apoio necessário para torná-lo factível.

Ao Diretor do IAM, Dr. Sinval P. Brandão-Filho por todo apoio oferecido a este e a tantos outros projetos; por suas portas sempre abertas; e pela consideração e incentivo ao meu

trabalho e à minha carreira. Agradeço igualmente à Dr^a M^a Edileuza Brito, por sua colaboração na captação dos pacientes e empenho nas coletas.

Agradeço especialmente à equipe que se envolveu e se dedicou a este trabalho: Cíntia Nascimento e Brenda Dias, que foram minhas mãos e braços em todo o tempo se dedicando aos experimentos e com as quais aprendi muito. Muito obrigada a Ana Karine Soares e Adriene Melo, que me deram todo o apoio com protocolos e análises, e tornaram-se grandes parceiras; e ainda a toda a equipe que trabalhou nas várias viagens a campo, aqui representados por Fernando Silva, com quem sempre pude contar para qualquer empreitada.

Aos que me ensinaram muito mais que os livros: meus companheiros de equipe! Rayana Moraes e Rômulo Pessoa, que além de melhores amigos se tornaram meu melhor time; os melhores críticos do meu trabalho e parceiros de luta. Obrigada pela sua paciência, sua generosidade, e seus conselhos. Obrigada Lays Trajano, Victor Vaitkevicius, TaynáGoes, Gilsan Oliveira, e Gabriella Melo por sua ajuda em tantas etapas, pelas suas perguntas, pelas suas respostas e pela sua companhia.

A todos os colegas do Laboratório de Imunoparasitologia e do Laboratório de Biologia Celular, estes últimos representados pela Dra Regina Bressan, que nos acolheram com tanta hospitalidade durante a realização dos experimentos.

À equipe do Laboratório de Endemias do LACEN PE, e à Dra Geane Oliveira por sua compreensão e flexibilidade, permitindo toda liberdade necessária para que eu realizasse simultaneamente tantas tarefas.

Ao meu amor, Gleison Albuquerque, que foi capaz de adiar seu sonho para que eu pudesse realizar o meu. Foi meu ombro amigo em todas as horas, o melhor marido e o melhor pai, e minha força pra continuar. À minha filha Ana Júlia, que me fez sentir capaz, e que não me negou sorrisos mesmo quando minha ausência se fez necessária.

À minha família, pelo apoio sem o qual eu nada faria.

À minha mãe, pelo seu “não”: “*Não permito que você desista*”. E por ter dado todas as condições para que eu finalizasse esta etapa acadêmica. Sua frase (sua força!) vai ecoar em cada objetivo que eu estabelecer, e a ela eu serei eternamente grata e obediente.

“Primeiro: lembre-se de olhar as estrelas lá no alto, e não para seus pés lá embaixo. Dois: nunca desista do seu trabalho. O trabalho lhe dá sentido e propósito, e a vida é vazia sem isso. Três: se você for afortunado a ponto de encontrar amor, lembre-se que ele está ali e nunca o jogue fora.”

Uma homenagem ao cientista contemporâneo
Stephen Hawking (1942 - 2018)

ALBUQUERQUE, Suênia da Cunha Gonçalves. **Associação entre o SNP IL-17A -197 G/A (rs2275913) e a susceptibilidade à leishmaniose tegumentar Americana no Estado de Pernambuco, Brasil.** 2018. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

RESUMO

A interleucina17 (IL-17) é um mediador da resposta imune contra *Leishmania*. A associação de SNPs no *IL-17* com desordens imunológicas e doenças infecciosas já foi demonstrada. No entanto, nenhuma associação de variantes do *IL-17* com a leishmaniose tegumentar Americana (LTA) foi ainda descrita. Este estudo avaliou a associação do SNP IL-17 -197 G/A rs2275913 com a susceptibilidade à infecção por *Leishmania braziliensis*, em indivíduos de regiões endêmicas do Estado de Pernambuco, Brasil. Pessoas de municípios do Estado foram diagnosticadas quanto à infecção por *L. (V.) braziliensis*, e agrupadas como sintomáticos (gS, casos), assintomáticos (gA, controles) e sem infecção (gSI). As frequências genotípicas foram determinadas e o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EqHW) foi avaliado. A associação do rs2275913 com a doença (casos) foi medida por *Odds ratio* (OR). As cargas parasitárias (cp) foram comparadas entre gS e gA, e entre os genótipos. A frequência de células IL-17+ e concentração de IL-17 secretada foram avaliadas por citometria de fluxo, e correlacionadas com a carga parasitária. 365 indivíduos foram incluídos no estudo de associação: 186 compuseram um grupo sem infecção, 88 foram considerados gS (casos) e 91 gA (controles). O alelo raro A foi encontrado em 45 gA, e 45 gS. O estudo de associação tipo caso-controle mostrou ausência de associação (OR=1,27; IC: 0,70-2,33; $p=0,424$) de portadores do alelo A com a susceptibilidade à LTA, frente à infecção por *L. braziliensis*. Maiores frequências de células CD4+ IL-17+ alternativas e patogênicas foram observadas entre portadores do alelo A (AA/AG x GG: $p=0,018$; $p=0,018$, respectivamente). A correlação de frequências de células IL-17+ IFN γ + e IFN γ - com as cps de pacientes expostos à infecção mostrou relação significativa de Th17 patogênicas (IFN γ +) ($p=0,043$; $r^2=0,347$) com a eliminação de parasitas. Dentro dos critérios estatísticos estabelecidos, O SNP IL-17 -197 G/A não tem associação suficiente para ser sugerido como um marcador de susceptibilidade ao desenvolvimento de doença frente à infecção por *L. braziliensis*, embora os resultados obtidos confirmem a capacidade deste SNP em alterar significativamente a quantidade de citocina expressa. O conjunto de resultados obtidos demonstra que a quantidade de IL-17 não exerce influência aparente sobre as cargas parasitárias dos indivíduos expostos à infecção, sugerindo que sua função neste aspecto seria relacionada ao estímulo da secreção de IFN γ , e à proporção de células Th17 IFN γ + diferenciadas em resposta à infecção. Este estudo acrescenta conhecimento sobre a influência de uma importante variação genética em IL-17 sobre a LTA, e pode contribuir para reforçar o papel da IL-17 na patogênese da LTA.

Palavras-chave: Interleucina 17, Leishmaniose tegumentar, SNP, imunopatogênese, Th17

ALBUQUERQUE, Suênia da Cunha Gonçalves. **Association between SNP IL-17A -197 G / A (rs2275913) and susceptibility to American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco, Brazil.** 2018. Thesis (PhD degree of Bioscience and Biotechnology for Health) - Aggeu Magalhães Institute, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

ABSTRACT

Interleukin17 (IL-17) is a mediator of the immune response against *Leishmania*. The association of SNPs in the IL-17 gene with immunological disorders and infectious diseases has already been demonstrated. However, no association of IL-17 variants with American cutaneous leishmaniasis (ACL) has yet been described. This study evaluated the association of IL-17 -197 G / A rs2275913 SNP with susceptibility to *Leishmania braziliensis* infection in individuals from endemic regions of the State of Pernambuco, Brazil. People from municipalities in the state were diagnosed for infection by *L. (V.) braziliensis*, and grouped as symptomatic (gS, cases), asymptomatic (gA, controls) and a group without infection (gWI). The genotypic frequencies were determined and the Hardy-Weinberg equilibrium (EqHW) was evaluated. The association of rs2275913 with disease (cases) was measured by *Odds Ratios (OR)*. Parasite loads (pl) were compared between gS and gA, and between genotypes. The frequency of IL-17+ cells and secreted IL-17 concentration were assessed by flow cytometry, and correlated with parasite loads. 365 subjects were included in the association study: 186 comprised one group without infection, 88 were considered gS (cases) and 91 gA (controls). The rare allele A was found at 45 gA, and 45 gS. The case-control association study showed no association (OR = 1.27, CI: 0.70-2.33, $p = 0.424$) of A allele carriers with susceptibility to *L. braziliensis* infection and ACL. Higher frequencies of CD4 + IL-17 + alternative and classic cells were observed among carriers of the A allele (AA/AG x GG: $p=0,018$; $p=0,018$, respectively). The correlation of frequencies of IL-17 + IFN γ + and IFN γ -cells with the pls of patients exposed to infection showed a significant relationship of pathogenic Th17 (IFN γ +) ($p = 0.043$; $r^2 = 0.347$) with the elimination of parasites. Within established statistical criteria, IL-17 -197 G / A SNP does not have sufficient association to be suggested as a marker of susceptibility to the development of disease against *L. braziliensis* infection, although the results obtained confirm the capacity of this SNP in significantly alter the amount of cytokine expressed. The results show that the amount of IL-17 has no apparent influence on the parasite loads of the individuals exposed to the infection, suggesting that its function in this aspect would be related to the stimulation of IFN γ secretion, and to the proportion of Th17 IFN γ + differentiated in response to infection. This study adds knowledge about the influence of significant genetic variation on IL-17 on ACL, and may contribute to enhance the role of IL-17 in the pathogenesis of ACL.

Keywords: Interleukin 17, cutaneous leishmaniasis, SNP, immunopathogenesis, Th17 cells

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Ciclo biológico de *Leishmania* sp. Destacam-se as fases evolutivas do parasito no hospedeiro mamífero (humanos, roedores ou cães) e no vetor invertebrado (fêmeas de insetos do gênero *Lutzomyia* sp.).....22
- Figura 2** - Espectro clínico da leishmaniose tegumentar Americana. A) região rural típica da ocorrência da LTA; B) apresentação clínica da leishmaniose cutânea localizada; C) leishmaniose cutânea disseminada; D) leishmaniose cutâneo-mucosa.25
- Figura 3** - Diferenciação dos linfócitos T *helper* tipo 1, 2 e 17 em resposta a diferentes espécies de *Leishmania* com definição da ativação macrofágica e impacto na carga parasitária.34
- Figura 4** - Esquema ilustrativo do *IL-17A*, destacando a localização do SNP -197G/A (rs2275913) entre regiões de ligação a fatores de transcrição na região promotora do gene, e suas respectivas sequências.38
- Figura 5** - Representação esquemática das etapas metodológicas seguidas no presente estudo.46
- Figura 6** - Exemplo da estratégia de aquisição de linfócitos CD4+ produtores de IL-17 (Th17) clássicas (IFN γ -) e patogênicas (IFN γ +) pela citometria de fluxo, em culturas de PBMC de pacientes de áreas endêmicas do Estado de Pernambuco.....54
- Figura 7**- Lesões ativas de pacientes inclusos no estudo, demonstrando fundo granuloso e bordas elevadas característicos da leishmaniose tegumentar e amastigotas de *Leishmania* visualizadas no exame microscópico da secreção de lesão, corados pelo Giemsa.....58
- Figura 8**–Resultados de técnicas moleculares (PCR-RFLP e Sequenciamento) aplicadas para definição dos genótipos de indivíduos residentes em áreas endêmicas do Estado de Pernambuco inclusos no estudo de associação do SNP *IL-17A* -197 G/A rs2275913 com a leishmaniose tegumentar Americana.....60
- Figura 9**-Comparação das cargas parasitárias (concentração de DNA em fentogramas - fg por microlitro - μ L) detectadas por PCR quantitativa em tempo real em amostras de indivíduos

(casos e controles) residentes em áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar Americana no Estado de Pernambuco..... 63

Figura 10 -Cargas parasitárias (concentração de DNA em fentogramas - fg por microlitro - μ L) distribuídas por genótipos para o SNP IL17 -197 G/A rs2275913 na amostra populacional total do estudo (A), e subdividida entre indivíduos sintomáticos (gS) e assintomáticos (gA) (B) residentes em áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar Americana no Estado de Pernambuco. 64

Figura 11 - Gel de eletroforese SDS-PAGE corado por azul de Coomassie demonstrando o padrão de bandejamento da fração proteica solúvel purificada de cultura de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (AgST) em concentrações de 5 (a) e 10 (b) microgramas. 64

Figura 12-Percentuais de células CD4+ IL-17+ IFN γ + e CD4+ IL-17+ IFN γ -e concentração de IL-17A em sobrenadantes de cultura de PBMC de indivíduos residentes de áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar Americana portadores e não portadores do SNP IL-17 -197 G/A rs2275913. 66

Figura 13 - Correlação entre os percentuais de linfócitos CD4+ IL-17+ produtores e não produtores de IFN γ e concentração de IL-17 em sobrenadantes de cultura de PBMC com a concentração de DNA parasitário detectada em pacientes de áreas endêmicas para LTA no Estado de Pernambuco..... 67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Papel da IL-17 e citocinas reguladoras na proteção ou agravamento de formas clínicas das leishmanioses.	32
Quadro 2 - Single nucleotide polymorphisms (SNPs) descritos em IL-17 e suas associações com patologias humanas de caráter inflamatório, destacando-se a presença do SNP -197 G/A (rs2275913) com associação positiva em vários estudos.	40
Quadro 3 - Anticorpos acoplados com fluoróforos utilizados para marcação de antígenos superfície e intracelulares nos experimentos de imunofenotipagem por citometria de fluxo e suas características.....	53
Quadro 4 - Divisão da amostra populacional total coletada por município e caracterizações dos indivíduos inclusos para o estudo de associação do SNP -197 G/A com a leishmaniose tegumentar Americana.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Avaliação clínica e distribuição por gênero dos indivíduos residentes em áreas endêmicas do Estado de Pernambuco, inclusos no estudo de associação do SNP IL-17 -197 G/A rs2275913 com a leishmaniose tegumentar Americana.	58
Tabela 2 –Distribuição dos indivíduos residentes em áreas endêmicas do Estado de Pernambuco por grupos de estudo e sexo, de acordo com o conjunto de critérios adotado para classificação em sintomáticos (gS), assintomáticos (gA) e sem infecção (gSI) por <i>L. (V.) braziliensis</i>	59
Tabela 3 -Distribuição dos genótipos para o SNP IL-17A -197 G/A rs2275913 na amostra total de indivíduos residentes em áreas endêmicas do Estado de Pernambuco inclusos no estudo.....	60
Tabela 4 -Distribuição dos genótipos para o SNP IL-17A -197 G/A rs2275913 no subconjunto de indivíduos residentes em áreas endêmicas do Estado de Pernambuco recaptados conforme genótipos para avaliação da resposta imunológica.....	61
Tabela 5 - Frequências genotípicas, frequências alélicas e análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra total de indivíduos residentes em áreas endêmicas do Estado de Pernambuco inclusos no estudo.....	61
Tabela 6 -Medidas de associação (Razão de chances; <i>OddsRatio</i> - <i>OR</i>) dos genótipos do SNP IL-17A -197 G/A rs2275913 com desenvolvimento de sintomas em indivíduos infectados, e com permissibilidade à instalação da infecção em áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar Americana no Estado de Pernambuco, comparados ao genótipo de referência (GG).....	62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 As leishmanioses: aspectos gerais	21
2.2 Leishmaniose tegumentar Americana	23
2.2.1 <i>Etiologia, vetores e reservatórios</i>	23
2.2.2 <i>Manifestações clínicas da LTA</i>	24
2.2.3 <i>Diagnóstico da LTA</i>	25
2.2.4 <i>Imunopatogênese e resposta imune celular na LTA</i>	26
2.3 Células T helper 17 e interleucina 17 na LTA	29
2.4 Single nucleotide polymorphisms (SNPs)	35
2.5 SNPs em genes de citocinas	36
2.6 SNPs em IL-17	37
2.7 Justificativa	42
3. PERGUNTA CONDUTORA	43
4. HIPÓTESE	44
5. OBJETIVOS	45
5.1 Geral	45
5.2 Específicos	45
6. METODOLOGIA	46
6.1 Desenho do estudo	46
6.2 Amostragem e avaliação clínica	47
6.3 Coleta de sangue e acondicionamento das amostras	47
6.4 Diagnósticoda infecção por <i>Leishmania</i> spp.	48
6.4.1 <i>IDRM</i>	48
6.4.2 <i>Extração de DNA</i>	49
6.4.3 <i>Diagnóstico molecular pela PCR quantitativa em tempo real</i>	49
6.5 Definição de grupos caso e controle	49
6.6 Genotipagem por PCR-RFLP e seqüenciamento	50
6.7 Obtenção de antígeno solúvel total de <i>L. (V.) braziliensis</i>	51
6.8 Avaliação da resposta imune	51
6.8.1 <i>Obtenção de células mononucleares do sangue periférico – PBMC</i>	51

6.8.2 <i>Cultivo celular</i>	52
6.8.3 <i>Cinética de tempo de cultivo para imunofenotipagem de células produtoras de IL-17</i>	52
6.9 Imunofenotipagem por citometria de fluxo	53
6.9.1 <i>Marcações de antígenos de superfície e intracelulares</i>	53
6.9.2 <i>Estratégia de aquisição e análise de células Th17 no citômetro de fluxo</i>	54
6.10 Dosagem de IL-17 nos sobrenadantes de cultura	55
6.11 Análises estatísticas	55
7. RESULTADOS	57
7.1 Amostragem e avaliação clínica	57
7.2 Diagnóstico e definição de grupos caso e controle	58
7.3 Frequências alélicas e genotípicas	59
7.4 Associação entre SNP -197 G/A e LTA	62
7.5 Avaliação das cargas parasitárias	62
7.6 Obtenção do antígeno para estímulo a PBMCs e avaliação de Th17 / IL-17	64
7.7 Avaliação da resposta imune celular	65
7.7.1 <i>Quantificação de IL-17 conforme o genótipo, SNP IL-17 -197 G/A</i>	65
7.7.2 <i>Correlação de células Th17 e IL-17 com a carga parasitária</i>	66
8. DISCUSSÃO	68
9. CONCLUSÕES	75
10. PERSPECTIVAS	76
REFERÊNCIAS	77
APÊNDICE A - TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	95
APÊNDICE B - 1º ARTIGO RELACIONADO PUBLICADO	99
APÊNDICE C - 2º ARTIGO RELACIONADO PUBLICADO	105
APÊNDICE D - LISTA COMPLETA DE PUBLICAÇÕES	116
APÊNDICE E – TESTE DE CONCENTRAÇÕES DO ANTÍGENO SOLÚVEL TOTAL DE LEISHMANIA (V.) BRAZILIENSIS PARA ESTÍMULO DE CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO	118
c) Cinética de tempo de cultivo para imunofenotipagem	119

ANEXO A - APROVAÇÃO PELA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA	121
ANEXO B - NOTA TÉCNICA SOBRE INTERRUÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE INSUMOS PARA IDRM	122

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses de caráter não contagioso e evolução crônica, e têm sua etiologia atribuída a várias espécies do gênero *Leishmania*, amplamente distribuídas no mundo. A transmissão de *Leishmania* está associada a insetos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) do gênero *Lutzomyia*. O parasitismo das leishmânias nos macrófagos de humanos e animais resulta em um complexo de doenças com importante espectro clínico, podendo acometer a pele, mucosas ou vísceras, dependendo da espécie infectante (BRASIL, 2007; GUERRA et al. 2006).

Condições socioeconômicas, desnutrição, mudanças climáticas, e movimentos populacionais que expõem pessoas não imunes ao ciclo da doença estão entre os fatores de risco para as leishmanioses, tornando-as doenças de alto potencial epidemiológico, segundo a Organização Mundial de Saúde - OMS (2016). A leishmaniose tegumentar Americana (LTA) é uma das endemias de maior importância em saúde pública no Brasil, devido a sua ampla distribuição pelo território nacional, ocorrência de formas clínicas graves e dificuldades no diagnóstico e tratamento (DORVAL et al. 2006). Pelo risco de gerar deformidades e sequelas psicológicas que refletem no campo social e econômico, a LTA torna-se uma das afecções dermatológicas de maior importância para novos estudos que direcionem a melhoria do diagnóstico, tratamento e controle (GUERRA et al. 2006).

Nas leishmanioses, fatores relacionados a competência vetorial, espécie infectante, e características intrínsecas ao hospedeiro atuam no estímulo e no direcionamento da resposta imune. Existem evidências de que o conjunto de citocinas produzidas logo após o estabelecimento da infecção seja determinante para a progressão do processo infeccioso para a cura, conferindo resistência à infecção (SCHARTON; SCOTT, 1993). Na intenção de entender os mecanismos envolvidos no controle espontâneo da infecção por *L. (V.) braziliensis*, alguns estudos têm avaliado o perfil de citocinas de indivíduos curados e assintomáticos (BITTAR et al. 2007; DA-CRUZ et al. 2002), concluindo que o balanço entre citocinas inflamatórias e regulatórias deve ser compatível com a indução de mecanismos efetores contra o parasito, seguidos pela modulação da resposta inflamatória para evitar os danos teciduais que resultam da exacerbação da resposta celular anti-*Leishmania*.

A recente demonstração de uma população de células T auxiliares (Th) produtoras de interleucina (IL) 17 (HARRINGTON et al. 2005; PARK et al. 2005), com funções efetoras distintas daquelas identificadas em Th1 e Th2, demonstrou uma nova influência sobre este equilíbrio. A IL-17 secretada pelas células T ativadas tem um papel pró inflamatório,

umentando a concentração local de quimiocinas e neutrófilos (FOSSIEZ et al 1996; WORTMAN et al. 2000). Como altas concentrações de IL-17 têm sido associadas com doenças crônicas, o estudo de sua participação como mediador de cura ou de agravamento da LTA tornou-se indispensável.

Diante deste painel e da importância de sua compreensão, novas ferramentas e conhecimentos em biologia celular e molecular têm sido utilizados para ampliar o saber a respeito dos mecanismos imunológicos envolvidos na infecção por *L. (V.) braziliensis*. Recentemente, a tecnologia disponível permitiu o mapeamento de mutações pontuais no genoma, os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Estes correspondem a diferenças de um único nucleotídeo na sequência de DNA, e podem ser responsáveis por variações de função ou de expressão de moléculas. Neste trabalho, a análise de SNPs de citocinas foi aplicada para estudar sua relação com a imunopatogênese da LTA.

Diversas publicações científicas implicam associação de SNPs em todas as cinco classes de citocinas (interleucinas, interferons, quimiocinas, família do fator de necrose tumoral - TNF, e membros da família do fator de crescimento tumoral - TGF), com uma grande diversidade de doenças inflamatórias e não inflamatórias, podendo ter efeitos protetores ou nocivos ao indivíduo (BHUSHAN; PERUMAL, 2012; GERARD; ROLLINS, 2001). Embora estes marcadores tenham sido amplamente explorados em sua relação com câncer, doenças alérgicas e autoimunes nos últimos anos, poucos estudos trabalharam a associação de SNPs em citocinas a doenças infecciosas, especialmente ao desenvolvimento de sintomas diante da infecção por *Leishmania* spp. (AL-BASHIER, 2014; FRADE et al. 2011; MATOS et al. 2007).

Os efeitos terapêuticos de citocinas como alvos de drogas têm sido explorados num certo número de doenças (CHUNG, 2006; VAN DEVENTER, 1999; VIOLA; LUSTER, 2008) com seu efeito estimulador ou inibidor sendo avaliado para o potencial de agir como mediadores de supressão de sintomas e/ou cura. Embora o tratamento de primeira escolha para a LTA seja na maioria das vezes efetivo e indicado, desvantagens tais como efeitos colaterais, longa duração do tratamento e contra-indicação para grupos de risco como cardiopatas, nefropatas, idosos, grávidas e outras condições devem ser observadas (MAYRINK et al. 2006). Este fato reforça a necessidade de estudos de base para o desenvolvimento de imunoterapias com melhor relação de efetividade.

Frente ao exposto e com base na dificuldade de determinar o papel da IL-17 na patogênese da LTA, tornou-se relevante a avaliação de SNPs no gene que codifica para esta

citocina em pacientes com progressão clínica da enfermidade. Sabendo que deficiências na expressão ou a super expressão de citocinas tem sido associadas a doenças (BHUSHAN; PERUMAL, 2012), sequências regulatórias deste gene merecem atenção especial.

O conhecimento de polimorfismos de genes de citocinas pode ajudar a fornecer marcadores para localizar a causa genética do desenvolvimento de sinais clínicos da LTA. Caracterizar os tipos celulares presentes em pacientes com diferentes genótipos será um avanço para o melhor esclarecimento da influência da IL-17 na resposta imune à infecção. Adicionalmente, este conhecimento pode ajudar a identificar as razões para a disparidade fenotípica da doença em diferentes grupos populacionais, e a concepção de medicamentos para populações específicas através de medicina personalizada, além do direcionamento de medidas de controle mais eficientes para populações vulneráveis.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 As leishmanioses: aspectos gerais

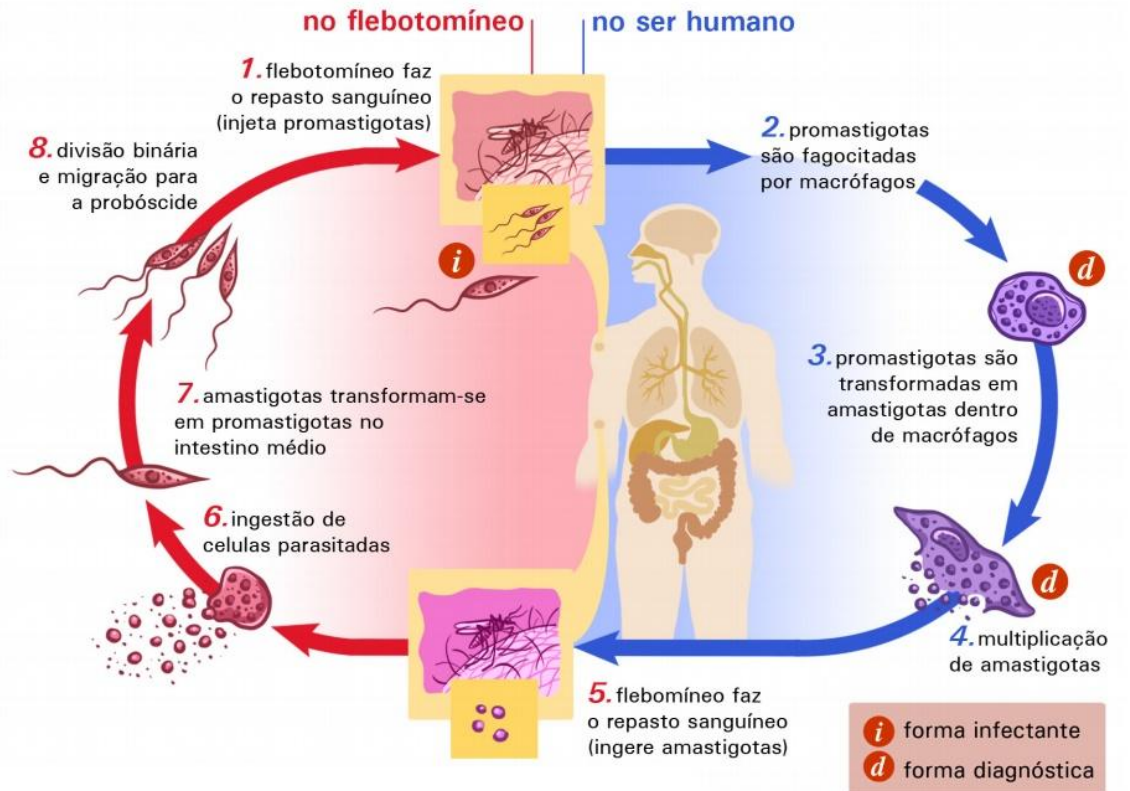
As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias causadas por protozoários (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) do gênero *Leishmania* transmitidas ao homem por picadas de insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos (CHAPPUIS et al. 2007; DESJEUX, 2004). A maioria das espécies de *Leishmania* tem origem zoonótica, sendo a variante antroponótica (*L. donovani*), ocorrente na Índia, Sudão e Afeganistão, consequência da adaptação de algumas espécies a estes ciclos (SHAW, 2007). Segundo Noyes (1998), o homem é considerado hospedeiro acidental (antropozoonose), enquanto o protozoário infecta cerca de nove ordens de mamíferos e répteis em áreas subtropicais e tropicais do mundo.

O ciclo evolutivo dos parasitos do gênero *Leishmania* compreende uma fase no hospedeiro invertebrado onde os parasitos se multiplicam por divisão binária, e outra fase no hospedeiro vertebrado no qual formas amastigotas vivem e se multiplicam no interior dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos. Fêmeas de insetos flebotomíneos, hospedeiros intermediários desses parasitos, são infectadas quando formas amastigotas são ingeridas durante o repasto sanguíneo. No trato digestivo do flebotomíneo, o parasito sofre sucessivas modificações, até que se transforma em promastigota, tornando-se novamente infectante ao hospedeiro definitivo mamífero (NEVES, 2004) (Figura 1). A parasitose afeta as células do sistema mononuclear fagocitário apresentando uma variedade de síndromes, conforme o tropismo da espécie infectante pelas vísceras ou tegumento. A doença pode, portanto, se apresentar nas formas tegumentar (leishmaniose tegumentar Americana - LTA) e visceral (leishmaniose visceral - LV) de acordo com a espécie parasitária envolvida; e suas formas clínicas diferem em distribuição geográfica, hospedeiro/vetor e taxas de incidência e de mortalidade (MARZOCHI; MARSDEN, 1991).

A leishmaniose é uma das mais importantes doenças parasitárias transmitida por vetor, e ocupa o nono lugar em termos de carga global da doença entre todas as doenças infecciosas e parasitárias (HOTEZ et al. 2004), sendo responsável por mais de 57.000 mortes por ano (HOTEZ et al. 2004; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000). Dados da Organização Mundial de Saúde indicam que 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco, com registro aproximado de dois milhões de novos casos, das diferentes formas clínicas ao ano (ALVAR et al. 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). Ambas as

formas clínicas da leishmaniose foram inicialmente caracterizadas como doenças de caráter eminentemente rural; no entanto, recentemente a doença vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte (BRASIL, 2010).

Figura 1 - Ciclo biológico de *Leishmania* sp. Destacam-se as fases evolutivas do parasito no hospedeiro mamífero (humanos, roedores ou cães) e no vetor invertebrado (fêmeas de insetos do gênero *Lutzomyia* sp.).



Fonte: Soares (2017)

Nota: Parasitos do gênero *Leishmania* sp. infectam fagócitos (neutrófilos, monócitos e macrófagos) e se utilizam de sua biologia celular para multiplicação. Durante o repasto sanguíneo, as formas amastigotas são sugadas pelo vetor, e evoluem para sua forma flagelada e móvel no intestino do inseto.

No âmbito nacional, estas enfermidades encontram-se como doenças endêmicas, negligenciadas, com surtos epidêmicos relatados em diversas cidades, posicionando o Brasil como o principal responsável pelos casos registrados na América Latina com 26.008 casos/ano, número superior aos registrados na Colômbia (17.420 casos), Peru (6.405 casos), Bolívia (2.647 casos), Argentina (261 casos), entre outros países Latinos (BRASIL, 2006; ALVAR et al. 2012).

A LTA é a forma clínica mais presente nas Américas, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. O foco de maior destaque é o continente sul-americano, que compreende todos os países, com exceção do Uruguai e do Chile (GONTIJO; CARVALHO, 2003). No Brasil, a forma cutânea da leishmaniose tem casos autóctones de LTA em todas as regiões do país (BRASIL, 2007). A importância da LTA como problema de

saúde pública reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

2.2 Leishmaniose tegumentar Americana

2.2.1 Etiologia, vetores e reservatórios

Mais de 30 espécies de *Leishmania* são conhecidas, sendo 20 patogênicas ao homem (ASHFORD, 2000). No continente europeu e Ásia as espécies que causam a Leishmaniose Tegumentar (LT) pertencem ao complexo *Leishmania tropica*; *Leishmania (Leishmania) tropica*, *L. (Leishmania) major* e *L. (Leishmania) aethiopica*. Algumas cepas de *Leishmania (Leishmania) infantum* podem ser responsáveis por causar LT sem comprometimento dos órgãos internos nesta região (KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVÁ, 2012; MASMOUDÍ et al. 2013).

Nas Américas, encontram-se as espécies do complexo *Leishmania braziliensis*; *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) shawi* e *L. (Viannia) peruviana*, e do complexo *L. mexicana*; *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Leishmania) venezuelensis*, além de *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) naiffi* e *L. (Viannia) lindenbergi*; sendo todas as espécies zoonóticas (KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVÁ, 2012). A maioria das espécies tanto do Velho Mundo como do Novo Mundo causam apenas lesões na pele, porém *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis* podem causar lesões também em mucosas (forma mucocutânea) (BRASIL, 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

No Brasil foram identificadas sete espécies dermatrópicas, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. A maior diversidade etiológica ocorre nas regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2010). A principal espécie, mais prevalente em seres humanos, encontrada em todas as zonas endêmicas do país é *Leishmania (V.) braziliensis*; transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos tais como, *Lutzomyia whitmani*, *Lu. intermédia*, *Lu. wellcomei*, entre outras (BRITO et al. 2012). Além desta, outras espécies têm sido descritas:

- a) *Leishmania (Viannia) guyanensis*, espécie que ocorre às margens do Rio Amazonas, transmitida principalmente por *Lutzomyia umbratilis*, *Lu. Anduzei* e *Lu. whitmani*;

b) *Leishmania (V.) naiffi* e *Leishmania (V.) shawi*, ocorrem nos estados do Pará e Amazonas, sendo os principais vetores *Lu. squamiventris*, *Lu. paraensis*, *Lu. ayrozai* e *Lu. whitmani*, respectivamente e;

c) ainda na região da Amazônia, *Leishmania (V.) lainsoni* e *Leishmania (L.) amazonensis* transmitidas, respectivamente, por *Lu. Ubiquitalis* e *Lu. flaviscutellata* (SHAW; LAINSON, 1975).

As espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, foram descritas em animais silvestres (*Bolomys lasiurus*), sinantrópicos (*Rattus rattus*) e domésticos (canídeos, felídeos e eqüídeos) (BRASIL, 2007). Em relação aos animais domésticos, apesar de numerosos registros de infecção natural, seu papel na manutenção do parasito no meio ambiente como reservatórios ainda não foi definitivamente esclarecido (DAVIES, 1999; LAINSON; SHAW, 1998; REITHINGER; FALQUETO; FERREIRA, 2005).

2.2.2 Manifestações clínicas da LTA

Em geral, a transmissão de *L. (V.) braziliensis*, principal espécie identificada em Pernambuco, vincula-se a atividades profissionais tais como cultivo de cana de açúcar, cacau e banana (MARINHO-JÚNIOR, 2010). Esta infecção frequentemente apresenta lesões cutâneas expansivas e persistentes, raramente múltiplas, com tendência a produzir metástases na mucosa nasal em cerca de 4% a 5% dos casos (BRASIL, 2007; BASANO; CAMARGO, 2004).

A apresentação de lesões dependerá tanto da espécie infectante (DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LINDOSO, 2012), como da imunidade do hospedeiro, podendo formar feridas ulceradas, nodulosas e lisas, placas planas ou verrugosas com hiperqueratose; estas lesões podem permanecer localizadas e evoluírem para cura espontânea, ou através dos vasos linfáticos, se disseminarem e produzir lesões secundárias em outras regiões da pele e mucosas (GOTO; LINDOSO, 2012).

Diante da diversidade de características clínicas, a LTA é dividida em: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL); Leishmaniose Cutânea Difusa (LCDf); Leishmaniose Cutânea Disseminada (LCDs); Leishmaniose Mucocutânea (LMC). A lesão cutânea localizada é a primeira a apresentar-se na maioria dos casos, podendo progredir para outras formas dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida (LINDOSO et al. 2012). LCDf produz lesões cutâneas disseminadas e crônicas em consequência da resistência ao tratamento, associada à deficiência na resposta imune celular do hospedeiro, produzindo lesões nodulares

por larga extensão cutânea (BRASIL, 2010). A LCDs, confundida frequentemente com a forma LCDf, tem expressão rara (até 2% dos casos), com apresentação de múltiplas lesões papulares acometendo uma grande extensão corporal (BRASIL, 2010). A LMC acomete parcialmente ou totalmente mucosas do nariz, boca e garganta sem cura espontânea (BRASIL, 2010) (Figura 2).

Figura 2 - Espectro clínico da leishmaniose tegumentar Americana. A) região rural típica da ocorrência da LTA; B) apresentação clínica da leishmaniose cutânea localizada; C) leishmaniose cutânea disseminada; D) leishmaniose cutâneo-mucosa.



Fonte: Castelluci et al. (2014)

2.2.3 Diagnóstico da LTA

De modo geral, o diagnóstico das leishmanioses se define pela associação de aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. O diagnóstico clínico da LTA pode ser realizado por meio das características da lesão associadas à anamnese, onde os dados epidemiológicos são de grande importância. Porém, o amplo espectro de formas clínicas dificulta esta forma de diagnóstico, tornando-o nem sempre simples ou imediato (GONTIJO; CARVALHO, 2003). As técnicas laboratoriais clássicas incluem exame parasitológico direto, intradermorreação de Montenegro (IDRM), isolamento do parasito em meio de cultura e detecção de anticorpos anti-*Leishmania* por métodos sorológicos (WEIGLE et al. 1987; BRITO et al. 2000).

A microscopia ainda é a abordagem diagnóstica padrão em níveis de saúde terciários, secundários, ou até mesmo primários em áreas de endemicidade, porque as técnicas mais

sofisticada têm custo elevado e estão raramente disponíveis. O cultivo dos parasitas em combinação com a *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) permite a identificação e caracterização de espécies de parasitas. A MLEE é um método para caracterizar organismos pelas mobilidades relativas na eletroforese, a partir de um grande número de enzimas intracelulares (STANLEY; WILSON, 2001). No entanto, requer conhecimento técnico aprofundado e é demorada, além de poder ter seu resultado prejudicado devido ao manejo das culturas (REITHINGER; DUJARDIN, 2006).

