



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

**ESTER ALVES DA SILVA AMORIM**

**AVALIAÇÃO DAS INTERLEUCINAS (IL) -1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 1Ra, 18 E 37 EM CÉLULAS DE  
PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

**RECIFE**

**2021**

**ESTER ALVES DA SILVA AMORIM**

**AVALIAÇÃO DAS INTERLEUCINAS (IL) -1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 1Ra, 18 E 37 EM CÉLULAS DE  
PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro

Coorientadora: Dra. Valéria Pereira Hernandez

RECIFE

2021

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Amorim, Ester Alves da Silva

Avaliação das interleucinas (IL) -1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 1Ra, 18 e 37 em células de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana / Ester Alves da Silva Amorim. - 2021.

111 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro.

Coorientadora: Dra. Valéria Pereira Hernandez.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Leishmaniose. 2. Parasitologia. 3. Expressão gênica. I. Castro, Maria Carolina Accioly Brelaz de (orientador). II. Hernandez, Valéria Pereira (coorientadora). III. Título.

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-132

ESTER ALVES DA SILVA AMORIM

**AVALIAÇÃO DAS INTERLEUCINAS (IL) -1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 1Ra, 18 E 37 EM CÉLULAS DE  
PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maira Galdino da Rocha Pitta (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Michelly Cristiny Pereira (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Rafael de Freitas e Silva (Examinador Externo)  
Universidade de Pernambuco

## **AGRADECIMENTOS**

Sou eternamente grata ao meu Deus, que sempre me ajudou na caminhada da vida até aqui.

À minha família, que foram o suporte que precisava em meio às dificuldades e incertezas da vida. Sem vocês, seria impossível.

À Ailton, que sempre foi meu porto seguro completo, me ajudando emocionalmente e com discussões científicas que foram importantes na realização desse trabalho. Meu cientista favorito.

Aos meus amigos/amigas, que sempre me apoiaram e confiaram em mim, com muita paciência e empatia. Alessya e Milena, sempre me alegrando e me fazendo enxergar o melhor de mim.

Às minhas orientadoras, Carol e Valéria, que confiaram em mim, mesmo não merecendo ainda. Sempre com muita cordialidade e paciência, me ajudaram na construção do trabalho de forma saudável. Obrigada mesmo.

Ao pessoal do LIBM e do Aggeu Magalhães, importantes também para que o trabalho na rotina do laboratório acontecesse, sempre me mostrando que também precisamos de pessoas para conquistarmos nossos objetivos.

## RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é representada pelas manifestações cutânea e mucocutânea da leishmaniose. Em resposta à infecção pelo protozoário, o sistema imunológico desencadeia respostas inflamatórias que resultam na ativação de linfócitos e produção de citocinas, incluindo as da família IL-1, que atuam como importante “gatilho” de ativação da resposta efetora, representada pelo perfil T *helper* 1 (Th1). Além disso, tais citocinas estão associadas à exacerbação da inflamação, o que precisa ainda ser melhor esclarecido na LTA. Sendo assim, este trabalho se propôs a avaliar os genes das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-18 e IL-37 (*IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL18* e *IL37*, respectivamente), em controles (CT = 10), pacientes acometidos pela LTA antes (AT = 23) e após o tratamento (PT = 12). Para isso, coletamos amostras de sangue de pacientes com LTA provenientes de áreas endêmicas de Pernambuco. As células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) foram separadas e cultivadas durante 24 e 72h com e sem o estímulo do antígeno total de *L. (V.) braziliensis* para análise da expressão gênica das citocinas por qPCR ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Nessa avaliação, somente *IL37* apresentou expressão significativa em pacientes AT após 24h de cultivo. Por outro lado, após 72h de estímulo, houveram diferenças importantes entre os três grupos, indicando que a resposta inflamatória parece se destacar ao longo do tempo. Na ausência do estímulo, os níveis de RNAs mensageiros (mRNA) de todas as citocinas da família IL-1 foram menores em pacientes pós-tratamento, indicando uma redução de suas expressões após a cura clínica. O estímulo com o antígeno total induziu significativamente as expressões de IL-1 $\alpha/\beta$  (gênica e proteica) e *IL37* em ambos os pacientes AT e PT, neste último, indicando a participação da memória imunológica que atua na reinfecção. Por outro lado, as quantificações menores de *IL1RN* e *IL18* encontradas em pacientes curados em relação ao grupo AT sugerem seus papéis muito mais de susceptibilidade à *Leishmania* do que de resistência. Níveis de *IFNG* e *IL1A/B* se correlacionaram positivamente em AT e PT. No entanto, apenas em AT, os níveis de *IL10* e *IL1A/B* se correlacionaram de forma positiva e significativa ( $r > 0,8$ ), indicando a presença de regulação em resposta à produção de IL-1. Sendo assim, nossos achados evidenciam a menor expressão de *IL18* como potencial marcador de resposta ao tratamento da LTA, bem como a ação atenuadora da *IL37* em resposta à *L.braziliensis*, o que até então não era conhecido.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Tegumentar Americana; Família IL-1; Expressão gênica.

## ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is represented by the cutaneous and mucocutaneous manifestations of leishmaniasis. In response to the protozoan infection, the immune system triggers inflammatory responses that involve the activation of lymphocytes and production of cytokines, including IL-1 family, which act as an important “trigger” of activation of the effector response, represented by the T helper (Th) 1 profile. In addition, such cytokines are associated with exacerbation of inflammation, which needs to be further clarified in ATL. Therefore, this study aimed to evaluate the cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-18 and IL-37 (*IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL18* e *IL37*, respectively), in controls (CT = 10), patients affected by ATL before (AT = 23) and after the treatment (PT = 12) with clinical cure. For this, we collected blood samples from patients from endemic areas of Pernambuco. The peripheral blood mononucleated cells (PBMC) were separated and cultured for 24 and 72 hours with and without stimulation of total antigen of *L. (V.) braziliensis* for gene expression analysis by qPCR ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). In this evaluation, only *IL37* showed significant expression in AT patients after 24h of culture. On the other hand, after 72h of stimulation, there were important differences between the three groups, indicating that the immune response seems to stand out over time. In the absence of stimulation, the levels of messenger RNAs (mRNA) of all IL-1 cytokines were lower in post-treatment patients, indicating a reduction in their expression after clinical cure. The stimulation with the total antigen significantly induced the expressions of IL-1 $\alpha/\beta$  (gene and protein) and *IL37* in both patients AT and PT, in the latter, indicating the maintenance of an immunological memory that acts in reinfection. On the other hand, the lowest quantification of *IL1RN* and *IL18* found in healed patients in relation to the AT group suggest their roles much more of susceptibility to *Leishmania* than resistance. Levels of *IFNG* and *IL-1A/B* were positively correlated in AT and PT. However, only in AT, the levels of *IL10* and *IL1A/B* were positively and significantly correlated ( $r > 0.8$ ), indicating the presence of regulation in response to IL-1 production. Thus, our findings show *IL18* as a potential marker of response to the treatment of ATL, as well as the mitigating action of *IL37* in response to *L. braziliensis*, which until then was not known.

**Keywords:** American Tegumentary Leishmaniasis; IL-1 family; Gene expression.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Situação da endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo.....                                                                                                                                                                                             | 17 |
| <b>Figura 2</b> - Distribuição dos casos de LTA pelas regiões do Brasil. ....                                                                                                                                                                                                | 18 |
| <b>Figura 3</b> - Estágios de desenvolvimento de Leishmania no flebotomíneo. ....                                                                                                                                                                                            | 20 |
| <b>Figura 4</b> - Ciclo de vida de Leishmania.....                                                                                                                                                                                                                           | 21 |
| <b>Figura 5</b> - Leishmaniose nas formas cutânea localizada (A), mucocutânea (B), difusa (C) e disseminada (D).....                                                                                                                                                         | 22 |
| <b>Figura 6</b> - Formas de apresentação das lesões cutâneas da LCL. ....                                                                                                                                                                                                    | 23 |
| <b>Figura 7</b> - Lesões de LTA cicatrizadas.....                                                                                                                                                                                                                            | 24 |
| <b>Figura 8</b> - Associações metodológicas para o diagnóstico da LTA. ....                                                                                                                                                                                                  | 25 |
| <b>Figura 9</b> - Morte e sobrevivência de Leishmania no sítio da infecção cutânea.....                                                                                                                                                                                      | 32 |
| <b>Figura 10</b> - Diferentes vias imunológicas na LTA. ....                                                                                                                                                                                                                 | 34 |
| <b>Figura 11</b> - Representação esquemática das citocinas IL-1 e seus principais receptores e co-receptores.....                                                                                                                                                            | 42 |
| <b>Figura 12</b> - Fluxograma das etapas de análise das citocinas IL-1. ....                                                                                                                                                                                                 | 51 |
| <b>Figura 13</b> - Eletroforese em gel de agarose 1,2% de RNA total. ....                                                                                                                                                                                                    | 54 |
| <b>Figura 14</b> - Representação gráfica dos resultados da qPCR.....                                                                                                                                                                                                         | 56 |
| <b>Figura 15</b> - Avaliação in vitro da expressão gênica de IL1A (A), IL1B (B), IL1RN (C), IL18 (D) e IL37 (E) antes e após 24h de estímulo com antígeno total de <i>L. braziliensis</i> em indivíduos saudáveis e pacientes AT.....                                        | 63 |
| <b>Figura 16</b> - Avaliação in vitro da expressão gênica das citocinas IL1A (A), IL1B (B), IL1RN (C), IL18 (D) e IL37 (E) antes e após 72h de estímulo com antígeno total de <i>L. braziliensis</i> entre os grupos controle, antes do tratamento e após o tratamento. .... | 66 |
| <b>Figura 17</b> - Níveis de expressão de IFNG e IL10 em indivíduos saudáveis e pacientes antes do tratamento e após o tratamento de PBMCs cultivados por 72h.....                                                                                                           | 67 |
| <b>Figura 18</b> - Correlação entre os níveis de expressão de IFNG e IL10 vs. IL1A e IL1B em pacientes AT após o estímulo com antígeno total. ....                                                                                                                           | 68 |
| <b>Figura 19</b> - Correlação entre os níveis de expressão de IFNG vs. IL1A e IL1B em pacientes PT após o estímulo com antígeno total. ....                                                                                                                                  | 69 |
| <b>Figura 20</b> -Níveis proteicos de IL-1 $\alpha$ antes e após o estímulo com antígeno total de <i>L. braziliensis</i> durante 72h entre os grupos controle, AT e PT.....                                                                                                  | 70 |
| <b>Figura 21</b> -Níveis proteicos de IL-1 $\beta$ antes e após o estímulo com antígeno total de <i>L. braziliensis</i> durante 72h entre os grupos controle, AT e PT.....                                                                                                   | 71 |

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro 1</b> - Principais funções dos receptores e ligantes da família IL-1.....        | 39 |
| <b>Quadro 2</b> - Comportamento das citocinas IL-1 em pacientes após 72h de estímulo. .... | 79 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> - Dados demográficos e clínicos de pacientes com lesão ativa (AT). .....                              | 59 |
| <b>Tabela 2</b> - Dados demográficos e clínicos pacientes curados após realização do tratamento (PT).....             | 61 |
| <b>Tabela 3</b> - Características dos grupos CT, AT e PT. ....                                                        | 62 |
| <b>Tabela 4</b> - Valores de FC de PBMCs de pacientes ativos estimuladas por 24h. ....                                | 62 |
| <b>Tabela 5</b> – Valores de FC de PBMCs de pacientes AT e PT estimuladas por 72h. ....                               | 65 |
| <b>Tabela 6</b> - Aspectos clínicos de pacientes com lesão ativa e dados de expressão gênica das citocinas IL-1. .... | 72 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |                                                                                                         |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| APC           | Célula apresentadora de antígeno ( <i>Antigen-presenting cell</i> )                                     |
| AVC           | Acidente vascular cerebral                                                                              |
| cDNA          | DNA complementar                                                                                        |
| Ct            | Limiar de ciclo ( <i>Cycle threshold</i> )                                                              |
| DAMP          | Padrões moleculares associados a danos ( <i>Damage-associated molecular patterns</i> )                  |
| DC            | Célula dendrítica ( <i>Dendritic cell</i> )                                                             |
| DEPC          | <i>diethylpyrocarbonate</i>                                                                             |
| DNA           | Ácido desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )                                              |
| dNTP          | desoxirribonucleotídeo trifosfato                                                                       |
| ELISA         | Ensaio de imunoabsorção enzimática ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )                         |
| IDRM          | Intradermorreação de Montenegro                                                                         |
| IFI           | Imunofluorescência Indireta                                                                             |
| IFN- $\gamma$ | Interferon-gama                                                                                         |
| Ig            | Imunoglobulina                                                                                          |
| IL-           | Interleucina                                                                                            |
| iNOS          | óxido nítrico-sintase induzida ( <i>Inducible nitric oxide synthase</i> )                               |
| IRAK4         | Quinase 4 associada ao receptor da interleucina-1 ( <i>interleukin-1 receptor-associated kinase 4</i> ) |
| LC            | Leishmaniose cutânea                                                                                    |
| LTA           | Leishmaniose Tegumentar Americana                                                                       |
| LV            | Leishmaniose visceral                                                                                   |
| LPG           | Lipofosfoglicano ( <i>lipophosphoglycan</i> )                                                           |
| MERTK         | Tirosina quinase Mer                                                                                    |
| mRNA          | RNA mensageiro ( <i>messenger RNA</i> )                                                                 |
| MyD88         | Fator de diferenciação mielóide 88 ( <i>Myeloid differentiation protein 88</i> )                        |
| NET           | Armadilha extracelular de neutrófilo ( <i>Neutrophil Extracellular Trap</i> )                           |
| NK            | Assassina natural ( <i>Natural Killer</i> )                                                             |
| NO            | Óxido nítrico ( <i>nitric oxide</i> )                                                                   |

|              |                                                                                                                     |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| OMS          | Organização Mundial da Saúde                                                                                        |
| PBMC         | Célula mononuclear de sangue periférico ( <i>Peripheral blood mononuclear cell</i> )                                |
| PCR          | Reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )                                                 |
| PSG          | Gel de secreção promastigota ( <i>Promastigote Secretory Gel</i> )                                                  |
| qPCR         | PCR quantitativa                                                                                                    |
| RNA          | Ácido ribonucleico ( <i>Ribonucleic Acid</i> )                                                                      |
| RNS          | Espécies reativas de nitrogênio ( <i>Reactive Nitrogen Species</i> )                                                |
| RT-PCR       | Reação em cadeia da polimerase por Transcriptase Reversa ( <i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i> ) |
| ROS          | Espécies reativas de oxigênio ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )                                                    |
| SFB          | Soro fetal bovino                                                                                                   |
| siRNA        | RNA silenciador                                                                                                     |
| TALE         | Termo de Assentimento Livre e Esclarecido                                                                           |
| TCLE         | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido                                                                          |
| TGF- $\beta$ | Fator de transformação do crescimento beta ( <i>Transforming Growth Factor beta</i> )                               |
| Th           | T auxiliar ( <i>T helper</i> )                                                                                      |
| TIR          | Receptor Toll/interleucina-1 ( <i>Toll/interleukin-1 receptor</i> )                                                 |
| Treg         | T regulador ( <i>T regulatory</i> )                                                                                 |
| TLR          | Receptores tipo Toll ( <i>Toll-like receptors</i> )                                                                 |
| TNF          | Fator de necrose tumoral ( <i>Tumor Necrosis Factor</i> )                                                           |

## SUMÁRIO

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                           | <b>14</b> |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>                                                 | <b>16</b> |
| <b>2.1 Leishmanioses .....</b>                                                      | <b>16</b> |
| 2.1.1 Epidemiologia.....                                                            | 16        |
| <b>2.2 Leishmaniose Tegumentar Americana .....</b>                                  | <b>18</b> |
| 2.2.1 Transmissão e ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .....                        | 18        |
| 2.2.2 Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana .....                    | 21        |
| 2.2.3 Diagnóstico.....                                                              | 25        |
| 2.2.4 Tratamento.....                                                               | 28        |
| <b>2.3 Resposta imune na LTA.....</b>                                               | <b>30</b> |
| 2.3.1 Resposta imune inata .....                                                    | 30        |
| 2.3.2 Resposta imune adaptativa .....                                               | 33        |
| <b>2.4 Família IL-1.....</b>                                                        | <b>37</b> |
| 2.4.1 IL-1 $\alpha$ ( <i>IL1A</i> ) e IL-1 $\beta$ ( <i>IL1B</i> ).....             | 43        |
| 2.4.2 IL-1Ra ( <i>IL1RN</i> ) .....                                                 | 44        |
| 2.4.3 IL-18 ( <i>IL18</i> ).....                                                    | 45        |
| 2.4.4 IL-37 ( <i>IL37</i> ).....                                                    | 46        |
| <b>3 OBJETIVOS .....</b>                                                            | <b>48</b> |
| <b>3.1 Objetivo Geral.....</b>                                                      | <b>48</b> |
| <b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>                                              | <b>48</b> |
| <b>4 JUSTIFICATIVA .....</b>                                                        | <b>49</b> |
| <b>5 METODOLOGIA.....</b>                                                           | <b>50</b> |
| <b>5.1 População de estudo e aspectos éticos.....</b>                               | <b>50</b> |
| <b>5.2 Obtenção de antígenos de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....</b>               | <b>51</b> |
| <b>5.3 Obtenção de células mononucleadas de sangue periférico .....</b>             | <b>52</b> |
| <b>5.4 Cultivo celular .....</b>                                                    | <b>52</b> |
| <b>5.5 Dosagem de citocinas de plasma sanguíneo e sobrenadante de cultura .....</b> | <b>52</b> |
| <b>5.6 Avaliação da expressão do mRNA por qPCR.....</b>                             | <b>53</b> |
| 5.6.1 Extração de RNA.....                                                          | 53        |
| 5.6.2 Transcrição Reversa .....                                                     | 54        |
| 5.6.3 PCR em Tempo Real .....                                                       | 54        |
| <b>5.7 Análise estatística.....</b>                                                 | <b>56</b> |

|                                                                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.8 Aspectos éticos.....                                                                                                                             | 56  |
| 6 RESULTADOS .....                                                                                                                                   | 58  |
| 6.1 Caracterização da população de estudo com LTA .....                                                                                              | 58  |
| 6.2 Avaliação da expressão gênica de <i>IL1A</i> , <i>IL1B</i> , <i>IL18</i> , <i>IL1RN</i> , <i>IL37</i> , <i>IFNG</i> e <i>IL10</i> por qPCR ..... | 62  |
| 6.3 Quantificação proteica das citocinas IL-1 $\alpha$ e IL-1 $\beta$ em sobrenadantes de cultura por ELISA .....                                    | 69  |
| 6.4 Associação entre expressão gênica e dados clínicos.....                                                                                          | 71  |
| 7 DISCUSSÃO .....                                                                                                                                    | 73  |
| 8 CONCLUSÕES.....                                                                                                                                    | 80  |
| 9 PERSPECTIVAS.....                                                                                                                                  | 81  |
| REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                     | 82  |
| APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Paciente .....                                                                       | 95  |
| APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Paciente Menor de 18 anos .....                                                      | 97  |
| APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle .....                                                                       | 99  |
| ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética .....                                                                                                           | 101 |
| ANEXO B – Solicitação de renovação do Comitê de Ética.....                                                                                           | 102 |
| ANEXO C – ARTIGO 1 – IL-1 FAMILY AND CUTANEOUS LEISHMANIASIS: A POORLY UNDERSTOOD RELATIONSHIP .....                                                 | 104 |

## 1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença negligenciada com impacto mundial, afetando principalmente pessoas pobres (OMS, 2019). Tal doença consiste na forma cutânea (LC) e mucocutânea (LMC) de apresentação da leishmaniose, que é responsável por 90% de todos os casos da doença no Brasil. Além disso, em Pernambuco já foram reportados casos em todas as regiões do Estado (AGUIAR et al., 2003; DE BRITO et al., 2012). Essa doença infecciosa é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, com várias espécies responsáveis, sendo a *Leishmania braziliensis* de maior impacto na região Nordeste do país (DE ARAÚJO et al., 2014).

A doença geralmente acomete a pele e em alguns casos, regiões de mucosas. Uma importante associação vem sendo demonstrada entre a resposta imunológica desenvolvida pelo paciente e o curso da infecção, sendo que a progressão e desenvolvimento da doença se dão devido ao intenso quadro inflamatório que é gerado em resposta à infecção da *Leishmania* na tentativa de eliminar a carga parasitária (GIUDICE et al., 2012).

Já é bem documentado que a resistência à leishmaniose, sobretudo em modelos murinos, está relacionada ao desenvolvimento de uma resposta imunológica do perfil auxiliar 1 (Th1) e produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-1, interferon gama (IFN- $\gamma$ ), Fator de Necrose Tumoral (TNF, do inglês *Tumor necrosis fator*) e IL-2 (MASPI et al., 2016). Já a susceptibilidade à infecção está relacionada ao desenvolvimento de um perfil de células T auxiliares 2 (Th2) e produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, resultando na replicação e persistência do parasita (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF, citocinas pró-inflamatórias, contribuem para uma resposta imunológica exacerbada do tipo 1 incapaz de controlar a doença (GIUDICE et al., 2012). O perfil Th17 também contribui com o dano tecidual e progressão da leishmaniose em linhagens de camundongo suscetíveis a *L. major* (BOAVENTURA et al., 2010).

Nesse contexto, a avaliação das citocinas da família IL-1, conhecidas por propagarem a inflamação e atuarem como gatilho para expressão de outras citocinas pró inflamatórias, é muito importante para um melhor entendimento do papel dessas proteínas na patogênese da infecção por *Leishmania* (LUKENS; GROSS; KANNEGANTI, 2012). A família IL-1 contém 11 membros que participam da regulação central da resposta inflamatória às infecções induzindo a produção de TNF e IFN- $\gamma$ , e por isso, contribuem para a progressão de quadros inflamatórios (LUKENS; GROSS; KANNEGANTI, 2012).

Por ser bastante heterogênea, alguns membros da família são anti-inflamatórios e antagonizam receptores que modulam a inflamação dirigida pela própria IL-1 (GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013). As citocinas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  participam da resposta Th1 e são as principais pró-inflamatórias, sendo produzidas por células imunes como macrófagos e neutrófilos. Já a IL-18 pode polarizar as respostas Th1 ou Th2, sinergizando com as citocinas IL-12 e IL-4, respectivamente, sendo bastante influenciada pelo microambiente. Por outro lado, o antagonista IL-1Ra inibe a sinalização de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e a proteína recombinante já é usada em tratamentos de quadros inflamatórios como artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal (VORONOV et al., 2010).

A IL-37, por sua vez, tem um papel inibidor importante da inflamação em doenças auto-imunes e auto-inflamatórias como colite, doença inflamatória intestinal, doença de Crohn e psoríase, porém o seu papel na infecção por *Leishmania* ainda não foi esclarecido (JIA; LIU; HAN, 2018).

Sabe-se que a resposta imune pró-inflamatória exagerada está associada ao desenvolvimento do dano tecidual e da úlcera na leishmaniose. Dessa maneira, a cura da leishmaniose exige uma resposta imune efetiva que seja capaz de matar os parasitas, mas não tão intensa a ponto de danificar os tecidos do hospedeiro (CARVALHO et al., 2012; GOMES et al., 2014). Sendo assim, o entendimento da resposta imune envolvendo a família da IL-1 é importante para se melhor caracterizar a proteção, cura e a susceptibilidade a doença. Visto que essa família ainda é pouco compreendida na doença, este estudo contribuiu demonstrando o comportamento da família IL-1 na LTA em pacientes, com destaque para IL-18 e IL-37, citocinas que ainda não haviam sido avaliadas nesse contexto. Observamos dados que sugerem a diminuição de *IL18* como um biomarcador de cura, assim como a atuação de citocinas IL-1 pró-inflamatórias e anti-inflamatória, como IL-37, após o estímulo com antígenos totais.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Leishmanioses**

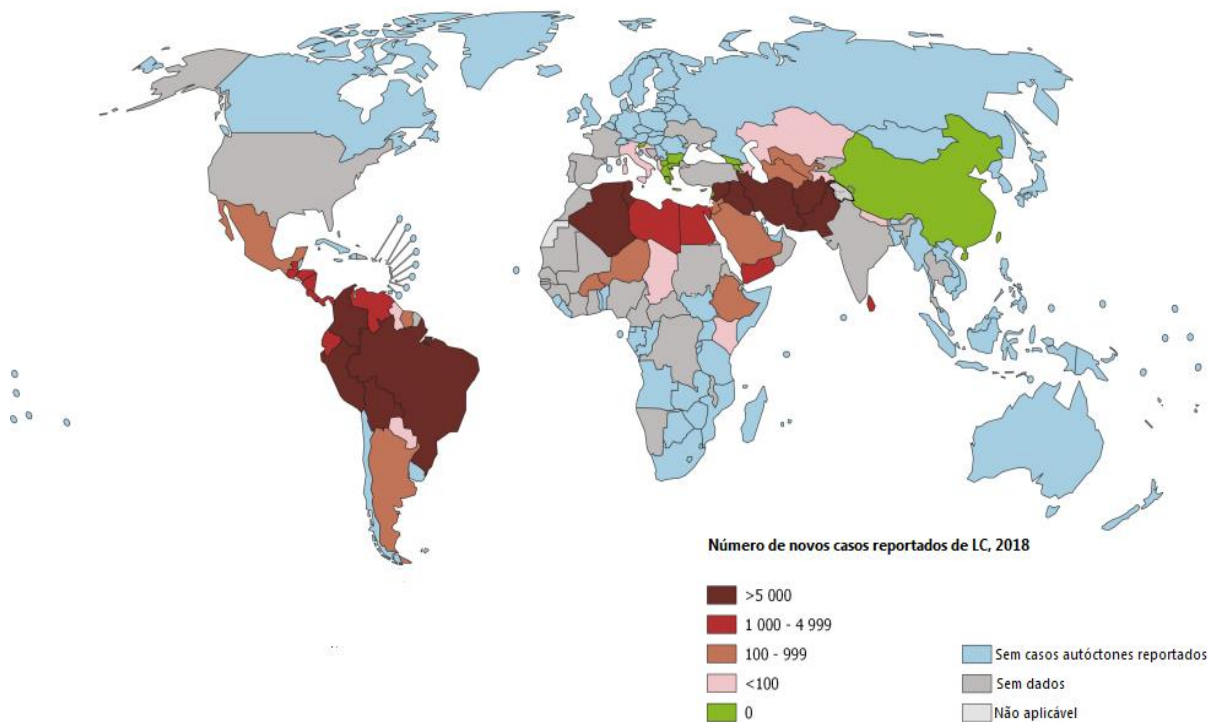
#### **2.1.1 Epidemiologia**

As leishmanioses representam algumas das diversas doenças tropicais infecciosas que afetam principalmente pessoas de baixa renda e não recebem investimentos ou atenção necessários em pesquisas e desenvolvimento de fármacos, por isso são consideradas negligenciadas. Os medicamentos disponíveis apresentam várias limitações como custo e efeitos colaterais diversos (RIBEIRO-ROMÃO et al., 2016; SANGENITO et al., 2019). Fatores como epidemiologia e ecologia são complexos, principalmente nas Américas, porque na mesma área geográfica são observadas variações de ciclo de transmissão, hospedeiros, vetores e manifestações clínicas da doença. Tudo isso contribui para tal negligência, já que muitas vezes não é levado em conta a diversidade clínica e epidemiológica para que haja o correto gerenciamento desses dados (ALVAR et al., 2012; BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018; PACE, 2014).

As leishmanioses se concentram principalmente em países pobres do Sudeste Asiático, África Oriental e América Latina, apesar também de serem endêmicas em vários países da Europa como Espanha, Portugal, Grécia e Croácia (EuroLeish, 2015). Sua distribuição totaliza 102 países com cerca de 350 milhões de pessoas em risco, e por isso se tornam problemáticas para os habitantes locais e também para estrangeiros (Figura 1) (ALVAR et al., 2012; BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018; OPAS/OMS, 2019; PACE, 2014).

Apesar de ter incidência em muitos países, a balança tende de forma expressiva nos mais pobres. Entretanto, alguns autores sugerem que os dados de incidência da doença são fortemente subnotificados. Essa estimativa reduzida se deve em parte às falhas dos sistemas de vigilância epidemiológica, falta de métodos de diagnóstico e até mesmo eventos de deslocamento populacional, causando flutuações nos dados (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017; OMS, 2019).

**Figura 1** - Situação da endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo.



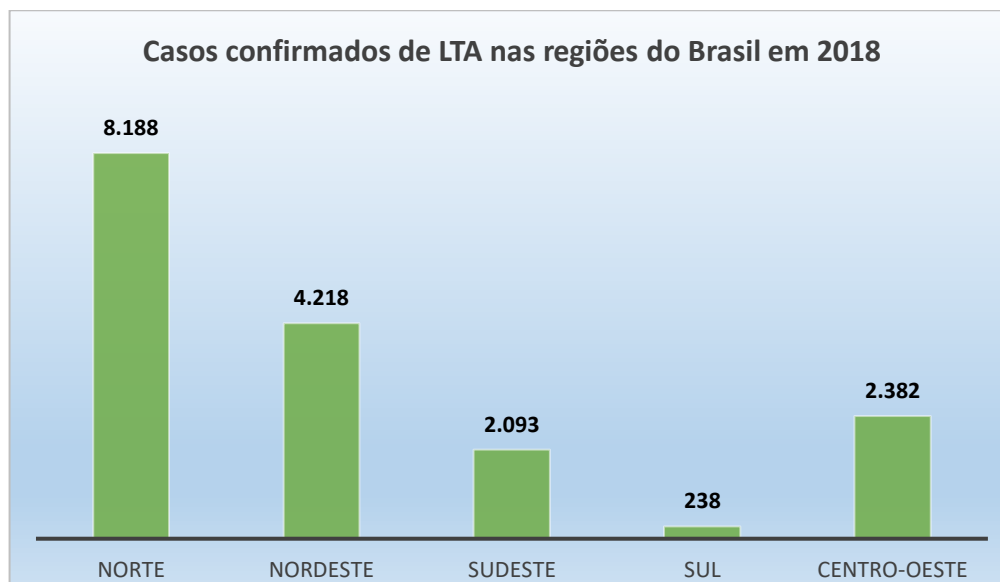
Fonte: modificado de OMS, 2018.

A leishmaniose pode ocorrer no homem em três formas clínicas gerais: visceral (LV), cutânea (LC ou LT) e mucocutânea (LMC), dependendo da espécie. A LV é a forma mais grave da doença causando febre, perda de peso e hepatoesplenomegalia, podendo ser fatal se não for tratada. A LC é a forma clínica mais prevalente em todo o mundo (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

Têm-se observado que mudanças climáticas e ambientais favorecem a prevalência da LC em regiões endêmicas devido a intervenções causadas pelo homem como aquecimento global, desmatamento e migrações em massa (BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018; DU et al., 2016; GONZÁLEZ et al., 2010).

A evolução da LTA no Brasil é caracterizada por uma expansão geográfica. Em 1980 foram registrados casos em 19 estados, situação que evoluiu a partir de 2003 para todos os estados do Brasil. Em 2018, 17.119 casos de LTA foram reportados apenas no Brasil. Nesse mesmo ano, a região Norte se destacou apresentando maior coeficiente de incidência de casos, seguida das regiões Nordeste e Centro-Oeste (SANTOS, 2018) (Figura 2).

**Figura 2** - Distribuição dos casos de LTA pelas regiões do Brasil.



Fonte: Ministério da Saúde/SVS/SINAN, 2018.

Dos casos de LTA confirmados em 2017, 4.775 foram notificados no Nordeste. De 2001 a 2016 foram notificados 6.628 casos de LTA em Pernambuco (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS/SINAN). A LTA é endêmica em todas as regiões do estado de Pernambuco, e segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN/PE), em 2018, 309 casos de LTA foram confirmados. Em Pernambuco, os surtos são detectados de forma esporádica, principalmente nas regiões Agreste e de Zona da Mata, havendo uma importante tendência de aumento de casos, se espalhando para outras áreas (DE BRITO et al., 2012). No Nordeste, a dinâmica populacional de flebotomíneos nas áreas remanescentes de Mata Atlântica parece resultar em um risco constante de infecção em humanos, demonstrando ter importante papel na transmissão da doença, principalmente de trabalhadores rurais e militares que fazem treinamentos nessas áreas (DANTAS-TORRES et al., 2017).

## 2.2 Leishmaniose Tegumentar Americana

### 2.2.1 Transmissão e ciclo de vida de *Leishmania*

A LTA é uma zoonose causada por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanomatidae e gênero *Leishmania*, subdividido nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (SANTOS, 2018). A transmissão pode ser zoonótica (que inclui animais como hospedeiros reservatórios durante o ciclo) ou antroponótica (na qual o homem é a única fonte de infecção para o vetor) (DESJEUX, 2004; READY, 2010). O protozoário parasita tem um ciclo de vida

heteroxênico por estar presente de forma alternada em hospedeiros vertebrados e insetos vetores (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003).

Com relação à transmissão da leishmaniose na América Tropical, acredita-se que inicialmente era restrita a habitats silvestres, e que os seres humanos tenham sido expostos ao parasita ao desenvolverem atividades relacionadas às florestas associadas à colonização de novas áreas. Nesse sentido, a modificação desses habitats causada pelo homem, como desmatamento e a crescente urbanização, vem aumentando a exposição e risco de infecção humana (GONZÁLEZ et al., 2010).

No Brasil, sete espécies já foram identificadas como agentes da LTA, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. O agente etiológico da LTA mais bem difundido no Brasil e em Pernambuco é *Leishmania (Viannia) braziliensis* (DANTAS-TORRES et al., 2017; DE BRITO et al., 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2017)

Uma característica intrínseca da dinâmica da doença é o fato de estar associada a presença de animais reservatórios, sendo os humanos hospedeiros acidentais (CHAVES; PASCUAL, 2006). Diversos grupos de animais silvestres como roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres são consideradas reservatórios naturais da *Leishmania*, além de também ocorrerem em animais domésticos como cães, gatos e equídeos, apesar de serem considerados hospedeiros acidentais (SANTOS et al., 2014).

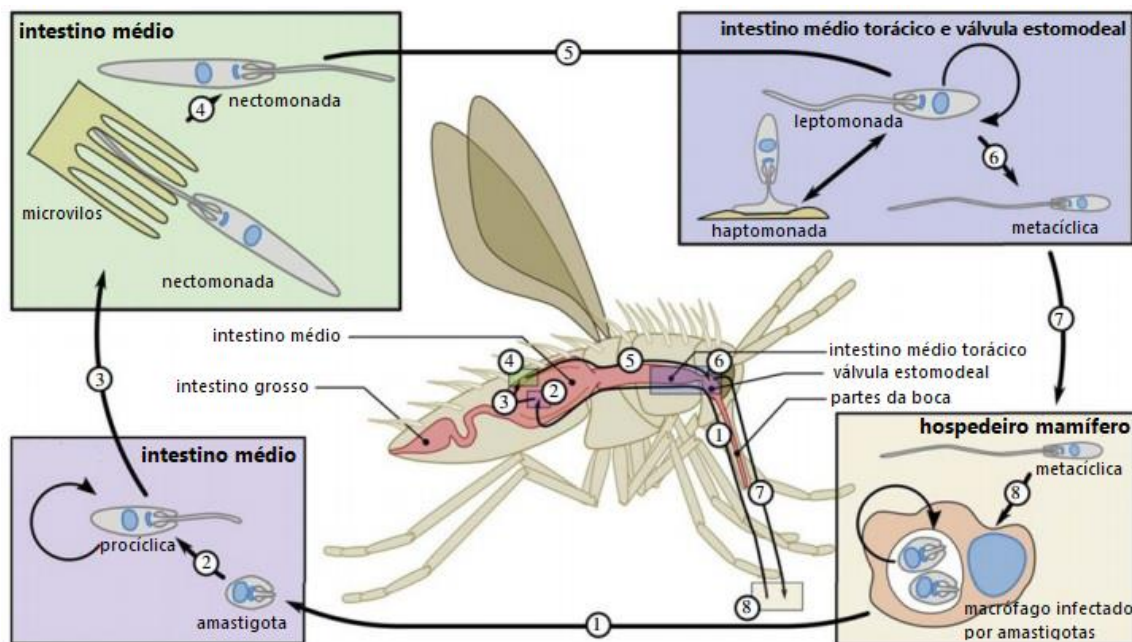
A transmissão dos protozoários se dá pela picada de flebotomíneos infectados que pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae, sub-família Phlebotominae e gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. Podem ser conhecidos popularmente como mosquito palha, dependendo da região geográfica (ANDRADE-NARVAEZ et al., 2016; Ministério da Saúde/Brasil, 2017). Somente flebotomíneos fêmeas participam da transmissão, visto que os machos não realizam o repasto sanguíneo, sendo que estes acabam se infectando com os parasitas presentes no sangue do hospedeiro humano ou outro mamífero (PINHEIRO, 2013).

No flebotomíneo, o ciclo de vida de *Leishmania* está associado ao trato digestivo. Dentro do intestino desse inseto vetor, os parasitas passam por quatro estágios de transformações, todas voltadas para morfologias de promastigotas flagelados extracelulares, sendo o último o estágio infeccioso. O microambiente e fatores, como pH do intestino médio, resultam na transformação morfológica das formas amastigotas, aspiradas do hospedeiro vertebrado, em promastigotas procíclicas. Estes se diferenciam em outras duas formas (nectomonada e leptomonada) no lúmen do intestino e na porção anterior do mesmo, onde finalmente a *Leishmania* se transforma em estágios metacíclicos, que são transmitidas para o hospedeiro vertebrado durante o repasto

sanguíneo (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; LESTINOVA et al., 2017; ROGERS, 2012; ROGERS; CHANCE; BATES, 2002) (Figura 3).

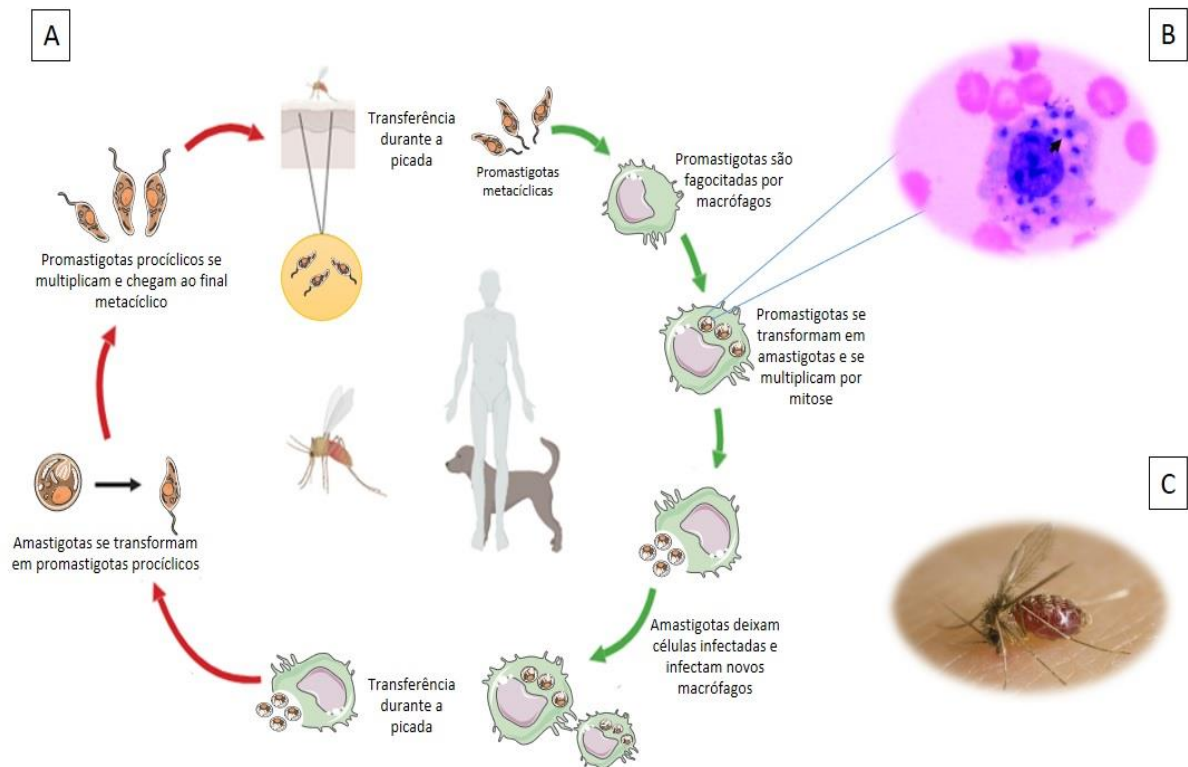
A forma infecciosa de *Leishmania* é a promastigota metacíclica, que é introduzida na pele junto com a saliva, após a picada do flebotomíneo. No interior dos flebotomíneos infectados, tais formas infectantes formam uma massa de parasitas inseridos em um material semelhante a gel, denominado gel de secreção promastigota (PSG, do inglês *Promastigote Secretory Gel*), que contribui na eficiência da transmissão de *Leishmania*, levando a regurgitação das promastigotas (ROGERS, 2012; ROGERS et al., 2004). Uma vez no hospedeiro vertebrado, estas formas são fagocitadas por células como macrófagos e ficam dentro de vacúolos parasitóforos. O parasita muda então sua forma para amastigota, que é arredondada e imóvel, e se multiplicam dentro dessas células do sistema monocítico fagocitário, incluindo macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Figura 4) (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; LESTINOVA et al., 2017).

**Figura 3** - Estágios de desenvolvimento de *Leishmania* no flebotomíneo.



Fonte: adaptado de SUNTER; GULL, 2017. Após aspiração das formas amastigotas do hospedeiro vertebrado, as leishmanias se transformam em promastigotas procíclicas no intestino médio (1-2). Em seguida, se diferenciam em promastigotas nectomonadas (3-4) e passam para o intestino médio torácico e a válvula estomodeal, transformando-se em leptomônadas. A partir disso, elas podem se diferenciar em haptomônadas (ligadas à válvula estomodeal) ou em promastigota metacíclica, forma infectante de mamíferos (5-6).

**Figura 4** - Ciclo de vida de *Leishmania*.



Fonte: a autora. O ciclo heteroxênico de *Leishmania* ocorre no hospedeiro vertebrado (setas verdes) e invertebrado (setas vermelhas) (A). Após a fagocitose, o parasita se diferencia na forma amastigota (seta preta), que é obrigatoriamente intracelular (B; Paula et al., 2008). O flebotomíneo pertencente ao gênero *Lutzomyia* é o inseto vetor transmissor da leishmaniose no Novo Mundo (C; [www.vectorbase.org](http://www.vectorbase.org)). Alguns componentes desta figura foram criados usando modelos modificados da Servier Medical Art, licenciados sob uma Licença não portada Creative Commons Attribution 3.0; <https://smart.servier.com>.

### 2.2.2 Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

No Novo Mundo, as espécies de *Leishmania* podem causar a forma tegumentar da doença, também chamada Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), que compreende a LC e outras manifestações, como a forma mucocutânea, cutânea difusa e disseminada (Figura 5) (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; MARTINS et al., 2014). Nas Américas, tais formas tegumentares são causadas principalmente pelos complexos *L. mexicana* e *L. braziliensis*, enquanto que no Brasil a *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e a *L. guyanensis* se destacam (BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018; PINHEIRO, 2013).

**Figura 5** - Leishmaniose nas formas cutânea localizada (A), mucocutânea (B), difusa (C) e disseminada (D).



Fonte: <http://www.enetmd.com> (A); VELOZO et al., 2006 (B), Ministério da Saúde, 2010 (C e D). Diferentes manifestações clínicas da LTA também contribuem para a complexidade dessa doença, principalmente no tratamento.

No Velho Mundo, as espécies de *Leishmania* causam úlceras autolimitadas na maioria das vezes, enquanto que no Novo Mundo a LTA está relacionada com diversas manifestações clínicas, que compreendem lesões cutâneas autolimitantes até formas mucocutâneas desfigurantes (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; MARTINS et al., 2014).

Após a transmissão, a infecção pode se manter subclínica ou se desenvolver após um período de incubação variável, geralmente de duas a quatro semanas, podendo se estender entre meses e anos. Um pequeno eritema surge como primeiro sinal de infecção, evolui em uma pápula, em seguida em um nódulo que ulcera progressivamente até se tornar a lesão característica da forma cutânea localizada (LCL). Quando sintomática, a aparência e extensão das lesões da pele variam de acordo com a espécie e estado imunológico do paciente. Porém a maioria dos pacientes exibem uma ou duas lesões, geralmente em locais expostos, variando em

tamanho de 0,5 a 3 cm de diâmetro. Tais lesões podem se autocurar, sem tratamento (HEPBURN, 2003; PINHEIRO, 2013; REITHINGER et al., 2007).

Existe também um amplo espectro de apresentações das lesões cutâneas no Novo Mundo para a LCL, e isso parece refletir diversos aspectos como estado imunológico do indivíduo, carga parasitária e a espécie de *Leishmania* (OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 2017). A forma mais comum se apresenta como uma úlcera com bordas infiltradas e circulares com fundo granuloso, também chamada de lesão ulcerada ou ulcerada franca. Outras formas menos frequentes citadas pela literatura incluem, por exemplo, a ectimatóide, nodular, úlcero-vegetante, úlcero-crostosa e impetigóide (Figura 6).

**Figura 6** - Formas de apresentação das lesões cutâneas da LCL.



Fonte: [www.realclearscience.com](http://www.realclearscience.com) (A); Ministério da Saúde/FUNASA, 2000 (B); Ministério da Saúde, 2010 (C). As formas de apresentação das lesões da LTA podem variar, principalmente no Novo Mundo. Algumas classificações incluem, por exemplo, a úlcera franca (A), úlcero-crostosa (B) e impetigóide (C).

A topografia da picada também influencia na manifestação, por exemplo, se for no lábio pode ser caracterizado por mucocutânea. O fato de que existem diversos padrões de lesões no Novo Mundo resulta em menores possibilidades de tratamento. Normalmente a forma cutânea se apresenta como uma úlcera indolor, típica, com borda elevada e base granulomatosa (MURBACK et al., 2011).

Existe também o risco de infecção bacteriana ou fúngica através da lesão, que pode levar a dor e complicações clínicas. A cicatrização pode levar meses ou anos, e normalmente resulta numa cicatriz hipopigmentada e estigmatizante por deixar marcas permanentes (Figura 7). A cura da doença não está associada à uma cura estéril, visto que podem ser encontrados parasitas ou DNA nas cicatrizes de pacientes curados até mesmo anos após o tratamento realizado com sucesso e obtida cura clínica (HEPBURN, 2003; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

**Figura 7** - Lesões de LTA cicatrizadas.



Fonte: COOTI; NISHINO; SERAFINI, 2004; NEVES et al., 2011.

Já a forma mucocutânea é caracterizada por lesões na mucosa nasofaríngea que iniciaram como úlceras simples de pele e progridem devido a metástase na região oronasal, sendo causada geralmente por *L. braziliensis*. As lesões mucosas geralmente aparecem um a dois anos após a infecção inicial (MARTINS et al., 2014; MURBACK et al., 2011).

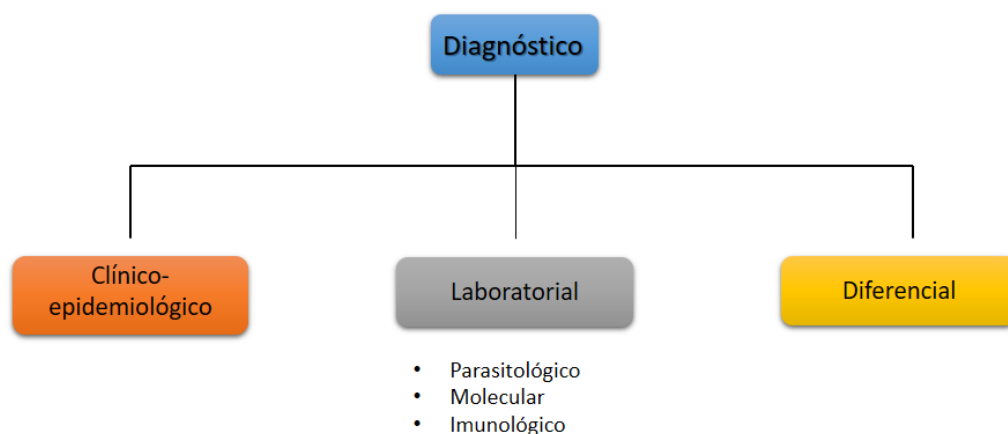
A forma cutânea difusa é marcada por lesões com menor responsividade ao tratamento, múltiplas, crônicas e disseminadas, causadas pela *L. amazonensis* aqui no Brasil. Tais lesões são carregadas de parasitas e podem cobrir todo o corpo do paciente, por isso, o tratamento é mais complicado e os pacientes não exibem autocura (PINHEIRO, 2013; REITHINGER et al., 2007). Outra forma de apresentação das lesões é a disseminada, que difere da difusa pelo perfil de resposta imune desenvolvido, causada principalmente por *L. braziliensis*, exibindo múltiplas

lesões papulares e de aparência acneiforme em diversas regiões do corpo, se destacando a face e o tronco (Ministério da Saúde/Brasil, 2017).

### 2.2.3 Diagnóstico

A associação entre os aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais definem um caminho mais correto para chegar ao diagnóstico da LTA (Figura 8). Os métodos clínicos-epidemiológicos podem ser aplicados em casos de pacientes que são provenientes de áreas endêmicas e exibem lesões típicas, porém sempre devem ser associados aos métodos laboratoriais (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; VASCONCELOS et al., 2018).

**Figura 8** - Associações metodológicas para o diagnóstico da LTA.



Fonte: a autora.

Com relação ao diagnóstico laboratorial, esses podem ser feitos por métodos parasitológicos, moleculares e imunológicos. Os métodos parasitológicos levam a uma confirmação da presença do parasita nos achados clínicos e fornecem informações específicas que enriquecem os dados epidemiológicos como qual é a espécie infectante. Por isso, esse método ainda é considerado por muitos como o padrão-ouro, devido ao reconhecimento do parasita, sem deixar ambiguidades (ALVES et al., 2013). Isso contribui com a administração de tratamentos mais adequados e confirma o diagnóstico diferencial (MINISTÉRIO DA

SAÚDE/BRASIL, 2009). Apesar disso, esse método apresenta uma baixa sensibilidade (podendo chegar a menos de 60%), além de dificuldades como contaminação de cultura e crescimento do parasita (SARKARI et al., 2014).

Dentre os métodos parasitológicos, há a demonstração direta, onde é coletada uma biópsia, a partir da qual pode ser feito um esfregaço de impressão (*imprint*), cultura *in vitro*, inoculação em hamster (*Mesocricetus auratus*) para isolamento *in vivo* ou exame histológico para visualização das formas amastigotas. Além da biópsia, os métodos alternativos de obtenção de amostras incluem aspirados por agulha e esfregaços de pele (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; HEPBURN, 2003).

As ferramentas imunológicas incluem a intradermoreação de Montenegro (IDRM), Imunofluorescência Indireta (IFI) e o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*/ELISA). O IDRM exibe uma alta sensibilidade (aproximadamente 80% e aumenta após a 4ª e 6ª semana de duração da lesão), e apesar de ter um desempenho relativamente bom no diagnóstico da LC e mucocutânea, essa técnica possui alguns pontos negativos, como o fato de não distinguir a doença ativa de infecção passada, demonstrar negatividade para lesões recentes, assim como na forma difusa e também em pacientes imunossuprimidos (DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; MANZUR; UL BARI, 2006).

A IFI é um método sorológico que pode ter uma sensibilidade baixa (em torno de 50%) para a LC devido aos baixos níveis de anticorpos circulantes na forma cutânea, porém, como a técnica emprega antígenos específicos de *Leishmania* para detectar anticorpos anti-*Leishmania*, pode exibir resultados variáveis. Por exemplo, Barroso-Freitas et al. (2009) observaram uma sensibilidade em torno de 90% e especificidade entre 77-86%, dependendo do antígeno usado (*L. major* ou *L. braziliensis*). Ainda existem possibilidades de reações cruzadas com a forma visceral e Doença de Chagas, e normalmente é negativa para a forma cutânea difusa (KAR, 1995; MURBACK et al., 2011).

Por sua vez, o ELISA exibe os parâmetros de especificidade (geralmente baixa, menor que 60%) e sensibilidade (entre 75-90%) bastante variáveis, também a depender do antígeno usado. Alguns desses antígenos podem ter alta sensibilidade (mais de 90%), mas em contrapartida produzem reações inespecíficas em pessoas com outras patologias como Doença de Chagas e micoses profundas e até mesmo com anticorpos de indivíduos sem a leishmaniose (DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015; SARKARI et al., 2014; SZARGIKI et al., 2009). Por isso, os baixos níveis de anticorpos em pacientes com LC (ao contrário da LV) tornam os testes

sorológicos não ideais para o diagnóstico sem a confirmação do parasitológico (HEPBURN, 2003).

Por fim, o uso da técnica da Reação em Cadeira da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction/PCR*) convencional e suas variações tem sido empregado para o diagnóstico da LC a partir da amplificação de diferentes regiões genômicas de *Leishmania* ou do cinetoplasto (kDNA) como parâmetro de detecção em amostras que podem ser pele ou mucosa. Além da quantificação, a PCR permite a identificação de espécies de parasito e exibe uma alta sensibilidade (entre 90-100%) e especificidade de 100%, porém que depende muito dos primers usados e região a ser amplificada, oferecendo uma alternativa para a confirmação do diagnóstico clínico (GOTO; LINDOSO, 2010; Ministério da Saúde/Brasil, 2009; MOREIRA; YADON; CUPOLILLO, 2018; OLIVEIRA et al., 2011; SÁNCHEZ-ROMERO et al., 2019). Entre as limitações dessa técnica, temos os erros de procedimentos que podem levar a falsos-negativos (principalmente durante a extração gerando má qualidade da amostra), alto custo, necessidade de operador treinado e infraestrutura e chances de contaminação. Esta última vem sendo reduzida com as abordagens em Tempo Real que dispensam o uso de eletroforese (DA C. GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2015; DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015; MOREIRA; YADON; CUPOLILLO, 2018).

Apesar disso, ainda não existe um procedimento ou técnica padrão aceita de forma unânime e bem distribuída para o diagnóstico da LTA. O exame microscópico ainda é considerado o método mais utilizado devido ao alto custo dos demais e por não estarem disponíveis em todas as regiões do país. No entanto, o uso da PCR vem ganhando cada vez mais importância pela sua capacidade de detecção em diversos tipos de amostras mesmo com baixas cargas parasitárias (ALVES et al., 2013; GALLUZZI et al., 2018; SCHALLIG; OSKAM, 2002).

Além disso, o diagnóstico diferencial com outras doenças é importante para que as lesões cutâneas não sejam confundidas com outras formas como úlceras traumáticas, úlceras de estase, úlceras causadas por anemia falciforme, piodermites, paracoccidioidomicose, neoplasias cutâneas, sífilis, tuberculose cutânea, psoríase, hanseníase, esporotricose, úlcera de buruli entre outras doenças cutâneas (BOLEIRA et al., 2010; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; VASCONCELOS et al., 2018).

#### 2.2.4 Tratamento

Desde a década de 1940 até os dias atuais, a terapia da leishmaniose está baseada principalmente no uso de antimoniais pentavalentes que existe sob duas formas: o antimoniato de meglumina ou N-metilglucamina (Glucantime<sup>®</sup>, fármaco de primeira escolha no Brasil) e o estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>, mais comercializado nos países de língua inglesa). Um dos problemas que dificultam o tratamento é que esses antimoniais devem ser administrados pela via parenteral, resultando em difícil acompanhamento principalmente dos residentes em áreas rurais, onde há mais casos (Ministério da Saúde/Brasil, 2009; PINHEIRO, 2013).

A OMS estipulou que a dose do Glucantime<sup>®</sup> fosse calculada em mg/Sb<sup>+5</sup>/kg/dia (sendo Sb<sup>+5</sup> o antimônio pentavalente). Sendo assim, o Ministério da Saúde do Brasil recomenda 10 a 20 mg/Sb<sup>+5</sup>/kg/dia de Glucantime<sup>®</sup> por via intravenosa ou intramuscular nas formas cutâneas localizadas e disseminadas durante 20 dias. O tratamento das formas mucosas é mais intenso porque há mais chances de recidivas, sendo recomendada a dose de 20 mg/Sb<sup>+5</sup>/kg/dia por 20-30 dias. Em todos os casos, se não houver cura, o tratamento é repetido por mais 30 dias, e se ainda não houver, são usados fármacos de segunda escolha como o isotionato de pentamidina e Anfotericina B, um antifúngico com ação leishmanicida, ou a sua forma lipossomal (AmBisome<sup>®</sup>). O critério de cura é clínico e baseado no aspecto da lesão a partir da sua reepitelização e regressão do eritema (GONÇALVES; COSTA, 2018; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003).

Como praticamente 90% do antimoniato de metilglucamina é excretado nas primeiras 48 h pelos rins, é necessário aplicar altas doses do fármaco em regime contínuo para garantir sua presença nos tecidos e resultados positivos do tratamento (RATH et al., 2003). A atividade antileishmanicida dos antimônios se dá devido a inibição da glicólise e da betaoxidação de ácidos graxos, levando à perturbação do metabolismo energético do parasito (HALDAR; SEN; ROY, 2011).

Apesar do Glucantime<sup>®</sup> ser considerado eficaz no tratamento, ele exibe uma elevada toxicidade e causa efeitos adversos, principalmente nos pacientes com mais de 50 anos (VASCONCELOS et al., 2018). Dentre os numerosos efeitos colaterais, estão dor nas juntas, mialgia, anorexia, náusea, vômito, azia, dor abdominal, prurido, febre, fraqueza, dor de cabeça, tontura, insônia, palpitações, alteração das enzimas hepáticas séricas (com sua elevação), leucopenia entre outros. Por isso, a administração em idosos é feita com cautela, além de haver contraindicação durante a gravidez, lactação, para indivíduos com hipersensibilidade e

pacientes com doenças crônicas (coração, fígado, doenças renais). Por isso, estima-se que 25% dos pacientes acabam interrompendo o tratamento (EIRAS; KIRKMAN; MURRAY, 2015; GONÇALVES; COSTA, 2018).

Além das administrações intravenosa e intramuscular do Glucantime<sup>®</sup>, uma alternativa que vem apresentando diminuição dos efeitos colaterais e da absorção sistêmica do fármaco é a via intralesional. No Velho Mundo ela já vem sendo usada, apesar de nas Américas ainda esteja na fase de discussão e implementação (DA SILVA et al., 2018). Essa terapia reduz o número de ampolas necessárias, o que reduz o custo e os efeitos colaterais. Ademais, o medicamento é administrado em altas concentrações diretamente no tecido, resultando em taxas de cura que podem chegar a 90% (AMEEN, 2010; OLIVEIRA-NETO et al., 1997). No Brasil essa terapia já foi incorporada e há recomendações como a realização feita apenas nos casos da forma clínica cutânea localizada, lesão única de até 3 cm e por profissionais capacitados (INI/FIOCRUZ, 2016; Ministério da Saúde/Brasil, 2017).

A ativação do sistema imunológico do paciente parece estar associada à eficácia do tratamento pelos antimoniais pentavalentes. Sabe-se, por exemplo, que o uso do antimonial melhora a capacidade de fagocitose dos monócitos de pacientes infectados, apesar de não ser ainda esclarecido se é um mecanismo direto ou indireto do fármaco (DE SALDANHA et al., 2012). Saberi et al. (2016) demonstraram em seu estudo níveis maiores de expressão de interleucina (IL) -12, uma citocina que participa na ativação de células T *helper* (T auxiliar) 1, em camundongos BALB/c tratados com Glucantime<sup>®</sup> em comparação aos não tratados. O mesmo foi observado em macrófagos de pacientes que receberam o tratamento em comparação ao controle. O mesmo trabalho observou que, de forma interessante, há uma redução nos níveis séricos de IFN- $\gamma$  entre a 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> semana de tratamento nos camundongos, apesar de serem 14 vezes maiores do que o observado nos não tratados. De Saldanha et al. (2012) também observaram diminuições nos níveis de TNF produzidos por monócitos de pacientes ao fim do tratamento. Isso evidencia que balanço imunológico pode levar à melhor resistência do hospedeiro.

Existem algumas outras terapias alternativas como crioterapia (indução da crionecrose que destrói as amastigotas e ativa uma resposta imune), termoterapia (induzindo a cicatrização das lesões por tratamento com calor local), além das formulações orais como o Miltefosine e alguns azóis como Fluconazol (DE PRATES et al., 2017; LÓPEZ-CARVAJAL et al., 2016; LÓPEZ et al., 2012; PACE, 2014).

Uma nova abordagem é a profilaxia, e a vacinação seria a melhor estratégia para um controle eficaz da leishmaniose. Isso é baseado no fato de que após a recuperação de uma

infecção, há uma imunidade considerada “sólida” que previne contra uma reinfecção (AMEEN, 2010; PACE, 2014). No entanto, ainda não há uma vacina disponível. Estudos se concentram em desenvolver uma vacina que seja eficaz e segura para a LC utilizando organismos atenuados, antígenos recombinantes, proteínas da saliva do vetor e vacinas de DNA (AMEEN, 2010; SCHALLIG; OSKAM, 2002). Algumas das dificuldades incluem a falta de investimentos, e as diferentes espécies de *Leishmania* e suas manifestações clínicas (WHYTE; ZUFFEREY, 2017).

## 2.3 Resposta imune na LTA

### 2.3.1 Resposta imune inata

O mecanismo de defesa contra a *Leishmania* em humanos envolve vários componentes da resposta imune inata e adaptativa, porém já é bem compreendida a capacidade desses protozoários de desenvolver estratégias de escape e modulação da resposta imune que garantem sua sobrevivência (MACHADO et al., 2004; ROSSI; FASEL, 2018). A resposta humoral durante a LTA parece não ser eficaz, visto que o parasita permanece no vacúolo parasitóforo, além disso, nas formas autocicatrizantes esse tipo de resposta é modesta (NYLÉN; GAUTAM, 2010). Durante a infecção, as células fagocíticas, como os neutrófilos, desempenham um papel crucial, contribuindo tanto para a sobrevivência, através do mecanismo de “Cavalo de Tróia”, como na destruição de *Leishmania* (BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018).

Essa destruição se dá porque as leishmanias são susceptíveis aos neutrófilos, sendo que logo após a infecção, estas células imunes são recrutadas de forma intensa para o sítio de infecção. O dano tecidual causado pela picada já é suficiente para causar tal recrutamento nos primeiros 90 minutos, que parece ser independente do parasita. Porém, fatores provenientes do flebótomo, como o PSG, contribuem na atração dos neutrófilos (HURRELL; REGLI; TACCHINI-COTTIER, 2016; ROSSI; FASEL, 2018).

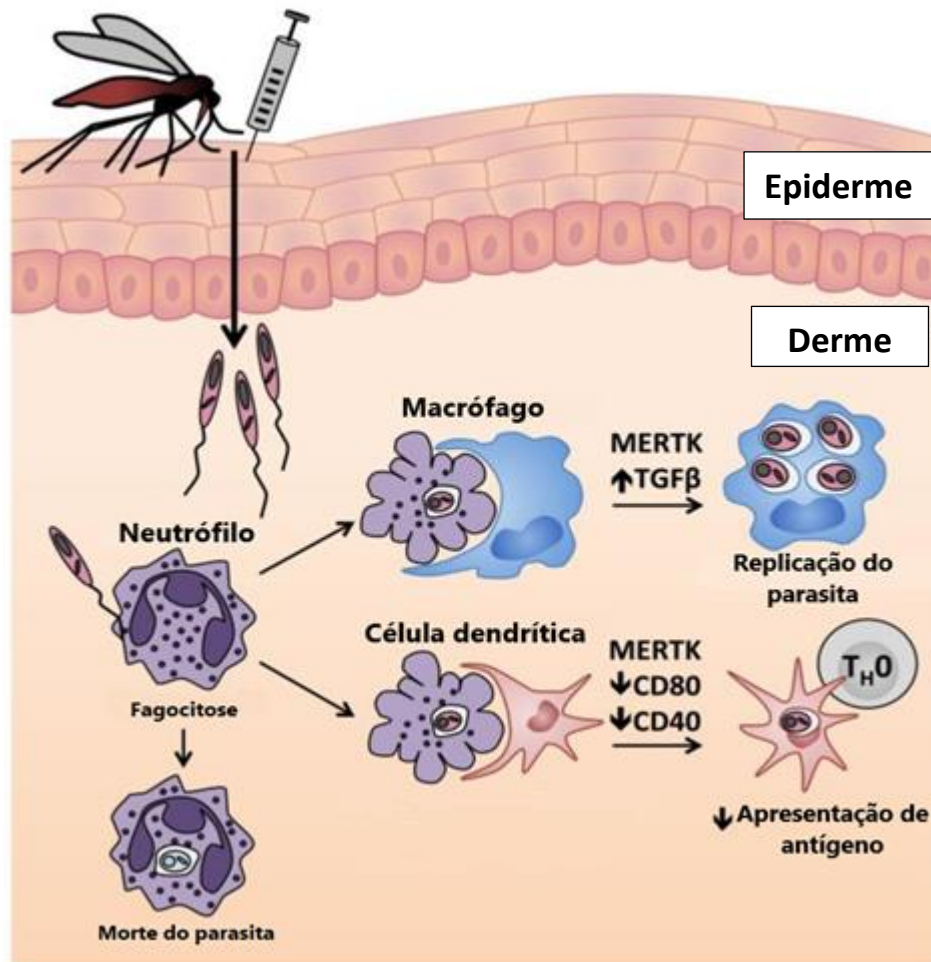
Os neutrófilos podem desempenhar a defesa por meio da fagocitose e morte dos parasitas ou formando redes de malhas extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês *Neutrophil Extracellular Trap*) e liberando fatores que agem como agentes microbicidas no meio extracelular como é visto na produção de peróxido de hidrogênio e NO (BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018; BRINKMANN et al., 2004; GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013). Após a fagocitose, os fagossomos se fundem com grânulos intracelulares para expor os parasitas a enzimas, peptídeos antimicrobianos e espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), formando os fagolisossomos (GUEIRARD et al., 2008).