No Brasil, a IDRM, também conhecida como Teste de Montenegro, tem sido usada em grande escala em inquéritos diagnósticos populacionais e como técnica de apoio ao diagnóstico parasitológico direto, conforme fluxo sugerido pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2007). O teste consiste em uma reação de hipersensibilidade celular tardia, estimulada pela inoculação de um antígeno específico por via subcutânea. O teste torna-se positivo em algumas semanas após a infecção, e tem sido usado como diagnóstico diferencial com dermatomicoses. O teste de Montenegro é um método decisivo para diagnóstico das lesões de *Leishmania* persistentes e das lesões mucosas, nas quais o número de parasitas é baixo e, portanto, difícil de detectar. O teste pode ser também útil para o acompanhamento em programas de vacinação, indicando o desenvolvimento de proteção e memória imunológica (COSTA et al. 1996).

Abordagens moleculares de diagnóstico, especialmente pela PCR (*polymerase chain reaction*) que detectam o DNA da leishmania, e têm sido amplamente utilizadas, em virtude de sua alta sensibilidade e praticidade no processamento de amostras (CRUZ et al. 2002; GARCIA et al. 2005; GONÇALVES et al. 2012; STRAUSS-AYALI et al. 2004). Entre as variações da PCR, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) tem apresentado destaque, even sendo utilizada por diversos autores, possibilitando a realização de estudos relacionados a carga parasitária, interação hospedeiro-parasito, monitoramento da terapia e caracterização de espécies (CASTILHO et al. 2008; FRANCINO et al. 2006; MARY et al. 2004; PAIVA-CAVALCANTI et al. 2013; VITALE et al. 2004; WEIRATHER et al. 2011; WORTMANN et al. 2004).

2.2.4 *Imunopatogênese e resposta imune celular na LTA*

A LTA compreende um conjunto de doenças com características clínicas e imunopatológicas distintas, nas quais o desenvolvimento e o agravamento dos sintomas relacionam-se com fatores diversos, tais como a espécie de parasito envolvida e a resposta

imune do hospedeiro. A resposta imune adaptativa do hospedeiro à infecção por *Leishmania* é regulada por vias de grande complexidade. Investigações sobre a resposta imune específica mediada por células (diagnóstico pela IDRM e respostas proliferativas dos linfócitos *in vitro*), em áreas endêmicas, demonstram que apenas um subconjunto de pessoas infectadas com *Leishmania* evolui para o desenvolvimento de sintomas clínicos da doença (DAVIES et al. 1995). Inquéritos epidemiológicos aplicados em áreas endêmicas da LTA revelam que apenas 2-3% dos indivíduos infectados por parasitas do subgênero *Viannia* (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, e *L. (V.) peruviana*) desenvolvem lesões dérmicas (JIRMANUS et al. 2012). Portanto, frente à infecção por estes parasitas, existem indivíduos naturalmente resistentes (assintomáticos) e indivíduos com diferentes graus de susceptibilidade (sintomáticos) (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

A função dos macrófagos durante a infecção é bem estabelecida. Estes atuam por meio da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) e intermediários tais como o óxido nítrico (ON), que levam à morte dos parasitas. No entanto, não existe um consenso para os mecanismos de suscetibilidade, e como eventos diferentes são preferencialmente desencadeados em um determinado hospedeiro (SOONG; HENARD; MELBY, 2012).

De modo geral, a lesão inicial da LTA ocorre em decorrência de um infiltrado inflamatório composto, em maior parte, por linfócitos e macrófagos, recrutados para a área dérmica após a inoculação dos parasitas. As leishmanias desenvolvem mecanismos para manipular o sistema de defesa do hospedeiro (NEVES, 2012). Entre estes mecanismos destaca-se a produção de dois glicoconjugados de superfície: o lipofosfoglicano e a glicoproteína 63 (gp63) (ROBINS; COTRAN, 2005).

O lipofosfoglicano atua na ativação do sistema complemento com o objetivo de induzir a fagocitose e proteger os parasitas inclusos nos fagolisossomas, inibindo as enzimas lisossomais. A gp63 auxilia na ligação do parasito aos receptores dos macrófagos. A acidez dentro dos fagolisossomas faz com que as promastigotas transformem-se em amastigotas, resistentes ao baixo pH. A multiplicação das amastigotas, dentro dos fagolisossomas, promove o rompimento do macrófago com infecção de novas células, potencializando a resposta inflamatória (BARRAL-NETO et al. 1986; GONTIJO; CARVALHO, 2003; ROBINS; COTRAN, 2005).

No contexto da imunidade adaptativa, a atividade dos linfócitos T CD4+ desempenha um papel dicotômico na resposta do hospedeiro à LTA, podendo promover uma resposta protetora, apresentando um perfil de citocinas do tipo Th1 ou, do tipo Th2, que acarreta

persistência da doença e sua patologia (BACELLAR et al. 2002; CHOI; KROPF, 2009; KEDZIERSKI, 2010; REIS et al. 2006).

Na LTA humana, a diferenciação de células T CD4+ para o tipo Th1 é mediada por IL-12, produzida por células apresentadoras de antígenos (APCs) no curso da infecção (ALEXANDER; BROMBACKER, 2012). O padrão de resposta imune do tipo 1 com produção de IFN γ , TNF e IL-12, tem sido associado com o controle da infecção por ativação macrófagica e, portanto, eficiente destruição parasitária (ROBERTS, 2006; AMEEN, 2010). A citocina IFN γ atua em sinergia com TNF ativando a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) de macrófagos (M ϕ) a produzir óxido nítrico (ON), resultando na morte intracelular do parasito e controle da doença (BOGDAN et al. 2000; NYLEEN; GAUTAM, 2010). Por outro lado, citocinas como IL-4, IL-10 e TGF β , consideradas do tipo 2, favorecem a multiplicação parasitária através da inibição da produção de IFN γ e bloqueio da ativação de macrófagos, reduzindo os níveis de óxido nítrico (ON) (GOMES-SILVA et al. 2007, OLIVEIRA et al. 2014). Estas citocinas também são capazes de inibir a diferenciação dos linfócitos T para um perfil Th1 e sua consequente produção de IFN γ e TNF, desfavorecendo a ação protetora (BARATTA-MASINI et al. 2007).

Apesar deste conhecimento, a resposta imune humana à infecção por *Leishmania* não está tão bem caracterizada como a resposta em camundongos, em virtude de sua complexidade (REIS et al. 2006). Apesar dos conceitos apresentados, mesmo na presença de moléculas efetoras como IFN γ , TNF, e ON durante a doença ativa em humanos, a multiplicação parasitária em muitos casos persiste, indicando que os processos biológicos envolvidos na patogênese são ainda mais complexos, e não podem ser interpretados apenas pela avaliação do equilíbrio entre os perfis Th1 e Th2, característicos dos modelos animais (KATARA et al. 2013). Adicionalmente, a recente caracterização de populações celulares influentes como Th9 e células T regulatórias (T_{regs}), bem como a avaliação das interações parasito-hospedeiro nas infecções por espécies diferentes de *Leishmania* têm levado ao questionamento do paradigma Th1/Th2 como modelo simples de resistência e susceptibilidade (ALEXANDER; BROMBACKER, 2012).

As T_{regs}, envolvidas na manutenção da homeostase imune através da deleção de células T auto-reativas e secreção de mediadores anti-inflamatórios como a IL-10 (PETERSON, 2012), têm sido estudadas quanto ao seu papel na resposta inflamatória nas leishmanioses cutâneas (ANDERSON et al. 2007; BELKAID et al. 2001; LAGES et al. 2008). As T_{regs} incluem células T CD4+ CD25+ FoxP3+ naturais, que são derivadas do timo

(nT_{regs}) e T_{regs} induzíveis (iT_{regs}), que derivam de sítios periféricos (ALEXANDER; BROMBACKER, 2012). A função das T_{regs} durante a infecção por *Leishmania* é multifacetado, e a promoção de doença ou proteção depende do modelo experimental investigado (ALEXANDER; BROMBACKER, 2012).

O conhecimento da plasticidade das células T e esta recente caracterização de populações de células T regulatórias, bem como de outras subpopulações de células T efectoras como Th17, Th9, e células T foliculares (Th(f)), tornou ainda mais complexo o entendimento das interações entre patógeno e hospedeiro responsáveis pelo processo de cura espontânea e doença nas leishmanioses (ALEXANDER; BROMBACHER, 2012; GOLLOB et al. 2008; KEDZIERSKI, 2010; NYLÉN; GAUTAM, 2010). Assim, o paradigma da resposta Th1/Th2 em humanos foi aceito até 2005, quando uma população celular bem diferenciada, conhecida como Th17 foi identificada (HERINGTON et al. 2005; PARK et al. 2005).

A interleucina 17, principal citocina secretada pelo perfil celular Th17, pode desempenhar um papel patogênico em um amplo espectro de doenças humanas, particularmente em condições inflamatórias crônicas quando a inflamação, muitas vezes desencadeada por agentes desconhecidos, não pode ser adequadamente atenuada pelo sistema imunológico (COSMI et al. 2014). Diante deste espectro de atividades, a IL-17 tem sido alvo de estudos nas infecções por *Leishmania* spp. Contudo, apesar dos esforços dispensados pela comunidade científica nos últimos 10 anos, resultados controversos têm sido encontrados e a atuação da IL-17 como fator de resistência ou susceptibilidade na LTA ainda não é bem compreendida (BACELLAR et al. 2009; NOVOA et al. 2011).

2.3 Células T *helper* 17 e interleucina 17 na LTA

Sabe-se que na presença de IL-12 as células T virgens diferenciam-se para o tipo Th1, gerando um sistema de *feedback* positivo autócrino, e que a IL-4 induz a especialização celular para o perfil Th2. Estudos recentes demonstraram que o perfil Th17 se diferencia sob exposição a combinações de IL-1, IL-6 e TGFβ (ONISHI; GAFFEN, 2010). Embora tenha sido demonstrado o TGFβ como requisito para a geração de células Th17 *in vitro* e *in vivo*, verificou-se que células Th17 podem ser geradas independentemente de TGFβ (GHORESCHI et al. 2010), de forma alternativa. Os tipos "clássicos" e "alternativos" de Th17 têm expressão diferencial de citocinas e conseqüentemente funções efectoras distintas: quando as células Th17 "clássicas" foram comparadas às células Th17 induzidas alternativamente, as células Th17 "alternativas" eram mais patogênicas (GHORESCHI et al. 2010; PETERS; LEE,

KUCHROO, 2011). Ambos os tipos de Th17 secretam principalmente IL-17A e IL-17F, com maiores níveis de IFN γ , GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) e IL-22 produzidos pela população diferenciada do modo alternativo (AKDIS et al. 2012).

Apesar de o tipo celular Th17 ter sido recentemente caracterizado, a IL-17 já possuía funções bastante conhecidas, incluindo múltiplos efeitos inflamatórios e hematopoiéticos assim como IL-1, IL-6, TNF e iNOS, nos tecidos endotelial, epitelial e fibroblastos (TESMER et al. 2008). A IL-17 está envolvida no recrutamento, migração e ativação de neutrófilos; com função importante na proteção das superfícies contra bactérias e fungos patogênicos extracelulares, podendo também mediar patologias imunológicas graves (KORN et al. 2009; NYLÉN; GAUTAM, 2010). Estudos funcionais da IL-17 demonstram sua habilidade em estimular a produção de outras citocinas e quimiocinas como IL-6 e IL-8 por vários tipos celulares (KAWAGUCHI et al. 2004). O papel estimulatório da IL-17 sobre quimiocinas como β -defensina e MIP-3 (*macrophage inflammatory protein - 3*) em conjunto com sua atividade de recrutamento e ativação de neutrófilos sugere que esta citocina é importante tanto nas respostas imunes inatas quanto adaptativas (KAWAGUCHI et al. 2004). Sabe-se que a IL-17 tem um papel importante no processo de inflamação tecidual, e seu envolvimento na fisiopatologia de doenças autoimunes e rejeição de órgãos transplantados tem sido amplamente demonstrado (ANTONYSAMY et al. 1999; CHAUBAUD et al. 1998; CIPRIANDI et al. 2009; FUJINO et al. 2003).

Diante destes efeitos, a IL-17 tem sido muito estudada em modelos experimentais, frente a infecções por fungos, bactérias e protozoários, mas seu papel em infecções humanas não está bem definido, especialmente com relação às leishmanioses (ASSIS-SOUZA et al. 2013). Embora os estudos de células Th17 em humanos tenham inicialmente sido escassos em relação aos estudos com modelo animal, a descoberta de semelhanças e diferenças também se tornou um fator contribuinte para sua compreensão (TESMER et al. 2008).

Recentemente, a atividade das células Th17 tem sido demonstrada nas infecções por diversas espécies de *Leishmania* (BOAVENTURA et al. 2010; KATARA et al. 2013; PITTA et al. 2009). Níveis elevados de IL-17 foram medidos em pacientes com LT, mostrando que a ativação Th17 é gerada por *L. major*, *L. (V.) braziliensis*, *L. tropica*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. naiffi*, agindo sobre a ativação de macrófagos e recrutamento de neutrófilos (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al. 2017). No entanto, mecanismos evolutivos permitiram que cada espécie desenvolvesse uma habilidade diferente de subverter a resposta imune celular em seu favor, gerando redes de interações de citocinas com

desfechos distintos conforme a espécie infectante (ALEXANDER; BROMBACKER, 2012). Estudos clínicos indicam diferenças nas respostas imunes na LT entre subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. Por exemplo, níveis mais elevados de Th17 foram encontrados nos soros de pacientes infectados com *L. (Viannia) guyanensis* do que naqueles infectados por *L. (Leishmania) amazonensis*. Assim, a influência de Th17 /IL-17 sobre a doença pode também ser influenciada pela espécie de *Leishmania* (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al. 2017) (Quadro 1).

Nas infecções por *L. infantum*, a presença de IL-17 tem sido relacionada ao controle da replicação parasitária fortalecendo a resposta Th1 e produção de ON (NASCIMENTO et al. 2015), bem como em infecções por *L. donovani* (PITTA et al. 2009). De modo oposto, Bacellar et al. (2009) demonstraram a produção de IL-17 durante a infecção por *L.(V.) braziliensis* e a correlação direta entre esta citocina e TNF, indicando o possível envolvimento de IL-17 na patogênese da LTA. Oliveira et al. (2014) demonstraram a atuação da IL-17 no desenvolvimento de sintomas na LTA, podendo ter sua expressão regulada por IL-10. Outros estudos, porém, relacionaram a presença de IL-17 em infecções por *L. (V.) braziliensis* com o progresso para cura espontânea através da ação sinérgica com o IFN- γ (VARGAS-INCHAUSTEGUI et al. 2008), e observaram maiores níveis de expressão desta citocina em pacientes subclínicos (NOVOA et al. 2011). A Figura 3 ilustra a diferenciação dos principais tipos de linfócitos na resposta imune adaptativa contra *Leishmaniasp.* e a participação das células Th17 no controle à infecção, podendo agravar o processo inflamatório ou colaborar para a redução da carga parasitária.

Estes achados controversos têm estimulado a busca por novos conhecimentos acerca da participação da IL-17 na resposta imune celular na LTA, no sentido de desvendar suas influências na expressão de citocinas como IFN γ , TNF, IL-10, IL-22 e ON, bem como no aumento de processo inflamatório e agravamento das lesões (ASSIS-SOUZA et al. 2013; BACELLAR et al. 2009; BOAVENTURA et al. 2010; NOVOA et al. 2011).

Quadro 1 Papel da IL-17 e citocinas reguladoras na proteção ou agravamento de formas clínicas das leishmanioses.

Forma clínica	Espécie	Modelo	Presença de IL-17	Conclusão	Autor
LTA	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Humano	↑doença ativa; ↑ pós tratamento; ↓ cura espontânea	IL-17 contribui para montar a resposta efetora, mas é regulada pela presença do ON, estando relacionada com a cura.	Assis-Souza et al. (2013)
LTA (LMC; LCL)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Humano	↑ LMC / LCL; ↓ sadios	IL-17 é produzida durante a infecção, e está envolvida com o desenvolvimento da doença.	Bacellar et al. (2009)
LTA (LMC)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Humano	↑ IL-17 e células produtoras de IL-17 em lesões de LMC	A presença de células Th17 nas lesões de LMC sugere seu envolvimento no desenvolvimento da doença.	Boaventura et al. (2010)
LTA	<i>L. (V.) panamensis</i>	Camundongos BALB/c	↑ IL-17 em animais curados, concomitante com a redução de carga parasitária	Aumento da resposta Th1 e Th17 decorrente de baixa expressão de IL-10 e IL-4 relaciona-se com a cura.	Castilho et al. (2010)
LTA (LCL)	<i>L. (V.) guyanensis</i> ; <i>L. (V.) naiffi</i> ; <i>L. (L.) amazonensis</i>	Humano	↑ na infecção pelas 3 espécies; = em LCL e LMC	Resultados indicam que a IL-17 está envolvida no desenvolvimento dos sintomas da LCL.	Espir et al. (2014)
LTA (LMC)	<i>L. major</i>	Camundongos	↑ na ausência de IL-10 ou IFN γ	Correlação de maiores dosagens de IL-17 ao desenvolvimento de doença.	Gonzalez-Lombana et al. (2013)
LV (PKDL*)	<i>L. donovani</i>	Humanos	↑ PKDL	Envolvimento da população celular Th17 (IL-23, IL-17) na patogênese da doença.	Katara et al. (2012)
LTA	<i>L. major</i>	Camundongos	↑ em lesões maiores	Camundongos deficientes em IL-17 têm menores lesões, relacionando-a com a gravidade da doença.	Lopez-Kotska et al. (2009)

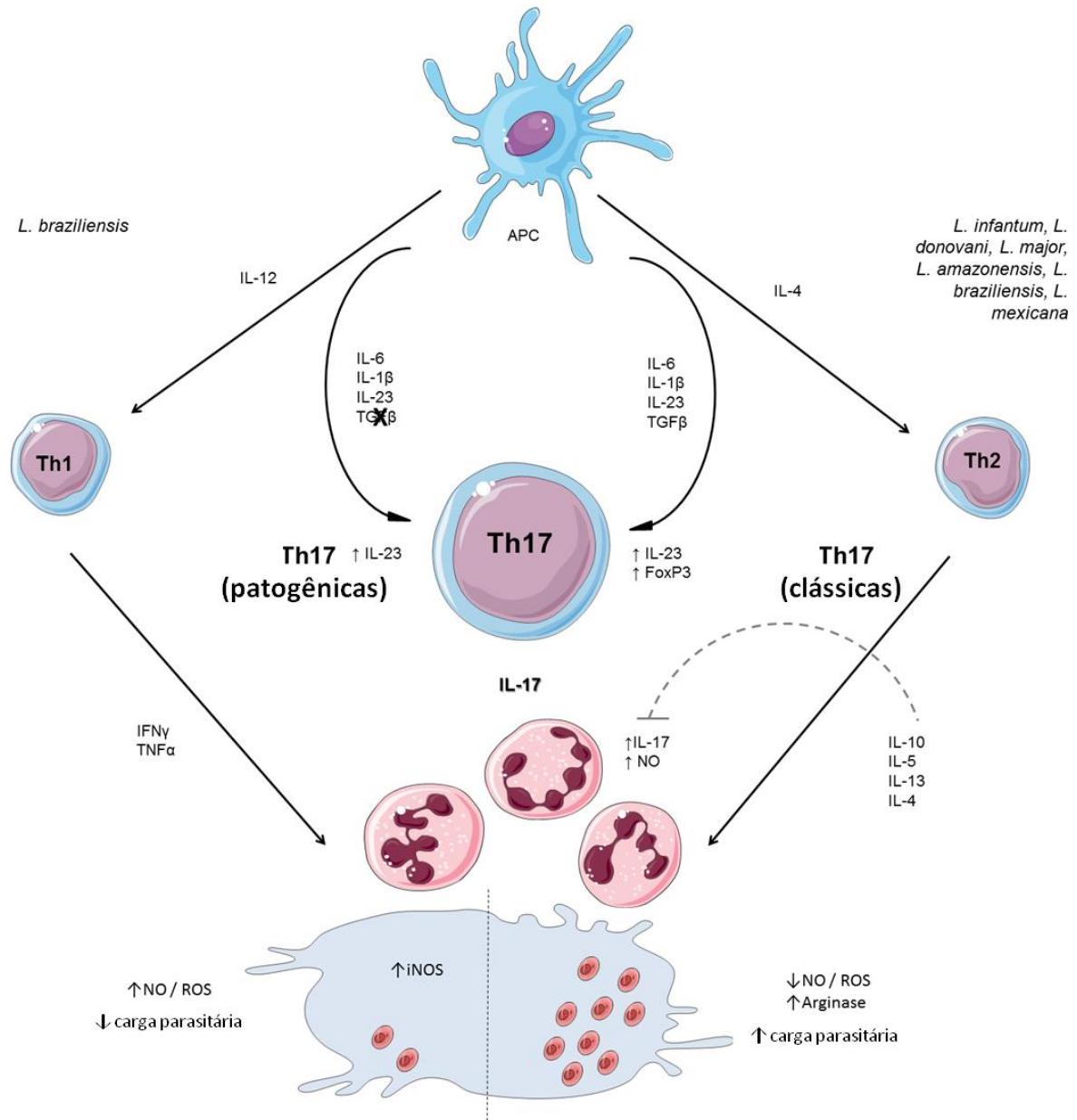
Quadro 1 - Papel da IL-17 e citocinas reguladoras na proteção ou agravamento de formas clínicas das leishmanioses

(continuação)

Forma clínica	Espécie	Modelo	Presença de IL-17	Conclusão	Autor
LV	<i>L. infantum</i>	Humanos	↑ no soro de pacientes com LV ↓ pós tratamento	IL-17 promove o controle da replicação parasitária fortalecendo a resposta Th1 e produção de NO.	Nascimento et al.(2015)
LTA	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Humanos	↑ em pacientes subclínicos	O controle da infecção parece estar relacionado à resposta imune inata com participação da IL-17	Novoa et al.(2011)
LTA	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Humanos	↑ na ausência de IL-10 e TGFβ	Atuação da IL-17 no desenvolvimento de sintomas na LTA	Oliveira et al.(2014)
LV	<i>L. donovani</i>	Humanos	↑ na presença de antígeno solúvel de <i>L. donovani</i>	Papel protetor da IL-17 frente à infecção por <i>L. donovani</i>	Pitta et al.(2009)
LTA (LMC, LCL)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Humanos	↑ na presença de APCs ativadas	A cura espontânea da infecção se correlaciona com a produção de IFNγ e IL-17.	Vargas-Inchaustegui et al.(2008)
LTA (LCL)	<i>L. tropica</i>	Humanos	↑ em pacientes com lesão	Participação de células Th17 patogênese da LC por <i>L. tropica</i> .	Katara et al.(2013)

Nota: (↑) - IL-17 aumentada; (↓) - IL-17 reduzida; *Leishmaniose dérmica pós calazar (*Post-kala-azar dermal leishmaniasis* - PKDL)

Figura 3 - Diferenciação dos linfócitos T *helper* tipo 1, 2 e 17 em resposta a diferentes espécies de *Leishmania* com definição da ativação macrofágica e impacto na carga parasitária.



Fonte: Gonçalves-de-Albuquerque et al. (2017), adaptado.

Legenda: Células T virgens se diferenciam no tipo Th1 na presença de IL-12, que atua na ativação de genes pró inflamatórios como IFN γ e TNF. Na presença de IL-4 são ativados genes do perfil Th2, que incluem IL-10, uma importante citocina reguladora da ativação macrofágica e inflamação. A diferenciação de células Th17 decorre da ativação de células T pela combinação de TGF β , IL-6, IL-1 β e IL-23. A presença de IL-23 é determinante para a manutenção de células Th17. As células Th17 também podem ser geradas independentemente do TGF β , numa via alternativa de ativação. Quando as células Th17 "clássicas" foram comparadas com aquelas geradas de modo alternativo as células "Th17 alternativas" foram mais patogênicas por apresentar maior produção de IFN γ . O IFN γ produzido por Th1 ativa a enzima iNOS e aumenta a produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), necessários para eliminação das amastigotas. A produção de ROS no microambiente de infecção é reforçada pela presença dos neutrófilos recrutados pela IL-17 e, na ausência de regulação por IL-10, pode levar ao agravamento do dano tecidual.

Para estabelecer o papel da IL-17 na rede de citocinas que desencadeiam os fenômenos imunes na LTA, o nível de expressão deste mediador pode ter influência determinante (KATARA et al. 2012). No entanto, a expressão gênica de mediadores imunológicos envolvidos na LTA é muito pouco analisada, especialmente em Th17 (SOUZA et al. 2016). Além disso, variações genéticas em regiões gênicas reguladoras podem tornar-se variáveis importantes, causando aumento ou redução na expressão de citocinas.

2.4 *Single nucleotide polymorphisms (SNPs)*

A susceptibilidade dos indivíduos a doenças e fatores ambientais tem sido atribuída a alelos específicos em genes relacionados ao risco. Algumas variações genéticas também têm sido sugeridas como possíveis componentes da suscetibilidade a doenças causadas por patógenos intracelulares de macrófagos, como hanseníase, tuberculose e leishmaniose. Estudos do genoma humano relatam cada vez mais associações entre polimorfismos genéticos e sua relação com susceptibilidade ou resistência em muitas das principais doenças infecciosas (CHAPMAN; HILL, 2012).

Diversos tipos de polimorfismos genéticos são conhecidos. Os polimorfismos de sequências repetidas (*small tandem repeats*- STR) são caracterizados por repetições de sequências com dois a cinco nucleotídeos, e são comumente chamados microssatélites. Um segundo tipo, chamado minissatélites ou *variable number of tandem repeats* (VNTR), identifica-se por conter número variável de repetições com sequências de nucleotídeos maiores. Finalmente, os SNPs são variações de apenas um nucleotídeo, e se distribuem aos milhões por todo o genoma (FRADE, 2010). Os STRs e os VNTRs, por serem multialélicos, tornam-se mais caros e difíceis de serem genotipados. Em contrapartida, os SNPs por sua maior simplicidade, permitem determinar com maior precisão as regiões gênicas associadas com doenças (PACHECO; MORAES, 2009).

Os SNPs são variantes bialélicas, que aparecem com frequência maior que 1% nas populações. A densidade de SNPs varia conforme a região do genoma, podendo ser encontrados 1 a cada 50-100pb (regiões densas) ou 1 a cada 500-1000pb (regiões de baixa densidade) (PACHECO; MORAES, 2009). Para efeito de estudos genéticos, os SNPs são tipicamente utilizados como marcadores de uma região genômica, com a grande maioria deles tendo impacto biológico mínimo sobre os sistemas. Estes podem, no entanto, ter consequências funcionais, causando mudanças em aminoácidos, na estabilidade dos transcritos

de RNA mensageiro (mRNA), ou alterações na afinidade de ligação de fatores de transcrição (GRIFFITH et al. 2008).

Estudos amplos de associação do genoma (*Genome Wide Association Studies - GWAS*) são uma abordagem de pesquisa para identificar *locus* gênicos envolvidos em doenças humanas. Estes estudos fazem medidas e análises de variações na sequência de DNA de todo o genoma humano, buscando identificar fatores genéticos de risco para doenças. O objetivo final dos GWAS é a utilização de fatores de risco genéticos para fazer previsões sobre o risco de desenvolver determinadas enfermidades e identificar as bases biológicas da susceptibilidade, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e tratamento (BUSH; MOORE, 2012).

2.5 SNPs em genes de citocinas

Sabe-se que as doenças infecciosas são multifatoriais, no entanto, diferenças genéticas entre os indivíduos são fatores importantes no direcionamento da manifestação e agravamento de sintomas. Na LTA, o fato de uma mesma espécie de parasito causar níveis distintos de gravidade de sintomas em uma mesma população, intensifica este raciocínio.

Como a resposta imunológica tem papel fundamental frente as infecções, os mediadores imunológicos, especialmente as citocinas, foram os principais alvos nos estudos genéticos iniciais sobre resistência e susceptibilidade a doenças infecciosas, com o objetivo de identificar indivíduos com maior probabilidade de desenvolver doença quando expostos ao agente infeccioso (DUGGAL; BEATY, 2008).

Genes para citocinas envolvidas em doenças complexas (doenças com causas multifatoriais), como as infecciosas e auto-imunes já foram identificados e têm sido amplamente estudados (CHAPMAN; HILL, 2012; HAVERKAMP; HOLLAND, 2008; MORAES et al. 2008). O grande interesse neste campo da pesquisa se concentra no fato de que microsátélites ou SNPs podem alterar a capacidade de ligação dos fatores de transcrição aos sítios das regiões promotoras destes genes, modificando a quantidade de citocina produzida (AWAD et al. 1998; FISHMAN et al. 1998; PRAVICA et al. 1999; TURNER et al. 1998; WILSON et al. 1997).

Nos últimos anos, grupos de pesquisas vêm utilizando marcadores genéticos para avaliar qual a influência dos fatores genéticos do hospedeiro na susceptibilidade à LTA. No entanto, o número de publicações sobre este tema na LTA, comparado a outras doenças como hanseníase e tuberculose ainda é pouco (COVAS, 2008). Na América do Sul, um estudo de

caso-controle realizado por Cabrera et al. (1995), avaliou o SNP TNF-308G/A, sendo observada uma maior frequência do alelo A em pacientes com leishmaniose mucosa tanto em condição de homozigose como em heterozigose, quando comparado ao grupo controle, indicando associação desta variante com o desenvolvimento da forma mais grave da doença.

No Brasil, estudos pioneiros para avaliar o impacto de marcadores genéticos no desenvolvimento da LTA foram publicados a partir de 2006 (CASTELLUCI et al. 2006; 2008). Estes estudos demonstraram uma associação entre o alelo C do SNP -174G/C no gene para IL-6 com a leishmaniose mucosa, em pacientes da região Nordeste; com menor expressão de IL-6 em indivíduos homozigotos para o alelo C (CASTELLUCI et al. 2006). Em 2010, Castelluci et al. (2010) verificaram associação entre a presença do alelo C do SNP IL-8RA +2607 G/C, considerado o mais frequente para o gene IL-8RA, com o desenvolvimento de sintomas na leishmaniose cutânea. Outros estudos de associação focados em citocinas têm contribuído para sustentar a hipótese de que SNPs localizados em regiões gênicas críticas podem servir como marcadores prognósticos tanto na LTA como na LV, bem como alvos para novas abordagens terapêuticas (CASTELLUCI, 2010; FRADE et al. 2011; MATOS et al. 2007; RAMASAWY; KAMALI-SARVESTANI et al. 2006; SALHI et al. 2008).

2.6 SNPs em IL-17

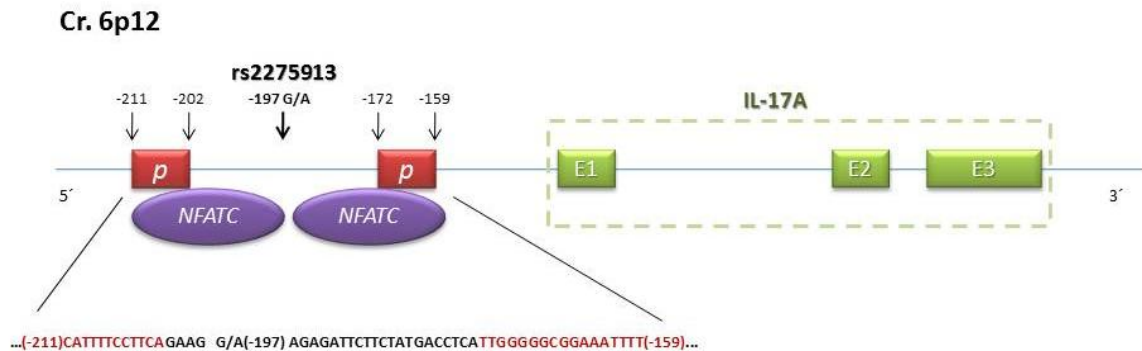
Considerando o papel central de citocinas na patogenia de algumas doenças e a recente caracterização do perfil celular Th17; SNPs distintos no gene para a IL-17 têm sido explorados nos últimos anos, mapeando o papel de cada mutação na expressão da molécula e consequentemente, sua associação com o risco de doença (KAWAGUCHI et al. 2006; ARISAWA et al. 2008; NORDANG et al. 2009; RASOULI et al. 2013; SARAIVA et al. 2013).

Até agora foram identificados seis membros da família IL-17, incluindo IL-17A (mais comumente referida simplesmente como IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (também chamada IL-25), e IL-17F; e há cinco receptores de IL-17, incluindo IL-17RA, IL-17RB/IL-25R, IL-17RC, IL-17RD/SEF e IL-17RE (GAFFEN, 2009). Contudo, as investigações funcionais acerca da IL-17 têm sido concentradas nos subtipos IL-17A, IL-17F e IL-17E, pois estas são expressas em diversos tipos celulares, como as APCs *enatural killer* (NK) (FOSSIEZ et al. 1996; KORN et al. 2009), sugerindo que sua atividade seria pleiotrópica (múltiplas células-alvo) (KAWAGUCHI et al. 2004).

O gene para a IL-17A humano é composto por três exons (dois íntrons) e localizado no cromossomo 6p12 (SADIGHI et al. 2014).

Existem diversos SNPs descritos para o gene da IL-17A humana, bem como em outros subtipos: o IL-17A -197 G/A (rs2275913), IL-17A +4169 A/G (rs4711998), IL-17F +7488 T/C (rs763780), sendo o mais explorado o -197 G/A, (dbSNP: rs2275913) (DAI et al.2014; ARISAWA et al. 2008; CHEN et al. 2010; CORREA et al. 2012). O IL-17A -197 G/A está localizado na posição 197 *upstream* ao sítio de início (*starting codon*) da transcrição do gene (região promotora), podendo regular a expressão do mRNA (DAI et al. 2014). A região promotora proximal do gene para a IL-17A contém muitos sítios de ligação para fatores de transcrição, incluindo o sítio de ligação para o fator nuclear de células T ativadas (*nuclear factor of activated T cells* - NFATC), importante na regulação da expressão de IL-17A (LIU et al. 2004). O rs2275913 se situa entre dois sítios de ligação de NFATCs, contudo, nenhum outro SNP localizado dentro dos sítios foi descrito (NORDANG et al. 2009) (Figura 4). Por esta localização estratégica, este SNP tem sido explorado em estudos de associação com várias doenças infecciosas e de caráter inflamatório, embora na maioria dos estudos não se tenha testado sua influência sobre a quantidade de citocina secretada conforme os genótipos.

Figura 4 - Esquema ilustrativo do *IL-17A*, destacando a localização do SNP -197G/A (rs2275913) entre regiões de ligação a fatores de transcrição na região promotora do gene, e suas respectivas sequências.



Fonte: Espinoza et al. (2011b), adaptado pela autora.

Nota.: *p*: sequência promotora de ligação para o fator nuclear de células T ativadas; NFATC: *nuclear factor of activated T cells*; E: exons da sequência codificadora do gene.

Correa et al. (2012) relataram aumento dos níveis de IL-17A em portadores do alelo A homozigotos e heterozigotos em comparação a homozigotos GG. Os níveis de IL-17 (mRNA e/ou proteína) têm sido correlacionados com a severidade da infiltração neutrofílica (OBOKI et al. 2008; SUN et al. 2005), sugerindo que fatores influentes na expressão da molécula podem influenciar na patogênese ou gravidade de doenças (CHEN et al. 2010). O alelo A, na

posição -197 do gene para a IL-17A, tem sido associado recentemente a susceptibilidade a doenças de caráter autoimune e inflamatório, como artrite reumatoide (NORDANG et al. 2009) e colite ulcerativa (ARISAWA et al. 2008), estes achados tornaram o gene para a IL-17 um importante alvo na perspectiva dos candidatos ao estudo de polimorfismos genéticos (CHEN et al. 2010).

Diversos estudos de variantes do gene para a IL-17 e sua relação com doenças cuja resposta imune é mediada pelo perfil Th1 têm sido realizados desde a identificação das células Th17 (Quadro 2) (CORREA et al. 2012; ARISAWA et al. 2008; NORDANG et al. 2009; CHEN et al. 2010; ESPINOZA et al. 2011; YU et al. 2011; HAN et al. 2014). Embora outros SNPs como o IL-17F +7488 T/C (rs763780) tenham sido comumente avaliados simultaneamente ao IL-17A -197 G/A (rs2275913), associações mais significativas desta última mutação com o desenvolvimento de doenças, têm sido encontradas (DAI et al. 2014; CORREA et al. 2012; NORDANG et al. 2009) em comparação aos SNPs localizados em outras estruturas gênicas, como éxons e UTRs (*untranslated regions*).

Estes achados, somados à possível influência sobre o nível de expressão da citocina (CORREA et al. 2012), tornaram interessante a investigação do rs2275913 na LTA. Adicionalmente, a quantificação da IL-17A expressa em cada genótipo pode contribuir para o maior esclarecimento do papel das células Th17 na evolução da resposta adaptativa à infecção por *L. (V.) braziliensis*. No entanto, estudos de associação entre polimorfismos genéticos em IL-17 e a susceptibilidade à LTA ainda são escassos na literatura.

Quadro 2 - Single nucleotide polymorphisms (SNPs) descritos em IL-17 e suas associações com patologias humanas de caráter inflamatório, destacando-se a presença do SNP -197 G/A (rs2275913) com associação positiva em vários estudos.