Apesar disso, a eficiência dessas estratégias depende da espécie de *Leishmania* infectante. Alguns estudos mostram que as leishmanias podem sobreviver dentro dos neutrófilos inibindo a formação do fagolisossomo. Por exemplo, *L. major* e *L. braziliensis* podem ser resistentes às ações das NETs por meio da ação de endonucleases que digerem as NETs (BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018; REGLI et al., 2017).

Existem ainda evidências que comprovam o papel dos neutrófilos na patogênese da leishmaniose. Isso acontece porque alguns parasitas conseguem se manter viáveis dentro de vacúolos parasitóforos, estruturas semelhantes ao fagolisossomo, após a captura pelos neutrófilos. Por terem um tempo de vida muito curto, os neutrófilos sofrem apoptose espontânea entre 6 e 12 horas, podendo se estender até 42 horas em casos de infecção. Nesse momento é observado um pico de migração de macrófagos para o sítio de infecção, que englobam os neutrófilos apoptóticos e acabam se infectando. Por fagocitarem neutrófilos em apoptose, os macrófagos são induzidos a um estado anti-inflamatório com a liberação de TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor beta*) (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017; VAN ZANDBERGEN et al., 2004).

Esse mecanismo já foi comparado a um “cavalo de Tróia”, porque o englobamento desses corpos apoptóticos infectados leva à supressão das respostas microbidas e silenciam as funções dos macrófagos, possibilitando a infecção de forma silenciosa (FADOK et al., 1998). Quantidades elevadas de IL-10 e baixas quantidades de IL-12 também contribuem para essa entrada em macrófagos, dando início a uma infecção duradoura (CECÍLIO et al., 2014). Essa estratégia também afeta a maturação das células dendríticas (DCs, do inglês *Dendritic cell*) e o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa eficiente, pois tais células podem também fagocitar os neutrófilos apoptóticos e diminuir sua capacidade de apresentar antígeno às células T (RIBEIRO-GOMES et al., 2015) (Figura 9).

**Figura 9** - Morte e sobrevivência de *Leishmania* no sítio da infecção cutânea.



Fonte: Adaptado de SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017. Após a chegada dos neutrófilos no sítio de infecção, as leishmanias podem ser mortas pela fagocitose ou se manterem viáveis até a apoptose. Neste último processo, há ativação do gene da proteína MERTK que está envolvida na depuração de células apoptóticas por macrófagos (eferocitose) e leva ao aumento de TGF- $\beta$ . As DCs que englobam os restos apoptóticos tem sua capacidade de apresentação de antígeno diminuída.

No início da infecção, as células *natural killer* (NK) também são atraídas, após o recrutamento de neutrófilos, e são uma fonte importante de IFN- $\gamma$ , que favorece a diferenciação do perfil Th1 de células T CD4<sup>+</sup> em linfonodos e induz resistência à *L. major* em camundongos (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013; PINHEIRO, 2013).

Nas primeiras horas de infecção, os macrófagos dispõem de respostas anti-*Leishmania* mais fortes que incluem produção de óxido nítrico-sintase induzida (iNOS, do inglês *Inducible nitric oxide synthase*), ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS, do inglês *Reactive Nitrogen Species*). Porém, os parasitas desenvolveram diversos mecanismos que interferem nessa resposta, como o revestimento de lipofosfoglicano (LPG, do inglês *lipophosphoglycan*) que protege os parasitas de ROS e RNS e impede a fusão do fagossomo que contém o parasita com

os lisossomos, além da protease de superfície gp63 que inibe a ação degradativa das enzimas fagolisossomais. Basicamente, as leishmanias conseguem dominar o estresse oxidativo até conseguir sua sobrevivência no macrófago (CARNEIRO et al., 2018; ROSSI; FASEL, 2018; ZAMBRANO-VILLA et al., 2002).

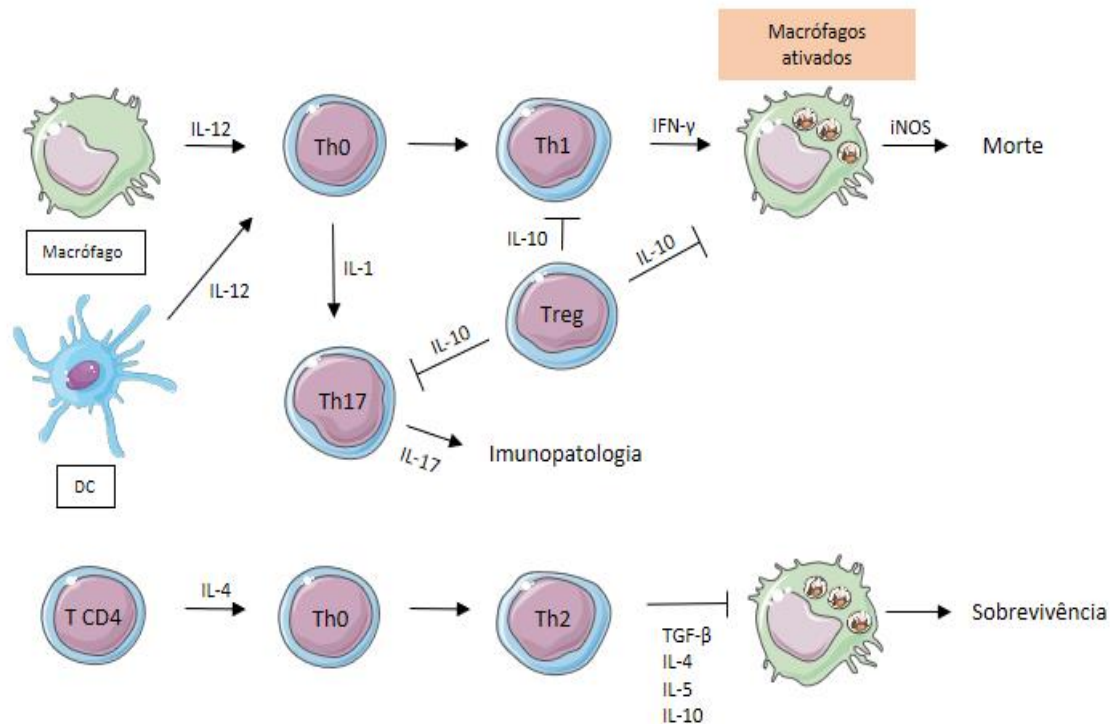
Dessa forma, os parasitas de *Leishmania* se multiplicam em macrófagos teciduais e se espalham para outros macrófagos, também de forma silenciosa. Na LTA, a infecção é geralmente limitada à pele e ao sistema linfático, mas pode influenciar os tecidos profundos causando a LC difusa ou penetrar nas membranas mucosas, resultando na forma mucocutânea (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016). É importante ressaltar que a fase inicial da infecção é crucial para ditar o desfecho da doença. Uma vez que o parasita é fagocitado, as células imunes inatas produzem em seguida citocinas que determinam o desenvolvimento da imunidade adaptativa. Isso influencia na geração de uma resposta protetora ou prejudicial. Além disso, mesmo sendo indispensáveis para uma resposta efetora e de memória, as células do sistema imune adaptativo também contribuem com a patogênese, principalmente na lesão tecidual e recidivas (ROSSI; FASEL, 2018).

### 2.3.2 Resposta imune adaptativa

O desenvolvimento de subpopulações de linfócitos T  $CD4^+$ , conhecidos como T auxiliares ou “*helpers*”, do inglês, pode se direcionar em quatro perfis principais: Th1, Th2, Th17 e Treg (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016). Todos levam a repostas distintas como resistência e susceptibilidade à *Leishmania* e desempenham papéis importantes no desfecho da doença (BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018) (Figura 10).

A resposta Th1 é crucial para o controle da replicação dos parasitas, através da produção de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-2 (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). Tais células induzem a produção de óxido nítrico em macrófagos que leva a destruição do parasita, além de resistência do hospedeiro (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013). A secreção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *Antigen-presenting cell*), macrófagos e células dendríticas, promove a diferenciação de células T “virgens” em linfócitos Th1 secretores de IFN $\gamma$ , através de um fator de transcrição principal que é o T-bet (ALEXANDER; BROMBACHER, 2012; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

**Figura 10** - Diferentes vias imunológicas na LTA.



Fonte: adaptado de MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016. A morte do parasita ou sua persistência durante a infecção são eventos que envolvem a atuação de células imunes e algumas citocinas principais que são cruciais na ativação de perfis de resposta associados a resistência (Th1), susceptibilidade (Th2), progressão da doença (Th17) e regulação da resposta imune (Treg). Alguns componentes desta figura foram criados usando modelos modificados da Servier Medical Art, licenciados sob uma Licença não portada Creative Commons Attribution 3.0; <https://smart.servier.com>.

O perfil Th1 de fato controla a multiplicação e disseminação do parasita na LC e LM, mas não erradica a infecção por *Leishmania*, e de forma exacerbada gera dano tecidual. Sabe-se que a produção excessiva da resposta Th1 e de citocinas pró-inflamatórias estão associadas à imunopatologia grave da doença. Isso acontece porque, apesar de serem fatores necessários para matar *Leishmania*, IFN-γ, TNF e NO também estão implicados na inflamação, levando ao dano tecidual (BACELLAR et al., 2002). Além disso, indivíduos assintomáticos não exibem uma resposta Th1 mais forte do que os que possuem a doença ativa, expressando baixos níveis de IFN-γ e TNF e níveis adequados de IL-10 (ALLEN; WYNN, 2011; BITTAR et al., 2007; MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016).

Uma tendência de fortes respostas Th1 é observada nas infecções de LC e LM (incluídas na LTA), principalmente nas infecções causadas pela *L. braziliensis*, mesmo quando o número de parasitas no tecido é escasso ou ausente. Isso acarreta no desenvolvimento da lesão, já que

o sistema imune não consegue destruir completamente as leishmanias e a resposta Th1 se dirige para uma reação inflamatória muito intensa, causando danos aos tecidos saudáveis, resultando nas úlceras (MACHADO et al., 2004). Isso se dá devido a produção exagerada de IFN- $\gamma$  e TNF que não é modulada nem por IL-10 nem por TGF- $\beta$ , fatores que antagonizam os efeitos dessas citocinas (GIUDICE et al., 2012; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

Uma outra população que vem sendo associada com a patogênese na LC e LM é a das células Th17. As células T auxiliares que produzem IL-17 (Th17) são uma subpopulação de células T conhecidas por mediar muitas doenças inflamatórias auto-imunes e crônicas (BACELLAR et al., 2009). A IL-17 media a atração de neutrófilos e liberação de proteinases que induzem o dano tecidual e dessa forma contribui para a progressão da leishmaniose em linhagens de camundongo suscetíveis infectados por *L. major* (LOPEZ KOSTKA et al., 2009). As citocinas da família IL-1 são conhecidas por promoverem a diferenciação de células Th17, induzindo o fator de transcrição IRF4 (do inglês, *IFN regulatory factor 4*) que é crucial na diferenciação de subpopulações T CD4<sup>+</sup>, incluindo células Th17. IL-1 também participa induzindo a expressão de ROR $\gamma$ t, um fator de transcrição expresso em células Th17, contribuindo assim para a patogênese da leishmaniose (HUBER; LOHOFFSIMS, 2014; SIMS; SMITH, 2010).

Boaventura e colaboradores (2010) observaram que células IL-17<sup>+</sup> estão presentes nas lesões da mucosa humana causadas por *L. braziliensis*, mediando a infiltração de neutrófilos nas lesões. Bacellar e colaboradores (2009) também relataram um aumento de expressão da IL-17 em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês *Peripheral blood mononuclear cell*) após estimulação com antígeno de *Leishmania*. A produção da IL-17 em pacientes com lesão ativa da LT parece estar relacionada a resposta imunológica frente ao parasita no início da infecção, tendo algum papel importante na resolução da doença (ALMEIDA, 2013). Pitta et al. (2009) relataram uma relação da IL-17 com a imunoproteção a *L. donovani* na LV.

Já os linfócitos Th2, que estão envolvidos na indução da resposta humoral e de eosinofilia, assumem um papel de suscetibilidade na LTA por induzir a produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, levando à replicação e persistência do parasita (PINHEIRO, 2013). Nesse perfil, a incapacidade dos antígenos de ativar DCs para produzirem IL-12 resulta numa via de diferenciação de linfócitos T virgens em Th2 secretores de IL-4, que ativa STAT6 e consequentemente o fator de transcrição GATA3 (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Apesar disso, a produção de citocinas anti-inflamatórias, provenientes do perfil Th2, em níveis

mais baixos podem contribuir na atenuação das reações inflamatórias e no reparo de lesões (ALLEN; WYNN, 2011; MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016).

Outra subpopulação de células T importante na imunidade na LTA é a de células T reguladoras (Treg), cujo marcador principal é o fator de transcrição FOXP3 (BALLKE et al., 2016). Elas promovem a auto-tolerância imunológica e regulam as respostas inflamatórias, prevenindo danos extremos, principalmente através da produção de IL-10 (ALEXANDER; BROMBACHER, 2012; BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018). O desequilíbrio entre Treg e células efetoras pode ser crítico para imunidade contra *Leishmania*, visto que as Treg se acumulam rapidamente em sítios de infecção por *L. major* e favorecem a expansão precoce do parasita por suprimirem as células T efetoras (BELKAID et al., 2002; SUFFIA et al., 2005).

Campanelli et al. (2006) verificaram que as células Treg funcionais podem ser encontradas em lesões de pele de pacientes com LC infectados com *L. braziliensis*, provavelmente trabalhando para controlar as funções das células T efetoras no local. Costa et al. (2013) também observaram que pacientes com lesão ativa apresentavam um aumento da ativação de Treg em relação aos indivíduos subclínicos, podendo estar favorecendo a replicação e persistência da leishmania, dificultando a eliminação dos parasitas e gerando uma inflamação crônica.

A imunidade protetora mediada pela infecção por *Leishmania* também está associada a ativação e expansão de células T CD8<sup>+</sup> específicas para o parasita (CARDOSO et al., 2015). Sua ação pode envolver a citotoxicidade, através de células T citotóxicas específicas para *Leishmania*, capazes de lisar diretamente os macrófagos infectados, mas também induzindo a produção de IFN- $\gamma$ , uma citocina importante para ativação de macrófagos e eliminação das leishmanias (UZONNA; JOYCE; SCOTT, 2004).

O papel das células T CD8<sup>+</sup> é paradoxal pois pode estar associado ao processo de cura e cicatrização, mas também na progressão da doença. Por exemplo, algumas pesquisas mostram um aumento das porcentagens de células CD8<sup>+</sup> em lesões mais antigas e que tais células produzem IFN- $\gamma$  que atua de forma crítica na ativação de Th1 (DA-CRUZ et al., 2005; NOVAIS; SCOTT, 2015). Apesar disso, as células CD8<sup>+</sup> podem desenvolver um fenótipo citolítico e direcionar a patologia quando migram para um sítio de lesão, levando ao aumento da morte celular e a inflamação. Além disso, possuem granzimas, que estão diretamente associadas à intensidade da reação inflamatória observada nas lesões de LTA (CARDOSO et al., 2015; FARIA et al., 2009; NOVAIS; SCOTT, 2015). Isso acontece porque o processo de apoptose induzido pelas células T CD8<sup>+</sup> ainda é capaz de afetar células saudáveis, devido à

ampla gama de estímulos que podem desencadear a ativação de inflamassomas e aumento da produção de IL-1 $\beta$ , também associada às lesões (NOVAIS et al., 2017).

Por fim, muito do que se sabe sobre as respostas de resistência e susceptibilidade à *Leishmania* e severidade da doença provém de estudos com diferentes modelos murinos modificados geneticamente que exibem variações na gravidade e resposta à doença. Camundongos BALB/c e C57BL/6, por exemplo, são modelos de susceptibilidade (por apresentarem respostas fortemente Th2) e resistência (associada ao desenvolvimento de uma resposta Th1 e ativação de macrófagos infectados) à *L. major*, respectivamente (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

No entanto, existem algumas limitações importantes que dificultam a extrapolação do que é observado em camundongos para humanos, como diferenças de respostas em infecções de diferentes espécies de *Leishmania*, dose de infecção pelas promastigotas metacíclicas que não se assemelham ao que acontece durante o repasto sanguíneo natural, além da ausência da saliva do flebotomíneo, que parece ter efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores (LESTINOVA et al., 2017; LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014). Alguns destaques das respostas desenvolvidas em camundongos e humanos foram revisadas no artigo publicado pelo grupo (DA SILVA AMORIM, et al., 2020). Por isso, a avaliação dos perfis de resposta imune em humanos tem grande importância para melhor compreensão dos mecanismos que envolvem a severidade e sucesso de cura na patologia da LTA.

## 2.4 Família IL-1

Os membros da família IL-1 são conhecidos por serem importantes citocinas pró-inflamatórias e estarem envolvidas em distúrbios associados à inflamação. A família inclui 11 citocinas, sendo que sete delas tem atividade pró-inflamatória e agonista (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33, IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  e IL-36 $\gamma$ ), três atuam como antagonistas de receptores (IL-1Ra, IL-36Ra, IL-38) e uma é considerada anti-inflamatória (IL-37), ou seja, quatro regulam negativamente a resposta inflamatória. Por sua vez, a família de receptores IL-1 (IL-1R) é formada por 10 membros, entre receptores e co-receptores, sendo eles IL-1R1, IL-1R2, proteínas acessórias IL-1RAcP e IL-18R $\beta$ , IL-18R $\alpha$ , ST2 (ou IL-33R), IL-36R, SIGIRR ou TIR8, TIGIRR-2 ou IL-1RAPL1 e TIGIRR-1 ou IL-1RAPL2 (BORTHWICK, 2016; GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013) (Quadro 1).

Todas essas citocinas tem seus genes localizados no cromossomo 2, com exceção de IL-18 e IL-33, as quais se encontram codificadas nos cromossomos 11 e 9 (MALIK; KANNEGANTI, 2018). As citocinas IL-1 participam nas respostas imunes contra infecções causadas por patógenos, mediando a resposta inflamatória (CHARMOY et al., 2016; MASPI; ABDOLI; GHAFFARIFAR, 2016) e atuam de forma bastante semelhante a IL-12 por induzirem a geração de linfócitos T secretores de IFN- $\gamma$ , polarizando assim a resposta pró-inflamatória Th1 que envolve a ativação de macrófagos, além de contribuírem para a ativação de células Th17 (SIMS; SMITH, 2010).

Também são consideradas “citocinas de alarme” devido ao papel de iniciação e propagação de uma rede de mediadores pró-inflamatórios e indução da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e leucócitos (RIDER et al., 2011; VORONOV et al., 2010). Atualmente, poucos estudos associam o papel dessa família no contexto da leishmaniose em pacientes, porém há muitas indicações de que ela contribua para a patogênese em humanos (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Dentre os produtores de citocinas IL-1, estão neutrófilos, monócitos, DCs, basófilos, mastócitos, plaquetas e macrófagos, sendo esta última a principal fonte a partir do sistema imune. Toda a família é secretada também por células epiteliais (APTE; VORONOV, 2008; ROLFES et al., 2020; SIMS; SMITH, 2010). A IL-1 produzida por DCs é crucial na indução da ativação do perfil de resposta Th1 na leishmaniose, além disso participa da cascata de sinalização da IL-17. Essa citocina também está envolvida na diferenciação precoce de células Th17 e na manutenção do fenótipo, tendo algum papel na autoimunidade mediada por Th17. Este perfil de resposta é conhecido por mediar a progressão da leishmaniose (CHUNG et al., 2009; LOPEZ KOSTKA et al., 2009; MASPI; ABDOLI; GHAFFARIFAR, 2016). Ainda na infecção por *Leishmania*, a principal citocina IL-1, chamada IL-1 $\beta$ , induz a produção de TNF e de NO, ativando assim os macrófagos (SCOTT; NOVAIS, 2016).

**Quadro 1** - Principais funções dos receptores e ligantes da família IL-1.

| Receptor | Ligante                                      | Atividade                                                                                                                                                                                                                                                            | Atuação na leishmaniose                                                                                                                                                                                                                       |
|----------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IL-1R1   | IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-38 | Resposta pró-inflamatória e Th17 com a ligação de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e co-receptor IL-1RAcP. É antagonizado por IL-1Ra que não permite o recrutamento de IL-1RAcP, além de ser inibido por IL-38                                                           | Papéis controversos (benéfico ou prejudicial) em diferentes modelos murinos e espécies de <i>Leishmania</i> , porém, há consenso quanto à contribuição na diferenciação de células T CD4 <sup>+</sup> (KOSTKA et al., 2006; XIN et al., 2007) |
| IL-1R2   | IL-1 $\beta$ , IL-1Ra                        | Receptor chamariz que se liga mais eficientemente a IL-1 $\beta$ do que IL-1R1, porém não é capaz de iniciar a transdução de sinal. Pró-IL-1 $\alpha$ também pode se ligar e ter sua maturação inibida. Ou seja, regula negativamente a inflamação induzida por IL-1 | Inibição da expressão dos transcritos de IL-1R2 na infecção por <i>L. chagasi</i> e <i>L. amazonensis</i> (ETTINGER; WILSON, 2008; LECOEUR et al., 2020)                                                                                      |
| IL-1RAcP | Co-receptor de IL-1R1, IL-1R2, ST2, IL-36R   | Promove a inflamação com a ligação a diversos receptores para permitir a formação de complexos que sinalizam a inflamação                                                                                                                                            | -                                                                                                                                                                                                                                             |

*Continua*

Continua

| Receptor        | Ligante                                                         | Atividade                                                                                                                                                                                                                              | Atuação na leishmaniose                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ST2             | IL-33                                                           | Pró-inflamatória e respostas Th2                                                                                                                                                                                                       | Contribui para a susceptibilidade na LV, modulando a resposta Th1 e o recrutamento de células imunes no fígado. Apesar disso, parece não ser crucial na diferenciação de células Th2 (KROPF et al., 2003; ROSTAN et al., 2013)                                      |
| IL-36R          | IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$ , IL-36 $\gamma$ , IL36Ra, IL-38 | Pró-inflamatória. É antagonizado por IL-36Ra e pode se ligar a IL-38, que levam a uma sinalização anti-inflamatória                                                                                                                    | Não há estudos em leishmaniose                                                                                                                                                                                                                                      |
| IL-18R $\alpha$ | IL-18, IL-37                                                    | A ligação de IL-18 e IL-18R $\beta$ para formar o complexo IL-18R leva a uma sinalização inflamatória e a respostas Th1. Porém, esse receptor pode se ligar a TIR8 e permitir a sinalização da IL-37, levando a inibição da inflamação | Formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> parecem inibir a expressão de <i>ill8r1</i> (gene do receptor IL-18R $\alpha$ ) em macrófagos murinos, dificultando a ativação das vias do inflamassoma, permitindo uma infecção menos modulada (LECOEUR et al., 2020). |
| IL-18R $\beta$  | IL-18 (co-receptor de IL-18R $\alpha$ )                         | Promove a inflamação com a ligação a IL-18R $\alpha$ para formar o complexo IL-18R                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                     |

Continua

## Conclusão

| Receptor                | Ligante                                                                                                                                                                 | Atividade         | Atuação na leishmaniose                                                                                                                                                                              |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TIR8<br>(SIGIRR)        | Não possui ligante.<br>Age como inibidor da sinalização TLR4/IL-1R e atua como co-receptor para a ligação da IL-37 a IL-18R $\alpha$ , levando a inibição da inflamação | Anti-inflamatória | Ainda não há estudos, mas pode ser um importante alvo de <i>Leishmania</i> para induzir o sucesso da infecção e manter uma resposta imune suprimida (GAZZINELLI; DENKERS, 2006; PARMAR et al., 2018) |
| TIGIRR-2<br>(IL-1RAPLI) | IL-38                                                                                                                                                                   | Anti-inflamatória | Não há estudos em leishmaniose                                                                                                                                                                       |
| TIGIRR-1<br>(IL-1RAPL2) | Receptor órfão de função desconhecida                                                                                                                                   | Desconhecida      | -                                                                                                                                                                                                    |

Fonte: Adaptado de BORASCHI et al., 2018 e GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013.

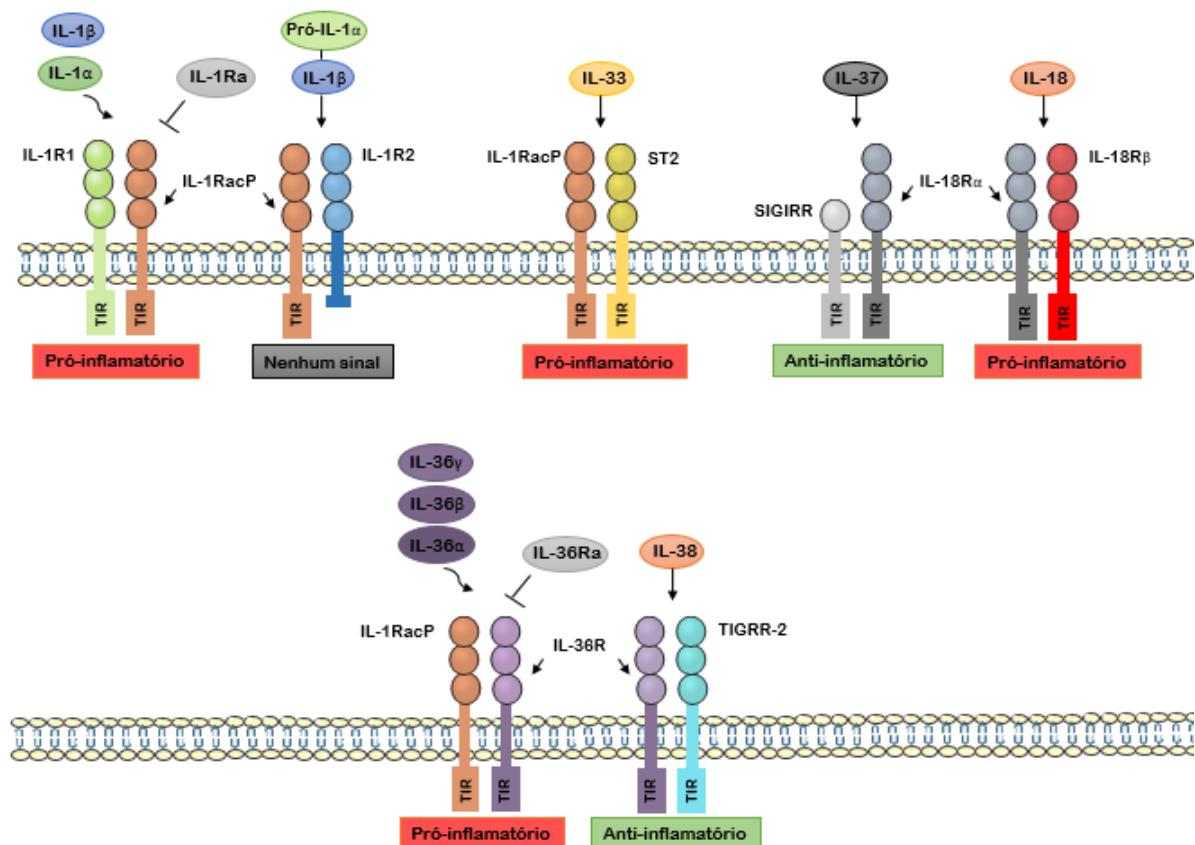
Como observado, as principais atividades observadas da família IL-1 são indução ou inibição da inflamação. A sinalização está relacionada de forma intrínseca aos receptores que contém três domínios de imunoglobulina extracelular (Ig; com exceção de TIR8 ou SIGIRR, que contém um) e um domínio de receptor Toll/IL-1 (*Toll/interleukin-1 receptor*/TIR) na porção citoplasmática, que tem similaridade compartilhada com os *Toll-like receptors* (TLR), principalmente o TLR4 (Figura 11). Esse domínio participa na transdução do sinal desencadeado pelo ligante sinalizando eventos como detecção de patógenos, danos aos tecidos e inflamação, permitindo o recrutamento de algumas moléculas que intermediam a via de sinalização como MyD88 (do inglês, *Myeloid differentiation protein 88*) e IRAK4 (do inglês, *interleukin-1 receptor-associated kinase 4*) (BORASCHI et al., 2018; GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013; SIMS; SMITH, 2010).

Além dos antagonistas naturais da família, outra forma de inibição da resposta inflamatória direcionada pela IL-1 é a expressão de receptores chamariz como o IL-1R2, que

são capazes de reconhecer e se ligar à citocina, mas não conseguem formar o complexo de sinalização do receptor e gerar a resposta. O IL-1R2 não possui o domínio TIR citoplasmático e captura a citocina IL-1 $\beta$  mais eficientemente do que IL-1 $\alpha$  e IL-1Ra. Dessa forma a citocina não fica disponível para se ligar ao seu receptor ativo, neutralizando a ação de IL-1 $\beta$  (BORASCHI et al., 2018; DINARELLO, 2009).

Grande parte das citocinas IL-1 são produzidas em formas biologicamente inativas como precursores, que após um estímulo são clivados na forma madura e capazes de ativar o receptor. Curiosamente, algumas citocinas como IL-1 $\alpha$  e IL-33 tem suas formas precursoras ativas (BORASCHI et al., 2018; DINARELLO, 2019). Como este trabalho visa avaliar cinco genes de citocinas IL-1 (*IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL18* e *IL37*), iremos discorrer suas principais propriedades e funções também na leishmaniose.

**Figura 11** - Representação esquemática das citocinas IL-1 e seus principais receptores e co-receptores.



Fonte: a autora. Alguns componentes desta figura foram criados usando modelos modificados da Servier Medical Art, licenciados sob uma Licença não portada Creative Commons Attribution 3.0; <https://smart.servier.com>.

#### 2.4.1 IL-1 $\alpha$ (*IL1A*) e IL-1 $\beta$ (*IL1B*)

As citocinas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são as principais da família IL-1 que atuam sobre o mesmo receptor (IL-1R1) e tem funções semelhantes, porém com diferenças importantes em como elas são produzidas e no mecanismo de atuação (SIMS; SMITH, 2010). Uma das características da IL-1 $\alpha$  é sua dualidade funcional, visto que a forma precursora da proteína é ativa e atua no núcleo regulando a expressão gênica como um fator de transcrição de genes relacionados a inflamação. Já a forma madura, liga-se ao seu receptor para desempenhar seu papel na inflamação e imunidade fora da célula (BERDA-HADDAD et al., 2011; RIDER et al., 2011).

O precursor da IL-1 $\alpha$  é expresso de forma constitutiva em células de origem mesenquimal como queratinócitos, células endoteliais e células epiteliais do pulmão, rim e trato gastrointestinal (DINARELLO, 2011). Por estar presente dentro da célula em condições normais, a liberação do precursor da IL-1 $\alpha$  funciona como um padrão molecular associado a danos (DAMP, do inglês *Damage-associated molecular patterns*) ou alarme de eventos como necrose e hipóxia como acontece nas doenças isquêmicas, iniciando uma cascata inflamatória, já que o precursor é capaz de se ligar ao mesmo receptor da forma madura (BERDA-HADDAD et al., 2011; BORTHWICK, 2016; GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013). No entanto, a forma precursora da IL-1 $\alpha$  é clivada por proteases, incluindo a caspase-1, calpaínas, granzimas B e elastase (MALIK; KANNEGANTI, 2018; XU; MU; WEI, 2019).

Por isso, a IL-1 $\alpha$  é primariamente dita como proteína intracelular e é raramente encontrada extracelularmente, além de existir uma forma de membrana presente em monócitos ativados (WERMAN et al., 2004). Outros tipos de células já foram relatados expressando IL-1 $\alpha$  em resposta à estímulos, incluindo células imunes como macrófagos e monócitos (BORTHWICK, 2016). Por outro lado, a forma precursora da IL-1 $\beta$ , pró-IL1 $\beta$ , não é ativa e nem capaz de se ligar ao receptor, havendo necessidade de clivagem pela caspase-1 para gerar a proteína madura e ativa (DINARELLO, 2011).