SNP	Cód. dbSNP	Doença	Expressão gênica/dosagem de IL-17	Conclusão	Autor
IL-17A (-197G/A); IL-17F (7488T/C)	rs2275913; rs763780	Câncer	Não verificado	IL-17A (-197G/A) positivamente correlacionado câncer; IL-17F (7488T/C) não correlacionado relacionado a risco	Dai et al. (2016)
IL-17A (-197G/A); IL-17F (7488T/C)	rs2275913; rs763780	Colite ulcerativa (CU)	Não verificado	IL-17A (-197G/A) AA ou GA e IL-17F (7488T/C) TT ou TC positivamente correlacionados ao desenvolvimento da CU	Arisawa et al. (2008)
IL-17A (-197 G/A)	rs2275913	Asma e infecções bacterianas associadas à asma	Níveis de IL-17 não variam significativamente entre os genótipos AA AG e GG	Presença do alelo A positivamente correlacionada ao risco de asma infantil ¹ .	Chen et al. (2010)
IL-17A (-197G/A); IL-17F (7488T/C)	rs2275913; rs763780	Periodontite	Aumento dos níveis de IL-17A em portadores do alelo A em comparação aos homozigotos GG. IL-17F sem diferenças entre genótipos	Alelo AIL-17A, correlacionado a piores quadros clínicos quando comparados aos homozigotos GG. Sem correlação entre IL-17F (7488T/C) e periodontite	Correa et al. (2012)
IL-17A (-197G/A)	rs2275913	GVHD malignidades hematológicas	Maior expressão e secreção de IL- 17 em portadores do alelo A	Genótipo AA positivamente correlacionado a formas agudas de GVHD, com maior rejeição a transplantes de medula óssea	Espinoza et al. (2011a)
IL-17A (-197G/A)	rs1974226	Leishmaniose Visceral	Não verificado	Sem correlação significativa entre IL-17A (-197 G/A) e LV.	Sadighi et al. (2014)

¹No estudo foi encontrada associação de homozigotos AA com maiores níveis de IgE. A presença de IgE (alergias) é o fator de risco mais importante na asma. Estudos relacionam IL-17 com alergias (SCHNYDER-CANDRIAN et al.2006).

Quadro 2 - Single nucleotide polymorphisms (SNPs) descritos em IL-17 e suas associações com patologias humanas de caráter inflamatório, destacando-se a presença do SNP -197 G/A (rs2275913) com associação positiva em vários estudos

(continuação...)

SNP	Cód. dbSNP	Doença	Expressão gênica/dosagem de IL-17	Conclusão	Autor
5 SNPs em IL-17A	rs4711998; rs8193036; rs3819024;rs2275913; rs7747909	Artrite Reumatóide (AR)	Não verificado	Associação significativa apenas do SNP rs2275913 com AR (fraca associação). Genótipo AA mais associado à doença.	Nordang et al. (2009)
9 SNPs em IL-17A	rs4711998;rs8193036;rs3819024;rs2275913; rs3819025; rs8193038; rs3804513; rs1974226; rs3748067	Brucelose humana	Não verificado	IL-17 rs4711998, rs8193038, rs3748067 com genótipos AA foram considerados fatores de susceptibilidade, enquanto IL-17 rs3819024 (GG) e rs3819025 (AA) foram correlatos à resistência.	Rasouli et al. (2013)
IL17A; IL17F	rs2275913;rs763780	Periodontite	Maior dosagem de IL-17A nos controles do que nos casos. Associação da expressão gênica com a presença dos SNPs não foi avaliada.	Aumento da IL-17A e a presença do alelo A no IL-17A rs2275913 são associadas resistência, enquanto o genótipo GG e o alelo G foram mais frequentes nos suscetíveis. Em IL17F nenhuma diferença significativa entre casos e controles foi encontrada	Saraiva et al. (2013)
IL-17A (-197G/A); IL-17F (7488T/C)	rs2275913; rs763780	Câncer gástrico	Não verificado	IL-17F genótipos GA e GG são associados a maior risco de câncer gástrico (susceptibilidade); IL-17A genótipo AG associado a apenas um tipo de câncer gástrico	Wu et al. (2010)
IL-17A -197 G/A	rs2275913	Colonização por <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Maiores níveis séricos de IL-17A em indivíduos com genótipo AA	Genótipos GG e AG positivamente correlacionados ao risco de colonização por <i>S. pneumoniae</i>	Juho et al. (2015)

2.7 Justificativa

Uma vez que a influência dos fatores genéticos têm sido demonstrada nos tipos de resposta imune desencadeada pelo hospedeiro, a identificação de marcadores genéticos que contribuam para susceptibilidade ou agravamento é sugerida como uma alternativa na busca de compreender os mecanismos envolvidos na patogênese da LTA. A descrição de associações entre SNPs e doenças infecciosas trouxe perspectivas de aplicações potenciais das informações contidas no genoma para o estudo de marcadores prognósticos, novos alvos terapêuticos e da possibilidade do uso de esquemas terapêuticos individualizados (HIRATA; TAVARES; HIRATA, 2006). Embora o SNP IL-17A -197 G/A (rs2275913) tenha sido associado a doenças fortemente relacionadas ao fator imunológico, não existem até o momento investigações sobre sua influência no desfecho clínico da LTA. Este estudo poderá contribuir para um melhor conhecimento da imunopatogênese da LTA em humanos e do papel da IL-17 como importante modulador da resposta celular. A associação de características genéticas com o desenvolvimento de sintomas clínicos na infecção por *L. (V.) braziliensis* pode proporcionar subsídios para a racionalização e direcionamento de pesquisas e desenvolvimento de imunoterápicos e imunoprolifáticos.

3. PERGUNTA CONDUTORA

Existe associação entre o SNP IL-17 -197 G/A (rs2275913) com susceptibilidade ao surgimento de sintomas na infecção por *L. (V.) braziliensis* em indivíduos de áreas endêmicas no Estado de Pernambuco?

4. HIPÓTESE

O polimorfismo -197 G/A na região promotora do *IL-17A* está associado a maior susceptibilidade a LTA em população de áreas endêmicas do Estado de Pernambuco; e ao modificar a quantidade da citocina contribui para o aumento da atividade inflamatória e decréscimo da carga parasitária.

5. OBJETIVOS

5.1 Geral

Avaliar a associação entre o SNP IL-17A -197 G/A (rs2275913) e susceptibilidade à leishmaniose tegumentar Americana, através da secreção de IL-17 e sua influência sobre a carga parasitária na infecção por *Leishmania braziliensis*.

5.2 Específicos

- a) Efetuar avaliação clínica e diagnóstico imunológico e/ou molecular de LTA em amostras de pacientes de áreas endêmicas do Estado de Pernambuco;
- b) Determinar as frequências alélicas e genótípicas do SNP IL-17 -197 G/A em amostras de indivíduos residentes em áreas endêmicas para LTA do Estado de Pernambuco;
- c) Mensurar a associação da presença do SNP IL-17 -197 G/A com surgimento de lesões características da LTA na infecção por *L. (V.) braziliensis*;
- d) Quantificar a população celular do tipo Th17 e seus subtipos em cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com genótipos conhecidos do SNP IL-17 -197 G/A;
- e) Correlacionar a presença do SNP IL-17 -197 G/A com a geração de resposta imune efetora tipo Th17 e quantificação de DNA parasitário na população estudada.

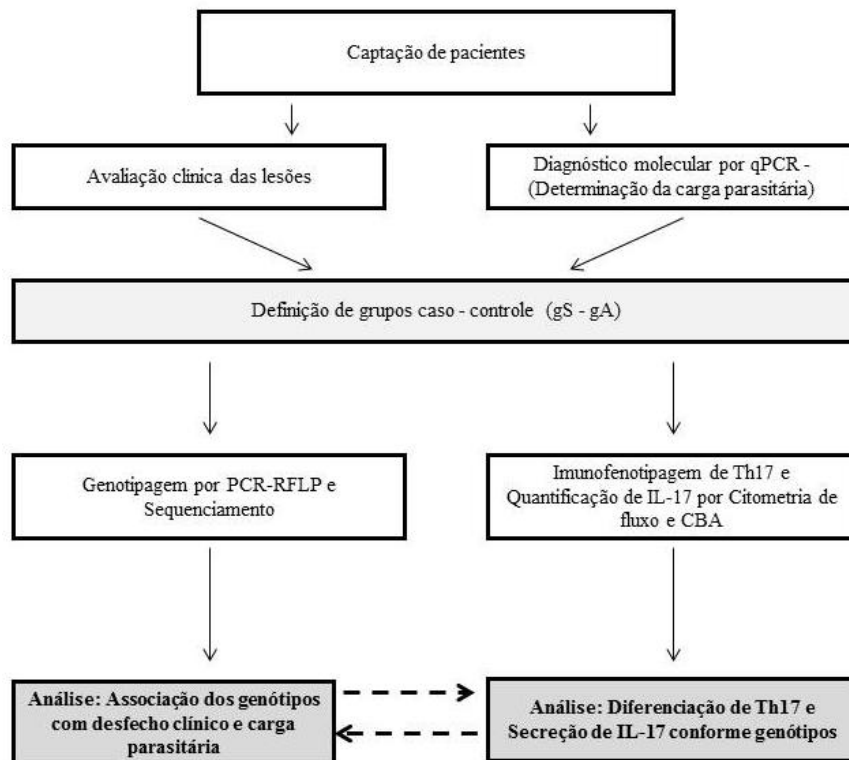
6. METODOLOGIA

6.1 Desenho do estudo

A relação do SNP IL-17 -197 G/A rs2275913 com o desfecho clínico da infecção foi medida através de um estudo de associação do tipo caso-controle. Esta abordagem incluiu indivíduos residentes em áreas endêmicas do Estado de Pernambuco. Foram selecionados indivíduos com lesão ativa e/ou cicatricial de LTA (grupo Sintomático - gS, considerado suscetível) e indivíduos infectados sem desenvolvimento de sintomas (grupo Assintomático - gA, considerado resistente). Residentes de áreas endêmicas, não infectados, foram incluídos por ocasião das coletas e configuraram um grupo controle negativo da população (grupo Sem Infecção - gSI).

Um estudo descritivo da relação dos genótipos com a carga parasitária quantificada nos grupos gS e gA, bem como da resposta imune diante das diferentes variantes genéticas foi realizado. Uma representação esquemática do delineamento do estudo pode ser observada na Figura 5.

Figura 5 - Representação esquemática das etapas metodológicas seguidas no presente estudo.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: gS - pacientes sintomáticos (casos); gA - pacientes assintomáticos (controles).

6.2 Amostragem e avaliação clínica

Para o estudo de associação dos genótipos, foi calculada a amostra representativa com auxílio do *software* EpiInfo versão 6.0. Para comparar gS e gA foi considerado um percentual de exposição de 30% da população à infecção, nível de confiança de 95%, *Odds Ratio* (OR) mínima a ser detectada de 2,5 e razão de 1 controle para cada caso. Para o estudo de associação de genótipos, foram considerados ambos os sexos, todas as idades, e qualquer grupo racial. Pacientes de municípios onde a LTA é endêmica, e aqueles atendidos no ambulatório de doenças infecciosas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC-PE) foram inclusos.

Na fase de recrutamento, os pacientes foram avaliados quanto a presença de lesão ativa conforme orientações do Manual de Vigilância da leishmaniose tegumentar Americana (BRASIL, 2010), sendo considerado também o histórico de doença progressa e apresentação de cicatriz característica da lesão, como critério de definição da condição clínica dos indivíduos. O número e a localização das lesões ou cicatrizes, bem como a realização ou não de tratamento foram avaliados.

Para o estudo descritivo da resposta imune conforme os genótipos foi utilizada amostragem de conveniência (COSTA NETO, 1977; REIS, 2003) de acordo com o número de pacientes que aceitaram participar da pesquisa, considerando manter a proporção do número de pacientes em cada grupo, com base no grupo de menor frequência na população. Para esta etapa, pacientes de ambos os sexos com idade igual ou superior a 15 anos e com genótipos previamente determinados neste estudo foram recrutados. Pacientes transplantados, imunodeprimidos, e com co-morbidades como câncer e diabetes, não foram inclusos nas análises.

Todos os pacientes inclusos neste estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A), elaborado conforme modelo anexo ao projeto de pesquisa aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP (Parecer nº 1.090.864) (ANEXO A).

6.3 Coleta de sangue e acondicionamento das amostras

Para os testes moleculares (qPCR diagnóstico e genotipagem) após antissepsia com algodão embebido em álcool etílico 70%, foram coletados com auxílio de agulhas 25x7 mm, 4mL de sangue acondicionados em tubo de coleta a vácuo com anticoagulante EDTA

(Vacutainer®). Para a realização das culturas de células dos indivíduos recaptados para avaliação da resposta imune, 20 mL de sangue divididos em 2 tubos Vacutainer® com heparina (2 x 10 mL) foram coletados, com auxílio de agulhas 25x7 mm. Para o diagnóstico molecular (qPCR) e análise genotípica (PCR-RFLP / Sequenciamento) (sangue com EDTA), o material foi estocado em *freezer* a -20°C para posterior extração de DNA. Para as análises imunológicas (sangue com heparina), o sangue coletado foi imediatamente processado, conforme descrito adiante.

6.4 Diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp.

Para o diagnóstico da infecção foi realizada a qPCR em conjunto com intradermo-reação de Montenegro (IDRM) para parte dos pacientes (84 pacientes) durante o tempo em que o antígeno esteve disponível. Em virtude da interrupção da fabricação do antígeno Leishmanina pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), com liberação de nota informativa oficial pelo Ministério da Saúde em 2016 (ANEXO B), e indisponibilidade deste material por meio de outras fontes, não foi possível avaliar a presença de memória imunológica contra *L. (V.) braziliensis* pela IDRM em todos os pacientes incluídos no estudo. Posteriormente, qPCR foi utilizada como critério de diagnóstico laboratorial indicativo de infecção e método de quantificação da carga parasitária.

6.4.1 IDRM

O teste de hipersensibilidade celular tardia foi realizado através da inoculação intradérmica de 0,1 mL do antígeno Leishmanina produzido e padronizado pelo CPPI (Secretaria Estadual de Saúde, Piraquara, PR, Brasil), fornecido pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, na face anterior do antebraço. A leitura foi realizada após 48 a 72 horas, para a verificação da nodulação, através do método da caneta esferográfica (SOKAL, 1975). Foram considerados positivos os pacientes que desenvolveram endurecimento local maior ou igual a 5 milímetros.

Como controle negativo da reação de hipersensibilidade, 0,1 mL de solução de soro fisiológico (NaCl 0,9%) foi inoculado na mesma face do antebraço, e o surgimento de endurecimento local avaliado. Indivíduos que desenvolveram reação de imunidade celular a este controle foram excluídos do estudo.

6.4.2 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue foi efetuada com o *QIAamp DNA Blood mini kit* (QIAGEN Sample and Assay Technologies), seguindo as instruções do fabricante, que compreendem basicamente 03 etapas: lise de células, lavagem da coluna de afinidade e eluição do DNA.

6.4.3 Diagnóstico molecular pela PCR quantitativa em tempo real

O DNA extraído foi teve sua qualidade testada antes da reação diagnóstica por meio do sistema G3PD2 (GONÇALVES et al. 2012), que assegura a não degradação da amostra antes do diagnóstico. Para a reação diagnóstica de detecção de *L. (V.) braziliensis* foram usados os *primers* kDNA1f [5'-ATGCCTCTGGGTAGGGGCGTTC-3'] e kDNA1r [5'-GGGAGCGCGGCCCACTATATT-3'] conforme protocolo descrito por Paiva-Cavalcanti et al.(2013). Estes *primers* têm como alvo o DNA do cinetoplasto do parasita, que por estar presente em milhares de cópias por célula confere maior sensibilidade à técnica. Para a determinação da carga parasitária, uma curva de diluição fator 1:10 do DNA genômico de *L. (V.) braziliensis*(MHOM/BR/1975/M2903) foi utilizada como padrão. As reações de qPCR com leitura pelo SYBR Green (Applied Biosystems) foram realizadas no equipamento ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems), instalado no núcleo de plataformas tecnológicas (NPT) do IAM/FIOCRUZ-PE, e as respectivas análises foram feitas utilizando o *software* ABI PRISM 7500 versão 2.0.6.

6.5 Definição de grupos caso e controle

Após a avaliação clínica e realização dos testes diagnósticos, os indivíduos foram distribuídos entre dois grupos de estudo. Pacientes que apresentaram uma ou mais lesões cutâneas ativas ou cicatrizadas, e/ou diagnóstico positivo pela IDRMs e/ou qPCR (pacientes sintomáticos - gS) foram considerados como casos. Pacientes sem lesão ou cicatriz que obtiveram IDRMs positiva e/ou qPCR positiva (pacientes assintomáticos - gA) foram considerados controles. Pacientes sem cicatriz ou lesão, e diagnosticados como negativos pela IDRMs e qPCR (pacientes sem infecção - gSI) configuraram um grupo de controle negativo no estudo.

6.6 Genotipagem por PCR-RFLP e seqüenciamento

Para a detecção específica dos alelos G e A do SNP -197 G/A rs2275913 foram utilizadas as técnicas de PCR e RFLP seguindo o protocolo de Wu et al. (2010), e/ou sequenciamento. Para a PCR e o sequenciamento, foram utilizados um *primerforward* (IL-17f: 5'-AACCAAGTAAGAATGAAAAGAGGACATGGT-3') e um *primer* reverso (IL-17r: 5'-CCCCCAATGAGGTCATAGAAGAATC-3'), direcionados a região de início do *IL-17A*. A PCR convencional precedente à RFLP foi composta por 100 ng de DNA genômico extraído da amostra do paciente, 10x Taq Buffer (Invitrogen), 1 µM de cada *primer* IL-17f e IL-17r, 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 2 mM, e 1U *Taq* polimerase, compondo um volume final de 25 µL. A ciclagem de temperaturas foi realizada em aparelho EppendorfMastercyclergradient (Eppendorf). Como controle de qualidade das reações, foi amplificado por PCR o gene G3PD em reação prévia, conforme protocolo descrito por Gonçalves et al. (2012).

A digestão enzimática dos produtos de PCR foi realizada em temperatura de 37°C por 1 hora pela enzima EcoNI (*XagI*) (Fermentas), em solução preparada conforme instruções do fabricante, formando 3 tipos de fragmentos: 102 pb, 68 pb e 34 pb. A determinação dos genótipos foi feita conforme o conjunto de fragmentos visualizados em cada amostra, sendo: GG (68 e 34 pb), AG (102, 68 e 34 pb) e AA (102 pb) (WU et al. 2010).

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% (visualização de produtos de PCR) e 3% (visualização de fragmentos após digestão), corados com brometo de etídeo 10mg/mL, e visualizados em transluminador com luz ultravioleta, utilizando o marcador de peso molecular Ladder 25bp (Invitrogen).

Os produtos de PCR obtidos pela amplificação do *IL-17* foram purificados usando o *PureLink Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo kit* (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram encaminhados ao Laboratório Central da Universidade Federal de Pernambuco (LabCen-UFPE) para realização do sequenciamento, utilizando *BioDye Terminator Cycle Sequencing Kit 3.1* (Applied Biosystems) em um sequenciador automático (*ABI 3100 Genetic Analyzer*). As seqüências obtidas foram analisadas e editadas utilizando o *software* BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), e comparadas com a seqüência rs2275913 disponível no dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

As técnicas de genotipagem foram aplicadas conforme a disponibilidade de recursos e a necessidade de confirmação dos resultados. Sempre que possível, as amostras foram genotipadas pelas duas técnicas simultaneamente, e sua concordância foi avaliada.

6.7 Obtenção de antígeno solúvel total de *L. (V.) braziliensis*

Para o estímulo das culturas de células realizadas no estudo, foi utilizada a fração solúvel total do lisado de promastigotas de *L.(V.) braziliensis*. Formas promastigotas (cepa MHOM/BR/75/M2903) foram expandidas em cultura em meio Schneider's (Sigma) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e 1% de antibiótico (penicilina 100 UI/ml e estreptomicina 100 mg/ml - Cultilab) até a fase de crescimento exponencial. A quantidade de células em cultura foi determinada por contagem em câmara de Neubauer, utilizando um microscópio óptico. Alíquotas contendo 10^9 células/mL foram então submetidas a três lavagens com salina tamponada (PBS – pH 7,2) através de centrifugações a $800 \times g$, por 15 minutos, a 4°C. Quando necessário, o material foi estocado a -80°C até o uso.

Para a obtenção do antígeno solúvel total, foi utilizado o protocolo descrito por Chamak-Ayari et al. (2014). As alíquotas estocadas foram descongeladas e ressuspensas em 1 mL de tampão de lise (Tris 1M; EDTA 5mM) contendo inibidor de protease metil-fenil-fluoreto – PMSF a 0,1 mM. A suspensão celular foi submetida a 3 ciclos rápidos de congelamento e descongelamento, seguidos de 6 pulsos de ultrassom 40W/30 segundos. As frações antigênicas solúvel (AgST) e insolúvel (AgIT) foram separadas por centrifugação a $10.000 \times g$ por 20 minutos. O sobrenadante resultante correspondente ao AgST de *L. (V.) braziliensis*, foi submetido a dosagem proteica segundo o método de Bradford (1976), além de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970), corada pelo azul de Coomassie. Após esses procedimentos, os antígenos foram armazenados a -80°C até a utilização nos ensaios de cultura celular.

6.8 Avaliação da resposta imune

6.8.1 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico – PBMC

Para a separação das Células Mononucleares do Sangue Periférico (*peripheral blood mononuclear cells* - PBMC), o sangue coletado nos tubos com heparina, foi diluído (1:2) em tampão PBS pH 7,2. Esta solução (sangue/PBS) foi adicionada a tubos de polipropileno de 50 mL (BD Falcon) contendo Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) numa proporção de 5mL de Ficoll para cada 10 mL de sangue/PBS. Após centrifugação dos tubos ($900 \times g$ a 20°C) por 30 minutos, os anéis de PBMC que se formaram na interface entre o Ficoll e o plasma foram

removidos utilizando-se pipetas-pasteur e colocados em tubos de polipropileno de 15 mL (BD Falcon). As células foram lavadas duas vezes por centrifugação durante 15 minutos (400 x g a 20°C) em 14mL de PBS pH 7,2. Finalizadas as lavagens as células foram ressuspensas em 1mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e contadas em câmara de Neubauer (Loptik Labor), em uma diluição (1:10) com azul de Trypan (Sigma-Aldrich) e ajustadas para a concentração desejada de 2×10^6 células/mL.

6.8.2 Cultivo celular

As culturas de PBMC foram realizadas em tubos estéreis para cultura de células, na concentração de 2×10^6 células por tubo, incubadas em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37°C. O cultivo foi realizado em meio RPMI 1640 contendo 1% de L- glutamina 200 mM, 1% piruvato de sódio 100 mM, 0,2% de bicarbonato de sódio 7,5% e 1% de antibiótico (penicilina 100 UI/ml e estreptomicina 100 mg/ml) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab). Como controle positivo do estímulo celular foi utilizado o mitógeno fitohemaglutinina (PHA) (Cultilab) na concentração de 5µg/ml. O estímulo específico contra a infecção por *L. (V.) braziliensis*, cuja concentração foi determinada em um experimento-teste descrito no Apêndice E, foi feito pela adição de 5µg/ml do AgST. Culturas sem estímulo (SE) foram utilizadas como controle negativo. Quatro horas antes do término do tempo de cultura definido foram retiradas alíquotas de 200µL dos sobrenadantes de cultura para posterior dosagem de IL-17, e estocados em *freezer* a -20°C. Em seguida, foram adicionados 20µL de Brefeldina A a 10 mg/mL (Sigma Aldrich), que funciona como um inibidor do transporte intracelular protéico, possibilitando a marcação intracitoplasmática das citocinas de interesse em etapas seguintes. O tempo de permanência das células em cultura para melhor diferenciação do perfil Th17 e secreção de IL-17 foi definido por um teste piloto, descrito no item 6.8.3.

6.8.3 Cinética de tempo de cultivo para imunofenotipagem de células produtoras de IL-17

Para avaliar o tempo necessário para diferenciação das células CD4⁺ IL-17⁺(Th17) amostras de sangue heparinizado de 5 pacientes-controle (gSI) foram coletadas conforme o procedimento descrito no item 6.3. O PBMC separado foi mantido em cultura em meio RPMI (item 6.8.2) contendo 5µg/mL de PHA, 5µg/mL de AgST ou sem estímulo, durante 24, 72 e

96 horas, conforme descrito por Bacellar et al. (2009) em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37°C, e acrescido de 20 µL de Brefeldina A 4 horas antes do final de cada tempo.

6.9 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

6.9.1 Marcações de antígenos de superfície e intracelulares

As células em cultura foram identificadas pela marcação específica com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8, anti-IL-17, e anti-IFN γ . Além disso usamos os anticorpos anti-CD25 e anti-CD28 para realização da compensação do citômetro. As características dos fluoróforos utilizados neste estudo estão na Quadro 3.

Quadro 3 - Anticorpos acoplados com fluoróforos utilizados para marcação de antígenos superfície e intracelulares nos experimentos de imunofenotipagem por citometria de fluxo e suas características.

Anticorpo	Marca	Fluoróforo
Anti-CD4	Life Technologies	PerCP
Anti-CD8	Invitrogen	FITC
Anti-CD25	Invitrogen	APC
Anti-CD28	Invitrogen	R-PE
Anti-IL-17	BD Pharmingen	PE
Anti-IFNγ	BD Pharmingen	APC

Legenda: CD: *Cluster of Differentiation*; APC: Alociocianina; FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: Ficoeritrina; PerCP: *Peridinin chlorophyll protein complex*.

Concluído o tempo de cultivo, os tubos de cultura foram retirados da estufa e acrescidos de 220µL de uma solução de EDTA a 20mM. Os tubos foram homogeneizados novórtex e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente (TA). As células foram lavadas com 8 mL de PBS-Wash gelado (PBS acrescido de 0,5% de albumina sérica bovina - Sigma, e 0,1% de azida sódica - Sigma) e centrifugadas a 400 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido por aspiração com bomba a vácuo, deixando o volume final de 2 mL. Em seguida, o precipitado de células foi homogeneizado e 1000 µL foram transferidos para tubos de poliestireno (5mL) previamente identificados e levados à centrífuga (400 x g por 5 minutos). As células foram permeabilizadas com 2mL de solução BD Perm/Wash (BD Biosciences, diluída 10 vezes em água destilada) por 10 minutos ao abrigo de luz e TA. Os tubos foram levados à centrífuga (400 x g por 5 minutos) e após descarte do sobrenadante foram adicionados 5µL de uma mistura de anticorpos monoclonais de superfície e intracelulares anti-CD4, anti-IL-17 e anti-IFN γ . Após incubação de 30 minutos em TA e ao abrigo de luz, as células foram lavadas e centrifugadas (400 x g por 5 minutos) com 1mL de Perm/Wash e posteriormente 1 mL de PBS-Wash. Por fim, as marcações foram fixadas com

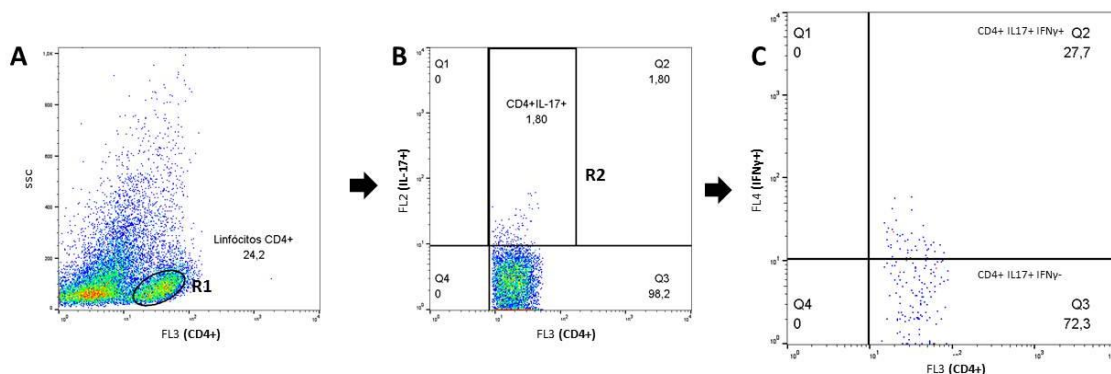
150 μ L de BD Cytofix (BD Biosciences) e acrescidas de 300 μ L de PBS-Wash. Os tubos foram estocados a 4° C até o momento da aquisição no citômetro de fluxo.

6.9.2 Estratégia de aquisição e análise de células Th17 no citômetro de fluxo

As células foram adquiridas em um citômetro de fluxo equipado com um sistema que detecta quatro fluorescências (FACS Calibur) (Bencton Dickson Immunocytometry System), disponível no NPT, IAM/Fiocruz-PE. As características celulares avaliadas na citometria de fluxo são: dispersão frontal de luz laser (FSC), proporcional à área da superfície ou tamanho da célula; dispersão lateral de laser (SSC), proporcional à granulação ou complexidade interna da célula e a emissão de fluorescências do tipo 1 (FL1), tipo 2 (FL2), tipo 3 (FL3) e tipo 4 (FL4) de acordo com o fluorocromo de marcação utilizado. Aquisições e análises foram feitas utilizando o programa Cell Quest Pro instalado em um computador acoplado ao citômetro e com o *software* FlowJo versão 10.0.7, respectivamente.

Para a análise de células T auxiliares tipo 17 (CD4+ IL-17+) a população foi selecionada através do *dot plot* SSCxFL3, com a criação de um *gate* (R1) em torno da população de linfócitos (Figura 6A), sendo adquiridos para cada aquisição 20.000 eventos. Após a seleção de R1, as células Th17 clássicas (T CD4+ IL-17+ IFN γ -) e Th17 alternativas (T CD4+ IL-17+ IFN γ +) foram analisadas pela obtenção de gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência. Para células CD4+ IL-17+foi estabelecida a modalidade FL3 (CD4/PercP) *versus*FL2 (IL-17/PE). A partir do gráfico FL3 xFL2, a região R2 foi estabelecidaafim de selecionar somente células CD4+ que expressassem IL-17(Figura 6B). Para criação de gráficos bidimensionais representativos de células CD4+IL-17+produtoras (Q2) e não produtoras (Q3) de IFN γ , a marcação FL3 (CD4+ IL-17+)x FL4 (IFN γ) foi utilizada (Figura 6C).

Figura 6 - Exemplo da estratégia de aquisição de linfócitos CD4+ produtores de IL-17 (Th17) clássicas (IFN γ -) e patogênicas (IFN γ +) pela citometria de fluxo, em culturas de PBMC de pacientes de áreas endêmicas do Estado de Pernambuco



Fonte: A autora.

Nota: (A) Gráfico de dispersão lateral (SSC)*versus* CD4-PerCP(FL3), demonstrando a marcação para linfócitos CD4+, através da janela R1; (B) FL2*versus* FL3, demonstrando a marcação de IL-17*versus* CD4sendo

selecionada nesse gráfico a janela R2; (C) FL4 *versus* FL3, demonstrando a marcação IFN γ *versus* CD4+ IL-17+. Valores numéricos em A representam percentuais de linfócitos CD4+ dentro da população total; em B representam percentuais de células dentro de linfócitos CD4+ (R1); em C representam percentuais de células dentro da população CD4+ IL-17+ (R2).

6.10 Dosagem de IL-17 nos sobrenadantes de cultura

A dosagem as secreção de citocinas nos sobrenadantes de cultura de PBMC foi realizada utilizando o kit *BD™ CBA Human IL-17A Flex Set* (Becton Dickinson) e leitura com equipamento FACS Calibur (Becton Dickinson), conforme instruções do fabricante com adaptações. Este sistema emprega esferas de poliestireno, recobertas com anticorpos específicos para IL-17A acoplados a ficoeritrina (PE), e são detectadas no canal FL2. Alíquotas dos sobrenadantes de cultura foram incubadas com as de esferas de captura, conjugadas com os anticorpos monoclonais específicos ao abrigo da luz. Estas esferas foram lavadas e re-incubadas na presença dos anticorpos monoclonais anti-IL-17 conjugados com PE. Após incubação, as esferas de captura foram novamente lavadas e analisadas no citômetro de fluxo. Os resultados foram analisados utilizando o *software* FCAP Array 1.0 (Becton Dickinson), e expressos em concentrações de picogramas por mililitro (pg/mL).

6.11 Análises estatísticas

Para testar a normalidade dos dados foi utilizado o teste de D'Agostino seguido do Teste T de Student para dados com distribuição normal ou teste de Mann-Whitney para dados com distribuição não normal, para comparação de variáveis quantitativas entre grupos (ex.: idade). Para comparação de três ou mais grupos foi aplicado o teste ANOVA (normal) ou Kruskal-Wallis (não normal) seguidos de pós teste de Tukey ou Dunn para a análise comparativa de todos os pares de colunas entre os grupos de pacientes (ex.: cargas parasitárias). O teste Qui-quadrado foi aplicado para comparação de variáveis qualitativas (ex.: sexo) entre grupos. Para análise de amostras pareadas por tempo (cinética da avaliação imunológica) foi aplicado o teste de Wilcoxon. Para correlacionar percentuais de células definidos em experimentos de imunofenotipagem com a carga parasitária, foi calculado o coeficiente de correlação linear de Pearson.

As frequências genóticas do SNP IL-17 -197G/A foram calculadas para os grupos

gS, gA e gSI por contagem direta dos genótipos, conforme Chen et al. (2010). As frequências alélicas foram determinadas pelas equações abaixo:

$$Freq(A) = \frac{2AA + AG}{2(AA + AG)} \quad Freq(G) = \frac{2GG + AG}{2(GG + AG)}$$

Para verificar se existe proporção anormal do polimorfismo entre os grupos de estudo, o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EqHW) foi testado para cada grupo separadamente. O resultado foi dado pela comparação (Teste Qui-quadrado - χ^2) entre frequências genótípicas observadas e as frequências esperadas, determinadas pela fórmula de Hardy-Weinberg $G^2 + 2AG + A^2 = 1$.

A associação das variantes genéticas com os grupos de estudo foi estimada como uma razão de chances (*Odds Ratio* - *OR*) comparadas ao genótipo de referência GG considerando as quantidades de indivíduos gS e gA de cada genótipo utilizando o método do Qui-quadrado, aplicado no *software* EpiStat 5.0 com apoio do departamento de estatística do IAM/Fiocruz-PE.

Os demais testes estatísticos foram realizados no *software* Graphpad Prism 5.0 com intervalos de confiança de 95%. Os resultados foram considerados significativos quando o valor de *p* foi igual ou menor que 0,05.

7. RESULTADOS

7.1 Amostragem e avaliação clínica

O cálculo amostral realizado conforme os parâmetros estabelecidos (item 6.2) definiu a necessidade de inclusão de 89 casos e 89 controles para a realização do estudo de associação. Para atingir este número, foram coletadas 365 amostras de sangue de indivíduos residentes em municípios onde a LT é endêmica no Estado de Pernambuco, ou pacientes atendidos em livre demanda nos ambulatórios de infectologia e dermatologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (Quadro 4).

Quadro 4 - Divisão da amostra populacional total coletada por município e caracterização dos indivíduos inclusos para o estudo de associação do SNP -197 G/A com a leishmaniose tegumentar Americana

Município	nº ind.	% da amostra	Sexo	Idade
Abreu e Lima-PE	14	3,83	F: 10 / M: 4	38,29 ± 17,52
Amaraji-PE	71	19,45	F: 31 / M: 40	26,10 ± 16,28
Pesqueira-PE*	74	20,27	F: 42 / M: 32	34,84 ± 16,75
Araçoiaba-PE	1	0,27	F: 1 / M: 0	36,0 ± 0
Camaraçibe-PE	1	0,27	F: 1 / M: 0	55,0 ± 0
Igarassu-PE	146	40	F: 91 / M: 55	32,22 ± 18
Moreno-PE	18	4,93	F: 10 / M: 8	43,10 ± 12,94
Paudalho-PE	16	4,38	F: 8 / M: 8	42,44 ± 21,46
Recife-PE	2	0,54	F: 1 / M: 1	54,0 ± 1,41
HUOC	22	6,02	F: 5 / M: 17	31,0 ± 10,79
Total	365	100	F: 200 / M: 165	32,96 ± 17,55

Nota: HUOC - Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife-PE. F: sexo feminino; M: sexo masculino. Idades apresentadas pela média ± desvio padrão.

* A amostra populacional coletada em Pesqueira-PE constitui-se de indivíduos pertencentes à comunidade indígena Xukurus de Ororubá. Estes índios segregam-se culturalmente pela conservação de seus costumes tribais, no entanto, em razão das relações de convivência, dos casamentos com não-índigenas e de seu não isolamento geográfico, não se considera este grupo etnicamente puro.

Entre o total de indivíduos inclusos nas análises genéticas, 32 foram posteriormente selecionados conforme o genótipo para as análises imunológicas e recaptados para coleta de amostra adequada (sangue heparinizado). Este grupo incluiu 24 pessoas do sexo feminino e 8 do sexo masculino com média de idade de 36,90 ± 18,45 anos, todos em acordo com os critérios de inclusão estabelecidos no item 6.2.

Na análise clínica foram observados indivíduos que apresentavam lesão ativa (48), cicatriz de lesão (53), ou pessoas com lesões ativas e também pregressas (recidivantes) (12). As lesões ativas apresentaram-se em número de 1 a 6 por indivíduo, localizando-se nos membros inferiores, membros superiores, face e/ou pescoço, uma vez que estas regiões corpóreas estão geralmente desnudas e acessíveis ao inseto vetor (Figura 7). As cicatrizes observadas apresentaram-se na região lombar ou membros inferiores, em número de 1 a 4 por

indivíduo. O número de pacientes com cada quadro clínico está descrito na Tabela 5. Entre os inclusos já curados (cicatriz) 81,13% (43) haviam sido submetidos a tratamento com Glucantime®, e os demais tiveram cura espontânea. Entre os pacientes com lesão ativa, 22,91% (11) estavam sob tratamento no momento da coleta. Os demais indivíduos com lesão ativa foram acessados antes do início do tratamento.

Figura 7- Lesões ativas de pacientes inclusos no estudo, demonstrando fundo granuloso e bordas elevadas característicos da leishmaniose tegumentar e amastigotas de *Leishmania* visualizadas no exame microscópico da secreção de lesão, corados pelo Giemsa.



Fonte: A autora.