A IL-1 $\beta$  é secretada por células hematopoiéticas, principalmente macrófagos e monócitos, e tem uma circulação mais sistêmica, ao contrário da IL-1 $\alpha$  que tem uma atuação mais localizada (GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013; SIMS; SMITH, 2010). A necessidade de ativação da pró-caspase-1 em caspase-1, feita por um complexo de proteínas chamado inflamassoma, demonstra uma forte regulação para que haja a liberação da IL-1 $\beta$  ativa. Apesar disso, já foi identificado um processamento da pró-IL1 $\beta$  através de enzimas proteolíticas serino-proteases de neutrófilos em camundongos, uma forma independente de

inflamassoma (BORTHWICK, 2016; JOOSTEN et al., 2009; MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002).

Sabemos que o desenvolvimento de uma resposta inflamatória equilibrada é de extrema importância para que haja uma ação efetora do sistema imune frente a um determinado patógeno, porém a exacerbação da inflamação também está por trás dos danos causados em muitas patologias, inclusive na LTA. As citocinas IL-1, principalmente IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , vem sendo associadas a esse desequilíbrio, visto que induzem potencialmente a expressão de TNF, IFN- $\gamma$  e IL-17 (GIUDICE et al., 2012; LUKENS; GROSS; KANNEGANTI, 2012; NOVAIS et al., 2017; VORONOV et al., 2010). Apesar da IL-1 $\beta$  induzir a diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> efetores, que no começo da infecção protege contra a *Leishmania*, a continuação de sua produção de forma elevada durante a fase crônica da infecção leva à progressão da doença (SIMS; SMITH, 2010).

Fernández-Figueroa e colaboradores (2012) observaram uma associação entre a produção da IL-1 $\beta$  e a gravidade das lesões em pacientes infectados com *L. mexicana*. Resultados semelhantes foram observados por Novais e colaboradores (2017), evidenciando o papel da inflamação induzida por IL-1 $\beta$  na gravidade da doença. A sinalização de IL-1 $\beta$  via MyD88 já foi associada a resistência do hospedeiro à infecção por *L. amazonensis* por contribuir na indução da produção de NO por macrófagos, o principal mecanismo de defesa contra esse patógeno intracelular (LIMA-JUNIOR et al., 2013).

Já foi demonstrado que os níveis de expressão de *IL1A* e *IL1B* são diretamente proporcionais a inflamação local e sistêmica e a gravidade na LT em camundongos infectados com *L. major*, e que a atenuação da IL-1 através do antagonista IL-1Ra pode levar à melhora da doença (VORONOV et al., 2010). Curiosamente, também existe um tempo ideal de administração da IL-1 e o desenvolvimento da imunidade Th1 na leishmaniose, sendo que se feito de forma tardia ou contínua, a IL-1 promove a expansão do perfil Th2 e a progressão da doença em modelos murinos (LOPEZ KOSTKA et al., 2009; NOVAIS et al., 2017).

#### 2.4.2 IL-1Ra (*IL1RN*)

Como já mencionado, o antagonista natural IL-1Ra se liga ao receptor IL-1R1 para bloquear a atividade de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  impedindo o recrutamento do co-receptor, por isso tem grande importância na regulação da resposta inflamatória (XU; MU; WEI, 2019). Além de IL-

1 $\beta$ , a IL-1Ra também é produzida por macrófagos durante a infecção por *Leishmania* como reguladora da atividade pró-inflamatória de citocinas como TNF (DOS SANTOS et al., 2017).

Sabe-se que o receptor da IL-1 é expresso em diversos tecidos do corpo e que antagonista IL-1Ra tem ação inibitória na atividade inflamatória induzida por IL-1 $\alpha/\beta$ . Por isso, a forma sintética e recombinante desse antagonista, expressa por *E. coli*, chamada Anakinra, foi aprovada para ser usada no tratamento de um amplo espectro de doenças inflamatórias e autoimunes como artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal e gota (DINARELLO, 2009; DINARELLO; VAN DER MEER, 2013; VORONOV et al., 2010).

Camundongos BALB/c, que já exibem respostas fortemente polarizadas para o perfil Th2 de resposta, com genes *IL1RN* deletados exibem uma ativação exacerbada de IL-1 $\alpha/\beta$  e desenvolvem condições patológicas como autoimunidade e artrite, esta última também devido a indução excessiva de IL-17 (KAUTZ-NEU et al., 2011). A atenuação da IL-1 através do antagonista IL-1Ra pode levar à melhora da progressão da leishmaniose em camundongos BALB/c infectados com *L. major*, além disso, o nocaute dessa proteína leva a manifestações mais severas da doença, apesar de causar uma diminuição da carga parasitária (VORONOV et al., 2010).

A produção natural da IL-1Ra pode ser suficiente para suprimir a inflamação, além de que os níveis circulantes são bem consideráveis em pessoas saudáveis (DINARELLO, 2011). Por outro lado, o aumento de sua produção pode sinalizar a exposição a citocinas e quimiocinas inflamatórias como resposta a inflamação induzida em articulações, sendo útil até como biomarcador (ATTUR et al., 2015).

O desequilíbrio IL-1/IL-1Ra tem grande importância na resposta imune exacerbada e está associada a imunopatologia dirigida pela *Leishmania*, por isso o tratamento com atenuantes pode contribuir beneficamente na infecção.

#### 2.4.3 IL-18 (*IL18*)

Assim como ocorre com a IL-1 $\beta$ , a citocina IL-18 é inicialmente produzida como precursor que é clivado pela caspase-1. Uma característica peculiar da IL-18 é que essa citocina pode ser do tipo Th1 ou Th2, a depender da presença de outras citocinas no microambiente. Por exemplo, na presença de IL-12 há um sinergismo entre essas duas citocinas que direciona a capacidade de induzir a produção de IFN- $\gamma$  e consequentemente ativar uma resposta Th1. Na

ausência da IL-12, IL-18 direciona a resposta Th2 induzindo a produção de IL-4 (DINARELLO, 2009; LEE; CHO; PARK, 2015).

Apesar disso, a IL-18 é inicialmente conhecida como *IFN- $\gamma$  inducing factor* por promover o aumento da produção de IFN- $\gamma$  nas células NK, linfócitos Th1 e em macrófagos ativados, tendo assim um papel muito importante na defesa contra infecção de patógenos intracelulares (NAKANISHI et al., 2001). Quantidades elevadas da IL-18 foram associadas a hiperinflamação na doença granulomatosa crônica (MEDA SPACCAMELA et al., 2019). Uma forma de regulação da ação da IL-18 é a proteína de ligação à IL-18 (IL-18BP), que é um receptor solúvel que se liga à citocina e neutraliza sua ação (DINARELLO, 2018).

Já foi relatada a presença da pró-IL-18 em células como queratinócitos, células dendríticas, macrófagos, células epiteliais intestinais e osteoblastos, enquanto que seu receptor (IL-18R) também é expresso em células T, NK, células B, macrófagos, neutrófilos, basófilos e células endoteliais. As vias de sinalização induzidas pela ativação do IL-18R incluem NF- $\kappa$ B, MyD88, STAT3 e MAPK (LEE; CHO; PARK, 2015).

Monteforte et al. (2000) induziram a deleção de *IL18* em camundongos resistentes C57BL/6 infectados com *L. major* e observaram que apesar do aumento da lesão, não houve alteração nos níveis de IFN- $\gamma$  e na capacidade de geração da resposta Th1, sendo assim capazes de resolução da doença. O papel da IL-18 também parece depender muito da espécie de *Leishmania* e do perfil genético do hospedeiro. Outro estudo mostrou que camundongos C57BL/6 IL-18<sup>-/-</sup> infectados com *L. amazonensis* desenvolveram lesões e carga parasitária menores, indicando que a IL-18 estaria envolvida na susceptibilidade à infecção (SOUSA et al., 2015).

De todo modo, a ausência da IL-18 em camundongos parece estar associada a indução do fenótipo Th2 e diminuição da resposta celular Th1, tendo algum papel no equilíbrio Th1/Th2 cuja alteração de forma exacerbada está à frente de várias imunopatologias (DAYAKAR et al., 2019; WEI et al., 1999).

#### 2.4.4 IL-37 (*IL37*)

A citocina IL-37 é o único agonista anti-inflamatório da família IL-1 e é encontrada apenas em humanos. A falta de expressão de homólogos em camundongos dificulta os estudos de avaliação do papel da IL-37. Graças ao mecanismo de *splicing* alternativo, cinco isoformas da IL-37 são geradas e identificadas de A-E, sendo a IL-37b a maior isoforma e parecendo ser

a mais ativa e importante. Sua expressão pode ser estimulada em células de PBMC e células dendríticas (BORASCHI et al., 2018; NOLD et al., 2010; WANG et al., 2018).

Nold et al. (2010) relataram que a estimulação de PBMC frente à LPS, IL-1 $\beta$  e TGF- $\beta$  aumenta a síntese da IL-37, além de que o silenciamento de sua produção com siRNA (*small interfering Ribonucleic Acid*) levou ao aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF. Isso demonstra seu papel na inibição da resposta inflamatória exacerbada (GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013).

De forma semelhante ao que foi relatado para a IL-1 $\alpha$ , a IL-37 pode atuar como uma citocina extra e intracelular, sendo nesta última forma atuando como um fator de transcrição se translocando para o núcleo e regulando genes, influenciando diretamente na redução dos níveis plasmático da IL-37 (WANG et al., 2018). Sharma e colaboradores (2008) observaram essa modulação superexpressando a IL-37 em células RAW, e após o estímulo com LPS houveram quedas significativas de produção de IL-1 $\alpha$ , TNF e IL-6.

É bem descrito que essa atuação na modulação de genes é feita pela forma madura da IL-37b após o seu precursor ser clivado pela caspase-1. Apesar de se ligar à cadeia do receptor da IL-18 (IL-18R $\alpha$ ) para atuar na inibição da inflamação, a IL-37 não atua como antagonista deste receptor (NOLD et al., 2010; SHARMA et al., 2008; WANG et al., 2018). Apesar disso, a IL-37 pode influenciar na ativação da IL-18 interagindo com a IL-18BP e formando um complexo com a IL-18 $\beta$ , não permitindo que se forme o complexo funcional com a cadeia  $\alpha$ , impedindo assim a ação da IL-18. Ou seja, a IL-37 aumenta a capacidade de neutralização da IL-18 (BUFLER et al., 2002). A IL-37 também suprime a inflamação inibindo a fosforilação do NF- $\kappa$ B se ligando à TIR8 (YAN et al., 2019).

Ainda não há estudos que se concentrem em entender o papel da IL-37 na inflamação dirigida pela infecção por *Leishmania*. No entanto, alguns trabalhos vêm avaliando sua importância em doenças inflamatórias. Dados mostram que os níveis plasmáticos da IL-37 aumentaram após o acidente vascular cerebral (AVC) em pacientes e camundongos, sugerindo a indução de sua atividade anti-inflamatória (ZHANG et al., 2019). A IL-37 também exibiu uma importante atuação na proteção da colite em tecidos intestinais de camundongos transgênicos que expressam a IL-37 humana, indicando mais uma vez seu papel na supressão das respostas imunes direcionadas à inflamação (LI et al., 2014; MCNAMEE et al., 2011).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar membros da família de citocinas IL-1 (IL-1 $\alpha$  e  $\beta$ , IL-18, IL-1Ra e IL-37) em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana antes e após o tratamento.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar *in vitro* a expressão gênica de *IL1A*, *IL1B*, *IL18*, *IL1RN* e *IL37* em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) sem e com estímulo de antígenos totais de *L. (V.) braziliensis*;
- Quantificar *in vitro* as citocinas IL-1 $\alpha$  e  $\beta$  no sobrenadante de cultura de PBMCs estimuladas com antígenos totais de *L. (V.) braziliensis*;
- Avaliar os níveis plasmáticos de IL-1 $\alpha$  em pacientes com lesão ativa;
- Avaliar e correlacionar as expressões entre *IFNG/IL1A* e *IL1B* e *IL10/IL1A* e *IL1B*;
- Correlacionar os dados de expressão das citocinas com os dados clínicos.

#### 4 JUSTIFICATIVA

A LTA é uma doença negligenciada, emergente e reportada em diversas áreas endêmicas no nosso país. Segundo dados do SINAN/PE, a região Nordeste apresenta a maior incidência de casos, ficando atrás apenas do Norte do país em número de casos.

Os fármacos atualmente disponíveis contra a LTA, baseadas em antimoniais pentavalentes, exibem inúmeros efeitos adversos, dificultando muitas vezes o tratamento completo. Não há vacinas até o momento.

Sabemos que a resposta imune desenvolvida na infecção pela *Leishmania* é crucial para ditar a progressão e desenvolvimento da doença, que se manifesta através das lesões e úlceras na LTA, sendo que as lesões mucocutâneas representam as formas mais graves. As respostas imunes do tipo 1 e 2 estão associadas à resistência e susceptibilidade, respectivamente.

As citocinas IL-1 participam no estabelecimento da resposta imune frente a patógenos, com potencial de exacerbação da inflamação, um problema central das lesões. Esse papel está geralmente atribuído às citocinas IL-1 $\alpha/\beta$ , porém algumas outras regulam negativamente a inflamação, como IL-1Ra e IL-37.

Pouco se sabe sobre o papel da família IL-1 na LTA em humanos, já que a maioria das investigações se concentram em modelos animais e utilizando as cepas de *L. major*. No entanto, a espécie que representa o maior número de casos de infecções no Nordeste do país é a *L. braziliensis*, também associada à intensa resposta inflamatória, podendo gerar espectros clínicos como a mucocutânea. Além disso, o que é observado em camundongos nem sempre se extrapola para os humanos, devido às diferenças biológicas e experimentais.

Nosso trabalho contribuiu com o estudo do comportamento da família IL-1 na LTA causada por *L. braziliensis*, fornecendo os primeiros resultados sobre os papéis das citocinas IL-18, cuja diminuição parece estar associada à cura, e IL-37, que participa da regulação em resposta ao estímulo em pacientes.

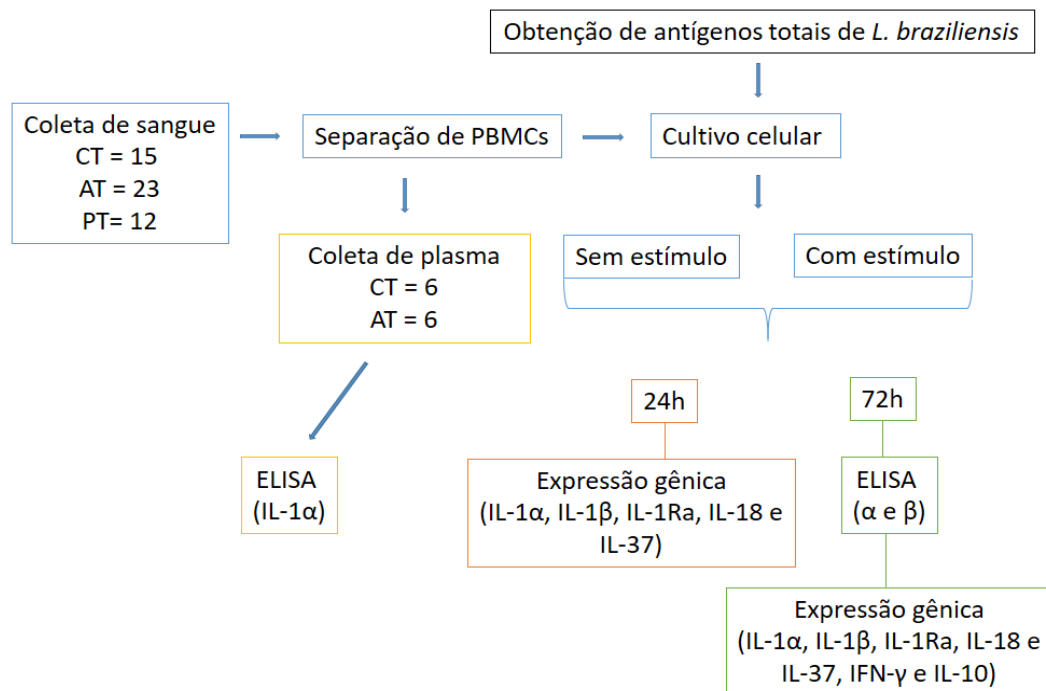
## 5 METODOLOGIA

### 5.1 População de estudo e aspectos éticos

Este estudo utilizou amostras de sangue de pacientes procedentes de diferentes áreas endêmicas para LTA em Pernambuco. Os pacientes foram encaminhados à uma unidade de saúde, onde foi realizado o diagnóstico clínico junto a um dermatologista e as amostras de sangue coletadas em parceria com o Serviço de Referência em Leishmaniose do Instituto Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ) para os testes laboratoriais. Dentre tais testes, foram realizados a pesquisa direta, PCR e IFI.

Foram formados os seguintes grupos de estudo: 1) portadores de lesão ativa, de ambos os sexos (N = 23) e 2) pacientes com cura clínica após tratamento (N = 12). As amostras foram armazenadas e processadas no laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular do IAM-FIOCRUZ-PE. Os pacientes foram esclarecidos do objetivo do estudo e a coleta de sangue foram feitas após os pacientes concordarem em assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE) (Apêndices A e B) (Aprovados no projeto de CAAE: 11083812.7.0000.5190).

O grupo controle foi composto por voluntários saudáveis (N = 10), residentes em áreas não endêmicas para a leishmaniose tegumentar, sem histórico pregresso de leishmaniose e que concordaram em participar da pesquisa e assinaram o TCLE (Apêndice C). Foram feitas as coletas de aproximadamente 18 ml de sangue nos controles, antes e após o tratamento quimioterápico com Glucantime®. A figura 12 mostra o fluxo de etapas seguidas para as análises subsequentes, também descritas no texto abaixo.

**Figura 12** - Fluxograma das etapas de análise das citocinas IL-1.

Fonte: a autora. CT = grupo controle, AT = pacientes com lesão ativa antes do tratamento, PT = pacientes pós-tratamento.

## 5.2 Obtenção de antígenos de *L. (V.) braziliensis*

Formas promastigotas (cepa MHOM/BR/75/M2903), cultivadas *in vitro*, foram expandidas em meio de cultura Schneider's (Sigma, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF; Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO) até a fase de crescimento exponencial. A massa parasitária foi então submetida a três lavagens com salina tamponada (PBS – pH 7,2) através de centrifugações a 800x g, por 15 minutos, a 4°C. Posteriormente o precipitado celular foi ressuscitado em 750 µl de tampão de lise branda e 250 µl de inibidor de protease. A suspensão foi colocada em tubos eppendorf, congelada e descongelada 7 vezes em nitrogênio líquido e banho-maria até as células estarem completamente lisadas, baseado no protocolo estabelecido pelo grupo de pesquisa. A suspensão foi então centrifugada a 4°C, 10.000 x g por 15 min. O sobrenadante, que corresponde à fração solúvel das proteínas, foi coletado e guardado. Em seguida, foi submetido a uma dosagem proteica segundo o método de Bradford (1976) modificado por Read & Northcote (1981), além de eletroforese em gel de

poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970). Após esses procedimentos, as frações antigênicas foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a utilização nos ensaios de cultura celular.

### 5.3 Obtenção de células mononucleadas de sangue periférico

O sangue coletado de cada paciente ou controle foi diluído a 1:1 (v / v) em meio RPMI 1640 (pH 7,2), depositado na solução gradiente Ficoll-paque PLUS (GE) e centrifugado por 35 min a 400 x g. Em seguida, foram isoladas alíquotas de plasma para dosagem proteica assim como a camada de células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com RPMI 1640 (pH 7,2) por centrifugação a 300 x g durante 10 min e ressuspensas em RPMI 1640 contendo 2 mM de L-glutamina, 50 mg / L de sulfato de gentamicina, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB) (ambos os reagentes Cultilab, Brasil).

### 5.4 Cultivo celular

A partir do PBMC obtido, foram separadas  $1 \times 10^6/\text{mL}$  células para o cultivo em tubos Falcon BD™ 5 mL de poliestireno e fundo redondo, utilizando meio RPMI 1640 suplementado SFB por 24h e 72h, em estufa com 5%  $\text{CO}_2$  à  $37^{\circ}\text{C}$ . Para cada controle/paciente, as células foram cultivadas em dois poços: um sem estímulo (SE) e outro que recebeu o antígeno total de *L. braziliensis* numa concentração final de  $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , obtidos de acordo com o item 5.2. Os tubos foram centrifugados durante 5 min a 300 x g. As células foram utilizadas para a etapa de qPCR e foram congeladas em 1 ml de Trizol. O sobrenadante da cultura celular foi recolhido e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para a dosagem posterior de citocinas por ELISA.

### 5.5 Dosagem de citocinas de plasma sanguíneo e sobrenadante de cultura

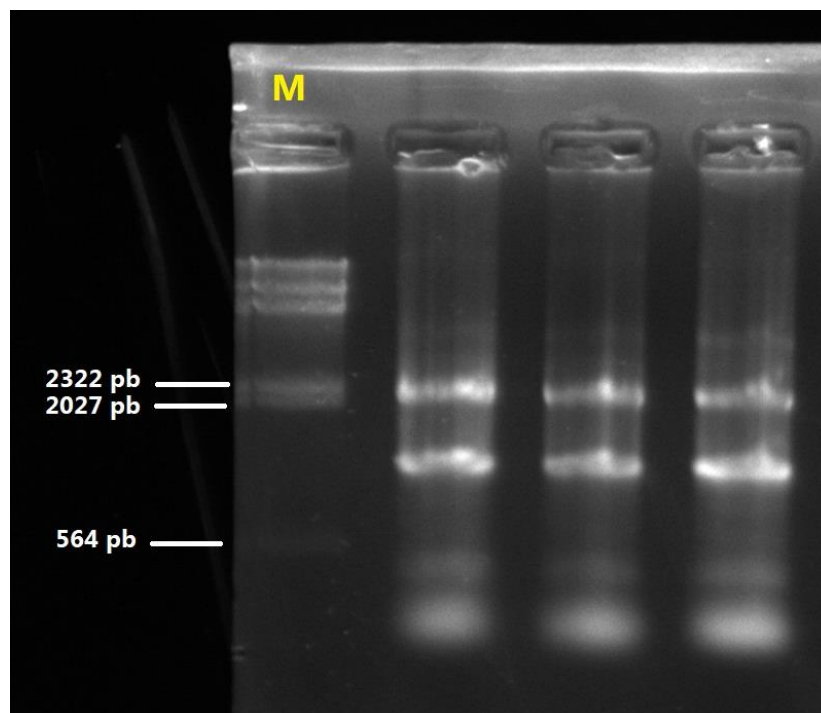
As citocinas IL- $1\alpha$  e  $\beta$  foram mensuradas do sobrenadante da cultura de 72h de pacientes e dos controles, bem como de amostras de plasma. Para isso, foram utilizados os kits de Elisa Quantikines da RnD Systems (EUA), cujos limites de detecção eram de  $250 \text{ pg/mL}$ , seguindo as recomendações do fabricante para o ensaio.

## 5.6 Avaliação da expressão do mRNA por qPCR

### 5.6.1 Extração de RNA

Após o término da cultura, os tubos de cultura foram centrifugados e as células foram ressuspensas em 1 ml de Trizol, armazenadas e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para a extração, foram descongeladas em TA homogeneizadas vigorosamente por pipetagem para solubilização das células e liberação do RNA. Foram adicionados 200  $\mu\text{l}$  de clorofórmio gelado e após uma homogeneização vigorosa até ficar um líquido de aspecto leitoso, foi incubado a TA por 5 minutos. Após esse tempo, foi feita uma centrifugação a 12.000 g por 15 minutos com temperatura ajustada a  $4^{\circ}\text{C}$  para separação das fases apolar (fenóis, resíduos e proteínas) e polar (DNA e RNA). A fase aquosa contendo o RNA foi coletada e transferida a um novo tubo, ao qual foi adicionado 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol gelado para precipitação do RNA e incubado por 30 min à TA. Os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 15 min ajustando a centrífuga a  $25^{\circ}\text{C}$ . Nessa etapa pode se observar a formação de um precipitado, sendo que o sobrenadante é descartado e o precipitado é lavado 1x com 1 ml de etanol 75% com centrifugação a 7.400 g por 5 minutos. O precipitado é secado e ressuspendido em 20  $\mu\text{l}$  de água DEPC ultra-pura. Como controle de qualidade do RNA total, o material genético foi corrido em um gel de agarose 1,2% para visualização da integridade (Figura 13), além de dosagem em NanoDrop™ 2000/2000c.

**Figura 13** - Eletroforese em gel de agarose 1,2% de RNA total.



Fonte: a autora. Pb = pares de bases; M = marcador de peso molecular Lambda DNA/HindIII.

### 5.6.2 Transcrição Reversa

Para a transcrição reversa do RNA em cDNA foi utilizado o kit TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) e seguidas as instruções do fabricante. A reação teve um volume final de 50 µl contendo 1 µg de RNA total, TaqMan RT Buffer 1x, MgCl<sub>2</sub> 5,5mM, Mix de dNTPs 500µM, hexâmetros randômicos 2,5µM, inibidor de RNase 0,4 U/µL, a enzima Multiscribe Reverse Transcriptase 3,125 U/µl. O volume foi completado com água DEPC ultra-pura. A reação consiste em um ciclo no termociclador, sendo dez minutos a 25°C, trinta minutos a 48°C e cinco minutos a 95°C. Após esta etapa, o cDNA foi armazenado a -20°C até a utilização nos ensaios de PCR em tempo real.

### 5.6.3 PCR em Tempo Real

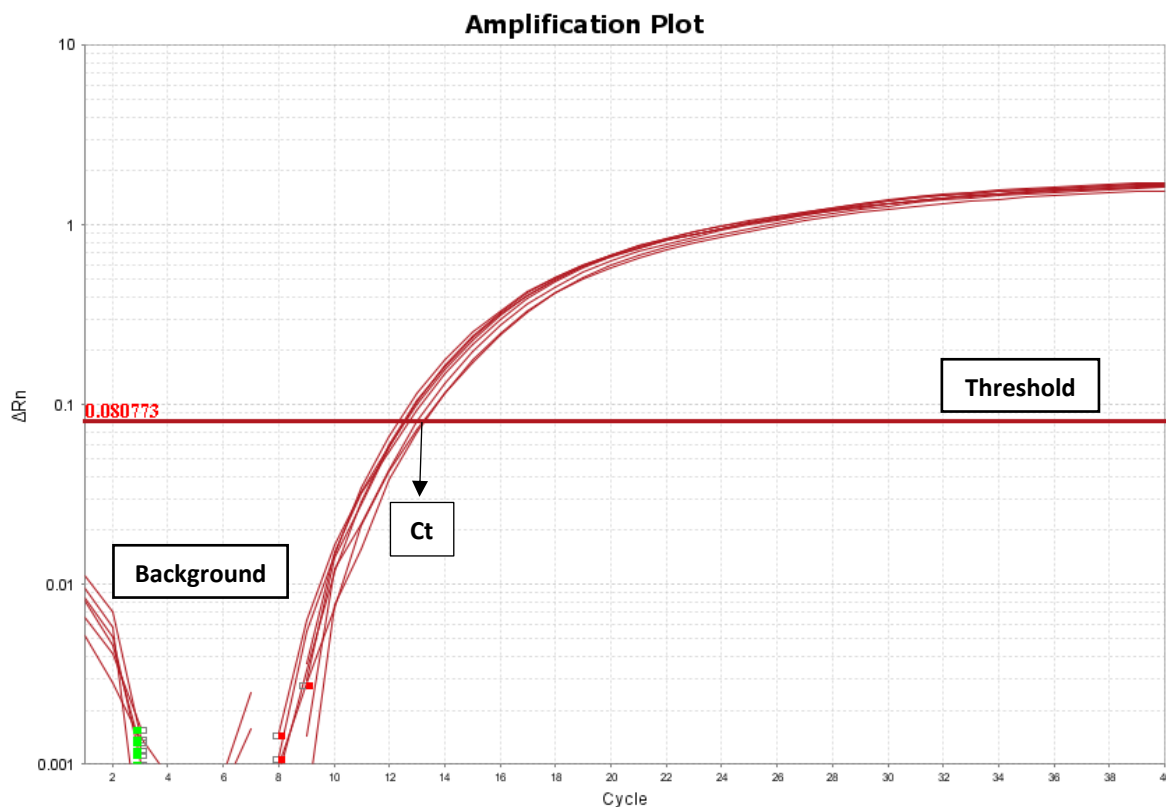
Os níveis de RNA mensageiro (mRNA, do inglês *messenger RNA*) foram quantificados usando o Sistema TaqMan® de detecção através dos equipamentos ABI-PRISM 7500 e usando

o kit TaqMan® Universal PCR Master Mix. As sondas usadas foram: IL1A/FAM-MGB (Hs00174092\_m1), IL1B/FAM-MGB (Hs01555410\_m1), IL1RN/FAM-MGB (Hs00893626\_m1), IL18/FAM-MGB (Hs01038788\_m1), IL37/FAM-MGB (Hs00367201\_m1), IFNG/FAM-MGB (Hs99999041\_m1) e IL10/FAM-MGB (Hs99999035\_m1). A reação aconteceu em *singleplex* (um alvo analisado por poço) com volume final de 20 µl, contendo 1,5 µl de cDNA e 18,5 µl de mix com TaqMan Universal PCR Master Mix, sonda e água DEPC ultra-pura.

Os genes alvos foram normalizados através da análise do gene constitutivo RNA ribossomal 18S como controle endógeno. A reação com volume final de 20 µl continha 1,5 µl de cDNA e 18,5 µl de mix com TaqMan Universal PCR Master Mix, primers *forward* e *reverse* para RNA ribossomal 18S, sonda para RNA ribossomal 18S (fluoróforo VIC) e água DEPC ultra-pura. A expressão relativa foi calculada através dos valores de Ct seguindo a fórmula:  $\Delta Ct = Ct (\text{gene alvo}) - Ct (\text{gene endógeno})$ , onde Ct é o número de ciclos necessários para que a curva atinja o *threshold* (Figura 14). Essa etapa normaliza a expressão do gene de estudo com um gene endógeno constitutivamente expresso para eliminar vieses da reação. Também é necessário um grupo calibrador (no nosso caso, controles) para relativizar a expressão e comparar com o grupo tratado (paciente). Sendo assim, é feita a subtração do  $\Delta Ct$  do grupo calibrador menos o  $\Delta Ct$  do grupo tratado para obter o  $\Delta\Delta Ct$ :  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{calibrador}) - \Delta Ct (\text{tratado})$ .

Os valores de  $\Delta\Delta Ct$  são aplicados na fórmula  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde RQ significa *relative quantification* ou quantificação relativa, e expressa o número de vezes (*fold change*) que o gene foi expresso em uma amostra comparado ao calibrador.

**Figura 14** - Representação gráfica dos resultados da qPCR.



Fonte: a autora. Curvas de expressão de *18S* em amostras antes e após o estímulo com antígenos de *Leishmania* durante 24h. O gráfico da curva de amplificação gerada pela captação do sinal da fluorescência versus número de ciclos. Os valores de Ct (limiar do ciclo ou *cycle threshold*) são definidos quando o valor de fluorescência emitida atinge o limiar de detecção (*threshold*). Já o background representa a fluorescência antes da fase exponencial.

## 5.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prisma 7.0. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk), após isso, empregados teste U de Mann-Whitney (não paramétrico) e T de student (paramétrico) de acordo com a normalidade observada. As análises de correlação foram feitas pelo teste de Pearson. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$  = estatisticamente significativos).

## 5.8 Aspectos éticos

Todo procedimento foi realizado após o consentimento e assinatura dos pacientes do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foi realizada uma coleta de 18 ml de sangue venoso dos grupos de pacientes e controles. O projeto passou por apreciação pelo

Comitê de Ética do IAM/FIOCRUZ recebendo aprovação (CAEE: 11083812.7.0000.5190) (ANEXO A).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Caracterização da população de estudo com LTA

As avaliações foram feitas a partir de um número total de 23 pacientes diagnosticados com LTA e com lesões ativas antes da realização do tratamento (AT) e 12 pacientes pós-tratamento, todos procedentes de áreas endêmicas de Pernambuco (Tabela 1).

Para os pacientes AT, os métodos laboratoriais para confirmação do diagnóstico incluíram a PCR, pesquisa direta e IFI, realizados para um total de 22, 15 e 12 pacientes, respectivamente, com lesão ativa. Destes, 86,7% (19/22) obtiveram positividade na reação de PCR, enquanto que 53,3% (8/15) e 58,3% (7/12) foram positivos na pesquisa direta e IFI, respectivamente. O tempo de evolução da lesão, ou intervalo desde que houve o surgimento dos sintomas até a chegada do paciente à uma unidade de saúde, variou de duas semanas a um ano e 15 dias, com média de 77,3 dias. Das 23 lesões, 16 (69,6%) eram do tipo ulceradas, seis (26%) eram úlcero-crostosas e uma (4,3%) tinha forma impetigóide (Tabela 1). 52,2% dos pacientes AT tinham uma única lesão no corpo, porém o número total variou de uma a 20 lesões, com média de 2,6 lesões por paciente, localizadas principalmente nos membros superiores (11/21 ou 52,4%) e inferiores (10/21 ou 47,6%) (Tabela 1).