Nota: Fotos capturadas durante as coletas e durante exame microscópico direto das lesões, realizado no Laboratório de Endemias do Laboratório Central Dr Milton B. de Sobral (LACEN-PE).

Tabela 1- Avaliação clínica e distribuição por gênero dos indivíduos residentes em áreas endêmicas do Estado de Pernambuco, inclusos no estudo de associação do SNP IL-17 -197 G/A rs2275913 com a leishmaniose tegumentar Americana.

Clínica	Homens	Mulheres	Total
Lesão ativa	29	19	48
Presença de cicatriz	29	24	53
Sem doença ativa ou pregressa	115	161	276

Nota: Doze indivíduos apresentaram lesão ativa e cicatriz, e estão inclusos em ambas as contagens.

Entre os indivíduos recaptados para a análise imunológica, 2 apresentavam cicatriz de lesão, sendo 1 curado espontaneamente e 1 curado por meio de tratamento. Nenhum apresentava lesão ativa no momento da coleta.

7.2 Diagnóstico e definição de grupos caso e controle

O teste de hipersensibilidade celular tardia (IDRM) foi realizado em 84 (23,01%) indivíduos. Entre estes, 34 (40,47%) tiveram resultado positivo visualizado por endureção local entre 5 e 22 centímetros no local do inóculo. Em dois dos pacientes, o resultado da IDRM foi invalidado pela presença de reação no local ao NaCl 0,9% (controle negativo), que indicou resposta imunológica inespecífica. Para estes, e para os demais pacientes nos quais

não foi possível a aplicação do antígeno, apenas o resultado da técnica molecular foi considerado.

Após análise do controle endógeno G3PD, que demonstrou inadequação do DNA em 3 das amostras coletadas (inviabilizando o teste molecular), a qPCR foi realizada em 362 amostras. Houve positividade da qPCR kDNA1 em 160 (44,19%) amostras, indicando a presença de *L. (V.) braziliensis* ou resquícios de seu material genético (infecção atual ou pregressa).

Conforme a avaliação da situação clínica e resultados dos testes imunológico e/ou molecular, os indivíduos foram distribuídos como gS, gA ou gSI. Partindo destes critérios, 88 indivíduos foram considerados gS; 91 foram considerados gA e 186 gSI. A Tabela 2 apresenta a distribuição dos grupos de estudo.

Tabela 2—Distribuição dos indivíduos residentes em áreas endêmicas do Estado de Pernambuco por grupos de estudo e sexo, de acordo com o conjunto de critérios adotado para classificação em sintomáticos (gS), assintomáticos (gA) e sem infecção (gSI) por *L. (V.) braziliensis*.

Sexo	gS	gA	gSI
Feminino	39	44	117
Masculino	49	47	69
Total	88	91	186

Nota: Indivíduos com infecção por *L. (V.) braziliensis* e lesão ativa e/ou cicatriz (grupo Sintomático - gS, casos); com infecção por *L. (V.) braziliensis* e sem lesão (Grupo Assintomático - gA, controles); e sem infecção (grupo Sem Infecção - gSI).

A distribuição dos indivíduos por sexo entre casos e controles teve caráter proporcional ($p= 0,589$). Os indivíduos classificados como gSI tiveram média de idade de $33,22 \pm 17,45$ anos. Entre os indivíduos infectados por *L. (V.) braziliensis*, os mais jovens expressavam menos a doença: entre os gS e gA, a comparação das faixas etárias apresentou diferença significativa ($p= 0,030$). A o gS e gA tiveram médias de idade de $35,75 \pm 16,10$ e $29,70 \pm 18,73$, respectivamente, sugerindo que a faixa etária pode favorecer a evolução da infecção para uma condição subclínica, sendo os mais jovens menos suscetíveis.

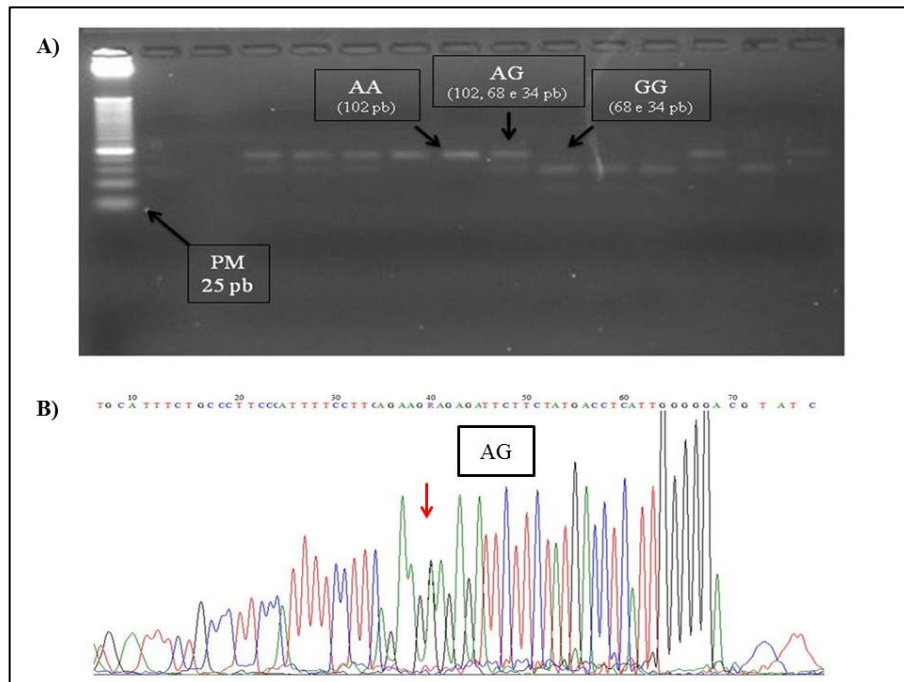
Entre os indivíduos recaptados para análise imunológica, 2 pertencem ao gS; 10 pertencem ao gA e 20 pertencem ao gSI.

7.3 Frequências alélicas e genotípicas

Os genótipos de 345 indivíduos foram obtidos com sucesso pelas técnicas aplicadas (PCR-RFLP e/ou seqüenciamento), em 20 amostras não foi possível efetuar esta análise por limitações das técnicas. O genótipo de 136 indivíduos foi determinado com sucesso pela

técnica de PCR-RFLP, e 244 amostras, tiveram resultados pelo sequenciamento. A Figura 8 ilustra a diferenciação entre os genótipos pelas duas técnicas aplicadas.

Figura 8—Resultados de técnicas moleculares (PCR-RFLP e Sequenciamento) aplicadas para definição dos genótipos de indivíduos residentes em áreas endêmicas do Estado de Pernambuco incluídos no estudo de associação do SNP IL-17A -197 G/A rs2275913 com a leishmaniose tegumentar Americana.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: A) Gel de agarose demonstrando fragmentos resultantes da digestão enzimática do *IL-17A* em indivíduos homocigotos e heterocigotos para os alelos A e G. B) Ferograma de sequenciamento de indivíduo heterocigoto para o SNP -197 G/A, com destaque para os picos sobrepostos na sequência, indicando bases diferentes na amostra. PM = padrão molecular (25bp DNA Ladder, Invitrogen).

A Tabela 3 mostra a distribuição dos genótipos entre os grupos de estudo gS, gA e gSI.

Tabela 3 -Distribuição dos genótipos para o SNP IL-17A -197 G/A rs2275913 na amostra total de indivíduos residentes em áreas endêmicas do Estado de Pernambuco incluídos no estudo.

Grupo / Genótipo	gS	gA	gSI	Total
GG	36	46	94	176
AG	37	35	65	137
AA	8	10	14	32
Total	81	91	173	345

Nota: Indivíduos com infecção por *L. (V.) braziliensis* e lesão ativa e/ou cicatriz (grupo Sintomático - gS, casos); com infecção por *L. (V.) braziliensis* e sem lesão (Grupo Assintomático - gA, controles); e sem infecção (grupo Sem Infecção - gSI).

Conforme a determinação dos genótipos, e com base no genótipo em menor quantidade na população (AA), foram recaptados 32 indivíduos para análise do painel

imunológico, sendo 11 com genótipo AA, 10 AG e 11 GG. A Tabela 4 apresenta a distribuição destes indivíduos por grupo de estudo.

Tabela 4-Distribuição dos genótipos para o SNP IL-17A -197 G/A rs2275913 no subconjunto de indivíduos residentes em áreas endêmicas do Estado de Pernambuco recaptados conforme genótipos para avaliação da resposta imunológica.

Grupo / Genótipo	gS	gA	gSI	Total
GG	0	5	6	11
AG	0	1	9	10
AA	2	4	5	11
Total	2	10	20	32

Nota: Indivíduos com infecção por *L. (V.) braziliensis* e lesão ativa e/ou cicatriz (grupo Sintomático - gS, casos); com infecção por *L. (V.) braziliensis* e sem lesão (Grupo Assintomático - gA, controles); e sem infecção (grupo Sem Infecção - gSI).

As proporções de indivíduos AA, AG e GG dentro dos grupos gS e gA foram equivalentes estatisticamente: as frequências genótípicas e alélicas observadas apresentaram-se em acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg em todos os grupos de estudo, demonstrando que os pacientes portadores do alelo raro A estão em uma frequência esperada e normal entre aqueles que desenvolvem os sintomas da LTA (Tabela 5).

Tabela 5 - Frequências genótípicas, frequências alélicas e análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra total de indivíduos residentes em áreas endêmicas do Estado de Pernambuco inclusos no estudo.

	Frequência genotípica observada (%)	Frequência genotípica esperada pelo EqHW (%)	Frequência do alelo A (%)	Frequência do alelo G (%)	valor dep
gSI					
AA	14 (8,09)	12,49 (7,21)	93 (26,88)	253 (73,12)	0,337
AG	65 (37,57)	68 (39,30)			
GG	94 (54,33)	92,49 (53,46)			
total	173				
gA					
AA	10 (10,98)	8,31 (9,13)	55 (30,22)	127 (69,78)	0,705
AG	35 (38,46)	38,37 (42,16)			
GG	46 (50,54)	44,31 (48,69)			
total	91				
gS					
AA	8 (9,87)	8,66 (10,69)	53 (32,72)	109 (67,28)	0,114
AG	37 (45,67)	35,66 (44,02)			
GG	36 (44,44)	36,66 (45,25)			
total	81				

Nota: Indivíduos com infecção por *L. (V.) braziliensis* e lesão ativa e/ou cicatriz (grupo Sintomático - gS, casos); com infecção por *L. (V.) braziliensis* e sem lesão (Grupo Assintomático - gA, controles); e sem infecção (grupo Sem Infecção - gSI).EqHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Valor de *p*: Significância estatística comparada de proporções entre as frequências esperadas e observadas pelo teste de Qui-quadrado ao nível de significância 95%.

7.4 Associação entre SNP -197 G/A e LTA

Não foram encontradas diferenças significativas na distribuição dos genótipos entre gS e gA, indicando que não houve associação dos genótipos com o desenvolvimento de doença em indivíduos sabidamente infectados (gS x gA). Para complementar esta análise, a associação dos genótipos com a resistência à infecção foi medida (sendo neste caso indivíduos gSI considerados como “controles” e grupo gA + gS considerado como “caso”). Nenhuma associação foi encontrada. A análise de ORs revela que o polimorfismo rs2275913 não se relaciona com a suscetibilidade à doença frente à infecção, e nem com a permissibilidade à entrada dos parasitos, uma vez que todos os indivíduos participantes são de áreas endêmicas e estão igualmente expostos ao vetor (Tabela 6).

Tabela 6 - Medidas de associação (Razão de chances; *OddsRatio* - OR) dos genótipos do SNP IL-17A -197 G/A rs2275913 com desenvolvimento de sintomas em indivíduos infectados, e com permissibilidade à instalação da infecção em áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar Americanano Estado de Pernambuco, comparados ao genótipo de referência(GG).

SNP IL-17	OR (IC 95%)	Valor de <i>p</i>
Caso-Controle gS x gA		
(susceptibilidade da infecção para doença)		
AG/AA	1,278 (0,701-2,330)	0,424
AG	1,351 (0,716-2,550)	0,354
AA	1,022 (0,366-2,854)	0,967
GG	1	
Caso-Controle (gS + gA) x gSI		
(susceptibilidade da exposição para infecção)		
AG/AA	1,30 (0,855-1,994)	0,236
AG	1,27 (0,811-1,986)	0,307
AA	1,47 (0,690-3,148)	0,341
GG	1	

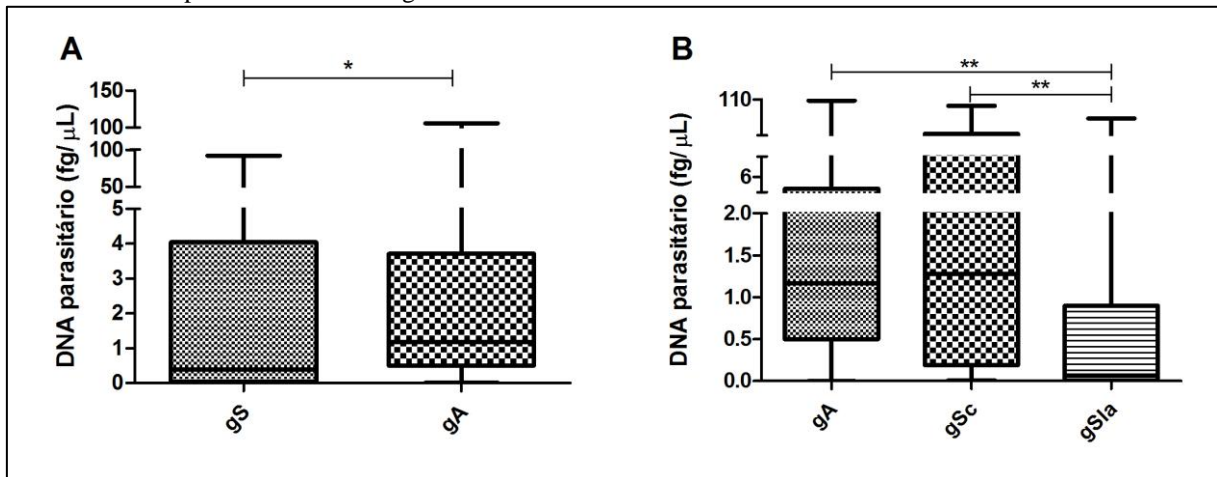
Nota: Valor de *p* calculado com base na comparação de proporções de sintomáticos e assintomáticos entre os portadores do alelo A e o genótipo de referência GG pelo teste Qui-quadrado, ao nível de 5% de significância. IC: intervalo de confiança.

7.5 Avaliação das cargas parasitárias

A comparação entre as cargas parasitárias dos grupos gS e gA demonstrou presença significativamente maior de DNA parasitário (em fentogramas - fg) nas amostras do grupo gA (med.= 1,17 fg/μL, mín.= 0,00 fg/μL, máx.= 106,02 fg/μL) em relação ao gS (med.= 0,39 fg/μL, mín.= 0,00 fg/μL, máx.= 92,02 fg/μL) (*p*= 0,003) (Figura 9A). Subdividindo o grupo sintomático, notou-se que gS curados (pacientes com cicatriz - gSc) (med.= 1,28 fg/μL, mín.= 0,01 fg/μL, máx.= 92,02 fg/μL) possuem maiores cargas parasitárias em relação àqueles com

lesão ativa (gSla) (med.= 0,07 fg/μL, mín.= 0,00 fg/μL, máx.= 56,60 fg/μL) ($p<0,0001$), mas têm quantidade semelhante de DNA parasitário em comparação aos assintomáticos. Comparando gA com gSla, foi encontrada maior quantidade de parasitos em gA ($p<0,0001$) (Figura 9B).

Figura 9- Comparação das cargas parasitárias (concentração de DNA em fentogramas - fg por microlitro - μL) detectadas por PCR quantitativa em tempo real em amostras de indivíduos (casos e controles) residentes em áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar Americanano Estado de Pernambuco.

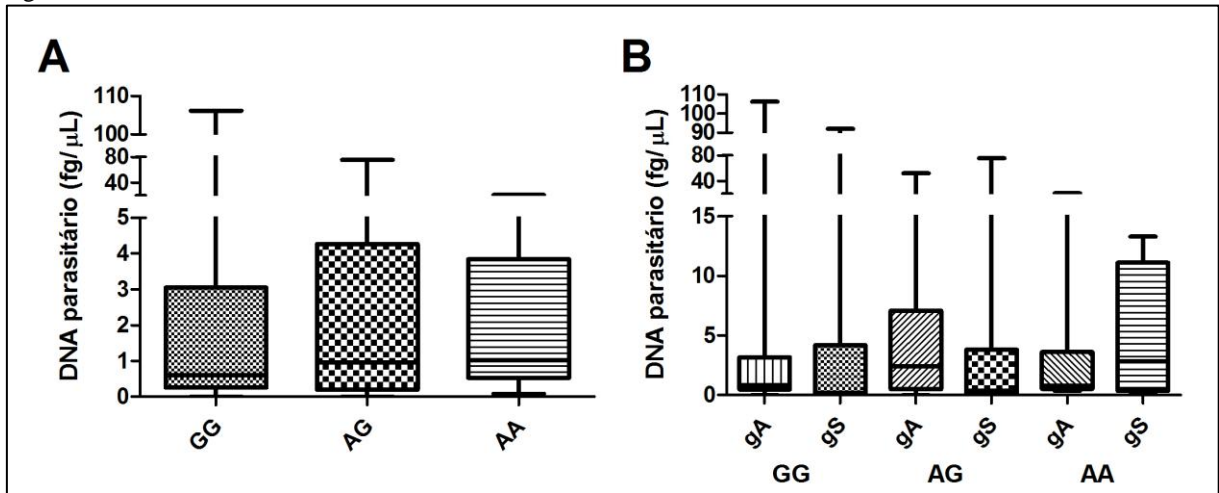


Legenda: Indivíduos com infecção por *L. (V.) braziliensis* e lesão ativa (la) e/ou cicatriz (c) (grupo Sintomático - gS, casos); com infecção por *L. (V.) braziliensis* e sem lesão (Grupo Assintomático - gA, controles) gA: n= 89, med.= 1,17 fg/μL, mín.= 0,00 fg/μL, máx.= 106,02 fg/μL; gS: n=71, med.= 0,39 fg/μL, mín.= 0,00 fg/μL, máx.= 92,02 fg/μL. A) Comparação entre as cargas parasitárias de gS e gA, com diferença estatística significativa (*). B) Comparação entre as cargas parasitárias (DNA em fentogramas - fg) de gA e subgrupos gSla/ gSc, com diferença estatística significativa (**). gSla: n=37, med.= 0,07 fg/μL, mín.= 0,00 fg/μL, máx.= 56,60 fg/μL; gSc: n= 33, med.= 0,07 fg/μL, mín.= 0,00 fg/μL, máx.= 56,60 fg/μL. Barras indicam as medianas.

* Valor de p menor que 0,05; ** Valor de p menor que 0,0001.

Para associar o SNP IL-17A -197 G/A com o aumento ou redução da quantidade de DNA de *L. (V.) braziliensis* circulante as cargas parasitárias foram comparadas conforme os genótipos (AA, AG e GG) e nos grupos gS e gA. Indivíduos portadores do alelo Ahomozigotos e heterozigotos tiveram concentrações semelhantes de DNA parasitário detectadas quando comparados aos GG ($p= 0,397$) (Figura 10A). As cargas parasitárias de pacientes do gA não aparentaram diferenças comparando-se os genótipos ($p=0,293$). Entre indivíduos do grupo gS foi possível notar visualmente maiores concentrações de DNA parasitário entre aqueles com genótipo AA, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa ($p= 0,506$) (Figura 10B).

Figura 10 - Cargas parasitárias (concentração de DNA em fentogramas - fg por microlitro - μL) distribuídas por genótipos para o SNP IL17 -197 G/A rs2275913 na amostra populacional total do estudo (A), e subdividida entre indivíduos sintomáticos (gS) e assintomáticos (gA) residentes em áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar Americana no Estado de Pernambuco.

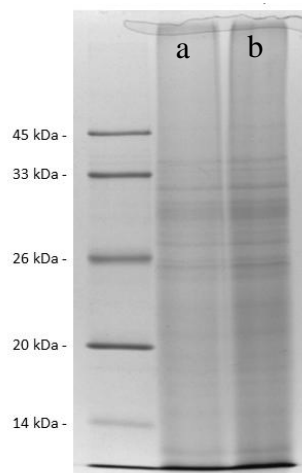


Legenda: Indivíduos com infecção por *L. (V.) braziliensis* e lesão ativa e/ou cicatriz (grupo Sintomático - gS, casos); com infecção por *L. (V.) braziliensis* e sem lesão (Grupo Assintomático - gA, controles). Barras indicam as medianas.

7.6 Obtenção do antígeno para estímulo a PBMCs e avaliação de Th17 / IL-17

O AgST de *L. (V.) braziliensis* foi obtido (Figura 11) pela metodologia otimizada descrita no item 6.7.

Figura 11 - Gel de eletroforese SDS-PAGE corado por azul de Coomassie demonstrando o padrão de bandejamento da fração proteica solúvel purificada de cultura de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (AgST) em concentrações de 5 (a) e 10 (b) microgramas.



Legenda: kDa: kilodaltons, marcador de peso molecular.

Embora a purificação do AgST de *Leishmania* não seja detalhadamente descrita nos estudos disponíveis na literatura (BRITO et al. 2001; CHAMAK-AYARI et al. 2014; MARTINS et al. 2015; COELHO et al. 2003), a fração proteica solúvel obtida por meio de

lise celular mecânica e ultracentrifugação demonstra capacidade de estimular PBMCs para expressar citocinas Th1, Th2 e Th17 (BACELLAR et al. 2009; BRELAZ-DE-CASTRO et al. 2014; NOVOA et al. 2011), após períodos entre 24 a 96 horas de incubação.

7.7 Avaliação da resposta imune celular

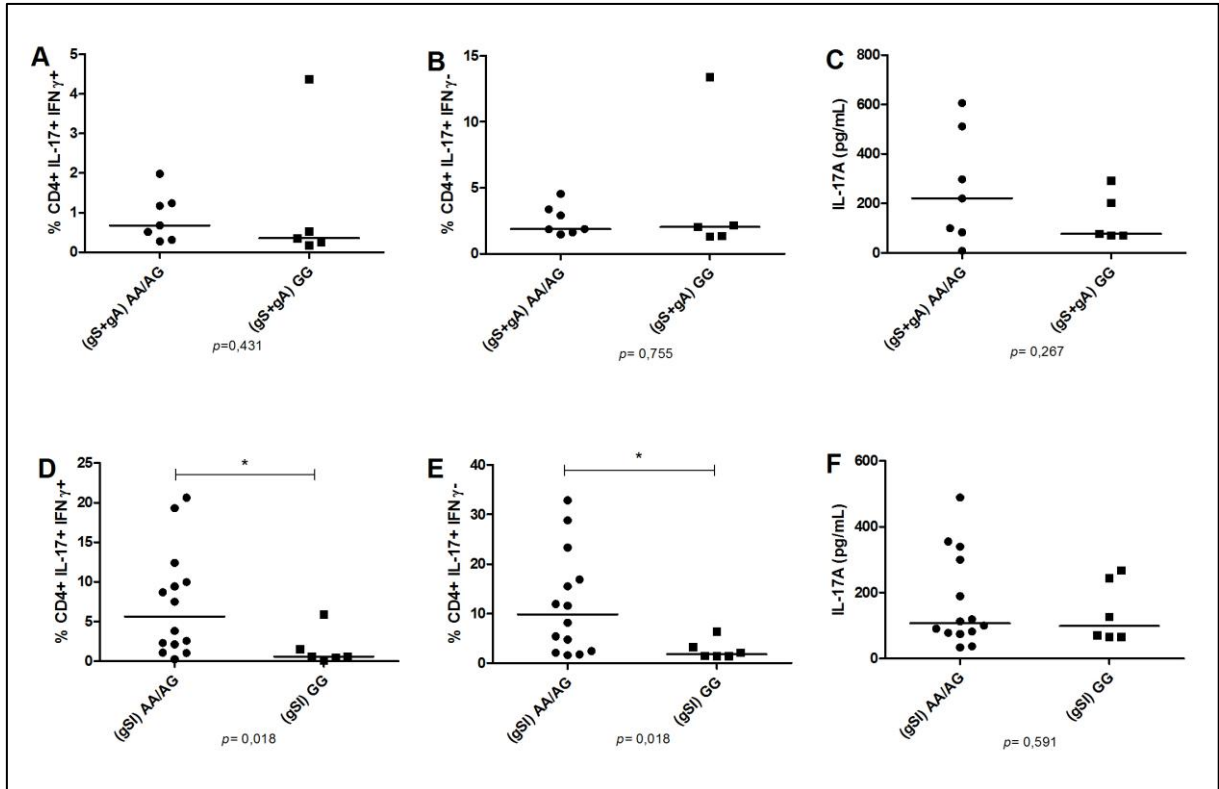
Para o estudo das expressões de moléculas de superfície e intracitoplasmáticas, foi realizada análise dos percentuais de populações de linfócitos produtores de IL-17 submetidas a estímulos *in vitro* conforme descrito no item 6.8.2, pelo tempo determinado: 72 horas (Anexo E).

7.7.1 Quantificação de IL-17 conforme o genótipo, SNP IL-17 -197 G/A

Para elucidar a influência do SNP IL-17 -197 G/A rs2275913 sobre a produção de IL-17 as frequências de linfócitos IL-17+ e as concentrações de IL-17 nos sobrenadantes de cultura de PBMC foram contrastadas entre portadores (AA/AG) e não portadores (GG) do alelo A em indivíduos com (gS + gA) e sem infecção (gSI). As análises foram baseadas nas culturas submetidas ao estímulo inespecífico fitohemaglutinina, que age como potencializador da expressão de citocinas de modo geral, permitindo considerar apenas a influência do SNP rs2275913 sobre a afinidade do fator de transcrição (ESPINOZA et al. 2011) ao sítio promotor e a consequente produção de citocina.

Em indivíduos infectados por *L. (V.) braziliensis* (gS e gA) a presença do alelo A não foi capaz de alterar significativamente a quantidade de células CD4+ IL-17+ alternativas (IFN γ +) e clássicas (IFN γ -) (Figura 12A e B, respectivamente). A análise de proporções dos subtipos de células CD4+ IL-17+ em indivíduos não infectados (gSI) revelou proporções maiores de células produtoras de IL-17 IFN γ + e IFN γ - em portadores do alelo A, comparados aos GG (Figura 12D e E, respectivamente). A secreção de IL-17 nos sobrenadantes de homocigotos AA e heterocigotos mostrou maiores medianas em indivíduos AA/AG, reforçando a influência do SNP para o aumento da produção da citocina, embora as diferenças entre estes e os GG não tenham sido significativas em nenhuma das condições de infecção (Figura 12C e F). Os valores de *p* obtidos pelos Testes de Mann-Whitney aplicados para comparação dos pares estão demonstrados na figura.

Figura 12-Percentuais de células CD4+ IL-17+ IFN γ + e CD4+ IL-17+ IFN γ - e concentração de IL-17A em sobrenadantes de cultura de PBMC de indivíduos residentes de áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar Americana portadores e não portadores do SNP IL-17 -197 G/A rs2275913.



Fonte: A autora.

Legenda: Percentuais de Th17 alternativas: CD4+ IL-17+ IFN γ + (A e D) / Th17 clássicas: CD4+ IL-17+ IFN γ - (B e E) e concentração de IL-17 (pg/mL) (C e F) secretada em sobrenadantes de cultura em PBMCs estimulados por fitohemaglutinina (10mg/mL), em indivíduos infectados por *L. (V.) braziliensis* sintomáticos e assintomáticos (A, B, C) e em indivíduos não infectados (D, E, F). As barras indicam as medianas. CD: Cluster of Differentiation.

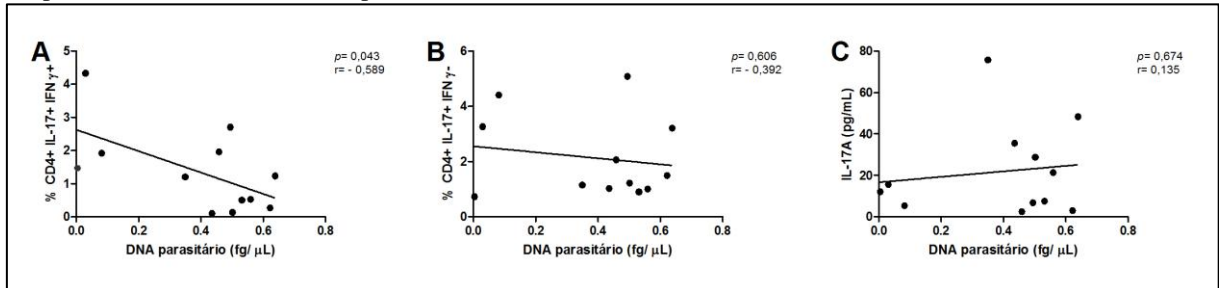
7.7.2 Correlação de células Th17 e IL-17 com a carga parasitária

A influência das células produtoras de IL-17 sobre a carga parasitária foi observada nos 12 pacientes expostos à infecção incluídos nas análises de resposta imunológica (2 gS e 10 gA). Avaliando a participação do IFN γ + por meio dos subtipos de IL-17 (alternativas e clássicas), uma correlação significativa dos percentuais de células CD4+ IL-17+IFN γ + com a concentração de DNA parasitário (em fg/ μ L) ($p=0,043$; $r=-0,589$) foi observada. Esta análise aponta que linfócitos Th17 estimulados por antígeno solúvel total de *L. (V.) braziliensis* (agST) produtores de IFN γ + são majoritariamente responsáveis pelo decréscimo da carga parasitária, enquanto os linfócitos CD4+ IL-17+ IFN γ - parecem exercer influência mais discreta sobre a eliminação dos parasitas ($p=0,606$; $r=-0,392$) (Figura 13A e B, respectivamente).

O papel da IL-17 sobre a destruição dos parasitas foi demonstrado pela análise de correlação das concentrações de IL-17 em sobrenadantes de cultura de PBMC de indivíduos

expostos à infecção. Não foi observada correlação da IL-17 com a carga parasitária ($p=0,674$, $r=0,135$) (Figura 13C).

Figura 13 - Correlação entre os percentuais de linfócitos CD4+ IL-17+produtores e não produtores de IFN γ e concentração de IL-17 em sobrenadantes de cultura de PBMC com a concentração de DNA parasitário detectada em pacientes de áreas endêmicas para LTA no Estado de Pernambuco.



Legenda: Percentuais de Th17 alternativas: CD4+ IL-17+ IFN γ + (A) / Th17 clássicas: CD4+ IL-17+ IFN γ - (B) calculado dentro da população total de linfócitos das amostras, e concentração de IL-17 detectada em sobrenadantes de cultura de células mononucleadas de sangue periférico (*peripheral blood mononucleated cells* - PBMC). CD: *Cluster of Differentiation*. r = coeficiente de correlação linear de Pearson. Valores de $p<0,05$ foram considerados significativos.

8. DISCUSSÃO

Fatores hereditários têm sido considerados como vias de explicação para a variação interindividual de suscetibilidade nas leishmanioses (CASTELLUCI, 2010; FRADE et al. 2011). Este estudo avaliou a associação de um fator genético em IL-17 (SNP IL-17A -197 G/A rs2275913) com o risco de desenvolver leishmaniose tegumentar Americana em municípios onde a doença é endêmica no Estado de Pernambuco, bem como a relação deste SNP com a geração da resposta celular do tipo Th17.

Um estudo realizado por Araújo et al. (2016) associou fatores biológicos (gênero), sociais (renda per capita), econômicos (atividade laboral) e relacionados ao peridomicílio (presença de animais) com o risco de LTA em PE. No entanto, não foram encontrados estudos de associação de fatores genéticos com leishmanioses na população humana pernambucana. Os indivíduos do presente estudo provém de 9 municípios de Pernambuco, compondo uma amostra populacional bem distribuída no Estado, já que este Estado tem 19 (34%) de seus 185 municípios considerados endêmicos para LTA (BRASIL, 2007; MIRANDA et al. 2011). Uma vez que esses municípios têm poucas variações geoclimáticas, de incidência, e de aspectos sociodemográficos, optou-se por agrupar todas as amostras para as análises.

Castelluci et al. (2006; 2010) utilizaram a IDRM como único critério diagnóstico para associar o SNPs de IL-6, CXCR e SLC11A1 com a leishmaniose cutânea e mucocutânea. A definição de grupos caso e controle, teve como objetivo discriminar entre indivíduos suscetíveis e resistentes à infecção por *L. (V.) braziliensis*. Foram usados testes de diagnóstico imunológico (IDRM) e molecular (qPCR kDNA1), com sensibilidades de 80-100% (MANZUR; BARI, 2006) e 91,4% (PAIVA-CAVALCANTI et al. 2013) respectivamente. A boa sensibilidade dos testes aplicados contribui em assegurar que houve exposição prévia dos grupos ao patógeno, mesmo quando sinais e sintomas não foram observados. Em virtude da indisponibilidade da IDRM (Anexo B), não foi possível utilizar os resultados destas técnicas em conjunto, avaliando exposição e desenvolvimento de memória imunológica. Apesar disso, a alta especificidade do sistema de qPCR utilizado suporta seu uso para identificar indivíduos que, de fato, foram alvos da transmissão vetorial de *L. (V.) braziliensis*, permitindo a composição de um grupo controle adequado.

A análise da distribuição de gênero entre os casos e controles sugeriu que a susceptibilidade a LTA não esteja associada ao sexo. Apesar disso, é conhecido que uma maior proporção dos pacientes com LTA seja do sexo masculino, em razão de sua maior exposição ocupacional (na agricultura, por exemplo) ao vetor, tendo incidências 2,5 a 3,5

vezes maiores da doença (CABRERA et al. 1995; GIEFING-KROLL et al. 2015). A comparação entre as médias de idade entre sintomáticos e assintomáticos, contudo, revela que indivíduos mais jovens são menos suscetíveis à doença causada por *L. (V.) braziliensis*. Um estudo de Shaw et al. (1995), avaliando a susceptibilidade a infecção por *L. (V.) peruviana* calculou que indivíduos infectados em idades menores são mais suscetíveis à LTA. O mesmo parece ocorrer em infecções por *L. infantum /donovani*, que causam a forma visceral da leishmaniose (SINGH et al. 2007; MACIEL et al. 2008). Um estudo de Adisson et al. (2014) mostrou que indivíduos com idades mais avançadas desenvolvem respostas inflamatórias mais potentes, por ter menor capacidade de controlar a inflamação. Em virtude da peculiaridade de *L. (V.) braziliensis* em estimular mais fortemente a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN γ , TNF e IL-6 do que as outras espécies de *Leishmania* (SILVEIRA et al. 2009; RODRIGUES et al. 2014), indivíduos mais jovens são favorecidos por sua melhor capacidade de controle da inflamação.

A IL-17A desempenha um papel importante na potencialização da imunidade celular adaptativa pró-inflamatória. Estudos com abordagens imunológicas e moleculares sugerem que os linfócitos Th17 têm impacto significativo no desenvolvimento e agravamento da LTA em modelos animais e em humanos, quando infectados por *L. (V.) braziliensis* (BACELLAR et al. 2009; GONZALEZ-LOMBANA et al. 2013; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al. 2017). O SNP rs2275913 está localizado dentro de um motivo de ligação para o fator nuclear de células T ativadas (NFACT) que é um regulador crítico de expressão de IL-17 (LIU; LIN; GAFFEN, 2004). Foi previamente demonstrado que o alelo -197A proporciona maior afinidade do NFACT pelo sítio promotor, resultando na secreção mais exuberante de IL-17 (ESPINOZA et al. 2011b).

Embora o papel protetor da IL-17 contra a leishmaniose visceral esteja sendo constantemente reforçado (PITTA et al. 2009; GHOSH et al. 2013; NASCIMENTO et al. 2015), e sua participação no agravamento da LTA seja evidente (BACELLAR et al. 2009; GONZALEZ-LOMBANA et al. 2013), investigamos pela primeira vez neste estudo a associação de uma variante genética em IL-17 com o desfecho clínico da doença. A análise de risco para leishmaniose tegumentar Americana, conforme o genótipo pelo cálculo da *OR* de pacientes portadores do alelo raro A, mostrou que esta variante não está diretamente associada com a susceptibilidade ao desenvolvimento de doença entre infectados, e nem com maior susceptibilidade ao estabelecimento da infecção. Apesar da conhecida influência de componentes genéticos na LTA (HANDMAN et al. 2005), o efeito individual deste SNP não

é suficiente para justificar o surgimento da doença, devido a natureza multifatorial da LTA. Na LTA, componentes salivares do vetor, virulência parasitária (que pode variar intraespécie) e estado nutricional, e imunológico (ex.: co-infecção HIV) (REITHINGER et al. 2007) são outros determinantes de susceptibilidade que podem se sobrepor ao *background* genético do hospedeiro.

Conforme verificado por Hong e Park (2012), em análise do tipo caso-controle para o n amostral adotado neste estudo a associação seria significativa quando $OR > 2,00$. Segundo os mesmos autores, para tornar estatisticamente significativa a interpretação das *ORs* deste estudo ($\pm 1,30$), uma amostra populacional 7 vezes maior seria necessária. Diante da baixa incidência da LTA (BRASIL, 2007) e da dificuldade de acesso aos casos por tratar-se de uma doença negligenciada, não fatal e de caráter rural, a obtenção de uma amostra desta magnitude torna-se difícil.

Estudos anteriores associaram o SNP rs2275913 a doenças fortemente relacionadas à atividade inflamatória crônica, como asma e doenças autoimunes (ARISAWA et al. 2008; CORREA et al. 2012; NORDANG et al. 2009), e algumas doenças infecciosas (LOCKART et al. 2006; MEEKS et al. 2009; JUHO et al. 2015). A associação do polimorfismo IL-17A rs2275913 com a tuberculose foi investigada, e não teve relação significativa com a doença em populações asiáticas e caucasianas (ZHAO et al. 2016). No entanto, recentemente Milano et al. (2016) propuseram que o alelo A estaria ligado a proteção contra tuberculose na região sul do Brasil ($OR = 0,29$; $p = 0,04$), devido a maior produção de IL-17 causada por maior afinidade deste alelo aos NFATCs.