O segundo grupo de estudo foi constituído por um total de 12 pacientes que obtiveram a cura clínica das lesões de LTA após a realização do tratamento com o Glucantime® (PT), procedentes também de áreas endêmicas de Pernambuco (Tabela 2). Os pacientes foram acompanhados durante todo o seu tratamento. Esses pacientes já haviam entrado no sistema com o diagnóstico confirmado junto ao médico dermatologista e pelo Serviço de Referência do IAM. O critério de cura foi clínico e considerado quando houve completa reepitelização da lesão.

Dos 12 pacientes pós-tratamento, 83,3% (10/12) apresentavam uma cicatriz normal de bordas elevadas, enquanto que 16,7% (2/12) apresentavam uma cicatrização parecida com uma placa. O tempo de coleta após o tratamento das lesões variou de 15 dias a um ano e quatro meses, tendo uma média de 4,4 meses. O número de lesões variou de uma a duas, sendo a média de 1,1 lesões por paciente. A localização das lesões foi mais predominante nos membros inferiores (75% ou 9/12) (Tabela 2). A média das idades dos grupos controle, pacientes AT e PT foi de 26,9, 42,6 e 24,3 anos, respectivamente. Seguindo a mesma ordem, a razão de homens/mulheres foi de 9:6, 10:13 e 8:4 (Tabela 3).

**Tabela 1** - Dados demográficos e clínicos de pacientes com lesão ativa (AT).

| <b>Código do paciente/ano</b> | <b>Idade (Anos)</b> | <b>Procedência</b>        | <b>Gênero</b> | <b>Tipo de Lesão</b> | <b>Tempo de evolução</b> | <b>Número de lesões</b> | <b>Local das lesões</b>    | <b>Teste - Pesquisa direta</b> | <b>Teste - PCR</b> | <b>Teste - IFI</b> |
|-------------------------------|---------------------|---------------------------|---------------|----------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------|
| AT01/19                       | 76                  | Passira – PE              | F             | Úlcero crostosa      | 1 ano e 2 meses          | 02                      | Narina D e E               | -                              | NR                 | +                  |
| AT02/19                       | 26                  | São Lourenço da Mata – PE | F             | Ulcerada             | 3 meses                  | 01                      | Perna D                    | +                              | +                  | -                  |
| AT03/19                       | 59                  | Moreno - PE               | M             | Ulcerada             | 2 meses                  | 04                      | Omoplata MSE Cotovelo      | -                              | -                  | +                  |
| AT04/19                       | 45                  | Moreno - PE               | M             | Ulcerada             | 4 meses                  | 01                      | Abdômen                    | -                              | -                  | +                  |
| AT05/19                       | 13                  | Nazaré da Mata – PE       | M             | Úlcero crostosa      | 15 dias                  | 01                      | Braço D                    | -                              | +                  | NR                 |
| AT06/19                       | 71                  | Recife – PE               | M             | Úlcero crostosa      | 15 dias                  | 02                      | Antebraço E Lábio inferior | -                              | +                  | NR                 |
| AT07/19                       | 28                  | Guabiraba – PE            | F             | Ulcerada             | 1 mês e 15 dias          | 02                      | Perna D                    | +                              | +                  | NR                 |
| AT08/19                       | 56                  | Aldeia – PE               | F             | Úlcero crostosa      | 2 mês 15 dias            | 05                      | Antebraço e Face (frontal) | +                              | +                  | +                  |
| AT09/19                       | 61                  | Aldeia – PE               | M             | Ulcerada             | 1 mês                    | 02                      | Antebraço                  | +                              | +                  | -                  |
| AT10/19                       | 54                  | Três Ladeiras – PE        | F             | Ulcerada             | 3 meses                  | 03                      | Perna E                    | +                              | +                  | +                  |
| AT11/19                       | 30                  | Igarassu – PE             | M             | Úlcero crostosa      | 4 meses                  | 02                      | Braço D e E                | +                              | +                  | -                  |
| AT12/19                       | 20                  | Igarassu – PE             | F             | Ulcerada             | 1 mês e 15 dias          | 01                      | Antebraço E                | NR                             | +                  | +                  |
| AT13/19                       | 12                  | Três Ladeiras – PE        | F             | Ulcerada             | 3 semanas                | 01                      | Perna E                    | +                              | +                  | -                  |
| AT14/19                       | 29                  | Três Ladeiras – PE        | F             | Ulcerada             | 1 mês                    | 01                      | Dedo do Pé E               | -                              | +                  | +                  |
| AT15/19                       | 58                  | Três Ladeiras – PE        | M             | Úlcero crostosa      | 2 meses                  | 01                      | Pescoço                    | +                              | +                  | -                  |
| AT16/19                       | 36                  | Igarassu – PE             | M             | Ulcerada             | 5 meses                  | 01                      | MSE                        | NR                             | +                  | NR                 |
| AT17/19                       | 34                  | Igarassu – PE             | F             | Úlcera impetigóide   | 4 meses                  | 01                      | Braço E                    | -                              | +                  | NR                 |

Continua

| Código do paciente/ano | Idade (Anos) | Procedência | Gênero | Tipo de Lesão | Tempo de evolução | Número de lesões | Local das lesões     | Conclusão               |             |             |
|------------------------|--------------|-------------|--------|---------------|-------------------|------------------|----------------------|-------------------------|-------------|-------------|
|                        |              |             |        |               |                   |                  |                      | Teste - Pesquisa direta | Teste - PCR | Teste - IFI |
| AT18/20                | 82           | Moreno - PE | M      | Ulcerada      | 6 meses           | 01               | Face esquerda        | NR                      | -           | NR          |
| AT19/20                | 41           | Moreno - PE | M      | Ulcerada      | 3 semanas         | 02               | Perna direita e MSE  | NR                      | +           | NR          |
| AT20/20                | 58           | Moreno - PE | F      | Ulcerada      | 3 semanas         | 20               | Perna E e D          | NR                      | +           | NR          |
| AT21/20                | 36           | Aldeia - PE | F      | Ulcerada      | 1 mês             | 1                | Perna D              | NR                      | +           | NR          |
| AT22/20                | 22           | Moreno - PE | F      | Ulcerada      | 15 dias           | 1                | Perna D              | NR                      | +           | NR          |
| AT23/20                | 32           | Moreno - PE | F      | Ulcerada      | 1 mês             | 4                | Braços D e E/Perna D | NR                      | +           | NR          |

Fonte: a autora. AT = pacientes com lesão ativa antes do tratamento, M = masculino, F = feminino, NR = não realizado, E = esquerdo e D = direito, MSE = membro superior esquerdo, IFI = imunofluorescência indireta.

**Tabela 2** - Dados demográficos e clínicos pacientes curados após realização do tratamento (PT).

| <b>Código do paciente /ano</b> | <b>Idade (Anos)</b> | <b>Procedência</b> | <b>Gênero</b> | <b>Tipo de cicatriz</b> | <b>Tempo após tratamento</b> | <b>Número de cicatrizes</b> | <b>Local das cicatrizes</b> |
|--------------------------------|---------------------|--------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>PT01/19</b>                 | 34                  | Ipojuca - PE       | M             | Cicatriz                | 2 meses                      | 01                          | Perna E                     |
| <b>PT02/19</b>                 | 20                  | Ipojuca - PE       | F             | Cicatriz                | 2 meses                      | 01                          | Perna E                     |
| <b>PT03/19</b>                 | 30                  | Ipojuca - PE       | F             | Placa                   | 1 mês                        | 01                          | Antebraço E                 |
| <b>PT04/19</b>                 | 4                   | Ipojuca - PE       | M             | Cicatriz                | 15 dias                      | 01                          | Perna E                     |
| <b>PT05/19</b>                 | 15                  | Ipojuca - PE       | M             | Cicatriz                | 15 dias                      | 01                          | Coxa                        |
| <b>PT06/19</b>                 | 36                  | Ipojuca - PE       | F             | Cicatriz                | 4 meses                      | 01                          | Perna E                     |
| <b>PT07/19</b>                 | 7                   | Ipojuca - PE       | M             | Cicatriz                | 2 meses                      | 02                          | Perna D                     |
| <b>PT08/19</b>                 | 13                  | Ipojuca - PE       | M             | Placa                   | 15 dias                      | 01                          | Braço E                     |
| <b>PT09/19</b>                 | 33                  | Ipojuca - PE       | M             | Cicatriz                | 1 mês                        | 01                          | Perna D                     |
| <b>PT10/19</b>                 | 56                  | Moreno - PE        | M             | Cicatriz                | 1 ano e 4 meses              | 01                          | Pé D                        |
| <b>PT11/19</b>                 | 19                  | Moreno - PE        | M             | Cicatriz                | 9 meses                      | 01                          | Joelho E                    |
| <b>PT12/19</b>                 | 24                  | Moreno - PE        | F             | Cicatriz                | 1 ano e 2 meses              | 01                          | Braço D                     |

Fonte: a autora. PT = pacientes pós-tratamento, M = masculino, F = feminino, E = esquerdo e D = direito.

**Tabela 3** - Características dos grupos CT, AT e PT.

| CARACTERÍSTICAS       | CT            | AT            | PT          |
|-----------------------|---------------|---------------|-------------|
| Número de indivíduos  | 15            | 23            | 12          |
| Média de idade (anos) | 26,87 (22-31) | 42,57 (13-82) | 24,3 (4-56) |
| Razão H/M             | 9/6           | 10/13         | 8/4         |

Fonte: a autora. CT = grupo controle, AT = pacientes com lesão ativa antes do tratamento, PT = pacientes pós-tratamento, H = homem, M = mulher.

## 6.2 Avaliação da expressão gênica de *IL1A*, *IL1B*, *IL18*, *IL1RN*, *IL37*, *IFNG* e *IL10* por qPCR

Com relação aos dados de expressão das citocinas IL-1, dois tempos de estimulação foram realizados, sendo 24h apenas em controles (CT) e pacientes com lesão ativa (AT), e 72h nos grupos CT, AT e pacientes pós-tratamento (PT). Em 24h de estímulo, de forma abrangente, não observamos diferenças significativas de expressão das citocinas entre os indivíduos saudáveis e pacientes, mesmo antes (SE) e após estimulação (AgT) (Figura 15). Uma exceção se abre para *IL37*, que demonstrou ser bem mais expressa antes do estímulo ( $RQ = 7,15$ ;  $p = 0,0173$ ) e após ( $RQ = 3,63$ ;  $p = 0,0506$ ).

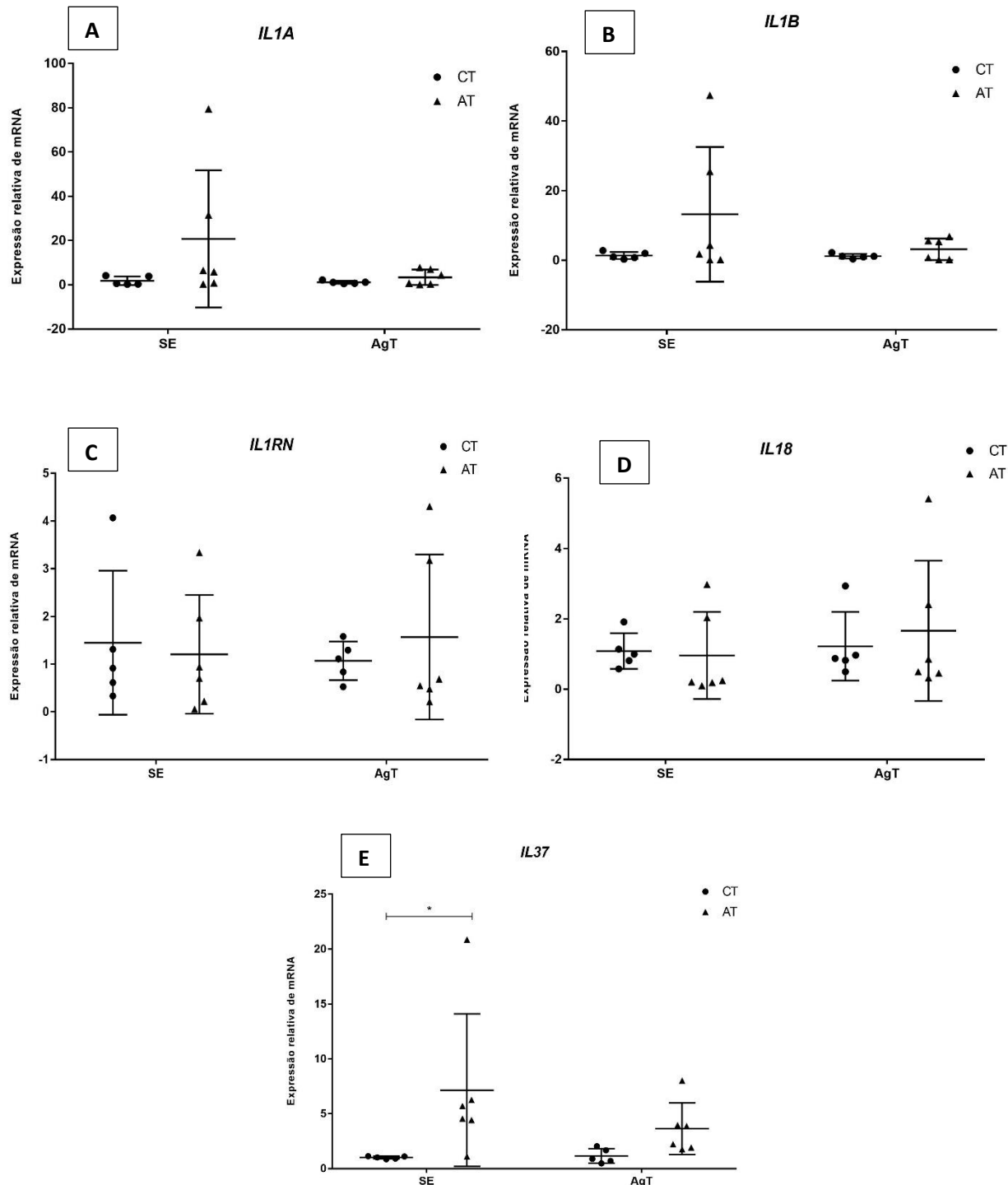
Os valores de *fold-change* (FC) para cada citocina, antes e após o estímulo, foram:

**Tabela 4** - Valores de FC de PBMCs de pacientes ativos estimuladas por 24h.

|     | <i>IL1A</i> | <i>IL1B</i> | <i>IL1RN</i> | <i>IL18</i> | <i>IL37</i> |
|-----|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| SE  | 20,73       | 13,21       | 1,20         | 0,95        | 7,14        |
| AgT | 3,39        | 3,14        | 1,57         | 1,66        | 3,63        |

Fonte: a autora. AgT = antígeno total, FC = *fold change*, PBMC = célula mononucleada de sangue periférico, SE = sem estímulo.

**Figura 15-** Avaliação *in vitro* da expressão gênica de *IL1A* (A), *IL1B* (B), *IL1RN* (C), *IL18* (D) e *IL37* (E) antes e após 24h de estímulo com antígeno total de *L. braziliensis* em indivíduos saudáveis e pacientes AT.



Fonte: a autora. CT = grupo controle (N= 5), AT = pacientes com lesão ativa antes do tratamento (N= 6), SE = sem estímulo, AgT = antígeno total.  $P < 0,05$ , obtido através de teste não paramétrico (Mann-Whitney) ou paramétrico (T-student). O cultivo das PBMCs com estímulo foi feito na concentração de  $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  de antígeno total.

Quando consideramos a ausência de estímulo (SE) após 72h de cultura, os pacientes AT expressaram maiores níveis de todas as citocinas do que os grupos CT e PT (Figura 16). Observamos que os genes *IL1A* e *IL37* foram significativamente mais expressas, mesmo sem o estímulo, em pacientes AT em relação ao controle (Figura 16).

Já para o grupo PT, observamos uma menor expressão das citocinas em relação ao grupo AT na ausência de estímulo. Em relação ao grupo controle, *IL1B* e *IL18* tiveram expressões semelhantes, enquanto que *IL1RN* se mostrou inibida. Por outro lado, *IL1A* e *IL37* foram mais expressas que o controle, sendo que apenas *IL1A* foi significativamente expressa ( $p = 0,0426$ ). Comparando os grupos AT e PT, não houve diferença significativa na expressão das citocinas entre esses pacientes antes do estímulo, mas é importante destacar uma diferença interessante nas expressões de *IL1RN* entre os pacientes sem estimulação ( $p = 0,0574$ ) (Figura 16C).

Comparando as expressões entre os grupos AT e CT após o estímulo (AgT), houve um aumento significativo da expressão de *IL1A* ( $p = 0,0007$ ) e *IL-1 $\beta$*  ( $p = 0,0039$ ). Também observamos que *IL37* foi significativamente mais expressa ( $p = <0,0001$ ) em relação ao controle. Por outro lado, não observamos diferenças significativas entre os níveis de expressão de *IL1RN* e *IL18* entre pacientes AT e controles, apesar de observarmos uma diminuição interessante do antagonista frente ao estímulo.

Em relação aos pacientes PT e CT, todas as citocinas foram diferencialmente expressas estatisticamente. Os genes das citocinas *IL-1 $\alpha$*  ( $p = 0,0002$ ), *IL-1 $\beta$*  ( $p = 0,0026$ ) e *IL-37* ( $p = 0,0003$ ) foram significativamente mais expressos do que o grupo controle. No entanto, o contrário foi observado *IL1RN* ( $p = 0,0295$ ) e *IL18* ( $p = <0,0001$ ), que tiveram suas expressões diminuídas de forma significativa após o estímulo (Figura 16).

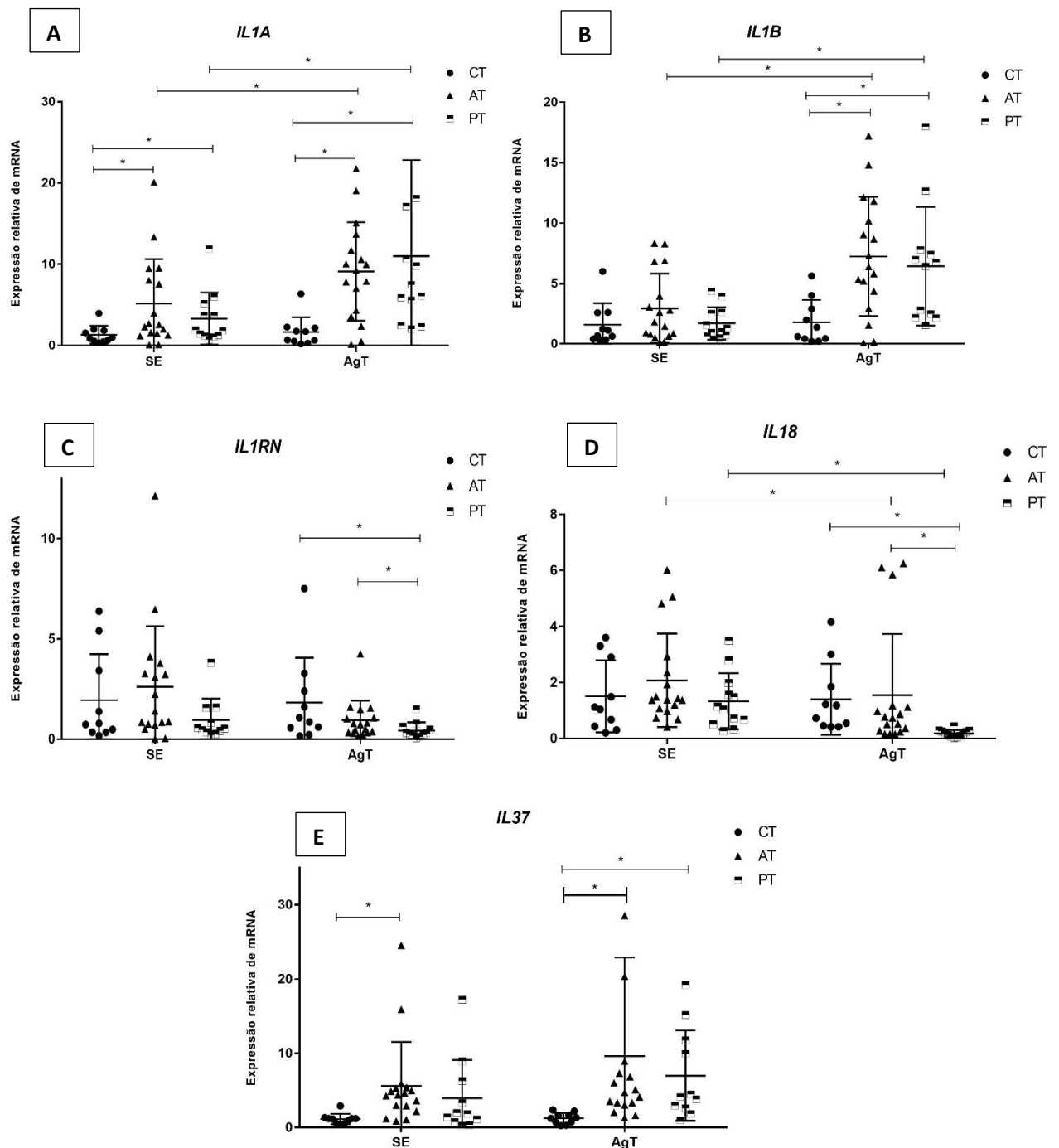
Comparando apenas os grupos AT e PT estimulados, é possível observar que todas as citocinas são mais expressas pelo grupo de lesão ativa, com exceção de *IL1A*. Há também diferenças significativas de expressão entre estes dois grupos de pacientes para *IL1RN* ( $p = 0,0214$ ) e *IL18* ( $p = 0,0004$ ), tendo o grupo AT produzido níveis maiores (Figura 16). Os valores de *fold-change* dos resultados de 72h estão resumidos na Tabela 5.

**Tabela 5** – Valores de FC de PBMCs de pacientes AT e PT estimuladas por 72h.

|     | <i>IL1A</i> |      | <i>IL1B</i> |      | <i>IL1RN</i> |      | <i>IL18</i> |      | <i>IL37</i> |      |
|-----|-------------|------|-------------|------|--------------|------|-------------|------|-------------|------|
|     | AT          | PT   | AT          | PT   | AT           | PT   | AT          | PT   | AT          | PT   |
| SE  | 5,13        | 3,31 | 2,95        | 1,70 | 2,42         | 0,96 | 2,07        | 1,33 | 5,60        | 3,95 |
| AgT | 9,11        | 11   | 7,24        | 6,43 | 0,91         | 0,43 | 1,54        | 0,18 | 9,62        | 7    |

Fonte: a autora. AgT = antígeno total, AT = pacientes com lesão ativa antes do tratamento, FC = *fold change*, PBMC = célula mononucleada de sangue periférico, PT = pós-tratamento, SE = sem estímulo.

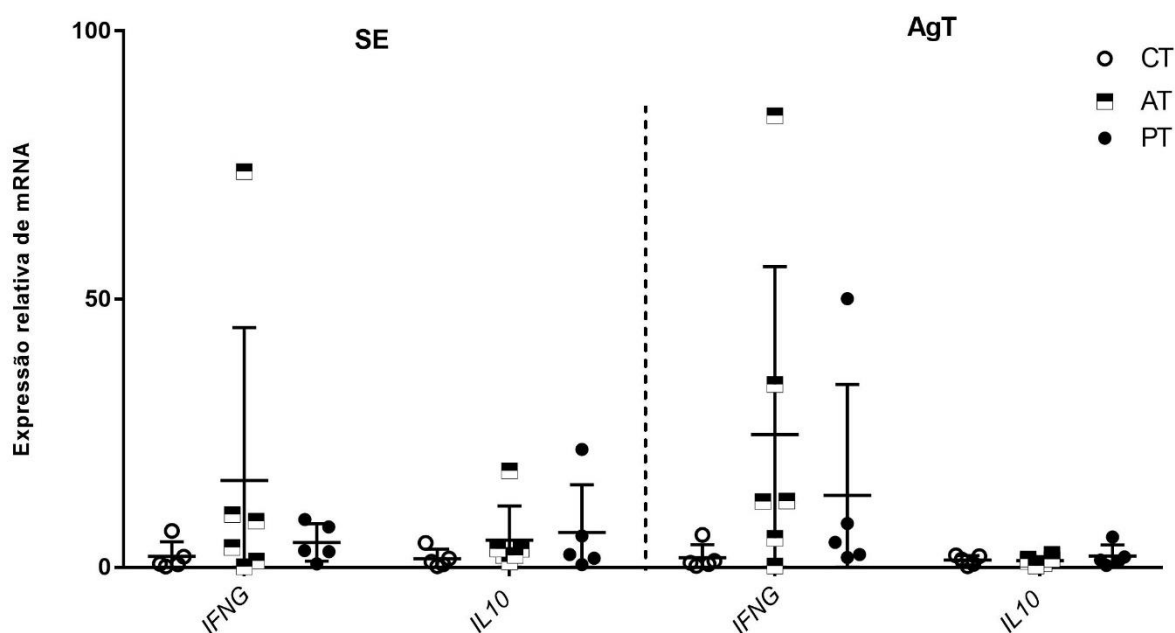
**Figura 16** - Avaliação *in vitro* da expressão gênica das citocinas *IL1A* (A), *IL1B* (B), *IL1RN* (C), *IL18* (D) e *IL37* (E) antes e após 72h de estímulo com antígeno total de *L. braziliensis* entre os grupos controle, antes do tratamento e após o tratamento.



Fonte: a autora. CT = grupo controle (N= 10), AT = pacientes com lesão ativa antes do tratamento (N= 17), PT = pacientes pós-tratamento (N= 12), SE = sem estímulo, AgT = antígeno total. P < 0,05, obtido através de teste não paramétrico (Mann-Whitney) ou paramétrico (T-student). O cultivo das PBMCs com estímulo foi feito na concentração de 10 µg/µl de antígeno total.

Com o objetivo de entender melhor a resposta inflamatória nos grupos estudados e fazer um paralelo com a família IL-1, avaliamos a expressão de *IFNG* e *IL10* antes e após o estímulo. Como esperado, o estímulo com o antígeno induziu a expressão de *IFNG* em ambos os grupos de pacientes AT (RQ = 16,2 e 24,8, antes e após o estímulo) e PT (RQ = 4,6 e 12,2, antes e após o estímulo). Já para *IL10*, houve uma inibição de sua expressão gênica, também em pacientes AT (RQ = 5 e 1,27, antes e após o estímulo) e PT (6,5 e 2, antes e após o estímulo). Não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 17).

**Figura 17** - Níveis de expressão de *IFNG* e *IL10* em indivíduos saudáveis e pacientes antes do tratamento e após o tratamento de PBMCs cultivados por 72h.

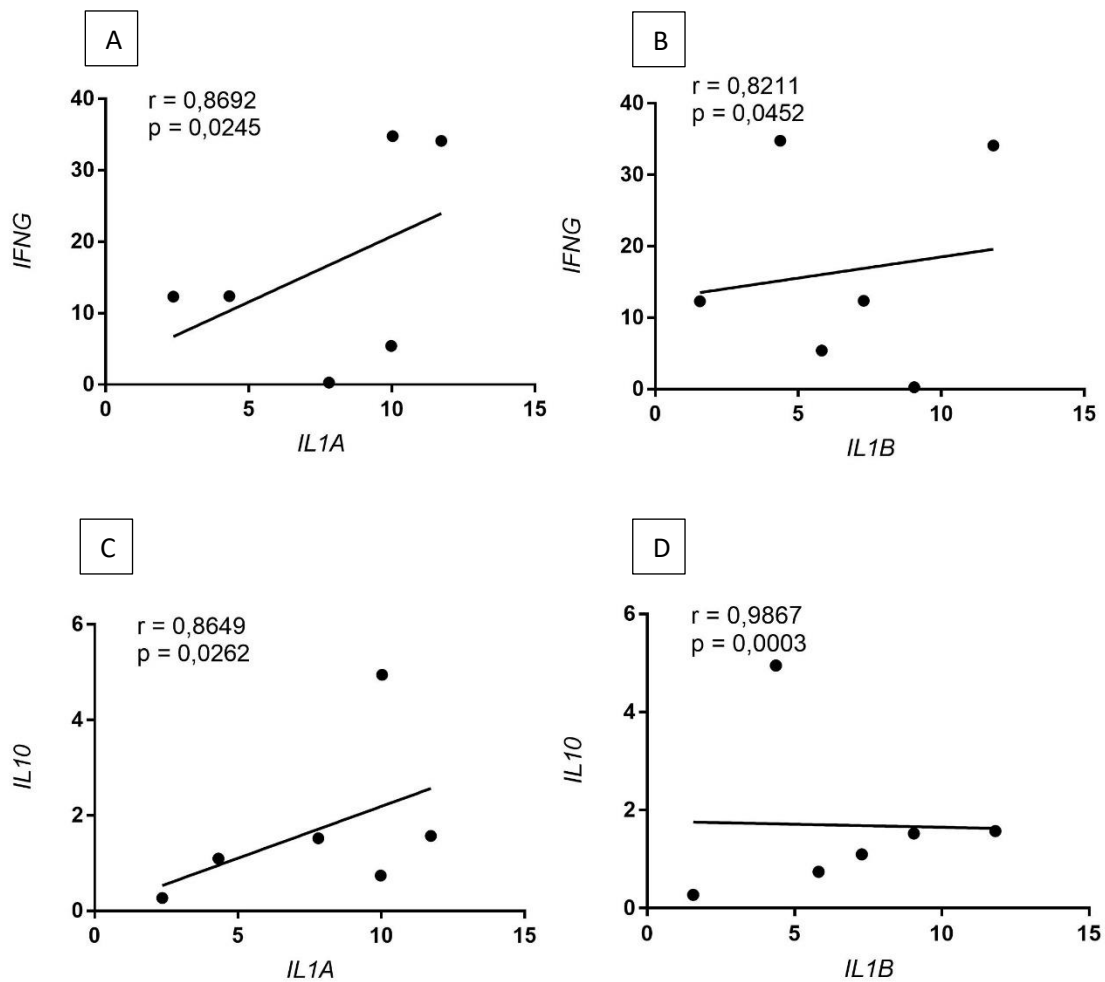


Fonte: a autora. CT = grupo controle (N= 5), AT = pacientes com lesão ativa antes do tratamento (N= 6), PT = pacientes pós-tratamento (N= 5), SE = sem estímulo, AgT = antígeno total.  $P < 0,05$ , obtido através de teste não paramétrico (Mann-Whitney) ou paramétrico (T-student). O cultivo das PBMCs com estímulo foi feito na concentração de 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de antígeno total.

Em seguida, os níveis de expressão de ambos, *IFNG* e *IL10*, foram correlacionados aos das principais citocinas IL-1, *IL1A* e *IL1B*. De forma interessante, pôde-se observar que a ativação desses genes analisados se correlaciona forte e positivamente nos pacientes com lesão ativa, inclusive entre uma citocina conhecida por ser reguladora, IL-10, e as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , todos com diferenças significativas (Figura 18).

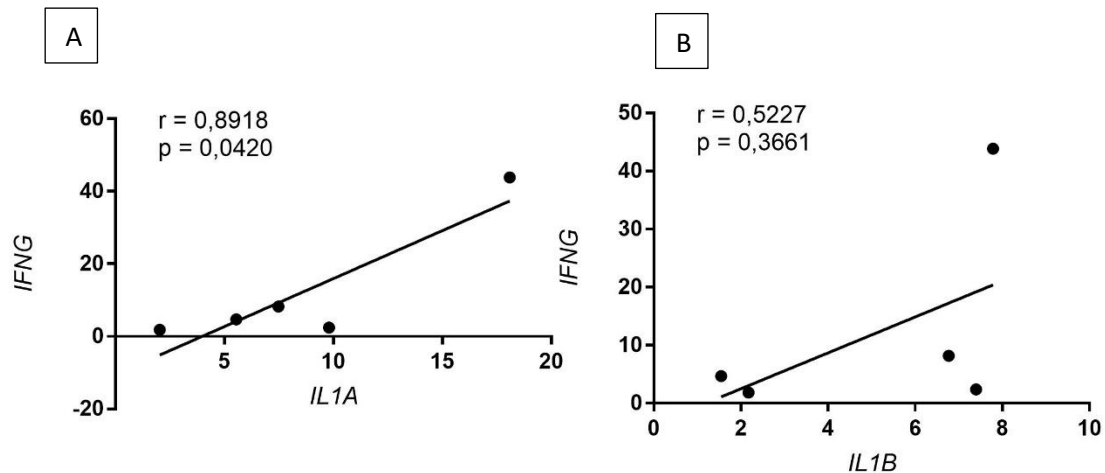
Entretanto, em pacientes que obtiveram cura clínica, não observamos correlações significativas entre *IL10* vs. *IL1A* e *IL1B*. Já entre *IFNG* vs. *IL1A* e *IL1B*, os resultados mostram que suas expressões gênicas foram induzidas de forma concomitante, tendo sido significativa para *IL1A* (Figura 19).

**Figura 18** - Correlação entre os níveis de expressão de *IFNG* e *IL10* vs. *IL1A* e *IL1B* em pacientes AT após o estímulo com antígeno total.



Fonte: a autora. Correlações realizadas pelo teste de Pearson.

**Figura 19** - Correlação entre os níveis de expressão de *IFNG* vs. *IL1A* e *IL1B* em pacientes PT após o estímulo com antígeno total.



Fonte: a autora. Correlações realizadas pelo teste de Pearson.

### 6.3 Quantificação proteica das citocinas IL-1 $\alpha$ e IL-1 $\beta$ em sobrenadantes de cultura por ELISA

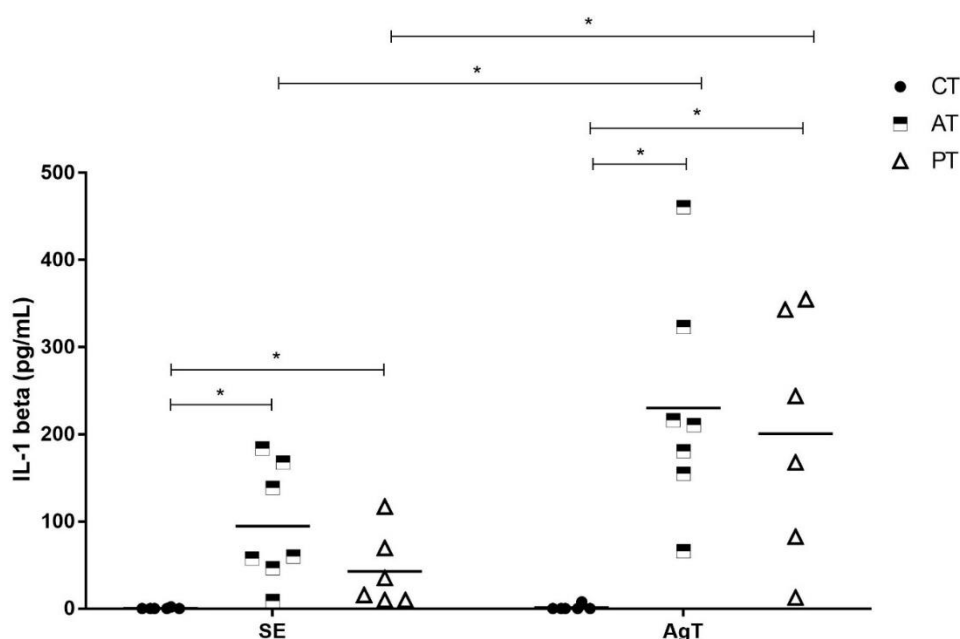
Além da expressão gênica, também confirmamos a secreção proteica de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nos três grupos de estudo, antes e após a estimulação antigênica, que foi capaz de induzir a produção de ambas as citocinas nos pacientes ativos e curados.

Para IL-1 $\alpha$ , antes do estímulo, os níveis foram de 3,3 e 5,3 pg/mL para os pacientes AT e PT, respectivamente, sem produção significativa em relação ao controle. Frente às frações antigênicas de *L. braziliensis*, houve um aumento para 48,9 pg/mL ( $p = 0,0008$ ) e 90,1 pg/mL ( $p = 0,0053$ ) em AT e PT, respectivamente, com diferenças significativas em comparação ao grupo controle. É importante destacar uma maior produção dessa citocina pelos pacientes que realizaram o esquema terapêutico (Figura 20).

Enquanto isso, observamos níveis maiores e significativos de IL-1 $\beta$  produzida pelas PBMCs mesmo antes de estimuladas em pacientes AT (94,7 pg/mL) e PT (42,8 pg/mL) em comparação aos indivíduos saudáveis ( $p = 0,0060$  e  $0,0358$ , respectivamente). Em resposta ao estímulo, pacientes AT (230,2 pg/mL;  $p = 0,0011$ ) e PT (200,7 pg/mL;  $p = 0,0055$ ) exibiram aumentos significativos nos valores quantificados, evidenciando a participação marcante dessa citocina na resposta induzida por *Leishmania* (Figura 21).



**Figura 21** -Níveis proteicos de IL-1 $\beta$  antes e após o estímulo com antígeno total de *L. braziliensis* durante 72h entre os grupos controle, AT e PT.



Fonte: a autora. CT = grupo controle (N = 6), AT = pacientes com lesão ativa antes do tratamento (N = 7), PT = pacientes pós-tratamento (N = 6), SE = sem estímulo, AgT = antígeno total.  $P < 0,05$ , obtido através de teste não paramétrico (Mann-Whitney) ou paramétrico (T-student). O cultivo das PBMCs com estímulo foi feito na concentração de 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de antígeno total.

Além de analisar em sobrenadantes de cultura de PBMC, também avaliamos os níveis plasmáticos de IL-1 $\alpha$ , tanto em indivíduos saudáveis como em pacientes AT, porém os mesmos foram indetectáveis.

#### 6.4 Associação entre expressão gênica e dados clínicos

Os níveis de expressão das citocinas IL-1 avaliadas em 72h de acordo com alguns aspectos clínicos de pacientes de lesão ativa são mostrados na Tabela 6. Os pacientes foram separados em três grupos de idade:  $\leq 30$  anos, entre 31 a 57 anos e  $\geq 58$  anos, afim também de tentar evidenciar as diferenças entre os indivíduos mais jovens e idosos. Os valores de expressão gênica, no entanto, não variaram significativamente entre os grupos, levando em conta a limitação do número baixo de pacientes idosos no estudo.

Os pacientes que tiveram um tempo de evolução mais precoce (60 dias) demonstraram níveis um pouco mais altos de expressão de *IL1A* e *IL1B*, e mais baixo de *IL37*, em comparação ao outro grupo. Além disso, níveis mais altos de todas as citocinas foram observados em

pacientes com a lesão úlcero-crostosa, apesar de não haver diferenças significativas. Por fim, pacientes que apresentavam uma única lesão não demonstraram diferenças significativas de expressão em comparação aos que desenvolveram mais lesões. Uma possível limitação é que a maioria dos pacientes deste segundo grupo tinham duas lesões.

**Tabela 6** - Aspectos clínicos de pacientes com lesão ativa e dados de expressão gênica das citocinas IL-1.

|                          | Expressão gênica ( <i>fold-change</i> ) |             |             |              |             |             |
|--------------------------|-----------------------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
|                          | N                                       | <i>IL1A</i> | <i>IL1B</i> | <i>IL1RN</i> | <i>IL18</i> | <i>IL37</i> |
| <b>IDADE (anos)</b>      |                                         |             |             |              |             |             |
| ≤ 30 anos                | 7                                       | 9,64        | 8,31        | 0,61         | 2,12        | 10,25       |
| ≥ 31 a 57 anos           | 5                                       | 5,82        | 5,46        | 0,61         | 0,53        | 3,94        |
| ≥58 anos                 | 5                                       | 11,64       | 8,07        | 1,63         | 1,74        | 14,42       |
| <b>TEMPO DE EVOLUÇÃO</b> |                                         |             |             |              |             |             |
| ≤ 60 dias                | 9                                       | 10,04       | 8,51        | 0,77         | 1,22        | 6,82        |
| > 60 dias                | 8                                       | 8,06        | 5,81        | 1,07         | 1,91        | 12,78       |
| <b>TIPO DE LESÃO</b>     |                                         |             |             |              |             |             |
| Ulcerada                 | 10                                      | 7,58        | 6,51        | 0,60         | 1,06        | 5,53        |
| Úlcero-crostosa          | 6                                       | 12,77       | 9,40        | 1,50         | 2,59        | 17,49       |
| Impetigóide              | 1                                       | 2,36        | 1,56        | 0,47         | 0,16        | 3,35        |
| <b>Nº DE LESÕES</b>      |                                         |             |             |              |             |             |
| 1                        | 9                                       | 9,60        | 7,49        | 0,65         | 1,77        | 8,55        |
| > 1                      | 8                                       | 8,56        | 6,96        | 1,20         | 1,28        | 10,82       |

Fonte: a autora.

## 7 DISCUSSÃO

A LTA compreende uma das formas de manifestações clínicas causadas pelo grupo de protozoários do gênero *Leishmania*, que chegam no hospedeiro humano por meio de flebotomíneos infectados. Apesar disso, o homem parece não ser crucial na manutenção desses protozoários na natureza por serem considerados hospedeiros acidentais participantes dessa doença zoonótica (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003). O risco de contrair essa infecção é bastante associado à chegada do homem nos ambientes de mata, por isso, a doença era vista anteriormente como restrita às populações de regiões florestais. No entanto, a crescente urbanização vem trazendo à tona o aspecto antroponótico da doença, levando a leishmaniose para novas áreas e evidenciando a adaptação dos vetores a novos ambientes (BENCHIMOL et al., 2019; FOLLADOR et al., 1999; LEAL; WERNECK; BORGES-OLIVEIRA, 2017).

Em nosso estudo, o acometimento da LTA entre os gêneros masculino e feminino foi relativamente equilibrado nos pacientes de lesão ativa (44% eram homens e 56% mulheres), enquanto que a maior parte dos pacientes pós-tratamento eram homens (66,7%) em relação às mulheres (33,3%). Diversos trabalhos relatam uma predominância dos acometimentos em homens devido à maior exposição desses indivíduos a áreas de risco, graças ao envolvimento com atividades ocupacionais rurais e serviços militares (DA SILVA; CUNHA, 2007; FRANÇA, 2009; ROCHA et al., 2015). Por outro lado, uma pesquisa feita no estado do Ceará relatou diferenças na proporção de homens/mulheres com LTA em diferentes cidades do estado, uma delas com frequência maior de mulheres acometidas. A hipótese levantada foi que o crescente engajamento das mulheres nas atividades ocupacionais aumente os riscos de contrair a infecção, ou até mesmo a ocorrência de transmissão peri ou intradomiciliar contribua no aumento da proporção de mulheres infectadas (SILVA, 2008). Isso pode ser também uma justificativa para nossos resultados.

A média de idade dos pacientes de lesão ativa foi maior do que a observada no grupo de pacientes curados (42,57 e 24,3, respectivamente). De fato, a faixa etária dos indivíduos acometidos parece variar nos diferentes estudos, mas, predominantemente, observamos uma faixa de idade associada a fase ativa de trabalho (estimada entre 20 a 39 anos), visto que aumenta o risco de exposição aos vetores flebotomíneos. Também observamos casos de infecção em crianças e idosos em nosso trabalho, corroborando com a ideia de transmissão além do ambiente florestal e adaptação dos mosquitos em áreas domiciliares (DA SILVA; CUNHA, 2007; FRANÇA, 2009).

As variações nas formas de apresentação das lesões observadas nos pacientes AT do nosso estudo refletem a complexidade da doença, destacada principalmente no Novo Mundo. A lesão ulcerada típica ou úlcera franca foi mais predominante nos pacientes AT do nosso estudo (69,6%). A detecção de outras formas menos comuns, como úlcero-crostosa e impetigóide confirma ideia de que a LCL é uma doença polimórfica da pele (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2000; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

As formas das cicatrizes observadas nos pacientes que obtiveram cura seguiram o mesmo resultado, com 83,3% apresentando a morfologia comum ulcerada e 16,7% com uma cicatriz em forma de placa, proveniente de uma lesão plana palpável e elevada acima da superfície da pele, segundo descreve Oliaro et al. (2013). O tempo médio de evolução das lesões é bem variável, sendo o intervalo de até 6 meses considerado pouco tempo (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; PASSOS et al., 2001). Ele reflete a intensidade e qualidade da resposta imunológica desenvolvida frente ao parasita, principalmente no início da infecção, podendo culminar para a cura de forma espontânea (Ministério da Saúde/Brasil, 2017).

As técnicas laboratoriais de diagnóstico para a leishmaniose exibem diferentes sensibilidades de detecção, seja do parasita ou de seus componentes como material genético e antígenos. Em nossos resultados, observamos uma maior frequência de positividade da técnica molecular de PCR (86,7%) em relação à pesquisa direta das formas amastigotas nas lesões e IFI. A PCR permite a detecção do material genético do parasita mesmo em quantidades muito pequenas ou baixa carga parasitária. Por outro lado, a probabilidade de visualizar o parasita na lesão diminui ao longo do tempo, levando às baixas sensibilidades observadas na pesquisa direta. Já para a IFI, os baixos níveis de anticorpos produzidos na LTA levam à redução da sensibilidade dessa técnica, exceto em pacientes com múltiplas lesões, cujo aumento da carga parasitária influencia na antigenicidade (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; POURMOHAMMADI et al., 2010).

Com relação aos níveis de expressão das citocinas IL-1 no contexto da LTA, as análises de 24 e 72 horas de cultivo e estimulação das PBMCs revelaram uma possível tendência de modulação da resposta imune nos momentos mais iniciais, e que o estabelecimento da resposta Th1 mais forte se dá num estágio mais tardio da infecção, tendo em vista os níveis de transcritos observados nos resultados de 72 horas (COÊLHO et al., 2010; ROCHA et al., 1999).

Após três dias de estímulo, observamos que as células dos pacientes com lesão ativa e curados exibem níveis mais altos de expressão de *IL1A*, mesmo na ausência de estímulo. Alguns dados sugerem que essa citocina é importante para a ativação de uma resposta Th1 e ativação

de células T CD4<sup>+</sup>, num trabalho em conjunto com a IL-12, apesar de também estar associada à desregulação da resposta imunológica (LOPEZ KOSTKA et al., 2009). No entanto, os níveis mais altos mantidos em pacientes após o tratamento indiquem que tal citocina não contribua para o desbalanço imunológico em pacientes.

Na análise da expressão proteica, observamos que a quantificação de IL-1 $\beta$  foi significativa em ambos os grupos de pacientes antes de receberem estímulo. Isso pode indicar que essa citocina tem uma produção persistente durante e após a infecção, enquanto que a produção de IL-1 $\alpha$  estaria mais restrita ao momento da apresentação antigênica. Além disso, níveis proteicos menores de IL-1 $\alpha$  podem ser observados já que também atua como citocina “alarme”, se restringindo ao interior da célula e sendo liberada após danos e injúria tecidual.

Além disso, os níveis plasmáticos de IL-1 $\alpha$ , tanto em controle como em pacientes, foram indetectáveis. Isso sinaliza que a regulação inflamatória é mais local do que sistêmica. Italiani et al., 2018 mencionam que mesmo em condições patológicas, ambas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  geralmente são indetectáveis na circulação humana.

Após o estímulo das PBMCs, observamos claramente um aumento significativo nas expressões gênica e proteica de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em pacientes AT, comparado ao grupo controle estimulado. Esse resultado demonstra a capacidade do estímulo de *L. braziliensis* em direcionar uma resposta inflamatória, que de forma exacerbada, piora a patogênese da LC e sua gravidade (FERNÁNDEZ-FIGUEROA et al., 2012). Alguns trabalhos demonstram que o estímulo das proteínas solúveis presentes no extrato obtido a partir de *L. braziliensis* é capaz de induzir fortes respostas Th1 através de IFN- $\gamma$  e TNF, além de proliferação de linfócitos (CHAMAKH-AYARI et al., 2014; SCHNORR et al., 2012).

Santos e colaboradores (2018) encontram resultados semelhantes, pois, após estimularem o PBMC de pacientes com LTA infectados por *L. braziliensis* com antígeno solúvel, relatam um aumento na produção da IL-1 $\beta$ . Também já foi observado que monócitos de pacientes com LC que não receberam estímulo apresentavam uma produção significativamente maior de IL-1 $\beta$  do que indivíduos controles (FERNÁNDEZ-FIGUEROA et al., 2012).

Nos pacientes curados (PT), vemos que o estímulo também induziu, de forma significativa em relação aos controles. Esse aumento após um novo reconhecimento das células aos antígenos de *Leishmania* pode indicar um aprimoramento da resposta imune graças a memória gerada após uma inflamação resolvida, contribuindo assim para a cura e proteção (CHAMAKH-AYARI et al., 2014; ITALIANI et al., 2020). Além disso, as citocinas IL-1 parecem ser cruciais na reativação de T CD4<sup>+</sup> efectoras e de memória já diferenciadas (JAIN et

al., 2018). Alguns trabalhos como o de Nogueira et al. (2014) e Da-Cruz et al. (2002) também demonstram a capacidade de produção de citocinas inflamatórias após estímulo pelos pacientes com LC, mesmo após um longo tempo de cura.

Uma análise das expressões de *IFNG* e *IL10* foi feita para avaliar a resposta ao estímulo pelo antígeno solúvel total de *Leishmania*, e pôde-se observar que as mesmas foram induzidas e inibidas, respectivamente, mas sem significância, em pacientes ativos e curados. Essa heterogeneidade de respostas pró e anti-inflamatória parece ser importante no desfecho clínico (CHAMAKH-AYARI et al., 2014). Além disso, a inibição de *IL10* pode indicar um perfil de resposta imune mais inflamatório induzido por tal espécie de *Leishmania* (DOS SANTOS et al., 2017).

Para tentar entender a dinâmica entre tais citocinas, foram feitas correlações entre seus níveis de expressão. Foram observadas correlações positivas e significativas entre *IFNG* e *IL1A* em ambos os grupos de pacientes, e com *IL1B* em pacientes AT. No entanto, apenas em pacientes com lesão ativa houve correlação entre *IL1A/B* e *IL10*, demonstrando que, em resposta ao estímulo, há uma regulação à medida em que os transcritos de *IL1A/B* aumentam e uma resposta inflamatória menos polarizada e mais mista (Th1/Th2) em comparação à resposta produzida por pacientes curados. Nogueira et al. (2014), por exemplo, observaram uma correlação negativa entre a produção de *IFNG* e *IL10* ao longo do tempo decorrido após a cura clínica da LMC, demonstrando o papel da regulação associado à cura dessa forma clínica. No entanto, um perfil misto de respostas 1 e 2 já foi associado a um modelo de inflamação persistente, graças a presença de monócitos com fenótipo M1/M2 (ITALIANI et al., 2020).

A família IL-1 também inclui o antagonista IL-1Ra, que regula a ação das citocinas IL-1 $\alpha/\beta$ . Observamos que pacientes tratados exibem níveis reduzidos de expressão de tal citocina reguladora, e isso pode indicar que, provavelmente, a taxa de citocinas IL-1 bioativas, capazes de se ligarem ao receptor, é maior nesses indivíduos (VON STEBUT et al., 2003).

O estímulo com os antígenos de *L. braziliensis* inibiu a expressão desse antagonista em ambos os pacientes AT e PT, tendo sido de forma significativa nos pacientes tratados. Essa redução também pode estar associada ao aumento observado de *IL1A/B*, possibilitando que assim possam desempenhar seu papel na inflamação e ativar as cascatas imunológicas em resposta ao patógeno. Isso também mostra que, após uma nova estimulação, pacientes que tiveram LTA induzem respostas inflamatórias direcionadas por IL-1 menos atenuadas pelo antagonista, que teria um papel regulador em pacientes.

Dos Santos e colaboradores (2017) infectaram uma linhagem de monócitos humanos chamada THP-1 com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* e verificaram que esta última

induz níveis mais baixos de IL-1Ra do que *L. (L.) amazonensis*, evidenciando a capacidade de *L. braziliensis* de induzir um perfil de resposta mais inflamatória. De fato, a resposta direcionada pela *L. (L.) amazonensis* em pacientes é caracterizada por um perfil Th1 mais fraco e Th2 mais pertinente, resposta essa também associada à manifestação difusa da LTA (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004)..

Com relação a IL-18, essa é uma citocina que pode atuar induzindo a produção de IFN- $\gamma$  por células T e NK, contribuindo assim para a resposta Th1 e proteção contra diversos patógenos intracelulares. No entanto, pode também facilitar a resposta Th2 induzindo a produção de IL-3, IL-9, IL-13 e IL-4 por células T, mastócitos e basófilos (BRYSON; WEI; ALEXANDER, 2008; NAKANISHI, 2018).

Há uma grande divergência sobre o papel da IL-18 na infecção por *Leishmania*, no que diz respeito à susceptibilidade ou resistência, mas sabe-se que o *background* genético direciona o papel dessa citocina para proteção ou exacerbação da doença através das respostas Th1 e Th2. Por exemplo, a deleção de *IL18* causa maior severidade da doença em camundongos C57BL/6, que são resistentes à *L. major* e capazes de desencadear respostas Th1, parecendo assim contribuir de certa forma com a resistência. Já em camundongos BALB/c, susceptíveis à infecção por *L. major*, a IL-18 parece contribuir nessa progressão (BRYSON; WEI; ALEXANDER, 2008; SOUSA et al., 2015). Contribuindo ainda mais para a complexidade do papel da IL-18 na leishmaniose, Sousa et al. (2015) sugerem a contribuição da IL-18 na infecção varia entre as espécies de *Leishmania*. Apesar disso, ainda não há estudos avaliando a IL-18 na infecção por *L. braziliensis*.

Em nossos resultados, semelhantemente à *IL1RN*, os níveis do mRNA de *IL18* estavam significativamente reduzidos em pacientes pós-tratamento em comparação aos de lesão ativa e controle. Essa diminuição, que acompanha uma reação inflamatória resolvida, corrobora com o que é descrito por Italiani et al. (2020), que demonstraram haver um aumento no receptor solúvel inibidor da IL-18 (IL-18BP) associado à atenuação da inflamação aguda e retorno da homeostase. Além disso, esse resultado pode indicar que a diminuição de *IL18* pode ser um biomarcador que sinaliza um bom prognóstico e resposta ao tratamento, sendo uma citocina sensível à terapia com Glucantime®.

Natale (2015) encontrou em seu estudo níveis mais altos da IL-18 em camundongos C57BL/6 selvagens infectados com *L. amazonensis* durante o período de exacerbação das lesões, e viu que o nocaute da IL-18 contribui para redução da gravidade da doença com lesões menores. A ausência dessa citocina também contribui para o processo de cicatrização tecidual, visto que a superprodução da IL-18 está associada à distúrbios fibróticos (DO et al., 2012).

Por fim, analisamos as expressões de *IL37* antes e após estimulação, um gene que codifica uma citocina que é sabidamente conhecida por suprimir a resposta inflamatória, inibindo a produção de citocinas como IL-1 $\alpha$ , IL-6 e TNF e atuando como fator de transcrição através da regulação de genes supressores da inflamação (NOLD et al., 2010; WANG et al., 2018). Nossos resultados demonstraram níveis significativamente mais altos de expressão do mRNA de *IL37* em pacientes AT em ambos os tempos de cultura, porém a inibição de sua expressão após o estímulo no tempo mais curto (24h) pode indicar que nesse estágio, há a tendência de uma resposta menos equilibrada.

Diversos estudos destacam que a expressão de *IL37* depende da presença de um meio inflamatório e de células inflamatórias no ambiente, e que em condições normais ela não é expressa ou está presente em baixos níveis (DINARELLO et al., 2016; WANG et al., 2018; YE; HUANG, 2015). Nossos dados mostram um possível papel regulador da IL-37 presente nos pacientes com a infecção ativa, muito provavelmente atuando para limitar a inflamação. Talvez por isso os pacientes curados exibam menores níveis dessa citocina, já que resolveram a lesão. Na presença do estímulo, ambos os pacientes ativos e curados exibiram níveis significativamente mais altos de expressão de *IL37* em relação ao controle. Nosso estudo é o primeiro a fornecer evidências da atuação da IL-37 na leishmaniose.

Uma pesquisa realizada com doenças inflamatórias intestinais como Doença de Crohn e colite ulcerativa revelou níveis mais altos de expressão da IL-37 nos tecidos inflamados, além de níveis séricos baixos dessa citocina nos pacientes, provavelmente associados à translocação da IL-37 para o núcleo para regular a inflamação, modulando a expressão gênica de citocinas como TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$  (LI et al., 2014). A inibição destas citocinas também foi observada quando PBMCs de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico foram estimulados com IL-37 recombinante purificada (YE et al., 2014).

Tudo isso indica a importância da IL-37 como modulador na patogênese causada pela *Leishmania*, bem como na supressão da resposta imune no contexto inflamatório e a possibilidade de exploração em testes clínicos como terapia de doenças inflamatórias. Quando associamos os dados clínicos às citocinas, é possível notar uma tendência de menor expressão de *IL37* e maior de *IL1A/B* em pacientes que tiveram uma evolução rápida da doença, indicando a importância de um equilíbrio inflamatório na progressão da LTA. Por isso, o estudo dessa citocina no contexto da LC pode ser promissor para abordagens terapêuticas ou até mesmo como um biomarcador que sinalize atividade inflamatória exacerbada.

Em nosso estudo, não encontramos associações significativas entre os níveis de expressões de IL-1 e características clínicas de pacientes AT, talvez devido ao número reduzido

de amostras. No entanto, ainda podemos observar que pacientes com tempo de evolução mais curto expressaram níveis maiores de citocinas inflamatórias e menores de *IL37*, bem como os que tinham a lesão úlcero-crostosa, indicando que um desequilíbrio na regulação pode estar associado a esses fatores.

Sendo assim, podemos observar uma importante regulação da produção das citocinas IL-1 frente à *L. braziliensis*, um parasita com potencial imunogênico dirigido à indução de uma intensa resposta inflamatória, assim como o papel da terapia com antimonial na atenuação de IL-18, o que parece contribuir para a cicatrização (Quadro 2). Como previsto, pacientes que exibem a infecção ativa expressam níveis induzidos de transcritos de citocinas IL-1 $\alpha/\beta$  em resposta à estimulação, indicando a participação dessas citocinas na resposta efetora, apesar de também haver produção de *IL37* e correlações significativas com *IL10*, indicando a participação da regulação. Além disso, pacientes curados mantêm a capacidade de expressarem citocinas inflamatórias após novo estímulo, com baixos níveis de IL1RN, demonstrando que sua redução esteja também associada à cura (Quadro 2). Nossos achados contribuem para elucidar a participação da família IL-1 e do papel ainda pouco conhecido da IL-18 na susceptibilidade na LTA, bem como a atuação reguladora da IL-37 em resposta à *Leishmania*.

**Quadro 2** - Comportamento das citocinas IL-1 em pacientes após 72h de estímulo.

|    | <i>IL1A</i> | <i>IL1B</i> | <i>IL1RN</i> | <i>IL18</i> | <i>IL37</i> |
|----|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| AT | ↑↑          | ↑↑          | ↓            | ↓           | ↑↑          |
| PT | ↑↑          | ↑↑          | ↓↓           | ↓↓          | ↑↑          |

Fonte: a autora. AT = pacientes com lesão ativa antes do tratamento, PT = pacientes pós-tratamento. Uma seta = sinaliza alteração, porém sem significância estatística, Duas setas = alteração com diferença significativa.

## 8 CONCLUSÕES

- O estímulo com antígenos de *L. braziliensis* é capaz de induzir expressões gênicas e proteicas significativas de citocinas IL-1 pró-inflamatórias em pacientes ativos e curados, indicando que estes mantêm a capacidade de produzirem citocinas inflamatórias após novo estímulo e que tais citocinas contribuem no estabelecimento de uma resposta Th1 durante a infecção.
- Nossos dados sugerem que a citocina IL-1 $\alpha$  exerce uma regulação inflamatória local em pacientes com LTA, tendo em vista os níveis indetectáveis no plasma sanguíneo.
- A diminuição da transcrição de *IL1RN* está associada à cura, provavelmente, porque a atuação de IL-1 $\alpha/\beta$  é importante na proteção contra *L. braziliensis*.
- A citocina IL-18 parece ter um papel Th2 na LTA em humanos, e sua inibição significativa em pacientes que realizaram o esquema terapêutico pode indicá-la como biomarcador do prognóstico de cura.
- A expressão de *IL37* é induzida em resposta à inflamação induzida por antígenos de *L. braziliensis*, provavelmente com papel de atenuação da doença.
- As correlações indicam que, provavelmente, pacientes que obtiveram sucesso na cura da LTA produzem uma resposta imune mais polarizada (Th1) e menos mista (Th1/Th2) após um novo estímulo.
- Pacientes que realizaram a terapia com o Glucantime® exibem uma diminuição na atividade transcricional de citocinas IL-1, destacando *IL1RN* e *IL18*, o que talvez contribua nos mecanismos de resistência que controlam a infecção por *Leishmania*.

## **9 PERSPECTIVAS**

- Dosar a citocina IL-37 em sobrenadantes de cultura de PBMCs de pacientes antes e após tratamento, com e sem estímulo.
- Avaliar por citometria de fluxo as populações celulares (linfócitos T e monócitos) que participam e contribuem na produção das citocinas da família IL-1 aqui estudadas.
- Publicar os dados das citocinas IL-1 do presente trabalho em um artigo científico.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, V. et al. Distribuição dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em Pernambuco no ano 2002. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. suppl 2, p. 46–47, 2003.
- ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F. T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: Is this paradigm still relevant. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 80, abr. 2012.
- ALLEN, J. E.; WYNN, T. A. Evolution of Th2 Immunity: A Rapid Repair Response to Tissue Destructive Pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 5, p. e1002003, maio 2011.
- ALMEIDA, A. F. **Avaliação da produção de citocinas Th17, Th1 e Th2 por linfócitos T em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Recife, p. 83. 2013.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, maio 2012.
- ALVES, C. F. et al. American Tegumentary Leishmaniasis: Effectiveness of an Immunohistochemical Protocol for the Detection of *Leishmania* in Skin. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63343, maio 2013.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: Advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 35, n. 7, p. 699-705, out. 2010.
- ANDRADE-NARVAEZ, F. J. et al. Asymptomatic infection with American cutaneous leishmaniasis: Epidemiological and immunological studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 10, p. 599–604, out. 2016.
- APTE, R. N.; VORONOV, E. Is interleukin-1 a good or bad “guy” in tumor immunobiology and immunotherapy. **Immunological Reviews**, v. 222, n. 1, p. 222-241, abr. 2008.
- ATTUR, M. et al. Plasma levels of interleukin-1 receptor antagonist (IL1Ra) predict radiographic progression of symptomatic knee osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 23, n. 11, p. 1915–1924, nov. 2015.
- BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734–40, dez. 2002.
- BACELLAR, O. et al. Interleukin 17 Production among Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 1, p. 75–78, jul. 2009.
- BAHRAMI, F.; HARANDI, A. M.; RAFATI, S. Biomarkers of cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 222, jun. 2018.
- BALLKE, C. et al. Characterization of Regulatory T-Cell Markers in CD4+ T Cells of the Upper Airway Mucosa. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148826, fev. 2016.
- BARROSO-FREITAS, A. P. T. et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 4, p. 383–389, abr. 2009.
- BELKAID, Y. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 502–507, dez. 2002.

- BENCHIMOL, J. L. et al. Leishmanioses: sua configuração histórica no Brasil com ênfase na doença visceral nos anos 1930 a 1960. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 14, n. 2, p. 611–626, ago. 2019.
- BERDA-HADDAD, Y. et al. Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1 $\alpha$ . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 51, p. 20684–20689, dez. 2011.
- BITTAR, R. C. et al. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 625–30, ago. 2007.
- BOAVENTURA, V. S. et al. Human mucosal leishmaniasis: Neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 10, p. 2830–2836, out. 2010.
- BOLEIRA, M. et al. Úlcera de Buruli. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 3, p. 281–301, jun. 2010.
- BORASCHI, D. et al. The family of the interleukin-1 receptors. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 197–232, jan. 2018.
- BORTHWICK, L. A. The IL-1 cytokine family and its role in inflammation and fibrosis in the lung. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 4, p. 517–534, jul. 2016.
- BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A. et al. Combination of flow cytometry and qPCR to study the immune response of american cutaneous leishmaniasis patients. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, p. 433–439, out. 2018.
- BRINKMANN, V. et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, mar. 2004.
- BRYSON, K. J.; WEI, X. Q.; ALEXANDER, J. Interleukin-18 enhances a Th2 biased response and susceptibility to *Leishmania mexicana* in BALB/c mice. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 7, p. 834–839, jun. 2008.
- BUFLER, P. et al. A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 21, p. 13723–13728, out. 2002.
- CAMPANELLI, A. P. et al. CD4 + CD25 + T Cells in Skin Lesions of Patients with Cutaneous Leishmaniasis Exhibit Phenotypic and Functional Characteristics of Natural Regulatory T Cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 9, p. 1313–1322, maio 2006.
- CARDOSO, T. M. et al. Protective and pathological functions of CD8+ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 3, p. 898–906, 2015.
- CARNEIRO et al. NOX2-derived reactive oxygen species control inflammation during *Leishmania amazonensis* infection by mediating infection-induced neutrophil apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 1, p. 196–208, 2018.
- CARVALHO, L. P. et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 301, out. 2012.
- CECÍLIO, P. et al. Deception and manipulation: The arms of *Leishmania*, a successful parasite. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 480, 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>>. Acesso em: 20 de nov. 2019.

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**, v. 9, n. 5, maio 2014.

CHARMOY, M. et al. The Nlrp3 inflammasome, IL-1 $\beta$ , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania* major in C57BL/6 mice. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 4, p. 897–911, abr. 2016.