O papel da IL-17 também é crucial para proteção contra *Trypanosoma cruzi*, que pertence a mesma família de protozoários de *Leishmania* sp. À IL-17 na doença de Chagas tem sido atribuído o controle da parasitemia por *T. cruzi* e proteção contra a forma cardíaca da doença de Chagas (MIYAZAKI et al. 2010; ERDMANN et al. 2013), mas também seu envolvimento com as formas mais graves de cardiomiopatia (ALMEIDA et al. 2018). Apesar deste conhecimento, a análise da associação entre o SNP rs2275913 e o desenvolvimento da forma cardíaca não mostrou relação significativa do alelo A com a cardiomiopatia na população colombiana estudada (RODRIGUEZ et al. 2015).

Para avaliar a influência do SNP IL-17 -197 G/A sobre a LTA, as cargas parasitárias dentro de cada grupo genotípico foram comparadas. Primeiro, as quantidades de DNA parasitário em indivíduos sintomáticos foi contrastada com os assintomáticos, revelando menores cargas parasitárias no primeiro grupo ($gS < gA$, $p = 0,003$). A escassez de parasitismo

é uma observação comum em pacientes com lesões dérmicas causadas por *L. (V.) braziliensis* (MAGALHÃES et al. 1986; PEREIRA et al. 2017), pois os pacientes desenvolvem respostas inflamatórias intensas que eliminam os parasitas e danificam o tecido, causando as lesões (BARRAL-NETO et al. 1986). Este fato enfatiza inclusive, a necessidade de técnicos experientes e indica abordagens moleculares como a qPCR para confirmar um diagnóstico (PIRMEZ et al. 1999; PAIVA-CAVALCANTI et al. 2013).

A cura parasitológica, no entanto, não ocorre em infecções por *L. (V.) braziliensis*, uma vez que o kDNA está presente em 80% dos pacientes curados (SCHUBACH et al. 1998; BACELLAR et al. 2009; ASSIS-SOUZA et al. 2013). Visto que o grupo gA é composto de residentes de áreas endêmicas, e diante da alta sensibilidade da técnica de qPCR, utilizada como critério de classificação dos casos, é esperado que estes possuam resquícios de DNA parasitário circulante, assim como os indivíduos sintomáticos curados (gSc). As baixas quantidades de DNA parasitário encontradas nos indivíduos com lesão ativa (gSla) em relação aos demais grupos reforçam que na LTA a doença não depende primordialmente da magnitude da carga parasitária. A LTA tem sido associada principalmente a falhas na secreção de citocinas anti-inflamatórias, especialmente a IL-10 (FARIA et al. 2005), que permitem a exacerbação da secreção de IFN γ e IL-17 (GONZALEZ-LOMBANA et al. 2013).

A participação da IL-17 foi correlacionada com a cura espontânea em humanos (NOVOA et al. 2011) e em infecção experimental de camundongos C57BL/6 por *L. (V.) braziliensis* (VARGAS-INCHAUSTEGUI et al. 2008) e com cura induzida na infecção por outra espécie do subgênero *Viannia* (CASTILHO et al. 2010), sendo atribuída nestes estudos a participação de mecanismos regulatórios para controlar a inflamação local. Por outro lado, a IL-17 também tem sido relacionada apenas ao aumento da inflamação, sem interferência sobre a destruição dos parasitas, que dependeria principalmente dos monócitos/macrófagos recrutados/ativados por IFN γ (LOPEZ-KOSTKA et al. 2009; GONZALEZ-LOMBANA et al. 2013).

Nas amostras deste estudo, foram observadas medianas semelhantes de DNA parasitário circulante entre AG e AA comparados a GG. Considerando que estudos anteriores demonstraram maior produção de IL-17 entre portadores do alelo A, este resultado contribui para reforçar que o decréscimo da carga parasitária não está diretamente ligado à atividade da IL-17. Anderson et al. (2009) encontraram associação entre a patologia grave e a presença de células CD4+IL-17+, que também estava ligada a um aumento no infiltrado celular de macrófagos neutrófilos. No entanto, apesar de contribuir para a exacerbação da lesão, nenhum

efeito benéfico de controle da replicação parasitária foi observado (ANDERSON et al. 2009). Foi sugerido ainda que neutrófilos podem agir a favor da permanência dos parasitas, facilitando sua inserção nos macrófagos inativados, dependendo do estágio da infecção (CARMO et al. 2010; RIBEIRO-GOMES et al. 2012). A presença de IL-17 parece, portanto, aumentar o processo inflamatório sem necessariamente causar morte parasitária. Por um mecanismo mediado pela presença de neutrófilos, maiores níveis de IL-17 poderiam ainda contribuir para a manutenção dos parasitas.

Outros estudos, porém, demonstraram a ação de Th17 em atrair células produtoras de $\text{IFN}\gamma$, que contribuem de forma significativa com a destruição de *Leishmania* sp. (VARGAS-INCHAUSTEGUI et al. 2008; KATARA et al. 2013). Conforme revisado por Gonçalves-de-Albuquerque et al. (2017), a atuação das células Th17 em relação aos parasitas depende do momento da infecção em que os neutrófilos são recrutados e do tempo de permanência da IL-17 no tecido, além da espécie parasitária envolvida.

As infecções por *Leishmania* sp. estimulam fortemente a produção de IL-17: níveis elevados de IL-17 foram medidos em sobrenadantes de cultura de PBMCs de pacientes com LT causadas por *L. (V.) braziliensis* (BACELLAR et al. 2009; CASTILHO et al. 2010), e em LT causada por outras espécies (ESPIR et al. 2011). Os estudos supracitados, porém, utilizam extratos totais de proteínas solúveis e não detalham metodologias de extração/purificação dos antígenos específicos utilizados para estimular as culturas de células. O protocolo utilizado neste estudo baseou-se na técnica utilizada por Chamak-Ayari et al. (2014), que isola proteínas de superfície de membrana de *Leishmania*, que são reconhecidas por células Th1 humanas e demonstraram alto nível de proteção em camundongos vacinados.

A influência do SNP rs2275913 na expressão e secreção da IL-17 foi demonstrada por um estudo de Espinoza et al. (2011b): linfócitos de pacientes saudáveis AA / AG estimulados *in vitro* por PHA secretaram níveis significativamente mais altos de IL-17 do que os indivíduos GG, sugerindo que a variante de sequência rs2275913 altera a afinidade do promotor do *IL-17* para fatores de transcrição liberados em resposta à ativação de células T, levando a uma produção diferencial de IL-17. Nosso estudo demonstrou que em indivíduos infectados por *L. (V.) braziliensis* a presença do alelo A não altera de forma perceptível a quantidade de citocina produzida (observada pelos percentuais de células Th17 alternativas e clássicas e concentração de IL-17 nos sobrenadantes), corroborando com a ausência de associação encontrada no estudo genético. Por outro lado, em indivíduos sem infecção, um percentual significativamente maior de células CD4+IL-17+ em comparação ao grupo não portador do A

(GG) é encontrado, confirmando os achados de Espinoza et al. (2011), embora a secreção da citocina (concentração de IL-17 nos sobrenadantes de cultura) não tenha sido efetivamente maior. É importante considerar que muitos tipos e subtipos celulares estão presentes na população de PBMC resultando em uma diversidade de regulações imunológicas. Ainda, outros polimorfismos importantes não investigados neste estudo (ex.: IL-17F 7488 T/C rs763780) podem atuar na quantidade total de citocina secretada em cada grupo (CHEN et al. 2010).

Os resultados aqui apresentados reforçam os achados anteriores sobre o aumento da produção de IL-17 pelo SNP rs2275913 (CHEN et al. 2010; ESPINOZA et al. 2011b). O estudo de associação com susceptibilidade nos contextos de exposição para infecção e de infecção para doença mostraram que a IL-17 não é determinante para o estabelecimento de *L. (V.) braziliensis* no hospedeiro ou para definir se o indivíduo infectado expressará clinicamente a doença, caracterizada pelas lesões dérmicas ulceradas. Contudo, a presença de maiores concentrações de IL-17 pode agravar a doença já expressa conforme revisado em literatura (HARTLEY et al. 2016; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al. 2017). Os dados obtidos neste estudo somados aos achados anteriores (CHEN et al. 2010; ESPINOZA et al. 2011) sugerem, portanto, que a presença deste SNP tendo como consequência aumento da IL-17 poderia ter relação com o agravamento das lesões da LTA devido a sua forte atividade inflamatória.

A eliminação parasitária em infecções por *Leishmania* spp. depende diretamente da presença de IFN γ (ANDERSON et al. 2009; GONZALEZ-LOMBANA et al. 2013). As análises de correlação dos tipos celulares CD4+IL-17+ IFN γ + e IFN γ - com a quantidade de DNA detectada nos indivíduos indicaram que linfócitos Th17 produtores de IFN γ + exercem influência mais significativa na destruição parasitária, enquanto os linfócitos CD4+ IL-17+ IFN γ - parecem exercer influência discreta sobre a eliminação dos parasitas, devido a sua atuação sinérgica com Th1/IFN γ . A não correlação da IL-17 com a carga parasitária foi confirmada pela análise de IL-17 em sobrenadantes, que não teve influência sobre a quantidade de DNA parasitário detectada. De fato, a sinergia de IL-17 e IFN γ em humanos é sugerida por uma correlação positiva entre a expressão de mRNA IL-17 e IFN γ em lesões ML causadas por *L. major* (BOAVENTURA et al. 2010), contrastando com o antagonismo observado em camundongos C57BL/6 (GONZALEZ-LOMBANA et al. 2013). Neste contexto, nosso estudo contribuiu em indicar que a presença de IL-17 não atua diretamente sobre a eliminação parasitária, sendo este papel diretamente relacionado com a atividade do

IFN γ , conforme previamente observado por ANDERSON et al. 2009; GONZALEZ-LOMBANA et al. 2003).

9. CONCLUSÕES

Este estudo avaliou pela primeira vez a relação entre uma variante genética em IL-17 e a susceptibilidade à LTA. O estudo de associação do tipo caso-controle não demonstrou significância suficiente da associação SNP IL-17 -197 G/A com a susceptibilidade a LTA para sugeri-lo comomarcador.

A avaliação da presença de IL-17 intracelular e extracelular e da secreção de IL-17 entre indivíduos saudáveis portadores e não portadores do alelo A neste estudo reforçou achados de estudos anteriores quanto à influência deste SNP para o aumento da produção desta citocina. Foi observado, porém, que indivíduos infectados por *L. (V.) braziliensis* não apresentam variação significativa de IL-17 entre os genótipos, corroborando o resultado das análises genéticas.

A análise de cargas parasitárias indicou que a presença de IL-17 não atua de forma direta na eliminação dos parasitas. Uma vez que linfócitos Th17 IFN γ ⁺ estão mais fortemente correlacionados com o número de parasitas,foi possível observar que a eliminação de *L. (V.) braziliensis* depende diretamente da presença de IFN γ .

10. PERSPECTIVAS

Os dados obtidos no presente estudo demonstram que a IL-17, estudada isoladamente, não tem papel determinante sobre o desenvolvimento de lesões dérmicas em consequência da infecção por *L. (V.) braziliensis*. A compilação dos recentes achados publicados na literatura científica acerca do papel da IL-17 na imunopatogenia da LTA aponta que esta citocina está associada ao agravamento das lesões causadas pela infecção por *L. (V.) braziliensis*, podendo inclusive levar à evolução da doença para a forma mucocutânea. Apesar de o SNP *IL-17A* -197 G/A rs2275913 não ser útil como marcador preditivo do surgimento da LTA, a confirmação de maiores concentrações de IL-17 na presença do alelo mutante sugere que este polimorfismo possa estar significativamente associado com o agravamento das lesões. Um estudo com desenho direcionado para a investigação desta hipótese pode ajudar a identificar indivíduos mais vulneráveis, possibilitando a prevenção de expressões mais graves e debilitantes da doença.

REFERÊNCIAS

- AJDARY, S. et al. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. **Infection and Immunology**, Oxford, v.68, n.4, p.1760–1764, 2000.
- AL-BASHIER, N. M. T. Impact of IFN- ($+874T/A$) and IL-10 ($-1082G/A$) on the Susceptibility to Visceral Leishmaniasis. **International Journal of Current Microbiology**, Nova Iorque, v.3, n.3, p.662-667, 2014.
- ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F. T helper 1/T helper 2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? **Frontiers in Immunology**, Lausanne, 2012. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2012.00080>> Acesso em: 20 de Abril de 2014.
- ALMEIDA, M. S. et al. Alternative Th17 and CD4 CD25 FoxP3 cells frequency increase and correlate with worse cardiac function in Chagas cardiomyopathy. **Scandinavian journal of immunology**, Estocolmo, v. 12, p. 46-48, 2018.
- ALMEIDA, T.M. **Perfil de expressão genica de mediadores da resposta imune celular de pacientes com leishmaniose tegumentar ativa**. Dissertação (Mestrado). 2013. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- ALVAR, J. et al. **Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence**. PLoS ONE, v. 7, n.5, e35671, 2012. Disponível em: <journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035671> Acesso em: 22 de Abril de 2014.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and experimental dermatology**, Sunnyvale, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.
- ANDERSON, C.F. et al. CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ Th1 cells are the source of IL-10 mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, Cambridge, v.204, p.285-297, 2007.

ANTONYSAMY, M. A. et al. Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. **Journal of Immunology**, Walnut, v. 162, p. 577-584, 1999.

ARISAWA, T. et al. The Influence of Polymorphisms of Interleukin-17A and Interleukin-17F Genes on the Susceptibility to Ulcerative Colitis. **Journal of Clinical Immunology**, Overland Park, v. 28, p. 44-49, 2008.

ASHFORD, R.W. The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v.30, p. 269-281, 2000.

ASSIS SOUZA, M. et al. Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: Profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. **Microbial Pathogenesis**, Nova Iorque, v. 57, p. 27-32, 2013.

AWAD, M.R. et al. Genotypic variation in the transforming growth factor β 1 gene. **Transplantation**, Seattle, v.66, p.1014-1020, 1998.

BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, Oxford, v. 70, n.12, p. 6734-6740, 2002.

BACELLAR, O. et al. Interleukin 17 Production among Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, Londres, v. 200, p.75-78, 2009.

BARATTA-MASINI, A. et al. Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. **Frontiers in Bioscience**, Searington, v. 12, p. 839-849, 2007.

BARRAL-NETO, M. et al. Imunologia da leishmaniose tegumentar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. São Paulo, v.19. n.3, p. 173-191, 1986.

BASANO S. A.; CAMARGO L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.7, p.328-37, 2004.

BELKAID, Y. et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **Journal of Experimental Medicine**, Cambridge, v.194, p.1497-1506, 2001.

BHUSHAN, S.; PERUMAL, N. B. Disease associated cytokine SNPs database: An annotation and dissemination model. **Cytokine**, Londres, v. 57, n.1, p. 107-112, 2012.

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**, Budapeste, v.40, p.2830-836, 2010.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological Reviews**, Cambridge, v. 173, p. 17-26, 2000.

BRASIL. Secretaria de vigilância em saúde. Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana. In: **Guia de Vigilância epidemiológica**. Brasília, 2010. 63p.

BRASIL. Secretaria de vigilância em saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose visceral**. Brasília, 2006. 120p.

BRITO et al. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of american cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, Oxford, v. 95, p. 203-206, 2001.

BRITO, M. E. F. et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 45, p. 425-429, 2012.

BRITO, M. E. F. et al. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Filadélfia, v. 7, p. 318-321, 2000.

BUSH, W. S.; MOORE, J. H. Genome-Wide Association Studies. **PLoS Computational Biology**, v.8, n.12, p.1-11, 2012.

CABRERA, M. et al. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, Cambridge, v. 182, p.1259-1264, 1995.

CACERES-DITTMAR, G. et al. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. **Clinical Experimental Immunology**, v. 91, p. 500-505, 1993.

CARMO, D. S.; KATZ, S.; LU, C. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. **PLoS One**, San Francisco, v.5, n.11, e13815, 2010. Disponível em: <journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0013815> Acesso em: 22 de Setembro de 2017.

CASTELLUCI, L. et al. CXCR1 and SLC11A1 polymorphisms affect susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil: a case-control and family-based study. **BMC Medical Genetics**, Londres, v.11, p. 10, 2010.

CASTELLUCI, L. et al. L6-174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v.194, p. 519-527, 2006.

CASTILHO, T. M. et al. Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Identification and Quantification of American *Leishmania* Species on the Basis of Glucose-6-Phosphatedehydrogenase. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Northbrook, v.78, p.122–132, 2008.

CASTILHO, T. M. et al. Murine model of chronic *L. (Viannia) panamensis* infection: Role of IL-13 in disease. **European Journal of Immunology**, Budapeste, v. 40, p. 2816-2829, 2010.

CHABAUD, M. et al. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. **Journal of Immunology**, Walnut, v. 161, p.409-414, 1998.

CHAMAKH-AYARI, R. et al. *In Vitro* Evaluation of a Soluble Leishmania Promastigote Surface Antigen as a Potential Vaccine Candidate against Human Leishmaniasis. **PLoS ONE**, San Francisco, v.9, n.5, e92708, 2014. Disponível em: <journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0013815> Acesso em: 22 de Setembro de 2017.

CHAPMAN, S.J; HILL, A.V. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nature Reviews Genetics*, v. 13, n. 3, p. 175-188, 2012.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, p. 873-882, 2007.

CHEN, J. et al. The Polymorphism of IL-17 G-152A was Associated with Childhood Asthma and Bacterial Colonization of the Hypopharynx in Bronchiolitis. **Journal of Clinical Immunology**, St Louis, v. 30, p. 539-545, 2010.

CHEN, J.M.; FEREC, C.; COOPER, D. N. A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview. **Human Genetics**, Tóquio, v.120, n. 1, p. 1-21, 2006.

CHOI, B. S; KROPF P. Evaluation of T cell responses in healing and nonhealing leishmaniasis reveals differences in T helper cell polarization *ex vivo* and *in vitro*. **Parasite Immunology**, Boston, v. 31, n. 4, p. 199-209, 2009.

CHUNG, K. F. Cytokines as targets in chronic obstructive pulmonary disease. **Current Drug Targets**, Lion, v.7, p.675–681, 2006.

CIPRANDI, G. et al. Serum interleukin-17 levels are related to clinical severity in allergic rhinitis. **Allergy**, Nova Iorque, v.64.n.9, p.1375-138, 2009.

COELHO et al. Immune Responses Induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 Antigen, but Not by the LACK Antigen, Are Protective against Experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Infection and Immunity**, Cambridge, v. 71. n. 73, p. 3988-3994, 2003.

CONCEIÇÃO J, et al. Characterization of Neutrophil Function in Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.10, n.5, e0004715, 2016. Disponível em: <
journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004715 > Acesso em: 22 de Setembro de 2017.

CONNE, B.; STUTZ, A.; VASSALLI, J. D. The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? **Nature Medicine**, Nova Iorque, v.6, n.6, p.637-641, 2000.

CORREA, J. D. et al. Association between Polymorphisms in Interleukin-17A and -17F Genes and Chronic Periodontal Disease. **Journal of Mediators of Inflammation**, Sylvania, e846052, 2012. Disponível em: < journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004715 > Acesso em: 28 de Agosto de 2017.

COSMI, L. et al. Th17 plasticity: pathophysiology and treatment of chronic inflammatory disorders. **Current Opinion in Pharmacology**, Oxford, v.17, p. 12-16, 2014.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 1977.

COSTA, C. A. et al. Montenegro Skin Test -Evaluation of the Composition and Stability of the Antigen Preparation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, p.193-194, 1996.

COVAS, C. J. F. **Estudo da influência de polimorfismos nos genes IL-10, IL-12, MIF e TNF na imunopatogênese da leishmaniose tegumentar Americana**. Dissertação (Mestrado). Instituto Oswaldo Cruz. 2010.

CRUZ, I., M. A. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. **Lancet**, Londres, v. 359, p. 1124-1125, 2002.

CUA, D. J; TATO, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v.10, p. 479–489,2010.

DA-CRUZ, A. M. et al. T-Cell-Mediated Immune Responses in Patients with Cutaneous or Mucosal Leishmaniasis: Long-Term Evaluation after Therapy. **Clinical Vaccine Immunology**, Washington, v. 9, n. 2251-25, p.251-256, 2002.

DAI, W. et al. *IL-17A* (-197G/A) and *IL-17F* (7488T/C) gene polymorphisms and cancer risk in Asian population: a meta-analysis. **OncoTargets and Therapy**, Auckland, v. 7, p. 703-711, 2014.

DAVID, C.V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatology and Therapy**, Estocolmo, v. 22, n.6, 491-502, 2009.

DAVIES, C. R. et al. Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: an epidemiological study of infection and immunity. **Epidemiology of Infection**, Ottawa, v. 114, p.:297-318, 1995.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DORVAL, M. E. M. C. et al. Ocorrência de leishmaniose tegumentar Americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v.39, n.1, p.43-46, 2006.

DUGGAL, P.; BEATY, T. H. Genetic epidemiology of infectious disease. In: **Genetic susceptibility to infectious disease**. 1a Ed. Oxford University Press, New York, p. 3-17, 2008.

ESPINOZA, J. L. et al. A single nucleotide polymorphism of IL-17 gene in the recipient is associated with acute GVHD after HLA-matched unrelated BMT. **Bone Marrow Transplantation**, Londres, v.46, p. 1455-1463, 2011.

ESPINOZA, J. L. et al. A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 10, e26229, 2011. Disponível em: <journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004715> Acesso em: 02 de Agosto de 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**, Walnut, e481750, 2014. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1155/2014/481750>> Acesso em: 28 de Agosto de 2017.

ETTINGER N. A.; WILSON, M. E. Macrophage and T-cell gene expression in a model of early infection with the protozoan *Leishmania chagasi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.2, n.6, e252, 2008.

FARIA, D. R. et al. Decreased *in situ* expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infection and Immunology**, Oxford, v. 73, n.12, p.7853–7859, 2005.

FISHMAN, D. et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **Journal of Clinical Investigations**, Berlim, v.102, p.1369-1376, 1998.

FOA et al. Production of Tumor Necrosis Factor-alpha by B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells: A Possible Regulatory Role of TNF in the Progression of the Disease. **Blood**, Boston, v. 76, n. 2, p. 393-400, 1990.

FOSSIEZ, F. et al. T Cell Interleukin-17 Induces Stromal Cells to Produce Proinflammatory and Hematopoietic Cytokines. **Journal of Experimental Medicine**, Palo Alto, v.183, p.2593-2603, 1996.

FOSTER, J. T. Real-Time PCR Assays of Single-Nucleotide Polymorphisms Defining the major *Brucella* clades. **Journal of Clinical Microbiology**, Washinton, v.46, n. 1, p. 296-301, 2008.

FRADE, A F. **Identificação de polimorfismos genéticos com impacto no desenvolvimento e progressão da leishmaniose visceral em indivíduos de áreas endêmicas do Maranhão e Piauí**. 2010. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

FRADE, A. F. et al. TGFB1 and IL8 gene polymorphisms and susceptibility to visceral leishmaniasis Infection. **Genetics and Evolution**, Maldeen, v.11, p.912-916, 2011.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, p. 214-221, 2006.

FUJINO, S. et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. **Gut**, Boston, v.52, 65-70, 2003.

PACHECO, A. G.; MORAES, M. O. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. **Review Disease Markers**, Hoboken, v. 27, p. 173-186, 2009.

GAFFEN, S. L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v.9, n.8, p. 556-567, 2009.

PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. **Molecular and Celular Probes**, Londres, v.27, n.3-4, p.122-128, 2013.

GARCIA, A. L. et al. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. **Infectious Genetic and Evolution**, Amsterdam, v. 5, p.109-116, 2005.

PARK, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**, Londres, v.6, p.1133-1141, 2005.

GERARD, C.; ROLLINS, B. J. Chemokines and disease. **Nature Immunology**, Londres, v.2, p.108–115, 2001.

GIBSON, N. J. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. **Clinical Chimica Acta**, Amsterdam, v.363, n.1-2, p. 32-47, 2006.

GOLLOB, K. J. et al. Immunoregulatory mechanisms and CD4⁻ CD8⁻ (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: A balancing act between protection and pathology. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 8, p. 1338-1343, 2008.

GOMES-SILVA, A. et al. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? **Clinical and Experimental Immunology**, Overland Park, v. 149, p. 440–444, 2007.

GONÇALVES, S. C. et al. Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of Leishmaniasis. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Londres, v. 8, p. 188-197, 2012

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 36, 2003.

GONZALEZ-LOMBANA, C. et al. IL-17 Mediates Immunopathology in the Absence of IL-10 Following *Leishmania major* Infection. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 3, e1003243, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555256> > Acesso em: 28 de Agosto de 2016.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, Filadélfia, v. 26, p. 293-307, 2012.

GRIFFITH, O. L. et al. ORegAnno: an openaccess community-driven resource for regulatory annotation. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, p. 107-113, 2008.

GUERRA, J. A. O. et al. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.22, n.11, p.2319-2327, 2006.

HANA, L. et al. Association of IL-17A and IL-17F single nucleotide polymorphisms with susceptibility to osteoarthritis in a Korean population. **Gene**, Londres, v. 533, p. 119-122, 2014.

HARRINGTON, L. E. et al. Interleukin 17-producing CD41 effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature Immunology**, Londres, v.6, p. 1123-1132, 2005.

HARTEL, C. et al. Ex vivo induction of cytokine mRNA expression in human blood samples, **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.8, p. 63-71, 2001.

HARTLEY, M. A. et al. Leishmanivirus-Dependent Metastatic Leishmaniasis Is Prevented by Blocking IL-17A. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 12, n.9, e1005852, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555256>> Acesso em: 2 de Agosto de 2017.

HAVERKAMP, M. H.; HOLLAND, S. M. Cytokine Genes II: IL-12, IFN- γ and their receptor genes. In: Kaslow RA, McNicholl JM, Hill AVS. **Genetic susceptibility to infectious disease**. Oxford University Press, New York, p. 227-246, 2008.

HEIM, M.; MEYER, U. A. **Genotyping of poor metabolizers of debrisoquine by allele-specific PCR amplification**. *Lancet*, Londres, v. 336, p.529-532, 1990.

HONG, E. P.; gARK, J. W. Sample Size and Statistical Power Calculations. **Genomics & Informatics**, Beijing, v. 10, n. 12, p. 117-122, 2012.

HOTEZ, P. J. et al. Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. **Clinical infectious diseases**, Henderson, v.38, p.871–878, 2004.

JAIN, K. K. Applications of biochips: from diagnostics to personalized medicine. **Current Opinion in Drug Discovery and Development**, Londres, v.7, p.285-289, 2004.

JUHO, V. et al. The Gene Polymorphism of IL-17 G-152A is Associated with Increased Colonization of *Streptococcus pneumoniae* in Young Finnish Children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Londres, v. 34, n. 9, p. 928-032, 2015.

KAMALI-SARVESTANI, M. et al. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Iranian patients. **Cytokine**, Filadélfia, v. 35, p.159-165, 2006.

KATARA et al. Analysis of localized immune responses reveals presence of Th17 and Treg cells in cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. **BMC Immunology**, Amsterdam, v. 14, n. 52, 2013.

KATARA, G. K. et al. Evidence for Involvement of Th17 Type Responses in Post Kala Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, e1703, 2012. Disponível em: <journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001703> Acesso em: 28 de Maio de 2013.

KAWAGUCHI, M. et al. IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n.4, p. 785-801, 2006.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis Vaccine: Where are we Today? **Journal of global infectious diseases**, Mumbai, v. 2, p. 177-185, 2010.

KOBETS, T.; GREKOV, I.; LIPOLDOVÁ, M. Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. **Current Medicinal Chemistry**, San Francisco, v. 19, p. 1443-1474, 2012.

KORN, T. et al. **IL-17 and Th17 Cells**. Annual Reviews on Immunology, Palo Alto, v.27, p. 485-517, 2009.

LAGES, C.S. et al. Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. **Journal of Immunology**, Walnut, v.181, p. 1835-1848, 2008.

LINDOSO, J. A. L. et al. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, Auckland, v. 3, p. 69-77, 2012.

LIU, X. K. et al. Crucial role for nuclear factor of activated T cells in T cell receptor-mediated regulation of human interleukin-17. **Journal of Biology and Chemistry**, Cambridge, v.279, p.527-562, 2004.

LIU, X. K; LIN X, GAFFEN S. L. Crucial role for nuclear factor of activated T cells in T cell receptor-mediated regulation of human interleukin-17. **Journal of Biology and Chemistry**, Cambridge, v. 279, p. 2762-2771, 2004.

LOPEZ-KOSTKA, S. et al. IL-17 Promotes Progression of Cutaneous Leishmaniasis in Susceptible Mice. **Journal of Immunology**, Walnut, v. 182, p. 3039-3046, 2009.

MARINHO JÚNIOR, J. F. **Infecção natural por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos envolvidos na manutenção da Leishmaniose Tegumentar Americana em área endêmica da Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil.** 2010. Dissertação (Mestrado), Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

MARTINS et al. Antigenicity, Immunogenicity and Protective Efficacy of Three Proteins Expressed in the Promastigote and Amastigote Stages of *Leishmania infantum* against Visceral Leishmaniasis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n.9, e0137683, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555256>> Acesso em: 2 de Agosto de 2017.

MARY, C. et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, n.11, p. 5249-5255, 2004.

MARZOCHI, M. C. A.; MARSDEN, P. P. ENCONTRO NACIONAL SOBRE SAÚDE E MEIO AMBIENTE (Fiocruz), Rio de Janeiro. Ecologia e controle de vetores - Leishmanioses. p. 31-36, Rio de Janeiro, 1991.

MASMOUDÍ, A. et al. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. **Journal of Dermatological Case Reports**, Warsaw, v. 2, p. 31-41, 2013.

MATOS, G. I. et al. IFN γ +874 T/A polymorphism is not associated with American Tegumentary leishmaniasis but can influence *Leishmania* induced IFN- γ production. **BMC Infectious Diseases**, Londres, v.24, p. 7-33, 2007.

MAYRINK et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v.39, n.1, p.14-21, 2006.

MORAES, A. S. et al. Cytokine Genes I: IL-10, IL-6, IL-4 and the IL1 family. In: **Genetic susceptibility to infectious disease**. Oxford University Press, Oxford, p. 208-226, 2008.

MOURA, T. R. et al. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**, Washington, v.73, n.9, p.5827-5834, 2005.

NASCIMENTO, M. L. S. et al. IL-17A acts synergistically with IFN- γ to promote protection against *Leishmania infantum* infection. **Journal of Infectious Diseases**, Amsterdam, v. 211, n. 6, p.1015-1026, 2015.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. Ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2012.

NEWTON, C. R. et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.17, p.2503-2516, 1989.

NIEDBALA, W. et al. Regulation of type 17 helper T-cell function by nitric oxide during inflammation. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 108, n. 22, 2011.

NORDANG, G. B. N. et al. Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand. **Rheumatology**, Auckland, v. 48, n. 4, p. 367-370, 2009.

NORDANG, G. B. N. et al. Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand. **Rheumatology**, Auckland, v. 48, n. 4, p. 367-370, 2009.

NOVOA, R. et al. IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. (V.) braziliensis* Infection. **Parasite Immunology**, Oxford, v.33, p. 132-136, 2011.

NOYES, H. A. Implications of a neotropical origin of the genus *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, p. 657-663, 1998.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological Perspectives of Leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases** Mumbai, v. 2, n. 2, p.135-146, 2010.

OBOOKI, K. et al. Th17 and allergy. **Allergology International**, Londres, v. 57, p.121-134, 2008.

OLIVEIRA, N. W. *et al.* The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, Londres, v. 66, p. 127-132, 2014.

OLIVEIRA, N. W. et al. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, Londres, v. 66, p. 127-132, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Control of the Leishmaniasis** In: Expert Committee on the Control of *Leishmaniases*, Genova, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmanioses**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>> Acesso em 26 de Janeiro de 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **World Health Report 2000**. Health Systems: Improving Performance. Geneva, 2000.

PETERSON, R. A. Regulatory T-Cells: Diverse Phenotypes Integral to Immune Homeostasis and Suppression. **Pathology**, Nova Iorque, v. 40, p. 186-204, 2012.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n.9, e45, 2001.

PINHEIRO, M. B. et al. CD4-CD8-ab and $\sigma\delta$ T Cells Display Inflammatory and Regulatory Potentials during Human Tuberculosis. **PLoS ONE**, San Francisco, v.7, n.12, e50923, 2012. Disponível em: <journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0050923> Acesso em 26 de Julho de 2016.

PIRMEZ, C. et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **Journal of clinical Investigation**, Londres, v. 91, n. 3, p. 1390-1395, 1993.

PITTA, M. G. R. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala-azar caused by *Leishmania donovani*. **Journal of Clinical Investigations**, Londres, v. 119, p.2379-2387, 2009.

PRAVICA, V. et al. *In vitro* production of IFN- γ correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN- γ gene. **European Journal of Immunogenetics**, Oxford, v.26, p.1-3, 1999.

RASOULI, M. et al. Interleukin-17A genetic variants can confer resistance to brucellosis in Iranian population. **Cytokine**, Londres, v. 61, p. 297-303, 2013.

REIS, L. C. et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, São Paulo, v.35, n. 2, p.103-115, 2006.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular Diagnosis of *Leishmaniasis*: Current Status and Future Applications. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.45, n.1, p.21-25, 2007.

REYNOLDS, J. M. et al. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. **Cytokine Growth Factor Reviews**, Oxford, v. 21, p. 413–423, 2010.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in Cell Infection Microbiology**, Lausanne, v.2, p.59, 2012.

ROBERTS, M. T. M. Current Understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **British Medical Bulletin**, Londres, v.75-76, p. 115-130, 2006.

ROBINS, S.L.; COTRAN, R. S. **Patologia: Bases patológicas das doenças**, Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2005.

RODRIGUES, F. M. D. et al. Expression of Foxp3, TGF- β and IL-10 in American cutaneous leishmaniasis lesions. **Archives of Dermatology Research**, Berlin, v.306, n.3, p.163-171, 2014.

SADIGHI, S. et al. Evaluation of interleukin 17: a polymorphism in patients with visceral leishmaniasis. **Journal of Anal Research in Clinical Medicine**, Nova Delhi, v. 2, n. 2, p.81-86, 2014.

SALHI, A. et al. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. **Journal of Immunology**, Walnut, v.180, p. 6139-6148, 2008.

SARAIVA, A. M. et al. Evaluation of IL17A expression and of IL17A, IL17F and IL23R gene polymorphisms in Brazilian individuals with periodontitis. **Human Immunology**, Nova Iorque, v. 74, p. 207-214, 2013.

SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural Killer Cells Are a Source of Interferon γ That Drives Differentiation of CD4 + T Cell Subsets and Induces Early Resistance to *Leishmania major* in Mice. **Journal of Experimental Medicine**, Washington, v.178, p.567-577, 1993.

SCHELLER et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1813, p.878-888, 2011.

SCHNYDER-CANDRIAN, S. et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. **Journal of Experimental Medicine**, Washington, v. 203, n. 12, p. 2715-1725, 2006.

SHAW, J. J. The leishmaniasis – survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p. 541-547, 2007.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil X. Some observations on intradermal reaction to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 69, p.323, 1975.

SILVEIRA, F. T. et al. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n.3, p.239-251, 2004.

SINGH et al. Age-influenced population kinetics and immunological responses of *Leishmania donovani* in hamsters. **Parasitology research**, Berlim, v. 12, p.919-924, 2007.

SOKAL, J.E. Measurement of delayed skin-test responses. **New England Journal of Medicine**, Cambridge, v.293, p.501-502, 1975.

SOONG, L.; HENARD, C.A.; MELBY, P.C. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. **Seminaries in Immunopathology**, Yale, v.34, n. 6, p. 735-751, 2012.

SOUZA, M. A. et al. American tegumentary leishmaniasis: mRNA expression for Th1 and Treg mediators are predominant in patients with recent active disease. **Immunobiology**, Amsterdam, v.221, n.2, p. 253-259, 2016.

STRAUSS-AYALI, D. et al. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p.1729-1733, 2004.

SUN, Y. C; ZHOU, Q. T.; YAO, W. Z. Sputum interleukin-17 is increased and associated with airway neutrophilia in patients with severe asthma. **Chinese Medicine Journal**, Xangai, v.118, p.953-956, 2005.

TACCHINI-COTTIER, F. et al. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4⁺ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. **Journal of Immunology**, Nova Iorque, v.165, n.5, p.2628-2636, 2000.

TESMER, L. A. et al. Th17 cells in human disease. **Immunology Reviews**, Totowa, v. 223, p. 87-113, 2008.

TURNER, D.M. et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **European Journal of Immunogenetics**, Oxford, v.24, p.1-8, 1997.

VAN DEVENTER, S. J. H. Review article: targeting TNF α as a key cytokine in the inflammatory processes of Crohn's disease – the mechanisms of action of infliximab. **Alimentation and Pharmacology Therapy**, Boston, v.13, p.3-8, 1999.

VARGAS-INCHAUSTEGUI, A. D. et al. Protective Immune Responses Transcription, and the Generation of Dendritic Cell Activation, ISG15 *Leishmania braziliensis* Infection Induces. **Journal of Immunology**, Walnut, v. 180, p. 7537-7545, 2008.

VIOLA, A.; LUSTER, A. D. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. **Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v.48, p.171–197, 2008.

VITALE, F. et al. TaqMan-Based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. **Academy of Sciences**, St. Louis, v. 1026, p.139-143, 2004.