CHAVES, L. F.; PASCUAL, M. Climate Cycles and Forecasts of Cutaneous Leishmaniasis, a Nonstationary Vector-Borne Disease. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 8, p. e295, ago. 2006.

CHUNG, Y. et al. Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 576–587, abr. 2009.

COÊLHO, Z. C. B., et al. In vitro initial immune response against *Leishmania amazonensis* infection is characterized by an increased production of IL-10 and IL-13. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 14, n. 5, p. 476-482, 2010.

COOTI, C. S.; NISHINO, L.; SERAFINI, S. Z. Caso para diagnóstico. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 3, p. 363–366, maio 2004.

COSTA, D. L. et al. Characterization of regulatory T cell (Treg) function in patients infected with *Leishmania braziliensis*. **Human Immunology**, v. 74, n. 12, p. 1491–1500, dez. 2013.

DA-CRUZ, A. M. et al. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. **British Journal of Dermatology**, v. 153, n. 3, p. 537–543, set. 2005.

DA-CRUZ, A. M. et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 2, p. 251-256, 2002.

DA C. GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. et al. Inclusion of Quality Controls on Leishmaniasis Molecular Tests to Increase Diagnostic Accuracy in Research and Reference Laboratories. **Molecular Biotechnology**, v. 57, n. 4, p. 318–324, abr. 2015.

DA SILVA AMORIM, E. A. et al. IL-1 family and Cutaneous Leishmaniasis: A poorly understood relationship. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 2020.

DA SILVA, L. M. R.; CUNHA, P. R. A urbanização da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Campinas - São Paulo (SP) e região: Magnitude do problema e desafios. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 6, p. 515–519, nov. 2007.

DA SILVA, R. E. et al. Towards a standard protocol for antimony intralesional infiltration technique for cutaneous leishmaniasis treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 2, p. 71–79, fev. 2018.

DANTAS-TORRES, F. et al. Sand fly population dynamics and cutaneous leishmaniasis among soldiers in an Atlantic forest remnant in northeastern Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005406, fev. 2017.

DAYAKAR, A. et al. Cytokines: Key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: Opportunities for novel diagnostics and immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, abr. 2019.

DE ARAÚJO, C. F. et al. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* amastigote extracts differ in their enhancement effect on *Leishmania* infection when injected intradermally. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 70, fev. 2014.

DE BRITO, M. E. F. et al. Leishmaniose cutânea no nordeste do Brasil: Uma avaliação crítica dos estudos realizados no estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 425-429, jul. 2012.

DE SALDANHA, R. R. et al. Meglumine antimonate treatment enhances phagocytosis and TNF- $\alpha$  production by monocytes in human cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 10, p. 596-603, out. 2012.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. **Cell and Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 31, jun. 2015.

DE PRATES, F. V. O. et al. Fluconazole in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*: A randomized controlled trial. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 1, p. 67-71, jan. 2017.

DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99-109, mar. 2015.

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

DINARELLO, C. A. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 519-550, abr. 2009.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3720-3732, abr. 2011.

DINARELLO, C. A. et al. Suppression of innate inflammation and immunity by interleukin-37. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 5, p. 1067-1081, maio 2016.

DINARELLO, C. A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 8-27, jan. 2018.

DINARELLO, C. A. The IL-1 family of cytokines and receptors in rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 15, n. 10, p. 612-632, out. 2019.

DINARELLO, C. A.; VAN DER MEER, J. W. M. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 6, p. 469-84, dez. 2013.

DO, D. V. et al. Interleukin-18 system plays an important role in keloid pathogenesis via epithelial-mesenchymal interactions. **British Journal of Dermatology**, v. 166, n. 6, p. 1275-1288, jun. 2012.

DOS SANTOS, J. C. et al. Cytokines and microbicidal molecules regulated by IL-32 in THP-1-derived human macrophages infected with New World *Leishmania* species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, 27 fev. 2017.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 1, p. 276, dez. 2012.

DU, R. et al. Old World Cutaneous Leishmaniasis and Refugee Crises in the Middle East and North Africa. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004545, maio 2016.

EIRAS, D. P.; KIRKMAN, L. A.; MURRAY, H. W. Cutaneous Leishmaniasis: Current Treatment Practices in the USA for Returning Travelers. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 52–62, mar. 2015.

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, jun. 2008.

EUROLEISH. **Euroleish.net: Control of Leishmaniasis, from bench to bedside and community**. Disponível em: <<http://www.euroleish.net/about-leishmaniasis>>. Acesso em: 09 mar. 2020.

FADOK, V. A. et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, and PAF. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 4, p. 890–898, fev. 1998.

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

FERNÁNDEZ-FIGUEROA, E. A. et al. Disease severity in patients infected with *Leishmania mexicana* relates to IL-1 $\beta$ . **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, p. e1533, maio 2012.

FOLLADOR, I. et al. Outbreak of American cutaneous leishmaniasis in Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 497–503, 1999.

FRANÇA, E. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Juína, Mato Grosso, Brasil. **Scientia Medica**, v. 19, n. 3, p. 103-107, jul./set. 2009.

GALLUZZI, L. et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 273, maio 2018.

GARLANDA, C.; DINARELLO, C. A.; MANTOVANI, A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. **Immunity**, v. 39, n. 6, p. 1003-1018, dez. 2013.

GAZZINELLI, R. T., DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 12, p. 895-906, 2006.

GIUDICE, A. et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 75, mar. 2012.

GOMES, C. M. et al. *Leishmania braziliensis* amastigotes stimulate production of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TGF- $\beta$  by peripheral blood mononuclear cells from nonendemic area healthy residents. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 5, p. 225–231, maio 2014.

GONÇALVES, S. V. C. B.; COSTA, C. H. N. Treatment of cutaneous leishmaniasis with thermotherapy in Brazil: An efficacy and safety study. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 93, n. 3, p. 347–355, maio 2018.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. DE L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, jan. 2003.

GONZÁLEZ, C. et al. Climate change and risk of leishmaniasis in North America: Predictions from ecological niche models of vector and reservoir species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, jan. 2010.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-33, abr. 2010.

GUEIRARD, P. et al. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 100–111, jan. 2008.

GUPTA, G.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. **Advances in Applied Microbiology**, v. 82, p. 155–184, 2013.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 1–23, 2011.

HEPBURN, N. Cutaneous leishmaniasis: an overview. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 49, n. 1, p. 50, jan-mar 2003.

HUBER, M., LOHOFF, M. IRF4 at the crossroads of effector T-cell fate decision. **European journal of immunology**, v. 44, n. 7, p. 1886-1895, abr. 2014.

HURRELL, B. P.; REGLI, I. B.; TACCHINI-COTTIER, F. Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 392-401, maio 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS. **Ministério da Saúde adota técnica para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar desenvolvida no INI**. Disponível em: <<https://www.ini.fiocruz.br/minist%C3%A9rio-da-sa%C3%BAdade-adota-t%C3%A9cnica-para-o-tratamento-da-leishmaniose-tegumentar-desenvolvida-no-ini>>. Acesso em: 19 fev. 2020.

ITALIANI, P. et al. Circulating levels of IL-1 family cytokines and receptors in Alzheimer's disease: new markers of disease progression?. **Journal of neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2018.

ITALIANI, P. et al. Profiling the course of resolving vs. persistent inflammation in human monocytes: the role of IL-1 family molecules. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1426, 2020.

JAIN, A. et al. T cell-intrinsic IL-1R signaling licenses effector cytokine production by memory CD4 T cells. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, dez. 2018.

JIA, H.; LIU, J.; HAN, B. Reviews of interleukin-37: Functions, receptors, and roles in diseases. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 14, abr. 2018.

JOOSTEN, L. A. B. et al. Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: Contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1 $\beta$ . **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 12, p. 3651–3662, dez. 2009.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 123–152, 1995.

KAUTZ-NEU, K. et al. A role for leukocyte-derived IL-1RA in DC homeostasis revealed by increased susceptibility of IL-1RA-deficient mice to cutaneous leishmaniasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 8, p. 1650–1659, ago. 2011.

KOSTKA, S. L. et al. Distinct roles for IL-1 receptor type I signaling in early versus established *Leishmania* major infections. **Journal of investigative dermatology**, v. 126, n. 7, p. 1582–1589, abr. 2006.

KROPF, P. et al. Signaling through the T1/ST2 molecule is not necessary for Th2 differentiation but is important for the regulation of type 1 responses in nonhealing *Leishmania major* infection. **Infection and immunity**, v. 71, n. 4, p. 1961–1971, abr. 2003.

LEAL, D. L.; WERNECK, M. A. F.; BORGES-OLIVEIRA, A. C. Validação da versão saúde bucal do Instrumento de Diagnóstico do Estágio de Desenvolvimento da Rede de Atenção à Saúde. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 8, n. 4, p. 65–75, nov. 2017.

LECOEUR, H. et al. Targeting Macrophage Histone H3 Modification as a *Leishmania* Strategy to Dampen the NF- $\kappa$ B/NLRP3-Mediated Inflammatory Response. **Cell Reports**, v. 30, n. 6, p. 1870–1882. e4, fev. 2020.

LEE, J. H.; CHO, D. H.; PARK, H. J. IL-18 and cutaneous inflammatory diseases. **International Journal of Molecular**, v. 16, n. 12, p. 29357–69, dez. 2015.

LESTINOVA, T. et al. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005600, jul. 2017.

LI, Y. et al. The possible role of the novel cytokines IL-35 and IL-37 in inflammatory bowel disease. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, ago. 2014.

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p. 909–915, jul. 2013.

LÓPEZ-CARVAJAL, L. et al. Efficacy of cryotherapy for the treatment of cutaneous leishmaniasis: meta-analyses of clinical trials. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 360, dez. 2016.

LOPEZ KOSTKA, S. et al. IL-17 Promotes Progression of Cutaneous Leishmaniasis in Susceptible Mice. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 5, p. 3039–3046, mar. 2009.

LÓPEZ, L. et al. Thermotherapy. An alternative for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **Trials**, v. 13, n. 58, maio 2012.

LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVÁEZ, F. J. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 1–11, jan-fev. 2014.

LUKENS, J. R.; GROSS, J. M.; KANNEGANTI, T. D. IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 315, out. 2012.

MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647–664, nov/dez. 2004.

MALIK, A.; KANNEGANTI, T. D. Function and regulation of IL-1 $\alpha$  in inflammatory diseases and cancer. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 124–137, jan. 2018.

MANZUR, A.; UL BARI, A. Sensitivity of leishmanin skin test in patients of acute cutaneous leishmaniasis. **Dermatology Online Journal**, v. 12, n. 4, maio 2006.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . **Molecular Cell**, v. 10, n. 2, p. 417–426, ago. 2002.

MARTINS, A. L. G. P. et al. American tegumentary leishmaniasis: Correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 1, p. 52–58, jan/fev 2014.

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 6, p. 247-260, ago. 2016.

MCNAMEE, E. N. et al. Interleukin 37 expression protects mice from colitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 40, p. 16711–16716, out. 2011.

MEDA SPACCAMELA, V. et al. High Levels of IL-18 and IFN- $\gamma$  in Chronically Inflamed Tissue in Chronic Granulomatous Disease. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 2236, out. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNASA-Fundação Nacional de Saúde/Ministério da Saúde. **VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA**. Disponível em: <[http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/zoonoses\\_intoxicacoes/leishmaniose/manu\\_leishman.pdf](http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/zoonoses_intoxicacoes/leishmaniose/manu_leishman.pdf)>. Acesso em: 6 jan. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Disponível em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_epidemiologica\\_7ed.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf)>. Acesso em: 7 jan. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Disponível em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_)>. Acesso em: 7 jan. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS/SINAN. **LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA** - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Brasil. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinanet/cnv/ltabr.def>>. Acesso em: 7 jan. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Tegumentar (LT): o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. Disponível em: <<http://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar>>. Acesso em: 7 jan. 2020.

MONTEFORTE, G. M. et al. Genetically Resistant Mice Lacking IL-18 Gene Develop Th1 Response and Control Cutaneous *Leishmania major* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 11, p. 5890–5893, jun. 2000.

MOREIRA, O. C.; YADON, Z. E.; CUPOLILLO, E. The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: Current status and perspectives. **Acta Tropica**, v. 184, p. 29-37, ago. 2018.

MURBACK, N. D. N. et al. Leishmaniose Tegumentar Americana: Estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 55–63, jan. 2011.

NAKANISHI, K. et al. Interleukin -18 regulates Th1 and Th2 responses. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 423–474, abr. 2001.

NAKANISHI, K. Unique action of Interleukin-18 on T cells and other immune cells. **Frontiers in Immunology**, v. 9, abr. 2018.

NATALE, C. C. **O papel da IL-18 na infecção por *Leishmania amazonensis***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – UFMG. Belo Horizonte, p. 120. 2015.

NEVES, L. O. et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1092–1101, nov. 2011.

NOGUEIRA, R. S. et al. Antigen-triggered interferon- $\gamma$  and interleukin-10 pattern in cured mucosal leishmaniasis patients is shaped during the active phase of disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 177, n. 3, p. 679–686, 2014.

NOLD, M. F. et al. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. **Nature Immunology**, v. 11, n. 11, p. 1014–1022, nov. 2010.

NOVAIS, F. O. et al. CD8<sup>+</sup>T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 $\beta$  production. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 2, p. e1006196, fev. 2017.

NOVAIS, F. O.; SCOTT, P. CD8<sup>+</sup> T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 3, p. 251–9, maio 2015.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 135–46, maio 2010.

OLIVEIRA-NETO, M. P. et al. Intralesional therapy of American cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazil - An area of *Leishmania (V.) braziliensis* transmission. **International Journal of Dermatology**, v. 36, n. 6, p. 463–468, jun. 1997.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C. et al. Clinical and laboratory profiles of patients with early spontaneous healing in cutaneous localized leishmaniasis: A historical cohort study. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, ago. 2017.

OLIVEIRA, D. M. DE et al. Comparison of different primers for PCR-based diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 204–10, maio/jun 2011.

OLLIARO, P. et al. Methodology of Clinical Trials Aimed at Assessing Interventions for Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, mar. 2013.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE/OMS. **Manual of Procedures for Surveillance and Control of Leishmaniasis in the Americas**. Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/resources/978-92-75-32063-1/en/>>. Acesso em: 12 jul. 2020.

PACE, D. Leishmaniasis. **The journal of infection**, v. 69, p. 10–18, nov. 2014.

PARMAR, Naveen et al. *Leishmania donovani* exploits Tollip, a multitasking protein, to impair TLR/IL-1R signaling for its survival in the host. **The Journal of Immunology**, v. 201, n. 3, p. 957-970, 2018.

PASSOS, V. et al. Leishmaniose tegumentar na Região Metropolitana de Belo Horizonte: aspectos clínicos, laboratoriais, terapêuticos e evolutivos (1989-1995). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 1, p. 5-12, jan-fev 2001.

PAULA, M. B. C. et al. Primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) na área urbana de Uberlândia, MG, concomitante com o relato de primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral humana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 304-305, jun. 2008.

PINHEIRO, R. O. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 16, n. 7/8, p. 79-82, 2013.

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 Investigation**, v. 119, n. 8, p. 2379–2387, ago. 2009.

POURMOHAMMADI, B. et al. Comparison of three methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Iranian journal of parasitology**, v. 5, n. 4, p. 1–8, dez. 2010.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, jul/ago 2003.

READY, P. D. Leishmaniasis emergence in Europe. **Eurosurveillance**, v. 15, n. 10, p. 19505, mar. 2010.

REGLI, I. B. et al. Survival mechanisms used by some *Leishmania* species to escape neutrophil killing. **Frontiers in Immunology**, v. 8, nov. 2017.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, set. 2007.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Apoptotic cell clearance of *Leishmania* major-infected neutrophils by dendritic cells inhibits CD8<sup>+</sup> T-cell priming in vitro by Mer tyrosine kinase-dependent signaling. **Cell Death and Disease**, v. 6, n. 12, dez. 2015.

RIBEIRO-ROMÃO, R. P. et al. Development of real-time PCR assays for evaluation of immune response and parasite load in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, jun. 2016.

RIDER, P. et al. IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  Recruit Different Myeloid Cells and Promote Different Stages of Sterile Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 9, p. 4835–4843, nov. 2011.

ROCHA, P. N. et al. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 180, n. 5, p. 1731-1734, 1999.

ROCHA, T. J. M. et al. Aspectos epidemiológicos dos casos humanos confirmados de Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de Alagoas, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 4, p. 49–54, dez. 2015.

ROGERS, M. E. et al. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v. 430, n. 6998, p. 463–467, jul. 2004.

ROGERS, M. E. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 223, jun. 2012.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, v. 124, n. Pt 5, p. 495–507, maio 2002.

ROLFES et al. Platelets fuel the inflammasome activation of innate immune cells. **Cell reports**, v. 31, n. 6, p. 107615, 2020.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, mar. 2018.

ROSTAN, O. et al. The IL-33/ST2 axis is associated with human visceral leishmaniasis and suppresses Th1 responses in the livers of BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. **MBio**, v. 4, n. 5, p. e00383-13, set-out. 2013.

SABERI, S. et al. In vivo/in vitro immune responses to *L. major* isolates from patients with no clinical response to Glucantime. **Advanced biomedical research**, v. 5, jul. 2016.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845-58, nov. 2002.

SÁNCHEZ-ROMERO, C. et al. Immunohistochemical and Molecular Diagnosis of Mucocutaneous and Mucosal Leishmaniasis. **International Journal of Surgical Pathology**, p. 106689691987670, set. 2019.

SANGENITO, L. S. et al. Leishmaniasis and Chagas Disease – Neglected Tropical Diseases: Treatment Updates. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 174–177, abr. 2019.

SANTOS, D. et al. IL-1 $\beta$  Production by Intermediate Monocytes Is Associated with Immunopathology in Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 5, p. 1107–1115, maio 2018.

SANTOS, G. M. DOS. Características epidemiológicas da Leishmaniose Tegumentar Americana em um estado do nordeste brasileiro. **Archives of health investigation**, v. 7, n. 3, abr. 2018.

SANTOS, J. L. C. et al. Leishmaniose Tegumentar Americana entre os indígenas Xakriabá: imagens, ideias, concepções e estratégias de prevenção e controle. **Saúde e Sociedade**, v. 23, n. 3, p. 1033–1048, jul. 2014.

SARKARI, B. et al. Performance of an ELISA and indirect immunofluorescence assay in serological diagnosis of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2014, ago. 2014.

SCHALLIG, H. D. F. H.; OSKAM, L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Tropical Medicine and International Health**, v. 7, n. 8, p. 641-51, ago. 2002.

SCHNORR, D. et al. IFN- $\gamma$  production to *Leishmania* antigen supplements the *Leishmania* skin test in identifying exposure to *L. braziliensis* infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 12, dez. 2012.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, jun. 2017.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581-92, ago. 2016.

SHARMA, S. et al. The IL-1 Family Member 7b Translocates to the Nucleus and Down-Regulates Proinflammatory Cytokines. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 8, p. 5477–5482, abr. 2008.

SILVA, J. C. F. DA. **Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), nos municípios de Crato, Juazeiro do Norte e Barbalha, Estado do Ceará, Brasil, 2003-2005**. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, p. 67. 2008.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n.3, maio 2004.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: Regulators of immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 2, p. 89-102, fev. 2010.

SOUSA, L. M. A. et al. IL-18 contributes to susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection by macrophage-independent mechanisms. **Cytokine**, v. 74, n. 2, p. 327–330, dez. 2015.

SUFFIA, I. et al. A Role for CD103 in the Retention of CD4 + CD25 + T reg and Control of *Leishmania major* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 9, p. 5444–5455, maio 2005.

SUNTER, J., GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, v. 7, n. 9, p. 170165, set. 2017.

SZARGIKI, R. et al. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 47–52, fev. 2009.

UZONNA, J. E.; JOYCE, K. L.; SCOTT, P. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon  $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 11, p. 1559–1566, jun. 2004.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 11, p. 6521–6525, dez. 2004.

VASCONCELOS, J. M. et al. American integumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, p. 221-227, dez. 2018.

VECTORBASE. **Image Gallery**: *Lutzomyia longipalpis*, 2018. Disponível em: <<https://www.vectorbase.org/image-gallery/Lutzomyia%20longipalpis>>. Acesso em: 19 fev. 2020.

VELOZO, D. et al. Leishmaniose mucosa fatal em criança. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 3, p. 255-9, 2006.

VON STEBUT et al. Interleukin 1 $\alpha$  promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 198, n. 2, p. 191-199, 2003.

VORONOV, E. et al. IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. **International Immunology**, v. 22, n. 4, p. 245–257, fev. 2010.

- WANG, L. et al. Interleukin-37: A crucial cytokine with multiple roles in disease and potentially clinical therapy (Review). **Oncology Letters**, v. 15, n. 4, p. 4711-4719, abr. 2018.
- WEI, X. Q. et al. Altered immune responses and susceptibility to *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus* infection in IL-18-deficient mice. **Journal of immunology**, v. 163, n. 5, p. 2821-8, set. 1999.
- WEI, X. Q. et al. Host genetic background determines whether IL-18 deficiency results in increased susceptibility or resistance to murine *Leishmania major* infection. **Immunology Letters**, v. 94, n. 1-2, p. 35-37, jun. 2004.
- WERMAN, A. et al. The precursor form of IL-1 $\alpha$  is an intracrine proinflammatory activator of transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 8, p. 2434-2439, fev. 2004.
- WHYTE, D. C., ZUFFEREY, R. Cutaneous Leishmaniasis: Update on Vaccine Development. **Human Parasitic Diseases**, v. 9, maio 2017.
- XIN, L., LI, Y., SOONG, L. Role of interleukin-1 $\beta$  in activating the CD11c<sup>high</sup> CD45RB<sup>-</sup> dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*-specific CD4<sup>+</sup> T cells in vitro and in vivo. **Infection and immunity**, v. 75, n. 10, p. 5018-5026, out. 2007.
- XU, D.; MU, R.; WEI, X. The Roles of IL-1 Family Cytokines in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, set. 2019.
- YAN, X. et al. Interleukin-37: The effect of anti-inflammatory response in human coronary artery endothelial cells. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, jan. 2019.
- YE, L. et al. IL-37 inhibits the production of inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus: Its correlation with disease activity. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 1, mar. 2014.
- YE, L.; HUANG, Z. IL-37 restrains autoimmune diseases. **Oncotarget**, v. 6, n. 26, p. 21775-6, set. 2015.
- ZAMBRANO-VILLA, S. et al. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 6, p. 272-8, jun. 2002.
- ZHANG, S. R. et al. IL-37 increases in patients after ischemic stroke and protects from inflammatory brain injury, motor impairment and lung infection in mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, maio 2019.

## APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Paciente



Centro de Pesquisas

Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



AGGEU MAGALHÃES

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Paciente

Projeto: “Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa e após cura clínica”.

O objetivo principal desse projeto é a análise de aspectos biológicos que pode ter influência na doença causada por *Leishmania Viannia braziliensis*. A *Leishmania* é um parasita do homem que causa doença (lesões) na pele, conhecida como leishmaniose tegumentar (ferida brava). Além disso, o projeto também pretende identificar alterações biológicas hereditárias (mutações) humanas que contribuem para o agravamento dessa doença.

O senhor e algumas pessoas da sua família estão sendo convidados a participar deste estudo porque moram em uma região onde a leishmaniose é comum. O senhor será acompanhado por visitas em sua casa, com objetivo de identificar se alguém de sua família foi contaminado pelo parasita que causa a leishmaniose. Para isto, as pessoas que moram em sua casa serão consultadas.

Como o senhor faz parte do grupo de pacientes, será solicitada uma coleta de sangue de 40 ml, o que equivale a quatro colheres de sopa. A coleta de 40 mL de sangue ocorrerá em dois momentos, ou seja, antes e depois do tratamento. Serão também realizados exames para confirmar sua doença e que incluirão a intradermoreação de Montenegro e biópsia da borda da ferida. Todas as informações e detalhes dos exames que serão realizados serão previamente esclarecidos para o senhor. Além disso, o senhor também receberá os resultados desses exames. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). A biópsia é a retirada de um pequeno pedaço da lesão, aplicando-se um anestésico; normalmente, não oferece riscos, exceto um pequeno sangramento no local ou um ponto de infecção, que pode ser tratado com limpeza e medicação locais. A biópsia será realizada pela médica participante do projeto no hospital onde ela trabalha. O transporte para realização da retirada da biópsia será feito pela secretaria de saúde de seu município.

O remédio utilizado para o tratamento será o Glucantime® e o senhor tomará injeções no braço ou nas nádegas em doses de 20 mg/Kg/dia em ciclos de vinte a trinta dias, sendo realizado no posto de saúde do município do presente estudo por médicos, enfermeiros ou auxiliares de enfermagem. Esse remédio (Glucantime®) é o mais utilizado, promove cura da doença e pode ter efeitos colaterais como náuseas e indisposição (moleza). Se ocorrer qualquer alteração em seu organismo, o senhor deverá procurar o médico do posto de saúde. O senhor não terá gastos em decorrência dos testes ou tratamento que realizará. Os benefícios em participar deste estudo são que o senhor e os membros de sua família serão estudados para avaliar se apresentam algum sinal de infecção ou se são imunes a desenvolver a leishmaniose. Esse trabalho trará grande benefício no estudo da leishmaniose,

pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. O senhor pode solicitar informações sobre o projeto a qualquer momento caso julgue necessário. O senhor poderá recusar ou retirar seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

A Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O CPqAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, e para isso um pesquisador do projeto entrará em contato com o senhor. O senhor poderá contactar o CEP/CPqAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

Caso sofra qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação, além do direito à assistência integral, o senhor terá direito à indenização. O pesquisador, o patrocinador e a instituição devem assumir a responsabilidade de dar assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos. Caso o senhor tenha alguma despesa por causa da sua participação nesta pesquisa, o senhor terá direito de receber o seu dinheiro de volta.

Este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o senhor venha a ter sobre o significado dos termos empregados nesse texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assine este impresso.

#### DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Eu,....., (identidade:.....), li e concordo em participar como voluntário neste projeto que envolverá o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ).

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Endereço do paciente para contato

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ

\_\_\_\_\_  
data

Endereço profissional do pesquisador responsável (Valéria Rêgo Alves Pereira): Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rêgo, s/nº, Recife, fone: (81) 21012631.

## APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Paciente Menor de 18 anos



Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas



AGGEU MAGALHÃES

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Paciente Menor de 18 anos

Projeto: “Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa e após cura clínica”.

O objetivo principal desse projeto é a análise de aspectos biológicos que pode ter influência na doença causada por *Leishmania Viannia braziliensis*. A *Leishmania* é um parasita do homem que causa doença (lesões) na pele, conhecida como leishmaniose tegumentar (ferida brava). Além disso, o projeto também pretende identificar alterações biológicas hereditárias (mutações) humanas que contribuem para o agravamento dessa doença.

O senhor e seu filho (a) estão sendo convidados a participar deste estudo porque moram em uma região onde a leishmaniose é comum. O senhor será acompanhado por visitas em sua casa, com objetivo de identificar se alguém de sua família foi contaminado pelo parasita que causa a leishmaniose. Para isto, as pessoas que moram em sua casa serão consultadas.

Como responsável pelo menor, o senhor está sendo convidado a participar deste estudo devido ao mesmo se encontrar no grupo de pacientes menores de 18 anos. Será solicitada uma coleta de sangue de 20 ml, o que equivale a duas colheres de sopa. A coleta de 20 mL de sangue ocorrerá em dois momentos, ou seja, antes e depois do tratamento. Serão também realizados exames para confirmar a doença e que incluirão a intradermoreação de Montenegro e biópsia da borda da ferida. Todas as informações e detalhes dos exames que serão realizados serão previamente esclarecidos para o senhor que é responsável pelo menor. Além disso, o senhor também receberá os resultados desses exames. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). A biópsia é a retirada de um pequeno pedaço da lesão, aplicando-se um anestésico; normalmente, não oferece riscos, exceto um pequeno sangramento no local ou um ponto de infecção, que pode ser tratado com limpeza e medicação locais. A biópsia será realizada pela médica participante do projeto no hospital onde ela trabalha. O transporte para realização da retirada da biópsia será feito pela secretaria de saúde de seu município.

O remédio utilizado para o tratamento será o Glucantime® e o paciente menor de idade tomará injeções no braço ou nas nádegas em doses de 20 mg/Kg/dia em ciclos de vinte a trinta dias, sendo realizado no posto de saúde do município do presente estudo por médicos, enfermeiros ou auxiliares de enfermagem. Esse remédio (Glucantime®) é o mais utilizado, promove cura da doença e pode ter efeitos colaterais como náuseas e indisposição (moleza). Se ocorrer qualquer alteração no organismo do menor, o senhor deverá procurar o médico do posto de saúde. O senhor não terá gastos em decorrência dos testes ou tratamento que o menor realizará. Os benefícios em participar deste estudo são que o senhor, o menor por quem o senhor é responsável e os outros membros de sua família serão estudados para avaliar se apresentam algum sinal de infecção ou se são imunes a desenvolver a

leishmaniose. Esse trabalho trará grande benefício no estudo da leishmaniose, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. O senhor pode solicitar informações sobre o projeto a qualquer momento caso julgue necessário. O senhor poderá recusar ou retirar o consentimento do menor, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

A Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O CPqAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, e para isso um pesquisador do projeto entrará em contato com o senhor. O senhor poderá contactar o CEP/CPqAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

Caso o menor sofra qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação, além do direito à assistência integral, o senhor como responsável pelo menor terá direito à indenização. O pesquisador, o patrocinador e a instituição devem assumir a responsabilidade de dar assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos. Caso o senhor tenha alguma despesa por causa da participação do menor pelo qual é responsável nesta pesquisa, o senhor terá direito de receber o seu dinheiro de volta.

Este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o senhor venha a ter como responsável pelo menor sobre o significado dos termos empregados nesse texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assine este impresso.

### DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Eu,....., (identidade:.....), responsável pelo menor....., li e concordo em participar como voluntário neste projeto que envolverá o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ).

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo menor

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Endereço do responsável pelo menor

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ

\_\_\_\_\_  
data

Endereço profissional do pesquisador responsável (Valéria Rêgo Alves Pereira): Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rêgo, s/n°, Recife, fone: (81) 21012631.

## APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle



Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas



AGGEU MAGALHÃES

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle

Projeto: “Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa e após cura clínica”.

O objetivo principal desse projeto é a análise de aspectos biológicos que pode ter influência na doença causada por *Leishmania Viannia braziliensis*. A *Leishmania* é um parasita do homem que causa doença (lesões) na pele, conhecida como leishmaniose tegumentar (ferida brava). Além disso, o projeto também pretende identificar alterações biológicas hereditárias (mutações) humanas que contribuem para o agravamento dessa doença.

O senhor e algumas pessoas da sua família estão sendo convidados a participar deste estudo porque moram em uma região onde a leishmaniose é comum. O senhor será acompanhado por visitas em sua casa, com objetivo de identificar se alguém de sua família foi contaminado pelo parasita que causa a leishmaniose. Para isto, as pessoas que moram em sua casa serão consultadas.

O senhor está sendo convidado a participar deste estudo por se encontrar no grupo controle, ou seja, grupo de indivíduos que não apresentam a doença e que servirão de comparação com os indivíduos doentes. Ao senhor será solicitada uma única coleta de sangue de 40 ml o que equivale a uma colher de sopa. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). Esse trabalho trará grande benefício no estudo da leishmaniose, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. O senhor pode solicitar informações sobre o projeto a qualquer momento caso julgue necessário. O senhor poderá recusar ou retirar o seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

A Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O CPqAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, e para isso um pesquisador do projeto entrará em contato com o senhor. O senhor poderá contactar o CEP/CPqAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

Caso sofra qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação, além do direito à assistência integral, o senhor terá direito à indenização. O pesquisador, o patrocinador e a instituição devem assumir a responsabilidade de dar assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos. Caso o

senhor tenha alguma despesa por causa da sua participação nesta pesquisa, o senhor terá direito de receber o seu dinheiro de volta.

Este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o senhor venha a ter sobre o significado dos termos empregados no presente texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assine este impresso.

### **DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE**

Eu,....., (identidade:.....), li e concordo em participar como voluntário neste projeto que envolverá o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ).

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Endereço do voluntário

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ

\_\_\_\_\_  
data

Endereço profissional do pesquisador responsável (Valéria Rêgo Alves Pereira): Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rêgo, s/nº, Recife, fone: (81) 21012631.

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética



## PARECER DE RELATÓRIO PARCIAL

**Título:** CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA E APÓS CURA CLÍNICA

**Pesquisador responsável:** Valéria Pereira Hernandez

**Instituição de realização do Projeto:** CPqAM

**Instituições Envolvidas:** CPqAM/ FIOCRUZ

**Data de aprovação do projeto no CEP/CPqAM:** 04/04/2013

**Data de apreciação do relatório parcial no CEP/CPqAM:** 30/03/2016

**Registro no CAAE:** 11083812.7.0000.5190

Prezada Dra., Valéria Pereira Hernandez

Após analisar o relatório parcial referente ao projeto em pauta na reunião do CEP/CPqAM que ocorreu dia 14 de Junho de 2016, informamos que o referido relatório foi deferido, pois se encontra em concordância com a Resolução sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, Res. 466 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares. O CEP/CPqAM defere também quanto à solicitação da pesquisadora responsável pelo projeto para prorrogação de prazo de conclusão do estudo, que fica alterada para 03 de julho de 2019

Recife, 26 de julho de 2016.