WEIGLE, K. A. et al. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis in Colombia: A comparison of seven methods. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v.36, n.3, p.489-496, 1987.

WEIRATHER et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, 3892e904, 2011.

WILSON, A. G. et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proceedings of the national academy of science - USA**, Washington, v.94, p.3195-3199, 1997.

WOLTMAN, A. M., et al. Interleukin-17 and CD40-ligand synergistically enhance cytokine and chemokine production by renal epithelial cells. **Journal of American Society of Nephrology**, Washington, v.11, p. 2044–2055, 2000.

WU, X. et al. Association between polymorphisms in interleukin-17A and interleukin-17F genes and risks of gastric cancer. **International Journal of Cancer**, Plainsboro, v. 127, p. 86-92, 2010.

YU, P. et al. Association of Single Nucleotide Polymorphisms of IL23R and IL17 with Ulcerative Colitis Risk in a Chinese Han Population. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n.9, e44380, 2012. Disponível em: <journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0050923> Acesso em 25 de Maio de 2015.

APÊNDICE A - Termos de consentimento Livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Paciente Menor de 18 anos

Ao senhor (a) responsável pelo indivíduo menor de idade, gostaríamos de convidar o (a) menor a participar do projeto de pesquisa intitulado “**Caracterização da resposta imune celular à infecção por *L. (V.) braziliensis* na presença do SNP 197(G/A) em região promotora do *IL-17*”**, que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). O objetivo principal desta pesquisa é obter informações sobre as causas genéticas e imunológicas do desenvolvimento da leishmaniose tegumentar em alguns indivíduos da comunidade, comparando características encontradas em amostras de sangue de indivíduos doentes e não doentes.

O (A) menor fará parte do grupo de pacientes, que será submetido à coleta de sangue, que será realizada com material estéril, descartável, e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executá-la. Serão coletados 22 mL de sangue em três tubos, que correspondem a 2 colheres de sopa e meia. Este volume não causa prejuízo à integridade física do menor. Quanto aos riscos, apesar de todas as medidas preventivas e cuidados tomados no sentido de proteger os voluntários, o menor poderá sentir algum desconforto ou ardência.

Este estudo contribuirá para um melhor conhecimento da leishmaniose tegumentar humana e o uso destas informações poderá permitir o desenvolvimento de tratamentos e medidas de controle da doença direcionadas às populações numa perspectiva futura.

Garantimos que a privacidade do (da) menor será preservada e os dados pessoais serão confidenciais e mantidos sob sigilo, não sendo divulgados em nenhuma hipótese. Antes da participação do menor no referido projeto, o senhor tem a total liberdade de pedir qualquer esclarecimento adicional que julgue necessário, que será esclarecido por um participante do estudo. O (A) Sr. (a) poderá recusar ou retirar o seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

Solicitamos sua autorização para que a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ-PE) possa utilizar as informações obtidas neste estudo em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, a identidade do (a) menor. Permitindo a participação do menor na pesquisa, o Sr. (a) concorda com o estoque (Linhagens de células e Banco de DNA) da amostra coletada para posterior estudo. Neste caso, o senhor (a) será informado da necessidade de utilizar a amostra em outra pesquisa.

Este documento será feito em duas vias, ficando uma em posse do participante e a outra com o coordenador da pesquisa.

Em caso de dúvidas ou outras informações posteriores o (a)Sr.(a) poderá entrar em contato com a equipe responsável, através dos telefones abaixo e caso exista a necessidade de apresentar recursos ou reclamações em relação à pesquisa poderá entrar em contato com o Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, através do telefone (81) 2101-2639, o qual tomará as medidas cabíveis.

Desejo ser informado se a amostra precisar ser analisada futuramente: () SIM () NÃO

Nome do menor

data:

Assinatura do responsável pelo menor

data:

Suênia da Cunha Gonçalves de Albuquerque, Biomédica Fone: 8785-2246
Responsável pela pesquisa

data:

Milena de Paiva Cavalcanti, PhD Fone: 2101-2679
Coordenadora do projeto

data:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Paciente Menor de 18 anos

Ao senhor (a) responsável pelo indivíduo menor de idade, gostaríamos de convidar o (a) menor a participar do projeto de pesquisa intitulado “**Caracterização da resposta imune celular à infecção por *L. (V.) braziliensis* na presença do SNP 197(G/A) em região promotora do *IL-17***”, que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). O objetivo principal desta pesquisa é obter informações sobre as causas genéticas e imunológicas do desenvolvimento da leishmaniose tegumentar em alguns indivíduos da comunidade, comparando características encontradas em amostras de sangue de indivíduos doentes e não doentes.

O (A) menor fará parte do grupo de pacientes, que será submetido à coleta de sangue, que será realizada com material estéril, descartável, e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executá-la. Serão coletados 22 mL de sangue em três tubos, que correspondem a 2 colheres de sopa e meia. Este volume não causa prejuízo à integridade física do menor. Quanto aos riscos, apesar de todas as medidas preventivas e cuidados tomados no sentido de proteger os voluntários, o menor poderá sentir algum desconforto ou ardência.

Este estudo contribuirá para um melhor conhecimento da leishmaniose tegumentar humana e o uso destas informações poderá permitir o desenvolvimento de tratamentos e medidas de controle da doença direcionadas às populações numa perspectiva futura.

Garantimos que a privacidade do (da) menor será preservada e os dados pessoais serão confidenciais e mantidos sob sigilo, não sendo divulgados em nenhuma hipótese. Antes da participação do menor no referido projeto, o senhor tem a total liberdade de pedir qualquer esclarecimento adicional que julgue necessário, que será esclarecido por um participante do estudo. O (A) Sr. (a) poderá recusar ou retirar o seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

Solicitamos sua autorização para que a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ-PE) possa utilizar as informações obtidas neste estudo em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, a identidade do (a) menor. Permitindo a participação do menor na pesquisa, o Sr. (a) concorda com o estoque (Linhagens de células e Banco de DNA) da amostra coletada para posterior estudo. Neste caso, o senhor (a) será informado da necessidade de utilizar a amostra em outra pesquisa.

Este documento será feito em duas vias, ficando uma em posse do participante e a outra com o coordenador da pesquisa.

Em caso de dúvidas ou outras informações posteriores o (a)Sr.(a) poderá entrar em contato com a equipe responsável, através dos telefones abaixo e caso exista a necessidade de apresentar recursos ou reclamações em relação à pesquisa poderá entrar em contato com o Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, através do telefone (81) 2101-2639, o qual tomará as medidas cabíveis.

Desejo ser informado se a amostra precisar ser analisada futuramente: () SIM () NÃO

Nome do menor

data:

Assinatura do responsável pelo menor

data:

Suênia da Cunha Gonçalves de Albuquerque, Biomédica Fone: 8785-2246
Responsável pela pesquisa

data:

Mílana de Paiva Cavalcanti, PhD Fone: 2101-2679
Coordenadora do projeto

data:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Paciente

Convidamos o Sr. (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “**Caracterização da resposta imune celular à infecção por *L. (V.) braziliensis* na presença do SNP 197(G/A) em região promotora do *IL-17*”**, que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). O objetivo principal desta pesquisa é obter informações sobre as causas genéticas e imunológicas do desenvolvimento da leishmaniose tegumentar em alguns indivíduos da comunidade, comparando características encontradas em amostras de sangue de indivíduos doentes e não doentes.

O (A) Sr. (a) fará parte do grupo de pacientes, que será submetido à coleta de sangue, realizada com material estéril, descartável, e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executá-la. Serão coletados 22 mL de sangue em três tubos, que correspondem a 2 colheres de sopa e meia. Este volume não causa prejuízo à sua integridade física. Quanto aos riscos, apesar de todas as medidas preventivas e cuidados tomados no sentido de proteger os voluntários, o Sr. (a) poderá sentir algum desconforto ou ardência.

Este estudo contribuirá para um melhor conhecimento da leishmaniose tegumentar humana e o uso destas informações poderá permitir o desenvolvimento de tratamentos e medidas de controle da doença direcionadas às populações numa perspectiva futura.

Garantimos que a privacidade do (da) Sr (a) será preservada e os dados pessoais serão confidenciais e mantidos sob sigilo, não sendo divulgados em nenhuma hipótese. Antes da participação no referido projeto, o senhor tem a total liberdade de pedir qualquer esclarecimento adicional que julgue necessário, que será esclarecido por um participante do estudo. O (A) Sr. (a) poderá recusar ou retirar o seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

Solicitamos sua autorização para que a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ-PE) possa utilizar as informações obtidas neste estudo em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. Aceitando participar da pesquisa, o Sr. (a) concorda com o estoque (Linhagens de células e Banco de DNA) da amostra coletada para posterior estudo. Neste caso, o (a) senhor (a) será informado (a) da necessidade de utilizar a amostra em outra pesquisa.

Este documento será feito em duas vias, ficando uma em posse do participante e a outra com o coordenador da pesquisa.

Em caso de dúvidas ou outras informações posteriores o (a)Sr.(a) poderá entrar em contato com a equipe responsável, através dos telefones abaixo e caso exista a necessidade de apresentar recursos ou reclamações em relação à pesquisa poderá entrar em contato com o Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, através do telefone (81) 2101-2639, o qual tomará as medidas cabíveis.

Desejo ser informado se a amostra precisar ser analisada futuramente: () SIM () NÃO

data:

Nome do participante do estudo

data:

Suênia da Cunha Gonçalves de Albuquerque, Biomédica Fone:
Responsável pela pesquisa

data:

Milena de Paiva Cavalcanti, PhD Fone: 2101-2679
Coordenadora do projeto

TERMO DE ASSENTIMENTO DO MENOR

Eu, _____, em acordo com a decisão de meus pais e/ou responsáveis aceito participar da pesquisa sobre o sistema de defesa do corpo contra a Leishmaniose, e permito que meu sangue seja coletado para análise.

Assinatura do menor

data:

Suênia da Cunha Gonçalves de Albuquerque, Biomédica Fone: 8785-2246
Responsável pela pesquisa

data:

Mílina de Paiva Cavalcanti, PhD Fone: 2101-2679
Coordenadora do projeto

data:

APÊNDICE B - 1º Artigo relacionado publicado

Gonçalves-de-Albuquerque et al. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2014, **20**:16
<http://www.jvat.org/content/20/1/16>



RESEARCH

Open Access

Tracking false-negative results in molecular diagnosis: proposal of a triplex-PCR based method for leishmaniasis diagnosis

Suênia da Cunha Gonçalves-de-Albuquerque, Rômulo Pessoa e Silva, Rayana Carla Silva de Moraes, Lays Adrienne Mendonça Trajano-Silva, Carlos Gustavo Régis-da-Silva, Sinval Pinto Brandão-Filho and Milena de Paiva-Cavalcanti*

Abstract

Background: Molecular biological methods have become increasingly relevant to the diagnosis and control of infectious diseases, such as leishmaniasis. Since various factors may affect the sensitivity of PCR assays, including DNA yield and purity, an optimal extraction method is pivotal. Losses of a parasite's DNA during extraction may significantly impair its detection by PCR and lead to false-negative results. This study proposes a triplex PCR assay targeting the parasite's DNA, an external control (pUC18) and an internal control (G3PD) for accurate diagnosis of leishmaniasis.

Results: Two primer pairs were designed to detect the plasmid pUC18 and a triplex PCR assay targeting the *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA, the external control and the internal control was standardized. The triplex PCR assay was assessed for its ability to detect the three target DNA fragments simultaneously. PCR products from pUC18 DNA resulted in bands of 368 (P1) and 316 (P2) base pairs (bp). The triplex PCR optimized with the chosen external control system (P1) allowed the simultaneous detection of the internal control (G3PD – 567 bp) as well as of small quantities (10 pg) of the target parasite's DNA, detected by amplification of a 138 bp product.

Conclusions: The new tool standardized herein enables a more reliable interpretation of PCR results, mainly by contributing to quality assurance of leishmaniasis diagnosis. Furthermore, after simple standardization steps, this protocol could be applied to the diagnosis of other infectious diseases in reference laboratories. This triplex PCR enables the assessment of small losses during the DNA extraction process, problems concerning DNA degradation (sample quality) and the detection of *L. braziliensis* kDNA.

Keywords: Extraction control, Multiplex PCR, pUC18, Leishmaniasis, Diagnosis, False-negative result

Background

Methods in molecular biology have become extremely relevant to the diagnosis and control of infectious diseases, such as leishmaniasis. Information on DNA sequences has been extensively exploited for the development of polymerase chain reaction (PCR) based assays for various applications, including understanding of parasite genetics and diagnosis of parasitic diseases [1]. DNA analysis offers

advantages over traditional serological and parasitological methods, including decreased sample processing time and elimination of the need for culturing [2,3]. As a result, medical and veterinary diagnostic tools and public health laboratories worldwide are increasingly being called upon to introduce molecular diagnostic tests for both endemic and exotic diseases [4].

PCR and its variations (e.g., nested, multiplex, real-time) have contributed to the detection of disease agents in humans and animals, including *Leishmania* spp. with high sensitivity and specificity [5-7]. Additionally, the possibility of combining multiple targets in the same assay enables

* Correspondence: mp@cpqam.fiocruz.br
 Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Recife, Pernambuco CEP 50670-420, Brasil



the identification of parasites to the species level, the evaluation of sample integrity and also PCR performance on pools of phlebotomine sandflies [8-12].

Recently, a duplex PCR assay was standardized to evaluate the integrity of the DNA template by amplifying the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (G3PD or GAPDH) of mammals in the same reaction for the diagnosis of *Leishmania* spp. infection [7]. The quality of the DNA samples extracted from blood and biopsies was evaluated by including a primer system to detect the G3PD gene in two standardized PCR assays for *L. infantum* (mVL) or *L. braziliensis* (mACL). The expression of this gene in all mammalian cells ensures its detection in samples whose conditions are suitable for diagnostic tests [13-15]. In the aforementioned study, the endogenous control was negative in 33% of the samples tested, demonstrating losses of reliability due to poor sample quality. In addition, some known positive samples, with quality assured by the G3PD detection, were PCR-negative for the main DNA target (*L. infantum*). These results indicated the necessity of not only ensuring the high quality of each individual sample, but also assessing possible losses of minimal amounts of the target parasite's DNA.

The extraction of nucleic acids from biological samples is a critical step and may result in losses of the target DNA [16]. Since various factors may affect the sensitivity of PCR assays, including DNA yield and purity, an optimal extraction method is essential. In recent years, commercial extraction kits have become available for blood and other biological specimens, such as skin. These kits perform direct cell lysis, speeding up sample processing and reducing the potential of variability, which has led to common use. However, extraction protocols often suffer from inadequacies including incomplete cell lysis, DNA binding to surfaces, poor DNA recovery and the co-extraction of salts and proteins that inhibit DNA-DNA hybridization and enzymatic reactions [16,17].

Realizing the importance of DNA extraction for the proper functioning of PCR-based methods, several groups have evaluated the efficiency of commercial kits for different types of samples [16,18-20]. Nevertheless, the most common PCR protocols monitor the sample quality by spectrophotometric determination of DNA or in separate reactions, neither controlling for PCR inhibition nor confirming successful DNA extraction recovery, ultimately increasing the costs and chances of false-negative results. Conversely, the detection of a known-to-be-present DNA sequence in the sample may reveal possible losses of genetic material during the purification process, thus enabling a more correct interpretation of the PCR results. Therefore, to refine the molecular diagnosis of human and canine leishmaniasis, this study assessed a molecular triplex PCR assay by targeting an external control (a commercial

plasmid), an internal control (a housekeeping gene) and the target parasite's DNA (*L. braziliensis* kinetoplast DNA).

Compared to the traditional PCR protocols, the protocol presented herein allows a better interpretation of PCR results and promote quality assurance of the leishmaniasis diagnosis. The cost-benefit ratio is improved by ensuring the quality of results sample-by-sample, along with the simultaneous detection of *Leishmania* spp. Performing three PCRs in one mixing saves reagents, which makes it a rational decision for repeating reactions. Additionally, this method may be adapted for the molecular diagnosis of any infectious disease, providing fast results with a small margin of error.

Methods

Blood samples and controls

Human and canine blood samples were collected from one healthy person and two healthy dogs and used as controls. These samples were used to produce known negative and positive controls for the optimization tests. Informed consent was obtained from the dogs' owners and the person included in the study, and all procedures were approved by the Research Ethics Committee (CEP-FIOCRUZ/PE, 42/2010) and by the Ethics Committee for Animal Use (CEUA-FIOCRUZ/RJ, LW-41/10 and LW-1/11) of our institution. As positive controls, a blood sample from a healthy dog and one from the human were spiked with genomic DNA of *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903): $\sim 4.5 \times 10^3$ parasites/mL were used, considering the detection limit (mACL = 10 pg) of the duplex PCR as determined previously [7].

DNA extraction by commercial kit

Blood DNA extraction was performed using a commercial kit (illustra® blood genomicPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare, USA), following the manufacturer's instructions and comprising five basic steps: blood cell lysis, load and bind, wash 1, wash 2, and elution. After protein degradation and cell lysis, before the second step (load and bind), the plasmid pUC18 was added according to the predetermined limit of detection.

Plasmid pUC 18, primers design and multiplex PCR standardization

The commercial plasmid pUC18 (Boehringer Mannheim, Brazil) was used to assess DNA losses during the extraction process. Two primer pairs (P1-P1f: 5'-GTAATAGCG AAGAGGCC-3'; P1r: 5'-TAAGAAACCATTATTATC-3' and P2-P2f: 5'-TTGTACTGAGAGTGCAC-3'; P2r: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') were designed based on two sequences available in GenBank [GenBank: L08752] and [Genbank:L09136]. PCR trials were conducted to evaluate the performance of the two pUC18 detection

systems. Non-template control (NTC) and three different concentrations of pUC18 were included in each PCR run. Based on these preliminary results, the primer pair with the best performance was chosen to compose the triplex system. The detection limit of the PCR was assessed by testing ten-fold serial dilutions (from 50 ng/ μ L to 0.5 fg/ μ L) of pUC18. Concentrations between 1 and 20 μ M of the forward (P_f) and reverse (P_r) primers were tested to determine the optimal amount of primers to be included in the duplex PCR reactions for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis (mACL) [7].

For the first triplex PCR trials, according to the preliminary results, the plasmid pUC18 was added to negative and positive controls whereas each primer (P_f and P_r) was added to the mACL master mix, containing the primers previously designed [7] for internal control detection (G1_f: 5'-ATCTTCCAGGAGCGAGATCCC-3'; G2_r: 5'-CTGCTTACCACCTTCTTGAT-3'). The primers kDNA_f (5'-ATGCCTCTGGGTAGGGGCGTTC-3') and kDNA_r (5'-GGGAGCGCGCCCACTATATT-3'), designated as kDNA1 system, were designed by our research group to detect the conserved region of the *L. braziliensis* kDNA. The standardization process was performed by analyzing the results of the interactions among the systems P_f/P_r; G3PD (endogenous control), and kDNA1. When necessary, changes were made in the cycling conditions by testing different annealing and extension temperatures performed in the Eppendorf Mastercycler gradient (Eppendorf AG, Germany). To assess the best conditions for the triplex PCR, different amounts of each reagent (dNTP, MgCl₂ and recombinant *Taq* DNA Polymerase, Invitrogen, Brazil) were also evaluated.

Specificity of primer pairs on triplex assays

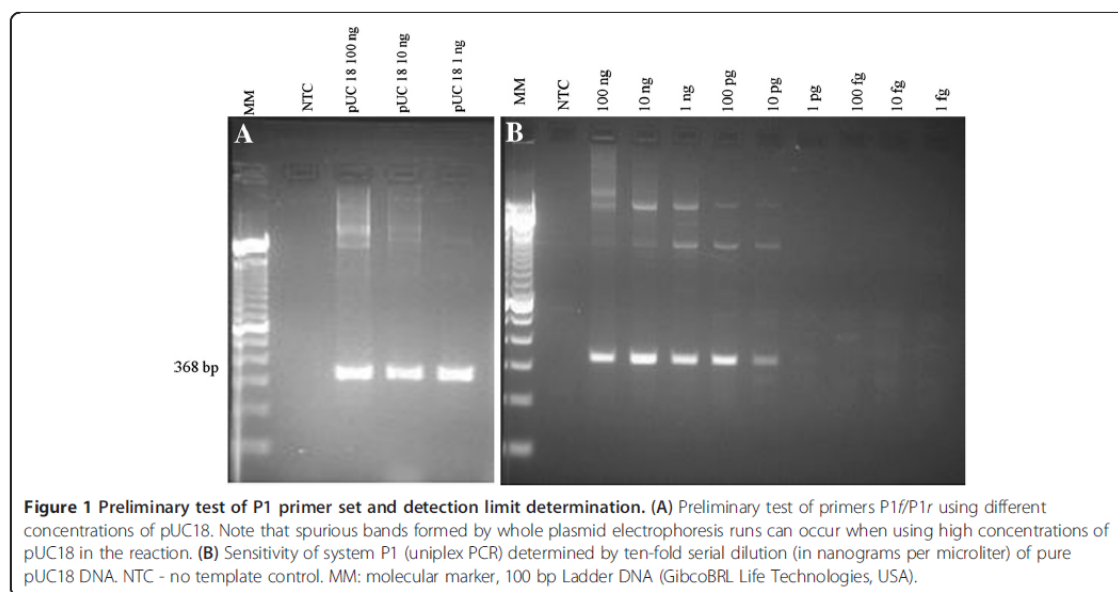
To evaluate the specificity of the primers in a triplex PCR format, a sample containing the three targets (*L. braziliensis*, G3PD gene, and pUC18) was subjected to PCR amplification by the three primer sets (kDNA1, G3PD and P1) separately, under standardized conditions. The PCR products obtained by this experiment were purified and sequenced using an automatic sequencer (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA). The obtained sequences were analyzed using BioEdit software (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) and compared with similar nucleotide sequences available in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Gel electrophoresis and documentation

Amplicons were resolved in 1.5% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide (10 mg/mL). A 100 bp Ladder DNA (GibcoBRL Life Technologies, USA) was used as the molecular marker. Gel pictures were taken using a Kodak MI GL100 Imaging System.

Results

The sequences of the two primer pairs targeting the plasmid pUC18 were: P1_f (5'-CGTAATAGCGAAGAGGCC-3') and P1_r (5'-TAAGAAACCATATTATC-3') for the system P1; and P2_f (5'-TTGTACTGAGAGTGCAC-3') and P2_r (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') for the system P2. Amplicons from pUC18 DNA resulted in bands of 368 (P1) and 316 (P2) base pairs (bp), being suitable for multiplex PCR with G3PD (567 bp) and kDNA1 (138 bp). Based on its excellent performance (Figure 1 – A), the system P1



was chosen to compose the triplex PCR. The system P2 was not reproducible. The uniplex PCR carried out with pure pUC18 DNA was able to detect a concentration as low as 5 pg/ μ L (total of 10 pg per reaction mixture) as shown in Figure 1 – B. The lowest amount of primers that held this sensitivity (10 μ M of each of them) was chosen to compose the first triplex PCR trials.

The observation of competition among primer pairs and target templates indicated a necessity to modify some conditions of mACL and P1 standardized initially. Simultaneous amplification of 10 pg per reaction pUC18, G3PD, and *L. braziliensis* was obtained under the following conditions: Taq Polymerase Buffer (0.7 μ M Tris-HCl, 1.8 nM KCl, pH 8.4), 5.6 nM MgCl₂, 40 nM dNTPs, 2 μ M of each primer kDNA/kDNAr1, 5 μ M of each primer G1F/G2R, 20 μ M of each primer Pf/Pr, 10 U of Taq polymerase and 2 μ L of DNA template.

Sequences of amplicons generated with the system P1 showed high homology (100% identity) with pUC18 cloning vector [GenBank: L08752.1]. High homologies (100% identity) were also found with other cloning vectors [GenBank: JX069764.1, JQ927446.1, HQ207194.1, and FJ389180.1] and with *Bacillus subtilis* [GenBank: CP002468.1]. As to G3PD, the highest homology (75%) was found with a sequence of a human x-linked GAPD pseudogene [GenBank: X01111.1]. The kDNA1 product presented 94% similarity to a sequence of *L. braziliensis* strain MHOM/BR/75/M2904 [GenBank: FR799010.1]. Identities between 88% and 93% were also found with other species of the subgenus *Viannia* (*L. peruviana*, *L. guyanensis*, and *L. panamensis*) (data not shown).

Discussion

The purpose of this work was to suggest a method to track possible causes of false-negative results in microbiological diagnosis by PCR, requiring minimal technical training. The triplex PCR assay proposed herein provides a rapid molecular tool to assess the occurrence of false-negative results by detecting simultaneously two quality controls and the target parasite's DNA simultaneously.

In theory, the differences in the guanine and cytosine (GC) contents of primers used (e.g., P1 and kDNA1) could interfere in the annealing temperatures for each primer pair and eventually affect the triplex PCR performance. However, no interference was observed under the standardized conditions.

A lack of reproducibility of the P1 in detecting the extraction control was observed only in positive samples. Depending on the parasitic load in the positive specimens, the early amplification of the parasite's DNA consumes the reagents, leading to no amplification of the DNA reporter. Indeed, the P1 system gave reproducible results during the optimization process in *L. braziliensis*-negative samples, being helpful in diagnosis interpretation and thus

achieving the proposed aim. Even minimal losses of genetic material may affect significantly the detection of the parasite's DNA, which is often found in small quantities, leading to incorrect diagnostic conclusions. As a recognized limitation, high molecular weight bands could be observed in agarosis gels, representing excess and/or folding of pUC 18 plasmid in the samples. However, the appearance of these bands does not confuse the interpretation of the results, as the amplicon size of each system is well known and was demonstrated by sequence analysis to be specific.

Against this background, this new tool provides a more reliable interpretation of the PCR results, as shown in Table 1, especially by virtue of contributing to quality assurance of leishmaniasis diagnosis. Furthermore, after simple standardization steps, this protocol could be applied to the diagnosis of other infectious diseases in reference laboratories.

While competition between targets was recorded initially, changes in the PCR conditions allowed us to eliminate competition problems, even while maintaining the detection limit (18 parasites per reaction), previously obtained with the mACL duplex system [7]. The simultaneous amplification of three different targets may interfere in the detection limit of PCR as compared with simplex PCR protocols, which may be able to detect minimal amounts of the parasite's DNA [21]. The main advantage of the triplex assay presented herein is the amplification of three different targets to ensure the quality of the result. The analysis of DNA sequences showed no cross-amplification among the three primer pairs included in the triplex PCR assay. Primers designed to detect the plasmid pUC18 and the housekeeping gene G3PD did not amplify *Leishmania* spp. DNA, thereby reducing the possibilities of false-positive results to zero. Interestingly, BLASTn searches revealed that the pUC18 sequence was similar to sequences of other plasmids, which are based on the pUC18 sequence and could also be tested and optimized, according to the availability in each laboratory or research group.

The continuous refinement of PCR technologies (e.g., introduction of robotics) and the increasing demand for rapid and efficient diagnostic tools are leading to an overall reduction of costs, making PCR-based methods more accessible [22,23]. As occurs with other diagnostic methods (e.g., serology), PCR-based methods are also liable to false-positive (e.g., due to background DNA contamination) and false-negative results. False-negative results may be attributable to many factors, including low amount of template DNA in the test sample, inadequate removal of PCR inhibitors, ineffective release of microbial DNA content from the host cells, and poor DNA recovery after extraction and purification steps. As a possible solution to clarify the presence of inhibitors or degraded target DNA

Table 1 Interpretation and actions suggested after observation of different positivity combinations of the quality controls and *Leishmania* spp. main target in the triplex PCR reaction

Result/PCR target positivity	Interpretation/meaning	Action
G3PD 567 bp (+) pUC 316 bp (+) <i>L. braziliensis</i> 138 bp (+)	Valid results for parasite diagnosis	Conclude diagnostic test observation
G3PD 567 bp (+) pUC 316 bp (-) <i>L. braziliensis</i> 138 bp (+)	Valid results for parasite diagnosis despite small loss of DNA in extraction	Conclude diagnostic test observation
G3PD 567 bp (-) pUC 316 bp (+) <i>L. braziliensis</i> 138 bp (+)	Valid results for parasite diagnosis despite small degradation of sample	Conclude diagnostic test observation
G3PD 567 bp (-) pUC 316 bp (-) <i>L. braziliensis</i> 138 bp (-)	Degradation of DNA sample/presence of PCR inhibitors and/or whole DNA loss during extraction	Repeat diagnostic procedure since the blood sample collection
G3PD 567 bp (-) pUC 316 bp (+) <i>L. braziliensis</i> 138 bp (-)	Degradation of DNA sample before extraction	Repeat diagnostic procedure since the blood sample collection
G3PD 567 bp (+) pUC 316 bp (-) <i>L. braziliensis</i> 138 bp (-)	Significant DNA loss (affecting mainly parasite genome) during extraction process	Repeat the DNA extraction procedure
G3PD 567 bp (+) pUC 316 bp (+) <i>L. braziliensis</i> 138 bp (-)	True negative result for <i>Leishmania</i> detection assured by the positivity of quality controls	Conclude diagnostic test observation

in samples, constitutive genes have been used in parallel assays to assess the integrity of the DNA template [7,15]. To improve the cost-benefit ratio and to shorten the time consumed by this evaluation, we recently proposed a duplex PCR assay capable of detecting a housekeeping gene as an endogenous control [7]. Nevertheless, samples from patients with low parasite burden may contain minimal amounts of a parasite's DNA, which may be even more profoundly affected by degradation or losses during the pre-PCR stages. This fact suggests the need to include additional internal controls to monitor possible failures during critical steps, such as DNA purification. The addition of a reporter DNA template may indicate the presence of *Taq* DNA polymerase inhibitors and degraded microbial DNA, as well as losses of small DNA amounts during the extraction and purification processes.

The advantages of using internal or external controls have been demonstrated with various types of clinical samples [24-28]. For instance, an external DNA recovery standard has been developed for the determination of DNA recovery efficiency in soil samples tested by quantitative PCR [16].

In addition, the fact that the *L. braziliensis* kDNA amplicon presented homology in relation to kDNA regions of

other *Viannia* species suggests that the primers and protocols reported in the study may be used directly or adapted for the detection of several species of these parasites.

Conclusions

The triplex PCR proposed herein enables the assessment of small losses during the DNA extraction process, problems concerning DNA degradation (sample quality) and the detection of *L. braziliensis* kDNA. To the best of our knowledge, no similar method has been applied to the molecular diagnosis of parasitic diseases using blood samples. An interesting insight of our group is the comparative analysis of the single PCR to the new triplex PCR protocol to maintain high diagnosis accuracy. This method may be applied to the molecular diagnosis of any infectious disease, providing quicker results with minimal margin of error.

Ethics committee approval

The present study was approved by the Ethics Committee for Animal Use (CEUA- FIOCRUZ/RJ), LW-41/10 and LW-1/11) of Oswaldo Cruz Foundation.

Consent

Informed consent was obtained from the dogs' owners and the person included in the study. Moreover, all procedures were approved by the Research Ethics Committee of Oswaldo Cruz Foundation (CEP-FIOCRUZ/PE, 42/2010).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MPC is the lead researcher of this study. MPC, SCGA and RPS designed the study. MPC and CGRS designed primers and gave intellectual support for this work. RPS, RCSM, LAMTS and SCGA performed experiments and their analysis. SCGA carried out the molecular genetic studies, analyzed amplicon sequencing and drafted the manuscript. SPBF and all authors read and approved the final version of this manuscript.

Acknowledgments

Thanks to the Program of Technological Development in Health Supplies (PDTIS/Fiocruz) for allowing us to use its facilities, and to the State of Pernambuco Research Foundation (FACEPE), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/PAPES VI and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for financial support.

Received: 17 October 2013 Accepted: 7 April 2014

Published: 22 April 2014

References

- Schallig HJDFH, Oskam L: Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop Med Int Health* 2002, **7**(8):641–651.
- Ogram AV, Saylor GS: The use of gene probes in the rapid analysis of natural microbial communities. *J Ind Microbiol* 1988, **3**(5):281–292.
- Tsai YL, Olson BH: Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl Environ Microbiol* 1991, **57**(4):1070–1074.
- Frank E: Funding the public health response to terrorism. *BMJ* 2005, **331**:378–379.
- Akhavan AA, Mirhendi H, Khamesipour A, Alimohammadian MH, Rassi Y, Bates P, Kamhawi S, Valenzuela JG, Arandian MH, Abdoli H, Jalali-zand N, Jafari R, Shareghi N, Ghanei M, Yaghoobi-Ershadi MR: *Leishmania* species: detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. *Exp Parasitol* 2010, **126**(4):552–556.
- Paiva-Cavalcanti M, Régis-da-Silva CG, Gomes YM: Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2010, **16**(4):537–542 [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S167891992010000400004&script=sci_abstract]
- Gonçalves SC, Régis-da-Silva CG, Brito MEFC, Brandão-Filho SP, Paiva-Cavalcanti M: Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of leishmaniasis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2012, **8**(2):188–197 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992012000200009]
- Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N: Single-Step multiplex PCR assay for characterization of new world *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol* 1998, **36**(7):1989–1995.
- Jorquera A, González R, Marchán-Marcano E, Oviedo M, Matos M: Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005, **100**(1):45–48.
- Rodríguez-González I, Marín C, Longoni SS, Mateo H, Alunda JM, Minaya G, Gutiérrez-Sánchez R, Vargas F, Sánchez-Moreno M: Identification of New World *Leishmania* species from Peru by biochemical techniques and multiplex PCR assay. *FEMS Microbiol Lett* 2007, **267**(1):9–16.
- de Pita-Pereira D, Cardoso MA, Alves CR, Brazil RP, Britto C: Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Trop* 2008, **107**(1):66–69.
- Oliveira DM, Reinhold-Castro KR, Bernal MV, Legriffon CM, Lonardoni MV, Teodoro U, Silveira TG: Natural infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania (Viannia)* spp. in the state of Paraná, southern Brazil, detected by multiplex polymerase chain reaction. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011, **11**(2):137–143.
- Gilsbach R, Kouta M, Bönisch H, Brüss M: Comparison of *in vitro* and *in vivo* reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *Biotechniques* 2006, **40**(2):173–177.
- Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Galdin M, Roura X, Alberola J: Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2007, **147**(3–4):315–319.
- Castilho TM, Camargo LM, McMahon-Pratt D, Shaw JJ, Floeter-Winter LM: A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Trop Med Hyg* 2008, **78**(1):122–132.
- Mummy KL, Findlay RH: Convenient determination of DNA extraction efficiency using an external DNA recovery standard and quantitative-competitive PCR. *J Microbiol Methods* 2004, **57**(2):259–268.
- Alm EW, Zheng D, Raskin L: The presence of humic substances and DNA in RNA extracts affects hybridization results. *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**(10):4547–4554.
- Coyne SR, Craw PD, Norwood DA, Ulrich MP: Comparative analysis of the Schleicher and Schuell IsoCode Stix DNA isolation device and the Qiagen QIAamp DNA mini Kit. *J Clin Microbiol* 2004, **42**(10):4859–4862.
- Whitehouse CA, Hottel HE: Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Francisella tularensis* DNA from spiked soil samples. *Mol Cell Probes* 2007, **21**(2):92–96.
- Dauphin LA, Walker RE, Petersen JM, Bowen MD: Comparative evaluation of automated and manual commercial DNA extraction methods for detection of *Francisella tularensis* DNA from suspensions and spiked swabs by real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011, **70**(3):299–306.
- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL: PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003, **47**(1):349–358.
- Livengood CH 3rd, Wrenn JW: Evaluation of COBAS AMPLICOR (Roche): accuracy in detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by coamplification of endocervical specimens. *J Clin Microbiol* 2001, **39**(8):2928–2932.
- Yang S, Rothman RE: PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis* 2004, **4**(6):337–348.
- Reiss RA, Rutz B: Quality control PCR: a method for detecting inhibitors of Taq DNA polymerase. *Biotechniques* 1999, **27**(5):920–926.
- Cubero J, van der Wolf J, van Beckhoven J, López MM: An internal control for the diagnosis of crown gall by PCR. *J Microbiol Methods* 2002, **51**(3):387–392.
- Lund M, Madsen M: Strategies for the inclusion of an internal amplification control in conventional and real time PCR detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples. *Mol Cell Probes* 2006, **20**(2):92–99.
- Murphy NM, McLauchlin J, Ohai C, Grant KA: Construction and evaluation of a microbiological positive process internal control for PCR-based examination of food samples for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Int J Food Microbiol* 2007, **120**(1–2):110–119.
- Leblanc-Maridor M, Garénaux A, Beaudreau F, Chidaine B, Seegers H, Denis M, Bellocc C: Quantification of *Campylobacter* spp. in pig feces by direct real-time PCR with an internal control of extraction and amplification. *J Microbiol Methods* 2011, **85**(1):53–61.

doi:10.1186/1678-9199-20-16

Cite this article as: Gonçalves-de-Albuquerque et al.: Tracking false-negative results in molecular diagnosis: proposal of a triplex-PCR based method for leishmaniasis diagnosis. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2014 **20**:16.

APENDICE C - 2º Artigo relacionado publicado



The Equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on Immunopathogenesis of Leishmaniasis

Suênia da C. Gonçalves-de-Albuquerque*, Rômulo Pessoa-e-Silva, Lays A. M. Trajano-Silva, Tayná Correia de Goes, Rayana C. S. de Moraes, Cintia N. da C. Oliveira, Virginia M. B. de Lorena and Milena de Paiva-Cavalcanti*

Department of Microbiology, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Heinrich Komer,
University of Tasmania, Australia

Reviewed by:

Hira Nakhasi,
Center for Biologics Evaluation and
Research (FDA), United States
Julia Walochnik,
Medical University of Vienna, Austria

*Correspondence:

Milena de Paiva-Cavalcanti
mp@cpqam.fiocruz.br;
Suênia da C. Gonçalves-de-
Albuquerque
sueniaaa@hotmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 03 July 2017

Accepted: 16 October 2017

Published: 30 October 2017

Citation:

Gonçalves-de-Albuquerque SdC,
Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM,
de Goes TC, de Moraes RCS,
da C. Oliveira CN, de Lorena VMB
and de Paiva-Cavalcanti M (2017)
The Equivocal Role of Th17 Cells and
Neutrophils on Immunopathogenesis
of Leishmaniasis.
Front. Immunol. 8:1437.
doi: 10.3389/fimmu.2017.01437

Advances in the understanding of leishmaniasis progression indicate that cellular interactions more complex than the Th1/Th2 paradigm define the course of infection. Th17 cells are a crucial modulator of adaptive immunity against *Leishmania* parasites acting mainly on neutrophil recruitment and playing a dual role at the site of infection. This review describes the roles of both these cell types in linking innate defense responses to the establishment of specific immunity. We focus on the Th17–neutrophil interaction as a crucial component of anti-*Leishmania* immunity, and the clinical evolution of cutaneous or visceral leishmaniasis. To date, information obtained through experimental models and patient evaluations suggests that the influence of the presence of interleukin (IL)-17 (the main cytokine produced by Th17 cells) and neutrophils during *Leishmania* infections is strictly dependent on the tissue (skin or liver/spleen) and parasite species. Also, the time at which neutrophils are recruited, and the persistence of IL-17 in the infection microenvironment, may also be significant. A clearer understanding of these interactions will enable better measurement of the influence of IL-17 and its regulators, and contribute to the identification of disease/resistance biomarkers.

Keywords: cutaneous leishmaniasis, visceral leishmaniasis, immunity, T helper 17, interleukin-17, neutrophil, immunopathogenesis

INTRODUCTION

Leishmania parasites are transmitted to mammals by female phlebotomine sandflies and cause a group of diseases with symptoms defined mainly by the parasite species and the host's ability to develop and control immune responses (1). Sickness results from uncontrolled infection, and the wide spectrum of clinical manifestations (from healing cutaneous lesions to fatal visceral infections) is associated with the parasite species involved, among other factors (2). The main clinical forms are cutaneous (e.g., *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, *Leishmania mexicana*, and *Leishmania braziliensis*), mucocutaneous (e.g., *L. braziliensis*), and visceral (*Leishmania donovani* and *Leishmania infantum*) leishmaniasis (3). Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe form and may compromise important organs and tissues, such as the liver, spleen, bone marrow, and lymph nodes, leading to hepatosplenomegaly, lymphadenopathy, anemia, constant fever, and immunosuppression (4). Cutaneous leishmaniasis (CL) is characterized in most cases by well-delimited ulcerated skin lesions with raised borders (5). Mucocutaneous leishmaniasis (ML) usually compromises mucosal regions of the nose, mouth, and pharynx, and is associated with disfiguring and psychosocial sequelae (6, 7). There are estimated to be 12 million people currently

living with leishmaniasis, and the World Health Organization estimates that there are approximately 0.7–1.2 million new cases of CL and 0.2–0.4 million cases of VL per year (6). While CL and ML are associated with social stigma, VL may result in fatality rates of 10–20% if not treated (6).

The parasites have a digenetic lifecycle and two distinct morphologies: the promastigote in the sandfly vector midgut, and the amastigote in mammalian host phagocytes. The motile, flagellated promastigotes exist, multiply, and develop extracellularly in the alimentary tract of blood-sucking female sandflies and are transmitted into the mammalian host during blood meals. Inside the host, they infect macrophages in the reticuloendothelial tissue and differentiate into non-motile amastigotes, and multiply as such in phagolysosomal vacuoles (8).

The interaction of inflammatory and regulatory responses delimited by cell-mediated immune responses drives disease expression and may result in asymptomatic infection, self-healing, or chronic leishmaniasis (1). Pathogenesis follows a complex set of interactions between factors triggered by the host's innate and acquired immune responses, which are strongly influenced by some aspects such as the host's genetic background (9, 10), infecting species, dose and route of inoculation (1), and sandfly saliva components (8). Only 2–3% of individuals infected with parasites of the *Viannia* subgenus (*L. braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania panamensis*, and *Leishmania peruviana*) develop skin lesions (11) and less than 10% of those infected with *L. donovani* or *L. infantum* develop active VL (12). The relationship established between *Leishmania* parasites and the vertebrate host can lead to a self-healing infection or to the clinical manifestations of leishmaniasis with different severity grades (4). The inflammatory responses mediate disease presentation and, in both forms of the disease, the different clinical manifestations are a function of parasite replication and the efficacy of the immune response generated (5). Clinical cure is associated with the activation of macrophages into a leishmanicidal state mediated by some specific proinflammatory cytokines (1). However, there is as yet no consensus on the mechanisms that lead to susceptibility in humans.

Cellular immunity generated by the T helper type 1 profile is considered to be the key mediator of resistance to *Leishmania*. A protective immune response against CL caused by *L. major*, *L. mexicana*, or *Leishmania amazonensis*, as well as VL caused by *L. donovani* or *L. infantum*, depends on the development of the proinflammatory T cell profile (13). However, exacerbated Th1 responses may cause severe tissue damage and are also responsible for the clinical presentation of the disease. High levels of Th1 cytokines in people with localized CL lesions are associated with disease outcome, because individuals infected with *L. braziliensis*, who do not develop the disease, produce less interferon (IFN) γ and tumor necrosis factor (TNF) (14). *L. braziliensis* infections are characterized by excessive production of proinflammatory cytokines such as IFN γ , TNF and interleukin (IL)-6 (12) and have lower levels of Foxp3⁺ cells (regulatory lineages) and IL-10 than those infected by other *Leishmania* species (15). In fact, the absence of IL-10-mediated regulation of Th1 is more significant in disease development due to *L. braziliensis* infection than the Th2 polarization itself (16). Indeed, high levels of IL-4 are not

observed in patients with severe diffuse CL, suggesting Th2 responses may have less influence on disease progression in humans than in animal models (17).

Interleukin-10 is an important regulatory cytokine that inhibits phagocytosis and affects the ability of macrophages to kill intracellular parasites, contributing to the growth and spread of *Leishmania* (18). IL-10 sources have been identified as CD4⁺/CD25⁺ T cells (Th2) (19, 20), CD4⁺/CD25⁻/FoxP3⁺ regulatory T cells (Tregs) (21), and CD4⁺/CD25⁻/FoxP3⁻ T cells (Th1) (16), stimulated by the recognition of amastigote antibodies (22). Together with other cytokines from these regulatory populations, IL-10 plays a central role in promoting an alternative kind of macrophage activation, which increases arginase expression and facilitates parasite expansion (13).

A successful cellular immune response, which allows parasite elimination without tissue damage, requires a balance between the set of cytokines secreted in the cellular response, beginning with the recognition of the parasite by antigen-presenting cells (APCs) and antigen presentation, the production of Th1 differentiation cytokines, the activation of IFN γ /TNF-producing Th1 cells, and classical macrophage activation (23), ending with the activation of Th2 cells, which mainly secrete IL-10 and block nitric oxide (NO) production by macrophages (13). However, even in the presence of effector molecules such as IFN γ , TNF, and NO during active disease in humans, parasite multiplication persists in many cases. Ansari et al. (24) suggested that despite high IFN γ levels during *L. donovani* infection, the host fails to control the disease due to an incomplete response to IFN γ . Similarly, high titers of TNF have been observed in sera from patients with active VL and diffuse CL, characterized by high parasite loads (25). The biological network acting for equilibrium between parasite clearance and tissue preservation in humans involves substantial participation from effector T cells other than Th1 and Th2 (26).

Helper T cell responses are now known to include four T cell subsets: Th1, Th2, Th17, and Tregs. Th17 cells have recently emerged as an independent T cell subset that may play an essential role in protecting against certain extracellular pathogens (27). However, this relatively newly discovered (28) T cell population has been demonstrated to influence the balance between inflammatory and anti-inflammatory cytokines, which must be orchestrated in the course of infection to guide a successful effector response to the intracellular *Leishmania* protozoa (13). Particular interest in the Th17 type remains focused on its main cytokine, IL-17. Although it is also produced by other cells including CD8⁺ T cells and neutrophils, IL-17 is mostly produced by Th17 cells. IL-17 is part of a complex mechanistic web that involves up- and downregulation of anti- and proinflammatory cytokines as well as interferences in the genetic background of the host. Furthermore, IL-17 performs an important function in neutrophil recruitment (29). Since neutrophils are regarded as an important element during *Leishmania* infection (30–33), it would be reasonable to consider that Th17 cells might have a significant role in the complex diseases caused by these parasites. The crosstalk between the neutrophils and APCs present at the site of infection contributes to the type and magnitude of the specific immune response that will develop (30, 34). Nevertheless,

at the site of infection, the protecting or damaging role of the neutrophil depends on the parasite species, host, and phase of infection (35). Thus, the effects of Th17/IL-17 are still unclear, as disease-promoting and protective responses have both been attributed to their influence. In this scenario, the Th17 cell activities in the context of the different clinical forms of leishmaniasis, interaction with regulatory cytokines, as well as host particularities, remain to be explored (13, 36).

Although many excellent reviews have discussed the cellular immune responses elicited against the different forms of leishmaniasis (35, 37, 38) or the roles of Th17/IL-17 in infectious and non-infectious diseases (39–42), reviews of the participation of IL-17 and Th17 participation in immunopathogenesis and control of the main clinical forms of leishmaniasis remain scarce (36). In the present review, we identify the Th17–neutrophil interaction as a crucial component of anti-*Leishmania* immunity. A better understanding of immune complexity will contribute to the identification of disease/resistance biomarkers and influence the development of vaccines and immunotherapies for leishmaniasis.

Th17 CELLS AND IL-17

The recent recognition of Th17 cells has provided new insights into the mechanisms that are important in autoimmune diseases and antimicrobial host defenses (28, 43). Th17 cells represent a subset of CD4 effector T cells distinct from Th1 and Th2 lineages, and mediate powerful effects on stromal cells; this results in the production of inflammatory cytokines and recruitment of leukocytes, especially neutrophils, creating a link between innate and adaptive immunity (29). *In vivo* studies indicate that IL-17 is an especially potent activator of neutrophils, both through expansion of the lineage and through their recruitment *via* chemokine expression regulation (44). IL-17 cooperates with other cytokines secreted by Th17 (such as IL-17E,¹ IL-21, and IL-22) to induce tissue inflammation, leading to different effector functions depending on the pathogen (47).

Th17 cell differentiation in both humans and mice is mediated by the activation of naïve T cells in the presence of a combination of TGF- β , IL-6, IL-1 β , and IL-23 (48, 49). IL-6 acts in concert with TGF- β to induce the development of Th17 effector cells. Together, TGF- β and IL-21 upregulate the IL-23 and IL-23 receptors, a decisive step in the full differentiation and maintenance of Th17 cells (50). Although the requirement of TGF- β for the classical generation of Th17 cells *in vitro* and *in vivo* has been demonstrated, as well as the endogenous production of TGF- β for autocrine stimulation (51), it has also been shown that Th17 cells can be generated independently of TGF- β (52), in an alternative manner. Thus, the availability of IL-23 and/or TGF- β has emerged as a determinant of Th17 effector phenotypes; in

other words, an abundance of TGF- β with a relative lack of IL-23 favors the generation of “classical” Th17 cells, while the presence of IL-23 alone promotes the generation of “alternative” Th17 cells. Transcription factors that are differentially expressed in “classical” vs. “alternative” Th17 cells will cause differential cytokine expression and effector functions. When “classical” Th17 cells were compared with alternatively induced Th17 cells, the “alternative” Th17 cells were more pathogenic (51, 52) (Figure 1).

Th17 differentiation is dependent on the steroid receptor-type nuclear receptor (ROR γ t) (47), as the transduction of naïve T cells with a retroviral vector containing ROR γ t induces the development of IL-17-producing T cells (53). The IL-23 receptor activates signal transducer and activator of transcription (STAT) 3, which induces ROR γ t (54). Conversely, in murine models, the generation of Th17 cells is inhibited by IL-4, IL-10, and IFN γ , possibly *via* downregulation of the IL-23 receptor (54, 55). The reciprocity of this antagonism from Th1/Th2 cells remains poorly understood, but as well as Th1 being counterbalanced by Th2 cells (56), Th17 cells are reciprocally related to Foxp3⁺ Tregs. The presence of TGF- β activates the transcription factor Foxp3 in naïve T cells, whereas the presence of IL-6 suppresses Foxp3, and combined with TGF- β induces ROR γ t, leading to Th17 differentiation. Thus, the balance between Th17 cells and Foxp3⁺ Tregs is mediated by the antagonistic interaction of the transcription factors Foxp3 and ROR γ t [reviewed by Korn et al. (47)].

Th17 is primarily known for its enhancement of host protection against extracellular bacteria and fungi, which requires robust inflammatory infiltrates that are not efficiently cleared by Th1 and Th2 responses (47, 57). IL-17 acts by activating iNOS and inducing the expression of granulocyte macrophage colony-stimulating factor, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF, and several chemokines, which collaborate to potentiate the inflammatory reaction (58). The induction of these inflammatory mediators suggests that IL-17 plays a role in intracellular parasite infections. Indeed, the differentiation of Th17 subsets has been noticed during infections of *Mycobacterium tuberculosis* (59), *Francisella tularensis*, and *Listeria monocytogenes* (60). The role of IL-17 is also essential for protection against *Trypanosoma cruzi* in the acute phase of Chagas disease (61, 62), suggesting that Th17 cells are important in the successful clearance of kinetoplastid protozoans such as *Leishmania*. However, although Th17 cells and IL-17 have been shown to protect against some intracellular pathogens including *Leishmania* (63, 64), many recent findings point to them as being responsible for excessive inflammation and pathology (65, 66). Currently available data from VL and CL studies are discussed below.

IL-17 in VL

Active VL is associated with the upregulation of Th2 cytokines and disease progression. Neutrophil depletion during experimental VL results in enhanced parasite loads (67). The effector role of IL-17A is mediated by the accumulation of neutrophils, the enhancement of IFN γ secretion, and the increased production of antimicrobial peptides, acute phase proteins, mucins,

¹IL-17 is the founding member of the IL-17 family of cytokines, which comprises IL-17A (commonly known as IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (also called IL-25), and IL-17F (45). The most widely investigated and understood cytokines of this family are IL-17A and IL-17E, which play an essential role in host defenses against microbial infections and are implicated in various inflammatory conditions such as autoimmune diseases, metabolic disorders, and cancer (46).

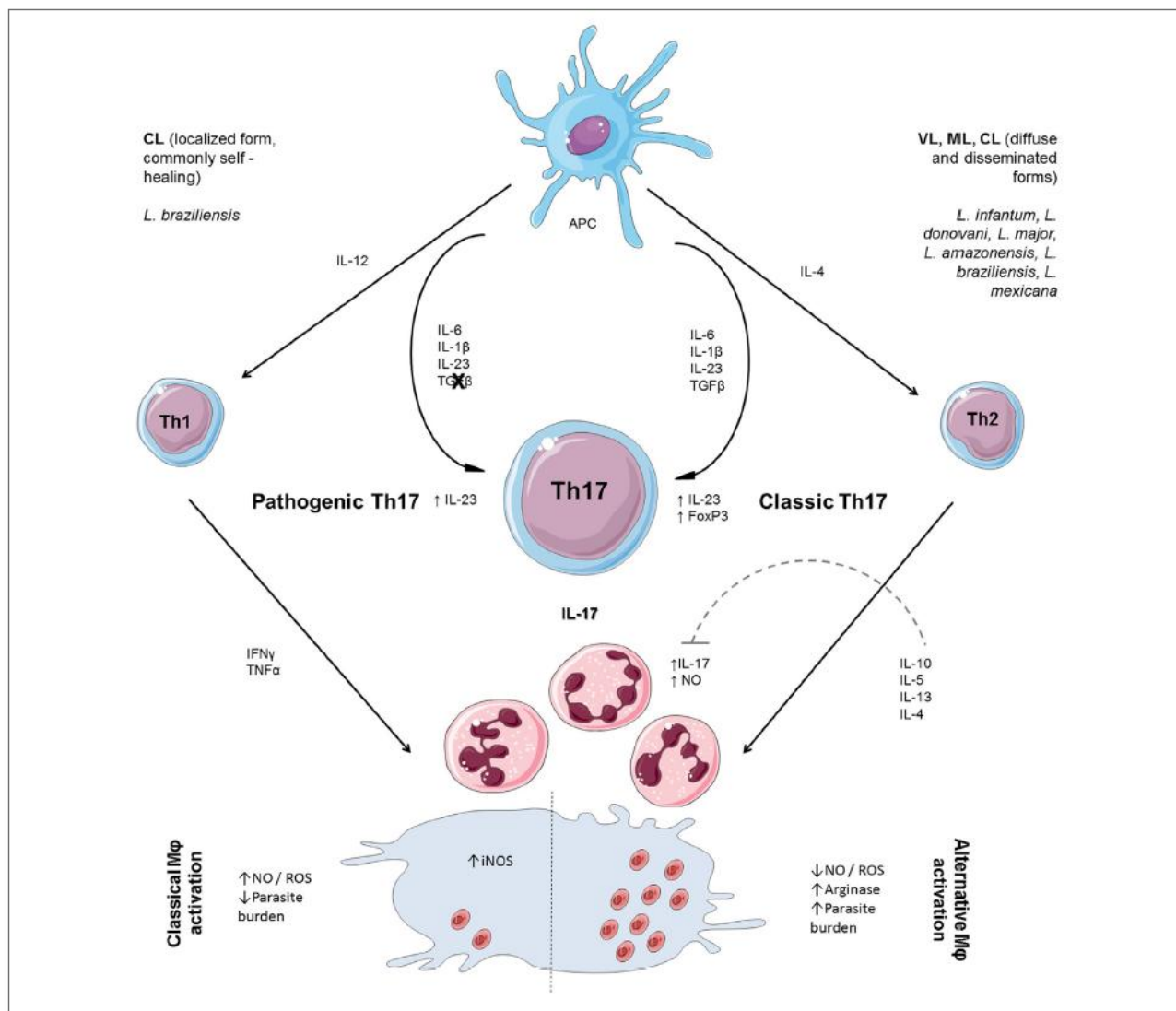


FIGURE 1 | T helper cell polarization and participation of neutrophils on effector responses to *Leishmania*. Th17 cell differentiation is mediated by activation of naïve T cells in a combination of TGF- β , interleukin (IL)-6, IL-1 β , and IL-23. TGF- β and IL-21 upregulate the IL-23 and IL-23 receptor, decisive for the maintenance of Th17 cells. Th17 cells can also be generated independently of TGF- β , in an alternative manner. When "classical" Th17 cells were compared with alternatively induced Th17 cells, the "alternative" Th17 cells were more pathogenic. Naïve CD4⁺ T cells differentiate to the Th1-cell lineage in the presence of IL-12. Interferon (IFN) γ secreted by Th1 activates inducible NO synthase (iNOS) and enhances production of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS), required for parasite clearance. The production of ROS in the infection microenvironment is enhanced by the presence of neutrophils recruited by IL-17 and, in the absence of IL-10 regulation, may worsen tissue injury. The secretion of IL-4 leads to transcription of Th2 genes (IL-10 and IL-13) broadly associated with susceptibility to *Leishmania* infection through alternative macrophage activation, favoring parasite persistence. IL-10 is an important regulatory cytokine that controls Th17 differentiation and regulates NO production. The influx of neutrophils plays a positive role by participating in parasite killing and is limited by the presence of IL-10.

and matrix metalloproteases (45). As IL-17 is associated with neutrophilic inflammation and enhancement of the proinflammatory response, the positive role of this cytokine in VL has been investigated. It is already known that *L. donovani* and *L. infantum* stimulate the differentiation of Th17 cells in peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects, as well as the production of IL-6 and IL-23 required for Th17 maintenance (68). A cohort study of individuals with VL showed that IL-17 is strongly associated with protection. This protective role is associated with the increase of CXCL chemokines, which serve

as potent chemoattractants for neutrophils and Th1 cells. Thus, naturally resistant subjects, showing greater IL-17 responses, would react more rapidly to *L. donovani*, not only by attracting innate immunity responses, but also by recruiting Th1 cells to tissues (68). In BALB/c mouse models of *L. donovani* infection, parasite clearance was associated with the secretion of Th1 cytokines along with IL-17 and IL-23. The blocking of stimuli by anti-IL-17 and anti-IL-23 led to increased parasite loads in the liver and spleen. Subsequent administration of recombinant IL-17 generated higher levels of IFN γ and NO than recombinant

IL-23 did, leading to a stronger association of IL-17 with parasite clearance (69). These data corroborated previous findings (68) that Th17 potentiates the Th1 response. Depending on the infectant parasite load, the speed of Th1 recruitment and the quantity of NO generation may determine disease progression or natural control.

mRNA analysis revealed greater IL-17A production in VL patients than in healthy controls, in a study performed by Nascimento et al. (55). In the same study, the highest production of IL-17A coincided with the parasitic peak in infected C57BL/6 mice. These data demonstrate the stimulation of IL-17 production by *L. infantum*, promoting the control of parasite replication by strengthening T helper type 1 responses and NO production. The authors also demonstrate that the absence of IL-17 signaling leads to the generation of a Treg/IL-10-dominated response and an impaired Th1 profile, resulting in parasite growth. However, although IL-17 receptor *knockout* mice were more susceptible to infection and also exhibited reduced inflammatory infiltration, the high levels of this cytokine observed in humans was not sufficient to generate IFN γ /NO levels that lead to natural recovery from VL (55). Thus, although the presence of this cytokine has been demonstrated, the significance of its participation in the effector response seems to be relative to the host.

Neutrophil influx mediated by IL-17A was revealed by Quirino et al. to be an important mediator of parasite clearance during VL (4). In this work, the authors indicate that IL-27 is an important regulator of Th1 and Th17 profiles in a VL mouse model. Composed of two subunits (IL-27p28 and Ebi3) that bind to IL-27 receptor, leading to STAT-1 (Th1) and -3 (Th17) activation, IL-27 plays a role in the regulation of the immune response (4). The authors observed that Ebi3^{-/-} mice present a peak in neutrophil migration at 4 weeks post-infection, both in the spleen and in the liver. These data reinforce the previous findings of Lopez Kostka et al. (70) that suggest that the IL-17–neutrophil axis has more of an influence in the recovery from VL infection after its establishment (when the antigens are already recognized and presented by DCs and macrophages) than in the prevention of infection. Neutrophils recruited by DCs in a toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent manner are efficient producers of NO and provide a prototypal Th1 and Th17 environment, leading to a decrease in parasite number in C57BL/6 mice infected with *L. infantum*. Furthermore, TLR2^{-/-} mice are unable to recruit neutrophils in this way and had higher levels of IL-10, indicating that a non-responsive neutrophil state is associated with parasite persistence (71). The presence of neutrophil infiltrate, however, may cause damage to the tissue, and seems to be most significant in skin, since the Th17 markers IL-23, IL-17, and ROR γ t were highly expressed during post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) compared with controls (72).

The cell source of IL-17A expression is another variant to be studied. IL-17A-knockout C57BL/6 mice are highly resistant to VL infection, showing fewer parasites in the liver and spleen. This phenotype was associated with enhanced IFN γ production by T cells and decreased accumulation of neutrophils and monocytes, resulting in fewer granulomas. The source of IL-17 was mainly $\gamma\lambda$ T cells, which commonly express markers for CD3, but not CD4 or CD8 (67), and are differentiated by IL-1 β

and IL-23, suggesting a different mode of activation to the conventional TGF- β and IL-6 that promote CD4⁺IL-17⁺ cells. IL-17 produced by $\gamma\lambda$ T cells suppresses NO-mediated parasite control in macrophages in the liver within 7 days of infection, contributing to susceptibility in C57BL/6 mice (73). The mechanisms that lead to counter-regulation between IFN γ and IL-17 secreted by $\gamma\lambda$ T cells remain to be elucidated.

IL-17 in CL

Leishmania infection strongly stimulates IL-17 production. Elevated levels of IL-17 have been measured in patients with CL and ML, showing that Th17 activation is generated by *L. major* (74, 75), *L. braziliensis* (64), *L. tropica* (26), *L. panamensis* (64), *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, and *Leishmania naiffi* (66) infections, acting on macrophage activation and neutrophil recruitment. However, clinical studies indicate differences in immune responses during CL between the subgenera *Viannia* and *Leishmania* (76). For example, higher levels of Th17 were found in the sera of patients infected with *L. (Viannia) guyanensis* than in those infected *L. (Leishmania) amazonensis* (66). Nevertheless, the mechanisms of immune evasion used by *L. amazonensis* are known to block cellular immune responses (37) and may also occur by decreasing Th17 activation. Thus, the influence of Th17/IL-17 on disease depends on the species. As studies on IL-17 are relatively recent, most performed to date have evaluated *L. major* models or *L. braziliensis* infections in patients. Comparing IL-17 participation in other *Leishmania* species seems, therefore, to be an interesting avenue of investigation.

Proinflammatory responses, especially Th1, are a required component in controlling leishmaniasis. However, in the case of CL and ML, the immune response itself contributes to lesion progress. In both these forms, patients develop intense inflammatory responses that damage tissues, despite the low number of parasites in lesions (25), so the disease is mostly associated with a failure of anti-inflammatory cytokine secretion, especially IL-10 (77). IFN γ and IL-17 levels are substantially elevated in mice lacking the capacity to respond to IL-10. According to Gonzalez-Lombana et al. (2), in these mice, IFN γ does not seem to contribute to pathology as much as IL-17, since the former promotes mostly monocyte infiltration, while the latter recruits neutrophils, constituting a nonspecific response. Interestingly, blocking IFN γ increases IL-17 level and pathology, supporting the hypothesis that, in C57BL/6 mice, IFN γ may be critical for downregulating the responses of IL-17 as well as IL-10 (2). In another study, self-healing of the infection in mice correlated with the expansion of IFN γ and IL-17-producing CD4 cells, suggesting the existence of other active mechanisms to regulate local inflammation (7).

In experimental models, lesion progression is related to IL-17-mediated neutrophil recruitment. During the course of infection with *L. major*, BALB/c (a susceptible strain) CD4⁺ cells and neutrophils produced more IL-17 than did cells from (resistant) C57BL/6 mice. IL-17-deficient mice had decreased neutrophil infiltration and smaller lesions than controls (70). Anderson et al. (74) found an association between severe pathology and the presence of IL-17⁺CD4⁺ cells, which was also linked

to an increase in cellular infiltrate expressing macrophage and neutrophil markers. However, despite contributing to lesion exacerbation, no beneficial effect of controlling parasite replication was observed. Conversely, neutrophils have been thought to contribute to parasite clearance in the early stages of experimental *Leishmania* infection (30), and their expression is closely, but not uniquely, related to IL-17 secretion (78). Thus, neutrophil participation must be better studied and linked to IL-17 associations with leishmaniasis. In resistant strains of mice, the number of polymorphonuclear leukocytes decreases to 2% within 72 h of infection, when the specific immune response is defined. In contrast, insusceptible BALB/c mice, neutrophils continue being recruited and have been detected in large numbers at the site of infection more than 10 days after parasite inoculation (30). Pedraza-Zamora et al. (79) showed that in BALB/c mice, Th17 cells and neutrophils both increased up to 90 days post-infection with *L. mexicana*. This suggests that chronic inflammation throughout *L. mexicana* infection is a consequence of neutrophil recruitment together with Th17 cell differentiation throughout the late phase of the infection. C57BL/6 mice show a more controlled response of these cells and a more resistant infection profile. Together, these data suggest that not only the level of IL-17 but also its persistence during infection resolution, is a decisive factor in disease progression. The excessive activation and maintenance of Th17 by the presence of neutrophils and Th1 may cause a damaging block of regulatory populations and IL-10 secretion, which is necessary to stop inflammation. For example, the study performed by Lopes Kostka et al. (70) suggested that DC-derived IL-23 maintains IL-17 production, thus being responsible for disease progression.

mRNA expression of ROR γ t and IL-17 is observed in patients with ML, and the synergy of IL-17 and IFN γ is suggested by a positive correlation between IL-17 and IFN γ mRNA expression in ML lesions caused by *L. major* (75), contrasting with the antagonism observed in C57BL/6 mice (2) mentioned earlier. Enzyme-linked immunosorbent assays showed that IL-17 secretion by peripheral blood mononuclear cells was elevated in patients with CL and ML compared with uninfected individuals, and downmodulated by IL-10 and TGF- β (65, 80) similarly to that seen with Th1/IFN γ , providing further evidence for the existence of IL-17/IFN γ synergy in humans. de Assis Souza et al. (63) showed that levels of IL-17 were significantly higher in patients infected by *L. braziliensis* during active disease than in those who recovered without intervention. Interestingly, the authors associated this decreased expression during healing to a suppressive role exerted by high NO levels. During treatment, NO levels decrease and allow more IL-17 secretion (63). In addition, the number of IL-17⁺CD4⁺ cells at lesion sites in patients with CL and ML directly correlates with the number of inflammatory cells, supporting their participation in neutrophil infiltration at lesion sites (65).

Although these important studies have linked the presence of IL-17 to more severe clinical presentations of disease, neutrophils are the first line of defense and are also capable of producing NO and killing parasites (32). Therefore, the presence of neutrophils in this inflammatory context can indicate either protection or injury. The reversal of immunodeficiency in *L. panamensis*-infected mice leads to an increase in IFN γ

and IL-17, allowing parasite control and elimination (64). This suggests that in the absence of anti-inflammatory cytokines (such as IL-10, IL-13, and IL-4), Th1/Th17 cells proliferate simultaneously and are responsible for parasite elimination, although neutrophil migration, and its role in this situation (3.5 weeks post-infection), was not assessed. This observation reinforces the differences in immunomodulation between parasite species. Interestingly, Nova et al. (81) also found a trend toward increased levels of IL-17 in human subclinical *L. braziliensis* infections compared with symptomatic CL, suggesting no pathological role of IL-17 in CL or ML. Although those authors associated spontaneous cure to a weak type 1 immune response (due to quick parasite control by innate immune responses), IL-17 levels were measured in the study only 96 h after soluble antigen stimuli, when the cellular immune response was probably being established. The expression of IL-27 (which can act as regulator of IL-17) was also higher in patients with CL caused by *L. braziliensis* than in subclinical individuals (81), reinforcing the idea that the Th17 profile contributed to cure in this study, and supporting a role of IL-17 in parasite depletion. Further investigations encompassing the absence of other IL-17 regulatory mechanisms (such as IL-13) in this situation are necessary.

NEUTROPHILS IN INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY TO *Leishmania*

Neutrophils are cells that operate in innate immunity as the first line of defense, and play an important role in the elimination of pathogens (82). Toxic granule release from the site of infection, secretion of cytokines, phagocytosis, and formation of fibrous structures, known as NETs (neutrophil extracellular traps) are some of the mechanisms used by these cells to eliminate microorganisms (82, 83). In addition to their role in the elimination of pathogens, neutrophils can also participate in immune regulation as a source of cytokines, including IL-2, IL-10, IFN γ , and TNE, thereby establishing a link between innate and adaptive immunity during infection, and even participating in the presentation of antigens to regulate T cell proliferation and antibody production by B cells (84). In fact, murine *L. (L.) amazonensis*-infected macrophages cocultured with neutrophils were better able to destroy the intracellular amastigotes (34). Since no significant difference in *L. (L.) amazonensis* parasite destruction was observed between co-cultures from susceptible BALB/c and resistant C3H/HePas mice, this leishmanicidal activity seemed not to depend on adaptive immunity, which determines an individual's resistance profile (34). However, due to the effector functions in the inflammatory process, neutrophils also need to be regulated because their excessive activity can lead to tissue destruction and even chronic inflammation (82).

Recent studies have addressed the role of neutrophils in *Leishmania* spp. infection. These cells may behave protectively or as enhancers of infection, depending on the parasite species, host, and stage of infection (32, 34). *In vitro* studies demonstrated that several *Leishmania* species are able to induce the formation of NETs, which are basically DNA structures coated with

antimicrobial molecules, released by neutrophils (85). These NETs are involved in the sequestration, immobilization, and killing of parasites [reviewed by Bardoel et al. (86)]. However, the efficacy of this immune strategy varies according to the *Leishmania* species involved. For instance, promastigotes of *L. amazonensis* showed susceptibility to NETs, while *L. donovani*, *L. infantum*, and *L. mexicana* were able to escape from this “trap” using different mechanisms (82). Furthermore, the same promastigote surface lipophosphoglycan that is involved in the activation of NETs (as for *L. amazonensis*) may also be associated with parasite resistance to killing through NETs, as occurs with *L. donovani* (87).

There is no consensus on the activity of neutrophils during infection by *Leishmania* species, as besides the complexity of species involved, there is heterogeneity between studies, which explore different host species, host strains, and tissue types, all factors that may interfere directly with the type of response to the infection (32). In an example of how the host strain (genetic background) may change its response, Tacchini-Cottier et al. (33) demonstrated that neutrophil-depleted C57BL/6 mice exhibited a normal course of infection caused by *L. major*, whereas neutrophil depletion in BALB/c resulted in blockage of the early characteristic IL-4 response, thus leading to an inhibition of Th2-type response. Currently, a specific neutropenic mouse strain (Genista) is being used; Hurrell et al. (82) demonstrated that Genista mice, as well as mice with transient neutrophil depletion, are able to control the parasite load and lesion size when infected with *L. mexicana*, indicating that parasite sequestration by neutrophils is associated with disease progression in mice.

Neutrophils that are recruited and that participate in the early stages of infection behave very differently to those associated with the late immune response against *Leishmania* parasites. In the initial phase of infection, neutrophils are recruited as a response to chemotactic substances released from the tissue lesion or from the sandfly's saliva, and also by stimuli from the parasites (32). DCs and neutrophils have been shown by microscopy studies to infiltrate the site of parasite inoculation within a few hours after sandfly bite, where they engulf the parasites. By 48 h after infection, most parasites at the inoculation site are found within macrophages (88). DCs that were recovered from the skin 1 day after infection appeared to have been infected by these parasitized neutrophils (32). *In vitro* and *in vivo* kinetics studies showed that interactions with early infected or not infected neutrophils (from the acute infiltrate), or even with their apoptotic corpses, may impair the innate response of DCs, thus delaying the activation of a specific immune response via CD4⁺ T cells (32). This response may be crucial for parasite depletion before symptom presentation, resulting in subclinical progression. The parasites may enter directly into the macrophages through receptor recognition, or may be transferred silently *via* neutrophils (89). Parasites may be transferred from neutrophils to macrophages in the following two ways: the first involves the release of the parasite from an infected apoptotic neutrophil, in which the free parasite is phagocytosed by the macrophage; the second suggests that the macrophage engulfs live infected neutrophils, referred to as “Trojan horses” (90, 91). Mollinedo et al. (92) have demonstrated viable *L. major*

and *L. donovani* promastigotes inside human neutrophils, and they suggest that this is linked to inhibition of the oxidative burst, as well as prevention of early fusion of lysosomes with parasite-containing phagosomes. The interaction and previous uptake of these early neutrophils by macrophages can drive the development of IL-10-high and IL-12-low macrophages, which are especially permissive to the survival and proliferation of *Leishmania* parasites (32).

Antigen presentation by neutrophils is also inefficient in eliciting adequate T cell differentiation. Recent work revealed that human leukocyte antigen–antigen D related (HLA-DR) positive neutrophils from subjects with VL did not stimulate T-cell proliferation, but they did show higher expression of programmed cell death ligand-1 than other neutrophils, and lymphocytes of the same subjects showed high expression of programmed cell death protein-1, reinforcing the mechanisms of apoptosis that favor *Leishmania* (93). This population of neutrophils also showed elevated expression of IL-10 mRNA and protein, and transcripts encoding arginase-1, which is involved in the suppression of T cell responses (94). Conversely, after *in vitro* infection with *L. braziliensis*, neutrophils from patients with CL produce more reactive oxygen species (ROS) and higher levels of chemokines associated with recruitment of neutrophils and Th1-type cells than neutrophils from healthy control subjects (95), highlighting that the mechanisms used by parasites to explore neutrophils in their favor vary by species.

After the first acute neutrophilic influx, a second wave of neutrophil recruitment to the site of infection occurs approximately 1 week after the first contact with parasites; this is especially mediated by IL-17. Studies using BALB/c IL-17-deficient mice suggest that this cytokine is not the main recruitment factor involved in early stages of infection, but acts beside IL-8 and granulocyte-colony-stimulating factor. However, after 4 weeks of infection, low levels of IL-17 lead to a low number of neutrophils (70). Thus, the role of IL-17 in both leishmaniasis forms (cutaneous and visceral) may be strictly associated with neutrophil function, infection stage, and antioxidant capacity, as well as IL-10 regulation. When the neutrophil is engulfed by an infected macrophage, parasite death is increased *via* an elevation in ROS production. However, this second response is also associated with lesion progression, especially in the mucosal form of leishmaniasis (2, 30). According to Gonzalez-Lombana et al. (2), the key point in the healing of a lesion in ML is the downregulation of IL-17 by IL-10 and IFN γ . The huge concentration of granules or products from neutrophils recruited by IL-17 in the site of infection promotes tissue lesioning. In this context, the authors suggest that the IL-17 pathway is an important therapeutic target for the treatment of severe leishmaniasis in patients in whom IL-10 regulatory function is compromised.

In experiments performed in BALB/c mice, Rousseau et al. (96) demonstrated that neutrophils are involved in the early phase of VL by controlling the parasite growth in spleen but not in liver. The authors also found that these cells appear to have no significant effect in late infection in either of these organs. Finally, Almeida et al. (97) found an association between the severity of canine VL, superoxide production and neutrophil apoptosis, observing that neutrophil function alters according

to disease stage. Initially, there is a high level of ROS production, ensuring resistance to infection. However, in the late phase of the disease, ROS production overcomes the antioxidant capacity of the cell, leading to oxidative stress followed by neutrophil apoptosis. The increase in apoptosis and the consequent decrease in oxidative activity results in a predisposition to coinfections, commonly seen in severe cases of canine VL (98). In support of this hypothesis, treatments based on antioxidants have generated good results in patients with leishmaniasis (98). In short, like in CL, neutrophils are part of the complex web that governs the establishment and development of VL in different hosts.

Further studies are needed to clarify the role of neutrophils in the control or proliferation of different species of *Leishmania*. Because the infection phase is crucial, time-dependent investigations of ROS production should be carried out, and the regulatory/inflammatory profiles of Th17 cell participation should be explored in different hosts, considering tissue peculiarities.

Th17 AND NEUTROPHILS CAN CONTRIBUTE TO PARASITE CLEARANCE OR DISEASE

Recent studies have advanced our knowledge about the influences of each parasite/host factor in the pathogenesis of human leishmaniasis. The characterization of the CD4⁺ T helper cell population Th17 has further added to the complexity of host–pathogen interactions, previously thought to be determined by Th1 or Th2 polarization. Currently, participation of innate immune responses and complicated interactions between cytokines secreted by different T cell profiles, as well as the diversity of *Leishmania* species and hosts, are known to be relevant to disease outcome.

Neutrophils can potently protect against or enhance infections and can likewise behave as Trojan horses, supporting the invasion of macrophages by *Leishmania*. In addition to DCs and other components of the innate defense system, neutrophils also regulate T cell polarization, through cytokine secretion, thus establishing a link between innate and adaptive immunity during parasitic infection. Although neutrophil presence has been mostly associated with parasite depletion and cure in *L. donovani* and *L. infantum* infections, the infiltration of these cells is suggested to cause more severe disease presentations in tegumentary forms of leishmaniasis. The reviewed data show that regulatory cytokines such as IL-10 and IL-4 are needed to promote the equilibrium in ROS production, which is enhanced by the presence of neutrophils in chronic infections. In the liver and spleen, *L. infantum/donovani* elicits anti-inflammatory cytokines and stimulates

arginase production, leading to control of inflammation while neutrophils and activate macrophages kill parasites. The data also suggest that neutrophil participation depends on the timing of their recruitment, the tissue infected, and their duration at the infection site.

Current understanding of the role of Th17 cells in the progression of pathogenesis or contribution to host-protective immunity is evolving rapidly. We now know that *Leishmania* infections trigger CD4⁺/IL-17⁺ T cell differentiation in mice and humans. The IL-17 function in neutrophil recruitment has been widely demonstrated in experimental models of leishmaniasis, in which strong inflammatory infiltrates are observed. Although mice are more dependent than humans on IL-17 to combat *L. infantum/L. donovani* infections, IL-17 has also been associated with improved recovery from VL in humans. Conversely, higher levels of IL-17 during commitment in skin in patients with PKDL, CL, and ML than in healthy controls suggest that in this tissue, IL-17 contributes less to healing than in other tissues. Most of the current data link the IL-17–neutrophil axis to disease development or lesion exacerbation in CL. Nevertheless, differences in immunomodulation between parasite species, and contradictory results in humans, point to IL-17 stimulatory (IL-23) or regulatory (e.g., IL-27, IL-10, and IL-13) cytokines, which may be important in determining how long IL-17 remains present. Similarly to the role of IL-12 in the context of Th1 generation, identifying the role of these cytokines in the development or maintenance of Th17 is essential for understanding the influence of its persistence at lesion sites.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SG-d-A and MP-C concept and drafted the paper. SG-d-A, RS, and LT-S acquired, interpreted data, and wrote the paper. SG-d-A, RS, VL, RM, and MP-C revised critically for intellectual content. All the authors approved the final version to be published. All authors agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

FUNDING

This study was supported by the Education Ministry of Brazil through the Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) and by the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), Universal Grant number APQ: 441584/2014-4.

REFERENCES

- Reithinger R, Dujardin J, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S, et al. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* (2007) 7:581–96. doi:10.1016/S1473-3099(07)70209-8
- Gonzalez-Lombana C, Gimblet C, Bacellar O, Oliveira WW, Passos S, Carvalho LP, et al. IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. *PLoS Pathog* (2013) 9(3):e1003243. doi:10.1371/journal.ppat.1003243
- Sharma U, Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian J Exp Biol* (2009) 47:412–23.
- Quirino GFS, Nascimento MSL, Davoli-Ferreira M, Sacramento LA, Lima MHE, Almeida RP, et al. Interleukin-27 (IL-27) mediates susceptibility to visceral leishmaniasis by suppressing the IL-17–neutrophil response. *Infect Immun* (2016) 84(8):2289–98. doi:10.1128/IAI.00283-16
- Gontijo B, Ribeiro de Carvalho ML. Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* (2003) 36(13): 71–80. doi:10.1590/S0037-86822003000100011

6. Alvar J, Velez I, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* (2012) 7(5):e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671
7. Vargas-inchaustegui DA, Xin L, Soong L. *Leishmania braziliensis* infection induces dendritic cell activation, ISG15 transcription, and the generation of protective immune responses. *J Immunol* (2008) 180:7537–45. doi:10.4049/jimmunol.180.11.7537
8. Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* (2001) 55:453–83. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.453
9. Chapman SJ, Hill AVS. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat Rev Genet* (2012) 13(3):175–88. doi:10.1038/nrg3114
10. Weirather JL, Duggal P, Nascimento EL, Monteiro GR, Martins DR, Lacerda HG, et al. Fine mapping under linkage peaks for symptomatic or asymptomatic outcomes of *Leishmania infantum* infection in Brazil. *Infect Genet Evol* (2016) 43:1–5. doi:10.1016/j.meegid.2016.05.005
11. Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, Lago E, Rosa ME, Machado PR, et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg* (2012) 86(3):426–33. doi:10.4269/ajtmh.2012.11.0378
12. Silveira FT, Lainson R, Gomes CMDEC, Laurenti MD, Corbett CEP. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* (2009) 31(5):423–31. doi:10.1111/j.1365-3024.2009.01116.x
13. Alexander J, Brombacher F. T helper 1/T helper 2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? *Front Immunol* (2012) 3:80. doi:10.3389/fimmu.2012.00080
14. Follador I, Araujo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP, et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis* (2002) 34:54–8. doi:10.1086/340261
15. Rodrigues FMD, Neto GTC, Menezes JGPB, Gama MEA, Gonc EG, Silva AR, et al. Expression of Foxp3, TGF- β and IL-10 in American cutaneous leishmaniasis lesions. *Arch Dermatol Res* (2014) 306:163–71. doi:10.1007/s00403-013-1396-8
16. Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks D. CD4+CD25-Foxp3- Th1 cells are source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* (2007) 204(2):285–97. doi:10.1084/jem.20061886
17. Jones DE, Buxbaum LU, Scott P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol* (2000) 165:364–72. doi:10.4049/jimmunol.165.1.364
18. Gautam S, Kumar R, Maurya R, Nylén S, Ansari N, Rai M, et al. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* (2011) 204:1134–7. doi:10.1093/infdis/jir461
19. Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med* (2001) 194(10):1497–506. doi:10.1084/jem.194.10.1497
20. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S. CD4+ CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* (2002) 420:633–7. doi:10.1038/nature01199
21. Lages CS, Suffia I, Velilla PA, Huang B, Warshaw G, Hildeman DA, et al. Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. *J Immunol* (2009) 27(4):590–609. doi:10.1016/j.humov.2008.02.015
22. Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol* (2001) 166:1141–7. doi:10.4049/jimmunol.166.2.1141
23. Soong L, Henard CA, Melby PC. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. *Lynn. Semin Immunopathol* (2012) 34(6):735–51. doi:10.1007/s00281-012-0350-8
24. Ansari NA, Saluja S, Salotra P. Elevated levels of interferon- γ , interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. *Clin Immunol* (2006) 119(3):339–45. doi:10.1016/j.clim.2006.01.017
25. Barral-Netto M, Badaró R, Barral A, Carvalho EM. Imunologia da leishmaniose tegumentar. *Rev Soc Bras Med Trop* (1986) 19(3):173–91. doi:10.1590/S0037-86821986000300010
26. Katara GK, Raj A, Kumar R, Avishek K, Kaushal H, Ansari NA, et al. Analysis of localized immune responses reveals presence of Th17 and Treg cells in cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. *BMC Immunol* (2013) 14:52. doi:10.1186/1471-2172-14-52
27. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T H 17 and regulatory T cells. *Nature* (2006) 441(7090):235–8. doi:10.1038/nature04753
28. Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* (2006) 18(3):349–56. doi:10.1016/j.coi.2006.03.017
29. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* (2008) 23(1):1–7. doi:10.1038/jid.2014.371
30. Charmoy MM, Auderset F, Allenbach C, Tacchini-Cottier F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *J Biomed Biotechnol* (2010) 2010:2–9. doi:10.1155/2010/719361
31. Chen J, Deng Y, Zhao J, Luo Z, Peng W, Yang J, et al. The polymorphism of IL-17 G-152A was associated with childhood asthma and bacterial colonization of the hypopharynx in bronchiolitis. *J Clin Immunol* (2010) 30(4):539–45. doi:10.1007/s10875-010-9391-8
32. Ribeiro-gomes FL, Sacks D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. *Front Cell Infect Microbiol* (2012) 2:59. doi:10.3389/fcimb.2012.00059
33. Tacchini-Cottier F, Zweifel C, Belkaid Y, Mukankundiye C, Vasei M, Launois P, et al. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol* (2000) 165(5):2628–36. doi:10.4049/jimmunol.165.5.2628
34. Carmo DS, Katz S, Lu C. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. *PLoS One* (2010) 5(11):e13815. doi:10.1371/journal.pone.0013815
35. Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol* (2016) 7:1–12. doi:10.1038/nri.2016.72
36. Banerjee A, Bhattacharya P, Joshi AB, Ismail N, Dey R, Nakhshi HL. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in *Leishmania* pathogenesis and in protective immunity by *Leishmania* vaccines. *Cell Immunol* (2016) 309:37–41. doi:10.1016/j.cellimm.2016.07.004
37. Kumar R, Nylén S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Front Immunol* (2012) 3:251. doi:10.3389/fimmu.2012.00251
38. Soong L. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *J Immunol* (2009) 180(7):4355–60. doi:10.4049/jimmunol.180.7.4355
39. Mills KHG. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol* (2008) 38:2636–49. doi:10.1002/eji.200838535
40. Bettelli EE, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* (2007) 19(6):652–7. doi:10.1016/j.coi.2007.07.020
41. CromeSQ, WangAY, LevingsMK. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol* (2010) 159(2):109–19. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.04037.x
42. Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Microbes Infect* (2013) 2(9):e60. doi:10.1038/emi.2013.58
43. Van De Veerdonk FL, Gresnigt MS, Kullberg BJ, Van Der Meer JWM, Joosten LAB, Netea MG. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB Rep* (2009) 42:776–87. doi:10.5483/BMBRep.2009.42.12.776
44. Gaffen SL. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine* (2008) 43(3):402–7. doi:10.1016/j.cyto.2008.07.017
45. Kawaguchi M, Takahashi D, Hizawa N. IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity study population. *J Allergy Clin Immunol* (2006) 117(4):795–801. doi:10.1016/j.jaci.2005.12.1346
46. Gu C, Wu L, Li X. Cytokine IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* (2013) 64(2):477–85. doi:10.1016/j.cyto.2013.07.022
47. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* (2009) 27:485–517. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710
48. Khader SA, Gopal R. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens. *Virulence* (2010) 1(5):423–7. doi:10.4161/viru.1.5.12862

49. Zuniga LA, Jain R, Christopher H, Cua DJ. Th17 cell development: from the cradle to the grave. *Immunol Rev* (2013) 252:78–88. doi:10.1111/immr.12036
50. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-shaikh B, Blumenschein W, et al. Interleukin 23 receptor is essential for terminal differentiation of effector T helper type 17 cells in vivo. *Nat Immunol* (2009) 10(3):314–24. doi:10.1038/ni.1698
51. Peters A, Lee Y, Kuchroo VK. The many faces of Th17 cells. *Curr Opin Immunol* (2011) 23(6):702–6. doi:10.1016/j.coi.2011.08.007
52. Ghoreschi K, Laurence A, Yang X, Tato CM, Mandy J, Konkel J, et al. Generation of pathogenic Th17 cells in the absence of TGF- β signaling. *Nature* (2010) 467(7318):967–71. doi:10.1038/nature09447
53. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelletier A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* (2006) 126:1121–33. doi:10.1016/j.cell.2006.07.035
54. Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* (2007) 123:326–38. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02719.x
55. Nascimento MSL, Carregaro V, Lima-júnior DS, Costa DL, Ryffel B, Duthie MS, et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against *Leishmania infantum* infection. *J Infect Dis* (2015) 211:1015–26. doi:10.1093/infdis/jiu531
56. Usui T, Preiss JC, Kanno Y, Yao ZJ, Bream JH, Shea JJO, et al. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFN γ gene acetylation and transcription. *J Exp Med* (2006) 203(3):755–66. doi:10.1084/jem.20052165
57. Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunopathol* (2007) 19:362–71. doi:10.1016/j.smim.2007.10.007
58. Kolls JK, Linde A. Interleukin-17 family members. *Immunity* (2004) 21:467–76. doi:10.1016/j.immuni.2004.08.018
59. Lockhart E, Green AM, Flynn JL. T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection 1. *J Immunol* (2006) 177:4662–9. doi:10.4049/jimmunol.177.7.4662
60. Meeks KD, Sieve AN, Kolls JK, Ghilardi N, Berg RE. IL-23 is required for protection against systemic infection with *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* (2009) 183:8026–34. doi:10.4049/jimmunol.0901588
61. Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Iwakura Y, Yoshida H, Alerts E. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* (2010) 185:1150–7. doi:10.4049/jimmunol.0900047
62. Erdmann H, Roßnagel C, Böhme J, Iwakura Y, Jacobs T, Schaible UE, et al. Immunobiology IL-17A promotes macrophage effector mechanisms against *Trypanosoma cruzi* by trapping parasites in the endolysosomal compartment. *Immunobiology* (2013) 218(6):910–23. doi:10.1016/j.imbio.2012.10.005
63. de Assis Souza M, Brelaz de Castro MCA, De Oliveira AP, De Almeida AF, De Almeida TM, Reis LC, et al. Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. *Microb Pathog* (2013) 57:27–32. doi:10.1016/j.micpath.2013.02.004
64. Castilho TM, Goldsmith-pestana K, Lozano C, Valderrama L, Saravia NG, McMahon-pratt D. Murine model of chronic *L. (Viannia) panamensis* infection: role of IL-13 in disease. *Eur J Immunol* (2010) 40:2816–29. doi:10.1002/eji.201040384
65. Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TMM, Gollob KJJ, Dutra WOO, et al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* (2009) 200(1):75–8. doi:10.1086/599380
66. Espir TT, Figueira LDP, Naiff MDE, Da Costa AG, Ramalho-Ortigão M, Malheiro A, et al. The role of inflammatory, anti-inflammatory, and regulatory cytokines in patients infected with cutaneous leishmaniasis in Amazonas state, Brazil. *J Immunol Res* (2014) 2014:1–10. doi:10.1155/2014/481750
67. Terrazas C, Varikuti S, Kimble J, Moretti E, Boyaka PN, Satoskar AR. IL-17A promotes susceptibility during experimental visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. *FASEB J* (2016) 30(3):1135–43. doi:10.1096/fj.15-277202
68. Pitta MGR, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest* (2009) 119(8):2379–87. doi:10.1172/JCI38813
69. Ghosh K, Sharma G, Saha A, Kar S, Das PK, Ukil A. Successful therapy of visceral leishmaniasis with curdlan involves T-helper 17 cytokines. *J Infect Dis* (2013) 207(6):1016–25. doi:10.1093/infdis/jis771
70. Lopez Kostka L, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, Von Stebut E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol* (2009) 182:3039–46. doi:10.4049/jimmunol.0713598
71. Sacramento LA, Costa JL, De Lima MHE, Sampaio PA, Almeida RP, Cunha FQ, et al. Toll-like receptor 2 is required for inflammatory process development during *Leishmania infantum* infection. *Front Microbiol* (2017) 8:262. doi:10.3389/fmicb.2017.00262
72. Katara GK, Ansari NA, Singh A, Ramesh V, Salotra P. Evidence for involvement of th17 type responses in post kala azar dermal leishmaniasis (PKDL). *PLoS Negl Trop Dis* (2012) 6(6):e1703. doi:10.1371/journal.pntd.0001703
73. Sheel M, Beattie L, Frame TCM, de Labastida Rivera F, Falcão RJ, Bunn PT, et al. IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cells suppress early control of parasite growth by monocytes in the liver. *J Immunol* (2015) 195:5707–17. doi:10.4049/jimmunol.1501046
74. Anderson CF, Stumhofer JS, Hunter CA, Sacks D. IL-27 regulates IL-10 and IL-17 from CD4+ cells in non-healing *Leishmania major* infection. *J Immunol* (2009) 183(7):4619–27. doi:10.4049/jimmunol.0804024
75. Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, De Andrade J, Dos Santos WLC, Cláudio J, et al. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol* (2010) 40(10):2830–6. doi:10.1002/eji.200940115
76. Ajdary S, Alimohammadian MH, Esлами MB, Kemp K, Kharazmi A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infect Immun* (2000) 68(4):1760–4. doi:10.1128/IAI.68.4.1760-1764.2000
77. Faria DR, Gollob KJ, Schriefer A, Machado PRL, Carvalho LP, Aure M, et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun* (2005) 73(12):7853–9. doi:10.1128/IAI.73.12.7853-7859.2005
78. Ribeiro-gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-de-souza MCA, Cysne-finkelstein L, Arnholdt AC, et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol* (2004) 172:4454–62. doi:10.4049/jimmunol.172.7.4454
79. Pedraza-zamora C, Delgado-domínguez J, Zamora-chimal J, Becker I. Th17 cells and neutrophils: close collaborators in chronic *Leishmania mexicana* infections leading to disease severity. *Parasite Immunol* (2017) 39(4):1–13. doi:10.1111/pim.12420
80. Oliveira WN, Eduardo L, Schrieffer A, Machado P, Carvalho EM, Bacellar O. Cytokine the role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine* (2014) 66(2):127–32. doi:10.1016/j.cyto.2013.12.016
81. Novoa R, Bacellar O, Nascimento M, Cardoso TM, Ramasawmy R, Oliveira WN. IL-17 and regulatory cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* infection. *Parasite Immunol* (2011) 33:132–6. doi:10.1111/j.1365-3024.2010.01256.x
82. Hurrell BP, Regli IB, Tacchini-Cottier F. Different *Leishmania* species drive distinct neutrophil functions. *Trends Parasitol* (2016) 32(5):392–401. doi:10.1016/j.pt.2016.02.003
83. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* (2012) 198(5):773–83. doi:10.1083/jcb.201203170
84. Carlsen ED, Liang Y, Shelite TR, Walker DH, Melby PC, Soong L. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* (2015) 182(2):109–18. doi:10.1111/cei.12674
85. Brinkmann V, Reichard U, Gossman C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* (2004) 303(5663):1532–5. doi:10.1126/science.1092385
86. Bardeol BW, Kenny EF, Sollberger G, Zychlinsky A. The balancing act of neutrophils. *Cell Host Microbe* (2014) 15(5):526–36. doi:10.1016/j.chom.2014.04.011
87. Gabriel C, McMaster WR, Girard D, Descoteaux A. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *J Immunol* (2010) 185:4319–27. doi:10.4049/jimmunol.1000893

88. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kamhawi S, Lawyer P, et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* (2009) 321(5891):970–4. doi:10.1126/science.1159194
89. Cecílio P, Pérez-cabezas B, Santarém N, Maciel J, Rodrigues V, Cordeiro A. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. *Front Immunol* (2014) 5:480. doi:10.3389/fimmu.2014.00480
90. Laskay T, Van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol* (2003) 11(5):210–4. doi:10.1016/S0966-842X(03)00075-1
91. Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology* (2008) 213(3–4):183–91. doi:10.1016/j.imbio.2007.11.010
92. Mollinedo F, Janssen H, De Iglesia-vicente J, Villa-pulgarin JA. Selective fusion of azurophilic granules with *Leishmania* containing phagosomes of human neutrophils. *J Biol Chem* (2010) 285(45):34528–36. doi:10.1074/jbc.M110.125302
93. Sharma S, Davis RE, Srivastva S, Nylén S, Sundar S, Wilson ME. A subset of neutrophils expressing markers of antigen-presenting cells in human visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* (2017) 214:1531–8. doi:10.1093/infdis/jiw394
94. Sharma AS, Srivastva S, Davis RE, Singh SS, Kumar R, Nylén S, et al. The phenotype of circulating neutrophils during visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* (2017) 97(3):767–70. doi:10.4269/ajtmh.16-0722
95. Conceição J, Davis R, Carneiro PP, Giudice A, Muniz C, Wilson ME, et al. Characterization of neutrophil function in human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *PLoS Negl Trop Dis* (2016) 10(5):e0004715. doi:10.1371/journal.pntd.0004715
96. Rousseau D, Demartino S, Ferrua B, François J, Anjuère F, Fragaki K, et al. In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. *BMC Microbiol* (2001) 1:17. doi:10.1186/1471-2180-1-17
97. Almeida BFM, Narciso LG, Melo LM, Preve PP, Bosco AM, Lima VME, et al. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. *Vet J* (2013) 198:599–605. doi:10.1016/j.tvjl.2013.08.024
98. Paula-Junior W, Rocha FH, Donatti L, Fadel-Picheth CMT, Weffort-Santos AM. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* cambess leaves hydroethanolic extract. *Braz J Pharmacogn* (2006) 16:625–30. doi:10.1590/S0102-695X2006000500007

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Gonçalves-de-Albuquerque, Pessoa-e-Silva, Trajano-Silva, de Goes, de Moraes, da C. Oliveira, de Lorena and de Paiva-Cavalcanti. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

APÊNDICE D - Lista completa de publicações no período 2014 - 2018

- COSTA, THACIANNA BARRETO; DE MORAIS, NATÁLIA GOMES; DE LIRA, JOANA MARIA BEZERRA; DE ALMEIDA, THAYS MIRANDA; **GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, SUÊNIA DA CUNHA**; PEREIRA, VALÉRIA RÊGO ALVES; DE PAIVA CAVALCANTI, MILENA; DE CASTRO, CÉLIA MARIA MACHADO BARBOSA. Relation between neonatal malnutrition and gene expression: inflammasome function in infections caused by *Candida Albicans*. *European Journal of Nutrition* (Print), v. 59, p. 693, 2017.
- SILVA, L. A. M. T.; PESSOA-E-SILVA, RÔMULO; **GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, SUÊNIA DA CUNHA**; SILVA DE MORAIS, RAYANA CARLA; DA COSTA OLIVEIRA, CINTIA NASCIMENTO; GOES, T. C.; CAVALCANTI, MILENA DE PAIVA. Standardization and evaluation of a duplex real-time quantitative PCR for the detection of *Leishmania infantum* DNA: a sample quality control approach. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 50, p. 1-8, 2017.
- **GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, SUÊNIA DA C.**; PESSOA-E-SILVA, RÔMULO; TRAJANO-SILVA, LAYS A. M.; DE GOES, TAYNÁ CORREIA; DE MORAIS, RAYANA C. S.; DA C. OLIVEIRA, CÍNTIA N.; DE LORENA, VIRGÍNIA M. B.; DE PAIVA-CAVALCANTI, MILENA. The Equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on Immunopathogenesis of Leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1437, 2017.
- DE MORAIS, RAYANA CARLA SILVA; DA COSTA OLIVEIRA, CINTIA NASCIMENTO; **DE ALBUQUERQUE, SUÊNIA DA CUNHA GONÇALVES**; MENDONÇA TRAJANO SILVA, LAYS ADRIANNE; PESSOA-E-SILVA, RÔMULO; ALVES DA CRUZ, HEIDI LACERDA; DE BRITO, MARIA EDILEUZA FELINTO; DE PAIVA CAVALCANTI, MILENA. Real-time PCR for *Leishmania* species identification: Evaluation and comparison with classical techniques. *Experimental Parasitology*, v. 165, p. 43-50, 2016.
- PESSOA-E-SILVA, RÔMULO; MENDONÇA TRAJANO-SILVA, LAYS ADRIANNE; LOPES DA SILVA, MARIA ALMERICE; **DA CUNHA GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, SUÊNIA**; DE GOES, TAYNÁ CORREIA; SILVA DE MORAIS, RAYANA CARLA; LOPES DE MELO, FÁBIO; DE PAIVA-CAVALCANTI, MILENA. Evaluation of urine for *Leishmania infantum* DNA detection by real-time quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods*, v. 131, p. 34-41, 2016.
- COSTA, THACIANNA BARRETO DA; MORAIS, NATÁLIA GOMES DE; PEDROSA, AMANDA LÚCIA F.; **DE ALBUQUERQUE, SUÊNIA DA CUNHA G.**; DE CASTRO, MARIA CAROLINA A. B.; PEREIRA, VALÉRIA RÊGO A.; CAVALCANTI, MILENA DE PAIVA; DE CASTRO, CÉLIA MARIA M. B. Neonatal malnutrition programs the oxidant function of macrophages in response to *Candida albicans*. *Microbial Pathogenesis*, v. 95, p. 68-76, 2016.

- DE MORAIS, NATÁLIA GOMES; DA COSTA, THACIANNA BARRETO; PEDROSA, AMANDA LÚCIA FARIAS; DE CASTRO, MARIA CAROLINA ACCIOLY BRELAZ; **DA GONÇALVES DE ALBUQUERQUE, SUÊNIA CUNHA**; PEREIRA, VALÉRIA RÊGO ALVES; DE PAIVA CAVALCANTI, MILENA; DE CASTRO, CÉLIA MARIA MACHADO BARBOSA. Effect of neonatal malnutrition on expression of nitric oxide synthase enzyme, production of free radicals and in vitro viability of alveolar macrophages infected with methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Nutrition* (Print), v. 00, p. 00, 2015.
- DE PAIVA CAVALCANTI, MILENA; DE MORAIS, RAYANA CARLA; PESSOA-E-SILVA R; TRAJANO-SILVA, LAYS ADRIANNE; **GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, SUÊNIA DA**; TAVARES, D. H. C.; CASTRO, M. C. A. B.; SILVA, R. F. E. ; PEREIRA, V. R. A. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell bioscienci*, v. 5, p. 31, 2015.
- **GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, SUÊNIA DA**; E SILVA, RÔMULO PESSOA; DE MORAIS, RAYANA CARLA ; TRAJANO-SILVA, LAYS ADRIANNE; RÉGIS-DA-SILVA, CARLOS GUSTAVO ; BRANDÃO-FILHO, SINVAL PINTO ; DE PAIVA-CAVALCANTI, MILENA . Tracking false-negative results in molecular diagnosis: proposal of a triplex-PCR based method for leishmaniasis diagnosis. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* (Online), v. 20, p. 16, 2014.
- **DA C. GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, SUÊNIA**; PESSOA-E-SILVA, RÔMULO; TRAJANO-SILVA, LAYS A. M.; DE MORAIS, RAYANA C. S.; BRANDÃO-FILHO, SINVAL P.; DE PAIVA-CAVALCANTI, MILENA. Inclusion of Quality Controls on Leishmaniasis Molecular Tests to Increase Diagnostic Accuracy in Research and Reference Laboratories. *Molecular Biotechnology*, v. 57, p. 318-324, 2014.
- SILVA, R. F. E. ; CASTRO, M. C. A. B.; **GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, SUÊNIA DA CUNHA**; TAVARES, D. H. C.; CAVALCANTI, M. P.; PEREIRA, V. R. A. Vaccines Against Trypanosomatids. In: Milena de Paiva Cavalcanti, Valéria Rêgo Alves Pereira, Alain Joseph Jacques Dessein. (Org.). *Tropical Diseases: An Overview of Major Diseases Occurring in the Americas*. 1ed.: Bentham EBooks, 2017, v. , p. 88-113.
- MANGUEIRA, E. V. C. ; FERREIRA, G. M. O. G. ; SILVA, M. B. A. ; SILVA, R. P. E. ; **DA CUNHA GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, SUÊNIA** . Endemias. In: Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco SES PE. (Org.). Manual de orientações de coleta, acondicionamento e transporte de amostras. 2ed. São Lourenço da Mata: Editora ME, 2017, v., p. 49-66.

APÊNDICE E – Teste de concentrações do Antígeno Solúvel total de *Leishmania (V.) braziliensis* para estímulo de cultura de células mononucleares do sangue periférico

a) Descrição do teste

Para padronização das condições de cultivo que foram aplicadas as amostras de pacientes, foi realizada uma cinética de tempo e concentração de estímulo antigênico, de modo a otimizar a secreção de IL-17 e citocinas pró inflamatórias (IFN γ e TNF) e anti-inflamatórias (IL-10, IL-6, IL-4, IL-20). Para tanto, as PBMCs de 6 pacientes foram estimuladas em meio de cultura com o extrato proteico solúvel de *L. (V.) braziliensis*(AgST) em concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$, e mantidas em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Células sem estímulo (SE), mantidas apenas com meio de cultura, foram os controles negativos do ensaio. Para avaliar a capacidade estimulatória do antígeno as citocinas secretadas no sobrenadante das culturas foram dosadas pela técnica de *Cytometric Bead Array* (CBA), utilizando o kit *BD™ CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (Becton Dickinson) e leitura no equipamento FACS Calibur (Becton Dickinson), conforme instruções do fabricante. Os resultados foram analisados utilizando o software FCAP Array 1.0 (Becton Dickinson). As comparações entre as concentrações e tempos foi dada pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas, ao nível de significância $p < 0,05$, executado no *software* Graphpad Prism 5.0

b) Resultados do teste

A análise das concentrações de citocina em sobrenadantes focada em IL-17 mostrou pico de secreção da citocina ao estímulo de 5 $\mu\text{g/mL}$ de AgST, após 72 horas de incubação. Nos demais tempos avaliados, as quantidades de IL-17 detectadas nos sobrenadantes de culturas com 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ foram discretamente diferentes, levando à não significância estatística do teste ($p = 0,733$) (Figura b.1). A secreção de IL-17 em cultura estimulada com 5 $\mu\text{g/mL}$ de AgST foi sensivelmente maior que no controle negativo (SE), enquanto uma maior quantidade de antígeno reduziu sua secreção ($p = 0,112$) (Figura b.2).

Figura b.1 - Concentrações de IL-17 em pictogramas por mL detectadas em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico estimuladas por 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno solúvel total (AgST) de *L. (V.) braziliensis* em diferentes tempos de incubação.

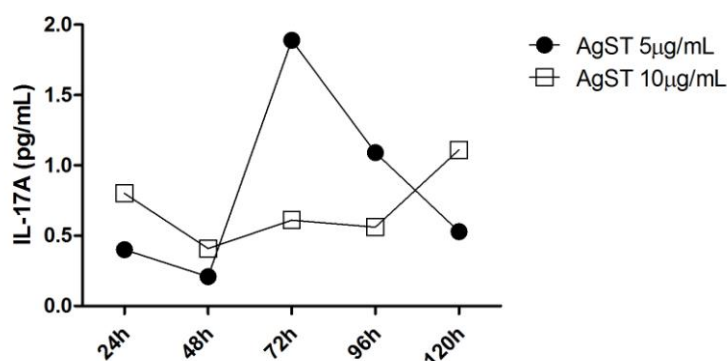
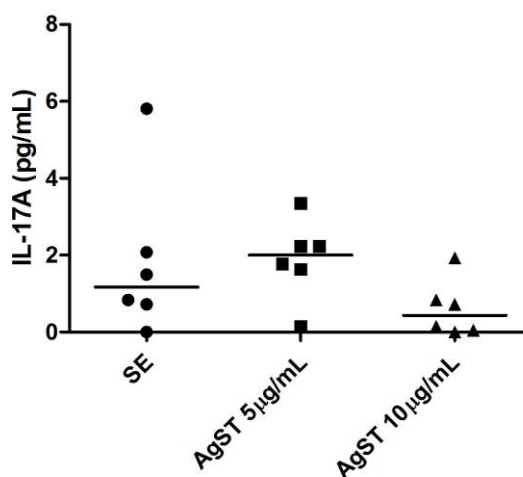


Figura b.2 - Concentrações de IL-17 em pictogramas por mL detectadas em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico estimuladas por 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno solúvel total (AgST) de *L. (V.) braziliensis*, e sem estímulo (SE) após 72 horas de incubação.



Com base nestas observações, foi padronizada a aplicação de 5 $\mu\text{g/mL}$ de AgST de *L. (V.) braziliensis* para estímulo das culturas deste projeto.

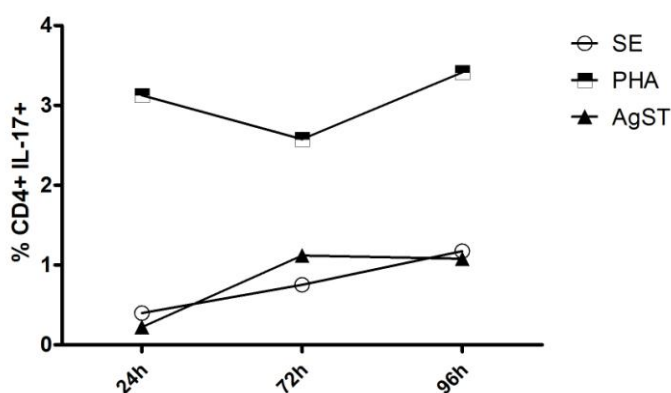
c) Cinética de tempo de cultivo para imunofenotipagem

Para a definição do tempo de cultivo necessário para diferenciação de células Th17 sob estímulo com o AgST de *L. (V.) braziliensis* purificado, foi realizado um experimento piloto onde foram utilizadas as PBMCs de 5 indivíduos-controle, não residentes de áreas endêmicas e não inclusos na amostragem deste estudo. Este grupo foi composto de

3 indivíduos do sexo feminino e 2 do sexo masculino, com média de idade de $36,2 \pm 11,23$ anos, tendo sido seus genótipos determinados por sequenciamento: 2 AG e 3 GG.

As células estimuladas foram adquiridas no citômetro conforme descrito no item 6.9. Houve diferenciação celular a partir de 24 horas de incubação, sendo os maiores percentuais de células CD4+ IL-17+ detectados em 96 horas em SE e PHA, em 72 horas em AgST (Figura c.1).

Figura c.1-Percentuais de linfócitos CD4+ IL-17+ detectadas por citometria de fluxo em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) após três tempos de incubação sob estímulos específico e inespecífico.



Legenda: Células cultivadas sem estímulo (SE); células cultivadas sob estímulo inespecífico do mitógeno fitohemaglutinina (PHA); células cultivadas com a fração solúvel do extrato proteico total (antígeno solúvel total) de *L. (V.) braziliensis* (AgST). Percentual de CD4+ IL-17+ calculado dentro da população total de linfócitos das amostras.

Sob estímulo específico (AgST de *L. (V.) braziliensis*) houve maior diferenciação para o tipo Th17 após 72 horas de exposição, com influência do tempo estatisticamente significativa ($p=0,012$) entre 24 e 72 horas e não significativa entre 72 e 96 horas. Na ausência de estímulo (SE) e sob estímulo inespecífico (PHA) as células não tiveram influência significativa do tempo em sua adaptação para o tipo Th17 ($p=0,055$ e $p=0,840$, respectivamente). Por meio destas observações, foi padronizada a incubação por 72 horas para a análise da diferenciação de Th17 e secreção de IL-17 em pacientes do estudo conforme seus genótipos.

ANEXO A - Aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização da resposta imunológica à leishmaniose tegumentar em população indígena de área endêmica do Estado de Pernambuco

Pesquisador: Suênia da Cunha Gonçalves de Albuquerque

Área Temática: Estudos com populações indígenas;

Versão: 6

CAAE: 23747413.9.0000.5190

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.090.864

Data da Relatoria: 27/05/2015

ANEXO B - Nota técnica sobre interrupção da distribuição de insumos para IDRM



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS
COORDENAÇÃO GERAL DE DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS
SCS - Quadra 4 Bloco A - 2º Andar - Ed Principal
CEP 70.304-000 - Brasília/DF
Tel. (061) 3213-8096/8095

NOTA INFORMATIVA Nº 36, DE 2016 - CGDT/DEVIT/SVS/MS


Esclarecimentos sobre o desabastecimento de antígeno para Intradermoreação de Montenegro.

1. O Ministério da Saúde (MS) informa que atualmente está desabastecido do insumo antígeno para intradermoreação de Montenegro (IDRM), diagnóstico de triagem para a leishmaniose tegumentar (LT). O desabastecimento nacional ocorreu depois que o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), único fornecedor do insumo a nível mundial, paralisou a produção do antígeno de Montenegro, por necessitar de adequações na área industrial e no processo de produção do Centro, conforme exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).
2. Para reduzir os danos causados pela falta deste insumo, em julho, o MS, em conjunto com a Fiocruz/RJ, realizou um curso de aperfeiçoamento no teste parasitológico direto para diagnóstico da LT para todos os LACENs com o objetivo de fortalecer o diagnóstico oportuno da doença no país. Além disso, este Ministério tem articulado com instituições parceiras para viabilizar o reestabelecimento do fornecimento do insumo, mas até o momento não se tem perspectiva de abastecimento.
3. Considerando o exposto acima, o MS informa que não há previsão de abastecimento de antígeno para IDRM a curto ou médio prazo e que é necessário o fortalecimento do exame direto para o diagnóstico da LT para os casos em que o parasitológico é viável.
4. Para informações adicionais, favor contatar o Grupo Técnico das Leishmanioses pelos telefones (61) 3213-8153/8156.

Brasília, 20 de outubro de 2016.


SÉRGIO DE ANDRADE NISHIOKA
Coordenador Geral de Doenças Transmissíveis

De acordo,


Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis

Eduardo Henrique Cunha