Janaina Campos de Miranda

Coordenadora CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Av. Moraes Rego, s/n  
50.870-420 Fone: (81) 2101.2639  
(81) 3453.1911 | 2101.2639  
Rio de Janeiro, RJ, Brasil  
E-mail: cepcpqam@fiocruz.br



## ANEXO B – Solicitação de renovação do Comitê de Ética

Fwd: PLATBR - Estado de apreciação de Pesquisa

----- Forwarded message -----

De: **Equipe Plataforma Brasil** <[plataformabrasil@saude.gov.br](mailto:plataformabrasil@saude.gov.br)>

Date: qua, 26 de jun de 2019 às 16:31

Subject: PLATBR - Estado de apreciação de Pesquisa

To: Val?ria Pereira Hernandes <[valeriaph@gmail.com](mailto:valeriaph@gmail.com)>

Caro (a) Pesquisador (a) e Assistente(s),

O projeto CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA E APÓS CURA CLÍNICA foi aceito para análise no CEP. Significa que o CEP concluiu a validação documental de sua última submissão, por favor verifique a situação do projeto de pesquisa e atenda a possíveis pendências documentais, se existirem. Caso contrário aguarde o parecer consubstanciado do CEP, cujo o nome pode ser consultado no campo localização atual do projeto, disponível no item detalhar.

Atenciosamente,

Plataforma Brasil

Siga **Ética em Pesquisa** nas Redes Sociais:

[Instagram](#)

[Facebook](#)

[Twitter](#)

[LinkedIn](#)



INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)



### COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PACIENTES  
PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA E  
APÓS CURA CLÍNICA

**Pesquisador:** Valéria Pereira Hernandes

**Versão:** 6

**CAAE:** 11083812.7.0000.5190

**Instituição Proponente:** FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

#### DADOS DO COMPROVANTE

**Número do Comprovante:**

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Informamos que o projeto CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA E APÓS CURA CLÍNICA que tem como pesquisador responsável Valéria Pereira Hernandes, foi recebido para análise ética no CEP Instituto Aggeu Magalhães (IAM) em 26/06/2019 às 16:31.

**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.670-420

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2101-2639

**Fax:** (81)2101-2639

**E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br

# ANEXO C – ARTIGO 1 – IL-1 FAMILY AND CUTANEOUS LEISHMANIASIS: A POORLY UNDERSTOOD RELATIONSHIP



## Cytokine and Growth Factor Reviews

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cytogfr](http://www.elsevier.com/locate/cytogfr)



### IL-1 family and Cutaneous Leishmaniasis: A poorly understood relationship

Ester Alves da Silva Amorim<sup>a,b,\*</sup>, Áquila Alcântara de França<sup>a,b</sup>, Valéria Rêgo Alves Pereira<sup>b</sup>, Maria Carolina Accioly Brelaz-de-Castro<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Federal University of Pernambuco (UFPE), Academic Center of Vitória (CAV), Rua do Alto do Reservatório s/n, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, PE, 55608-680, Brazil

<sup>b</sup>Oswaldo Cruz Pernambuco Foundation (Fiocruz/PE), Department of Immunology, Av. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
IL-1 family  
Cytokines  
Cutaneous leishmaniasis  
Inflammation  
Immune response

#### ABSTRACT

The cytokines of the interleukin (IL)-1 family act in the initiation of an effective immune response in *Leishmania* infection, represented mainly by the T helper 1 (Th1) profile, in addition to being associated with disease exacerbation and controversial contributions in the Th2 responses. The family also includes members who self-regulate inflammation, such as antagonists and anti-inflammatory cytokines, most of which have not yet been studied in Cutaneous Leishmaniasis (CL) in humans. Here we summarize findings about what is known so far about the role of these cytokines in mice, the main study model, and in humans. We reinforce the importance of studies of these cytokines as new targets in the context of CL.

#### 1. Introduction

Leishmaniasis is a tropical infectious disease that affects mainly low-income people. It does not receive necessary investments or attention in research and development of drugs, so it is considered neglected. This disease can occur in humans in three general clinical forms: visceral (VL), cutaneous (CL) and mucocutaneous (MCL), depending on the species of infectious *Leishmania*, with CL being the most prevalent clinical form worldwide [1]. With a distribution in 102 countries, the cases are mainly concentrated in poor countries in Southeast Asia, East Africa and Latin America, with around 350 million people at risk [2–4]. The drugs available for the treatment of the disease have several limitations, such as high cost and several side effects [5,6].

CL usually affects the skin and, in some cases, mucosal regions. An important association has been demonstrated between the immune response developed by the patient and the course of the infection. The progression and development of the disease occur due to the intense inflammatory condition that is generated in response to *Leishmania* infection in an attempt to eliminate the parasitic burden [7]. However, an exacerbated profile of proinflammatory response is not effective in eliminating parasites and can still leave consequences for the patient, which are the lesions and characteristic ulcers of the disease [7–9]. In this context, some studies highlight the cytokines of the interleukin (IL)-1 family because they act to propagate inflammation and are

considered “triggers” for the expression of other proinflammatory cytokines. Their study can contribute strongly to a better understanding of the progress of the pathogenesis of *Leishmania* infection [10–12].

The IL-1 family includes 11 cytokines that participate in the immune responses against infections caused by pathogens, mediating the inflammatory response [13,14]. A certain heterogeneity in the roles of IL-1 family cytokines can be observed, including pro and anti-inflammatory agonists, as well as natural receptor antagonists that negatively regulate the inflammatory response [15,16]. Despite this, some stand out, such as IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , which are the main agonists studied in several autoimmune and inflammatory contexts, including in CL [14]. In the literature, it is possible to observe some controversies regarding the role of some IL-1 cytokines in CL, represented by the dichotomy resistance and susceptibility to *Leishmania*. These divergences seem to be influenced, mainly, by the *Leishmania* species and the host's genetic background, as observed in studies with genetically modified mice. Few studies are observed in humans, and the extent to which these results can be extrapolated is something to be understood.

#### 2. Immune response in CL

The defense mechanism against *Leishmania* in humans involves several components of the innate and adaptive immune response, but these protozoa have developed strategies for escaping and modulating

\* Corresponding author at: Federal University of Pernambuco (UFPE), Academic Center of Vitória (CAV), Rua do Alto do Reservatório s/n, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, PE, 55608-680, Brazil.

E-mail addresses: [esterlves1997@hotmail.com](mailto:esterlves1997@hotmail.com) (E.A.d.S. Amorim), [aquilaalcf@gmail.com](mailto:aquilaalcf@gmail.com) (Á.A. de França), [valeriaph@gmail.com](mailto:valeriaph@gmail.com) (V.R.A. Pereira), [carolina.brelaz@gmail.com](mailto:carolina.brelaz@gmail.com) (M.C.A. Brelaz-de-Castro).

<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.06.007>

Received 19 May 2020; Accepted 4 June 2020

## 2. Immune response in CL

The defense mechanism against *Leishmania* in humans involves several components of the innate and adaptive immune response, but these processes have developed strategies for escaping and modulating the immune response that guarantee their survival [17,18]. Much of what is known about resistance and susceptibility responses to *Leishmania* and disease severity comes from studies with different genetically modified murine models. They exhibit variations in disease severity and response to the pathogen, and there is a consensus regarding the characteristics of the developed immunological response in the CL observed among such models but not with humans. This response is discussed below, but despite this, it is important to be aware that the wide spectrum of clinical manifestations of CL in humans cannot be fully reproduced in the experimental model.

The efficiency of the innate immune response strategies performed by neutrophils depends on the species of infective *Leishmania*. Some studies show that leishmaniasis can survive inside neutrophils by inhibiting the formation of phagolysosome. For example, *L. major* and *L. braziliensis* may be resistant to the actions of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) through digestion with endonucleases derived from both parasites and sandflies [19,20].

The development of subpopulations of T CD4+ lymphocytes can be directed in four main profiles: Th1, Th2, Th17 and Treg [14]. They all lead to different responses such as resistance and susceptibility to *Leishmaniasis* and play important roles in the outcome of the disease [19]. The effective response against *Leishmania* is related to the development of the auxiliary profile 1 (Th1) and production of proinflammatory cytokines such as IL-12, IL-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-2 [14,21]. The susceptibility to infection is related to the development of a profile of helper T cells 2 (Th2) and production of cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-13, resulting in the replication and persistence of the parasite [22].

In the resistance response, the Th1 lymphocytes induce the production of nitric oxide in macrophages that leads to the destruction of the parasite, in addition to host resistance [23]. The secretion of IL-12 by antigen presenting cells (APCs), macrophages and dendritic cells (DCs), promotes the differentiation of naive T cells into IFN- $\gamma$ -secreting Th1 lymphocytes, through a major transcription factor which is the T-bet [22,24].

The Th1 profile in fact controls the multiplication and dissemination of the parasite in CL and MCL, but does not eradicate *Leishmania* infection and, when exacerbated, generates tissue damage. It is known that the excessive production of the Th1 response and proinflammatory cytokines are associated with severe immunopathology of the disease (Fig. 3). This is because, despite being factors necessary to kill *Leishmania*, IFN- $\gamma$ , TNF and nitric oxide (NO) are also implicated in inflammation, leading to tissue damage [25]. In addition, asymptomatic individuals do not exhibit a stronger Th1 response than those with active disease, expressing low levels of IFN- $\gamma$  and TNF and adequate levels of IL-10 [14,26,27].

Th17 cells also appear to contribute to the progression of CL in humans and mice. Boaventura et al. in 2010 [28] observed that IL-17+ cells are present in human mucosa lesions caused by *L. braziliensis*, mediating the infiltration of neutrophils. Bacellar et al. [29] also reported an increase in IL-17 expression in supernatants from peripheral blood mononuclear cell cultures after stimulation with *Leishmania* antigen, indicating that, despite having some role in defending against the pathogen [30], this cytokine contributes to the severity of the disease. In susceptible mice infected with *L. major*, IL-17 mediates the attraction of neutrophils and the release of proteinases that induce tissue damage and thus contributes to the progression of leishmaniasis [31].

On the other hand, Th2 lymphocytes, which are involved in inducing the humoral response and eosinophilia, assume a role of susceptibility in CL by inducing the production of cytokines such as IL-4, IL-5, IL-6 and IL-13, leading to replication and persistence of the parasite [32]. In this profile, the inability of antigens to activate DCs to produce IL-12 results in a pathway of differentiation of naive T lymphocytes into IL-4 secreting Th2, which activates STAT6 and consequently the transcription factor GATA3 [22]. Despite this, the production of anti-inflammatory cytokines, coming from the Th2 profile, at lower levels can contribute to the attenuation of inflammatory reactions and the repair of injuries [14,26].

## 3. IL-1 family

Members of the IL-1 family are known to be important proinflammatory cytokines and to be involved in disorders associated with inflammation. The family includes 11 cytokines, seven of which have

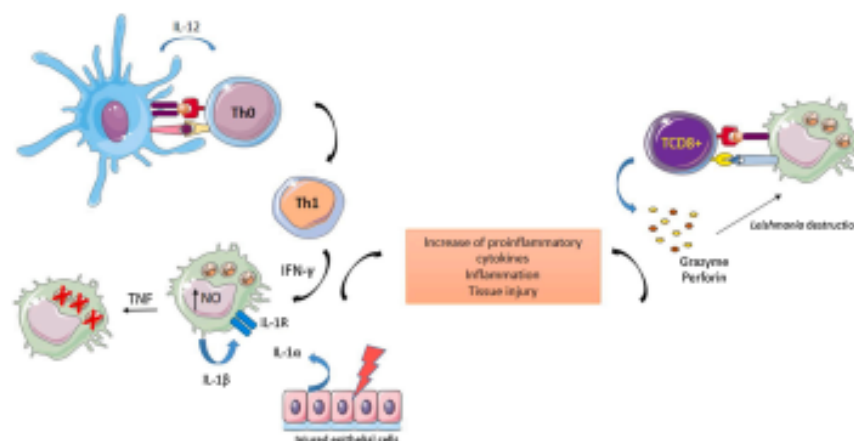


Fig. 3. Cellular immune response in CL. The death of the parasite during infection is an event that involves the action of immune cells and some major cytokines that are crucial in activating response profiles associated with resistance. Despite this, the same response responsible for the clearance of parasites is implicated in the establishment of a toxic microenvironment that leads to cell death. Components of this figure were created using modified templates from Servier Medical Art, which are licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License; <https://smart.servier.com>.

proinflammatory and agonist activity (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33, IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  and IL-36 $\gamma$ ), three act as receptor antagonists (IL-1Ra, IL-36Ra, IL-38) and one is considered anti-inflammatory (IL-37), and therefore, four down-regulate the inflammatory response (Fig. 2). In turn, the family of IL-1 receptors (IL-1R) consists of 10 members, including receptors and co-receptors, which are IL-1R1, IL-1R2, accessory proteins IL-1RAcP and IL-18R $\beta$ , IL-18Ra, ST2 (or IL-33R), IL-36R, SIGIRR or TIR8, TIGIRR-2 or IL-1RAPL1 and TIGIRR-1 or IL-1RAPL2 [15,16].

All of these cytokines have their genes located on chromosome 2, with the exception of IL-18 and IL-33, which are encoded on chromosomes 11 and 9 [33]. They are also considered “alarm cytokines” due to the role of initiating and spreading a network of proinflammatory mediators and inducing the expression of adhesion molecules in endothelial cells and leukocytes [12,34]. Among the cells that produce the IL-1 cytokines are neutrophils, monocytes, DCs, basophils, mast cells and macrophages, the latter being the main source from the immune system. The whole family is also secreted by epithelial cells [35,36].

Some cytokines from the IL-1 family, such as IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , participate in the generation of IFN- $\gamma$ -secreting T lymphocytes, thus polarizing a Th1 proinflammatory response that involves the production of TNF and NO and activation of macrophages [37,38], in addition to contributing to the activation of Th17 cells, a profile known to mediate the progression of leishmaniasis [29,39]. On the other hand, IL-33 has been associated with a type 2 [40] and a regulatory immune response [41], in addition to attenuating the development of type 1 immunity [42].

Another inflammatory cytokine is IL-18. The binding of IL-18 and IL-18R $\beta$  to form the IL-18R complex leads to inflammatory signaling and Th1 responses. However, IL-18R can also bind to a co-receptor called TIR8 and allow signaling of IL-37, the only anti-inflammatory agonist in the family, thus leading to inhibition of inflammation [43]. Interestingly, the release of the mature forms of IL-1 $\beta$ , IL-18 and the IL-37b isoform requires processing by caspase-1 as a result of the activation

of inflammasome complexes [43,44].

Another internal regulation of the IL-1 family on inflammation involves the action of IL-38, an antagonist that competes for binding to the IL-36R receptor with the other cytokines of the IL-36 subfamily (IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  and IL-36 $\gamma$ ), whose signaling involves the activation of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways [45,46]. Thus, IL-38 has an anti-inflammatory function that still needs to be better understood, especially in humans and in leishmaniasis as a whole, since there are no studies that have evaluated it in this pathological context [47].

The IL-1 family cytokine signaling is intrinsically related to receptors that contain three extracellular immunoglobulin domains (with the exception of TIR8 or SIGIRR, which contains one) and a Toll / interleukin-1 receptor / TIR in the cytoplasmic portion (Fig. 2), which has a similarity shared with Toll-like receptors (TLR), mainly TLR4. This TIR domain participates in the signal transduction triggered by the ligand, signaling events such as pathogen detection, tissue damage and inflammation, allowing the recruitment of some molecules that intermediate the signaling pathway such as MyD88 and IRAK4 [16,36,43].

Most of the cytokines of the IL-1 family are produced in biologically inactive forms as precursors, which after a stimulus are cleaved in the mature form and capable of activating the receptor. Interestingly, some cytokines like IL-1 $\alpha$  and IL-33 have their active precursor forms [43,48]. In addition to the natural antagonists of the family, another way of inhibiting the inflammatory response directed by IL-1 is the expression of decoy receptors such as IL-1R2, which are able to recognize and bind to the cytokine, but fail to form the receptor signaling complex and generate the response. IL-1R2 lacks the cytoplasmic TIR domain and captures the cytokine IL-1 $\beta$  more efficiently than IL-1 $\alpha$  and IL-1Ra. Thus, the cytokine is not available to bind to its active receptor, neutralizing the action of IL-1 $\beta$  [43,49].

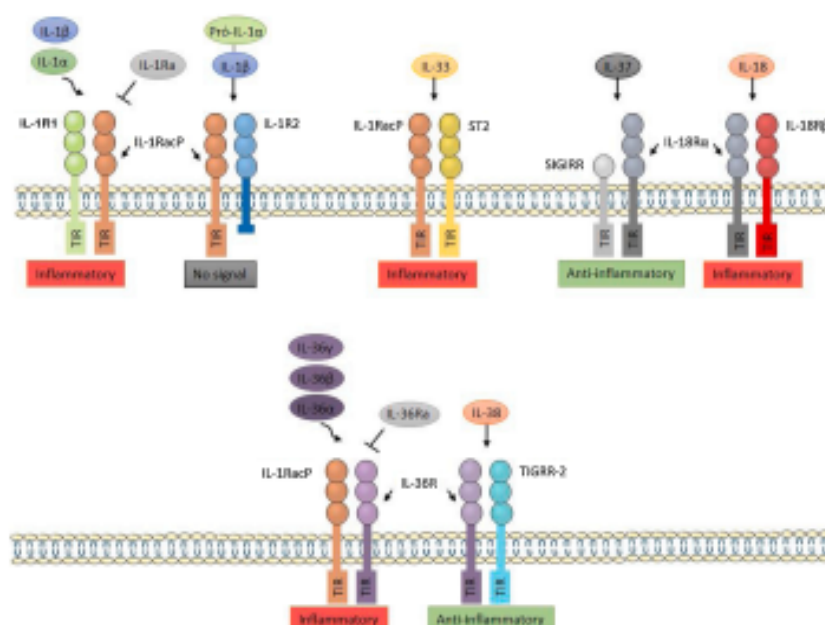


Fig. 2. Family of cytokines IL-1 and its main receptors and co-receptors. Components of this figure were created using modified templates from Servier Medical Art, which are licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License: <https://smart.servier.com>.

#### 4. Role of IL-1 in cutaneous leishmaniasis

Currently, few studies associate the role of this family in the context of leishmaniasis in patients, but there are many indications that it contributes to the pathogenesis in humans [11,38,50]. They participate directly in the activation of the immune response against pathogens; so, the performance of these cytokines becomes crucial for an effector and resistance mechanism against *Leishmania*. The balance of this response is also necessary for the tissue healing process to occur and result in the clinical cure of cutaneous leishmaniasis. In addition, understanding the role of anti-inflammatory IL-1 cytokines, which modulate the response of agonists themselves, can contribute to therapeutic strategies. To better understand what we have so far and considering the different study models, we have grouped the main information in the table below (Table 1). The table emphasizes and how much this family still needs to be studied in CL.

##### 4.1. Mice as the main study model in cutaneous *Leishmania* infections

The role of IL-1 cytokines in susceptibility and resistance to *Leishmania* is still a subject of controversy, even in studies with murine models. Due to its contribution in the activation and differentiation of T CD4+ lymphocytes and the development of the Th1 response, some studies have highlighted IL-1 $\alpha$  as a participant in the induction of the resistance response to *L. major* observed in resistant C57BL/6 mice. On the other hand, lower levels of expression of this cytokine are observed by DCs of susceptible BALB/c mice, known to succumb to leishmaniasis due developing strong Th2 responses [37,51,52]. In this sense, another study showed that infection by *L. major* in macrophages of BALB/c mice induces the gene expression of IL-1 $\alpha$  through a MyD88-dependent

Table 1  
Summary of the main functions of ligands of the IL-1 family in CL.

| Cytokine                                      | Receptors and co-receptor | Role in CL                                                                                                                                                                         | Cell or model type               | References |
|-----------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------|
| IL-1 $\alpha$                                 | IL-1RI, IL-1RII, IL-1RAcP | Participates in the differentiation of Th1 lymphocytes into type 1; excess and long-term levels can exacerbate the disease                                                         | BALB/c mice                      | [12,47]    |
| IL-1 $\beta$                                  | IL-1RI, IL-1RII, IL-1RAcP | May be associated with disease progression                                                                                                                                         | RAG mice, human, mice, and PBMCs | [11,75]    |
| IL-1Ra                                        | IL-1RI                    | Important mitigation of lesion development. It seems to depend on the species of <i>Leishmania</i> and the genetic profile of the host, despite contributing to the susceptibility | BALB/c and RAG mice              | [11,12,54] |
| IL-18                                         | IL-18RI, IL-18RII         | It seems to depend on the species of <i>Leishmania</i> and the genetic profile of the host, despite contributing to the susceptibility                                             | C57BL/6 and BALB/c mice          | [61,65,66] |
| IL-33                                         | ST2, IL-1RAcP             | Associated with Th2 responses, although it is not crucial for its development. Negatively regulates Th1 response and IFN- $\gamma$ production                                      | BALB/c mice                      | [65,67]    |
| IL-36 $\alpha$ , $\beta$ , and IL-36 $\gamma$ | IL-36R, IL-1RAcP          | n/a                                                                                                                                                                                | n/a                              | -          |
| IL-37                                         | IL-18RI, TRIL (SIGIRR)    | n/a                                                                                                                                                                                | n/a                              | -          |
| IL-38                                         | IL-36R, TIGRR-2           | n/a                                                                                                                                                                                | n/a                              | -          |

PBMC-peripheral blood mononuclear cells, n/a – not analyzed.

signaling pathway, although no protein secretion has been detected, indicating post-transcriptional regulatory mechanisms to inhibit cytokine production [53].

Even so, the performance of IL-1 also appears to be associated with dysregulation of the immune response [29]. Within this context, one study showed that IL-1 $\alpha$ -deficient BALB/c mice had a less severe disease, with the development of a significantly reduced number of nodules [12], while another described the detrimental effect of long-term exposure of IL-1 $\alpha$  for disease progression by inducing a Th2 response profile in the later stage of infection [37].

The knockout of IL-1Ra in BALB/c mice also leads to an exacerbated activation of IL-1 $\alpha$ / $\beta$ , making them develop pathological conditions such as autoimmunity and arthritis, the latter also due to excessive induction of IL-17, in addition to impaired production of IL-12 and IFN- $\gamma$  [54]. Despite this, the knockout of this antagonist was also described causing a decrease in the parasitic burden in susceptible mice, and its use in the attenuation of IL-1 resulted in a lower progression of leishmaniasis [12].

IL-1 $\beta$  is secreted by hematopoietic cells, mainly macrophages and monocytes, and has a more systemic circulation, in contrast to IL-1 $\alpha$  which has a more localized action [16,36]. Although IL-1 $\beta$  induces the differentiation of effector T CD4+ lymphocytes, which at the beginning of the infection protect against *Leishmania*, the continuation of its high production during the chronic phase of the infection also leads to the progression of the disease [36]. In addition, even though IL-1 $\beta$  signaling via MyD88 is important in the recognition and response to *Leishmania* infection in mice because it induces NO production by macrophages, its role does not seem to be crucial in the resistance observed in C57BL/6 mice, but in BALB/c [54,55]. This may be because the already differentiated Th1 cells do not express receptors for IL-1, and therefore the cytokine has no effect on them [56]. In both VL and CL, for example, during infections by *L. donovani* and *L. guyanensis*, the activation of the inflammasome complex is impaired, and consequently the processing of IL-1. This interference has consequences in the clearance of parasites [57,58].

As with IL-1 $\beta$ , the cytokine IL-18 is initially produced as a precursor that is cleaved by caspase-1. A peculiar characteristic of IL-18 is that this cytokine can be of the Th1 or Th2 type, depending on the presence of other cytokines in the microenvironment [49,59]. Controversial results regarding its contribution to CL are observed depending on the *Leishmania* species and the host's genetic background. The deletion of IL-18 in resistant C57BL/6 mice infected with *L. major* resulted in increased lesions, but there was no change in the levels of IFN- $\gamma$  and in the ability to generate the Th1 response, thus the mice were still capable of resolving the disease [60]. However, another study showed that this same knockout mouse model infected with *L. amazonensis* developed smaller lesions and parasitic load, indicating that IL-18 would be involved in susceptibility to infection by this pathogen [61]. Anyway, the absence of IL-18 in mice seems to be associated with the induction of the Th2 phenotype and a decrease in the Th1 cell response, having a role in the imbalance of Th1/Th2 responses whose exacerbated alteration is ahead of the intense tissue inflammation/injury or *Leishmania* persistence, respectively [62,63].

The polarization of the Th2 response, which is also associated with the diffuse and visceral forms of leishmaniasis [64], may also be influenced by IL-33, a cytokine of the IL-1 family that contributes to susceptibility in VL, negatively modulating the Th1 response and the recruitment of immune cells in the liver [42,65]. In CL, there are some studies that focus on evaluating the expression of its receptor (ST2) in mouse Th2 cells, initially identified as an orphan receptor and whose signaling was associated with the IL-33 ligand only in 2005 [66–68]. Although the performance of IL-33 does not seem to be crucial in the differentiation of Th2 cells and the production of cytokines in this profile, the suppression of its signaling with monoclonal anti-ST2 antibodies in BALB/c mice, during infection with *L. major*, lead to a stronger Th1 response, thus it seems to play a role in susceptibility to the parasite

[65].

#### 4.2. What is known in humans and what are the gaps to fill?

There are few studies that correlate the IL-1 family and CL in humans, and the use of mice as the main study model can raise problems of extrapolating results due to some variables of the infection model itself [22]. This leads to several gaps regarding the molecular immune response developed during human infection by *Leishmania* parasites. In order to build a panoramic view on this subject, in this topic we have gathered the findings available in the literature and then indicate the spaces to be filled.

Only three IL-1 cytokines have been studied so far in humans, including the main inflammatory IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and the dual IL-18. A survey of patients infected with *L. mexicana* with localized lesions allowed the visualization of IL-1 $\alpha$ , with a significant increase in lesions older than 4 months when compared to those of 2 months in duration. The authors justify the increase and the correlation with other cytokines when considering the elevation of infiltrated T lymphocytes in the lesion [60]. In fact, an increase in cytokines may be linked to the duration of the lesion [70], however, more studies need to be done seeking to better elucidate the relationship of disease duration, number of T cells and the expression of this cytokine. No other studies were found that brought IL-1 $\alpha$  in the context of the disease, which draws attention due to the fact that this cytokine is constitutively present in epithelial cells, so it is important to understand its contribution to pathogenesis in the context of this cutaneous disease.

IL-1 $\beta$ , unlike IL-1 $\alpha$ , is best described. In the infection by *L. mexicana*, researchers demonstrated a possible association of a polymorphism located in the promoter region of the IL-1 $\beta$  gene and the worsening of CL related to the induction of the cytokine expression due to the mutation [50]. Therefore, the increase in IL-1 $\beta$  production favors the establishment of inflammation and can induce the spread of the parasite, which, as is well known, uses immune cells as hosts. The same authors reported levels of IL-1 $\beta$  directly proportional to the parasitic burden, in addition to a much greater distribution of this cytokine in lesions cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) [50].

With regard to the distribution of IL-1 $\beta$ , high levels in patients with DCL and in a few with the localized form allowed this cytokine to be correlated with the severity of the disease and inflammation [50]. Caceres-Dittmar et al. (1993) [71] showed that the mRNA responsible for the production of this cytokine was less expressed in DCL, a form of leishmaniasis characterized by an important Th2 deviation from the immune response and failures in the activation of Th1 lymphocytes [72]. In *L. tropica* infection, IL-1 $\beta$  was found at high levels in almost all biopsies analyzed [73]. In the case of *L. major* infection, a study showed that, although the stimulus significantly induced the expression of IL-1 $\beta$ , there was no significant difference in the levels observed between healed patients, asymptomatic individuals and controls [74].

During the infection by *L. braziliensis*, IL-1 $\beta$  also showed correlations with the appearance of ulcers, the duration of lesions and areas of necrosis [75,76]. Infection with *L. braziliensis* is known for the development of a more severe form of CL and MCL, characterized by strong Th1 deviations and exacerbated inflammation, showing that this parasite has a strong immunogenicity. When infected macrophages were investigated with and without IL-1 $\beta$  blocked by neutralizing antigens, it was seen that it had no role in the elimination of parasites. Thus, in patients who are not at risk of increased parasitic load, blocking this cytokine becomes an efficient alternative to fight the disease [75]. Although it is not clear how this cytokine directs the progression of CL, together these findings show that *L. braziliensis* seems to cause a modulation that guides patients to a more inflammatory response.

The current treatment for cases of CL is based on the use of pentavalent antimonial, that have a high degree of toxicity. The action of these drugs includes mainly the induction of leishmanicidal activity of macrophages [77] and immunomodulation based on CD4 + and

CD8 + T cells, but the detailed mechanism is still not well understood [78]. Considering this, two studies showed the effect of the pentavalent antimonials on plasma levels of IL-1 $\beta$ . The first, carried out by Kocyigit et al. [79], observed a three-fold increase in IL-1 $\beta$  levels in patients after 21 days of treatment with Glucantime® compared to the before treatment group. The second study [70] showed high levels of IL-1 $\beta$  in infected patients during use antimonial (Pentostam®) compared to healthy individuals, that significantly decreased after treatment and clinical cure. Due to methodological divergences, further studies are needed correlating the treatment based on pentavalent antimonials and the levels of cytokines participating in the course of *Leishmania* infection through different routes of administration.

Divergent results are also presented regarding IL-18 during *Leishmania* infection. In 2013, Shahi et al. [80] found higher levels of IL-18 production in supernatants from PBMC culture stimulated with *L. major* antigens from patients with chronic CL lesions compared to cured individuals. This indicated a much more susceptible and aggravating role of this cytokine in the pathology than disease resistance. IL-18 was also significantly increased in lesions of patients with *L. tropica* in the acute and chronic conditions of CL, compared to the production of that same cytokine in healthy skin cells of the same individuals [81].

On the other hand, a study made a survey of all transcripts produced by human macrophages derived from the U937 cell line after infection of *L. braziliensis* for 72h, and within the group of negatively regulated genes was IL-18. This may indicate the modulation that *Leishmania* exerts on the host's defense machinery in an attempt to stabilize the infection, as this investigation time may simulate a later stage of infection by the parasite [82]. Stimulation of PBMC cells from healthy individuals with *L. major* does not seem to be able to induce IL-18, but rather IL-1 $\beta$ , both cytokines matured by the inflammasome [74]. This reinforces the idea of IL-18's flexible role, regulated by the microenvironment and the presence of other cytokines such as IL-12 [83], emphasizing the need to further study its and synergism with other cytokines.

In addition to the IL-1 type 1 receptor antagonist, other cytokines in the family have a suppressive effect on inflammation induced by the inflammatory agonists themselves, such as IL-37, IL-38 and IL-36Ra, and can become potential therapeutic targets. Although IL-36 has been associated with chronic inflammatory diseases [84] and responses mediated by Th17 cells [45], known to contribute to tissue damage and progression of leishmaniasis in mouse strains susceptible to *L. major* [26] and patients with American cutaneous leishmaniasis [27], we do not know what their role is in leishmaniasis.

#### 5. Conclusion

Although quite heterogeneous, we observed that the IL-1 cytokine family plays a central role in the recognition of pathogens and in directing an immune response from different profiles, whether Th1, Th2 or Th17, all of which are important in the context of CL. Some paradoxes in animal studies involve the action of the main inflammatory cytokines IL-1 $\alpha$ / $\beta$ , as there seems to be a fine line between their importance in resistance, as an effector mechanism against *Leishmania* and their contribution to the exacerbation of the inflammation responsible for the pathology. However, there seems to be a consensus that in the later stages of infection, such cytokines play a role in susceptibility and aggravates the progression of CL.

In humans, how these cytokines behave during *Leishmania* infection is poorly understood, especially how antimonial treatment modulates such molecules and the involved mechanism of the inflammatory response exacerbation. Currently there is strong evidence that such cytokines contribute to tissue degradation. The clarification of the role of the IL-1 family further contributes to elucidating the adaptive success of this parasite, which exerts a strong modulation on the host's immune response. Thus, we reinforce how crucial it is to understand its dynamics in CL for the discovery of new therapeutic targets.

## Funding

AMORIM, E. A. S. is the recipient of a MSc fellowship from FACEPE. FRANCA, A. A. is the recipient of a BSc fellowship from PIBIC/UFPE. This work was supported by FACEPE (APQ 0820-2.11.2017).

## Declarations of Competing Interest

None.

## References

- [1] H.J.C. de Vries, S.H. Reedijk, H.D.F.R. Schallig, Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management, *Am. J. Clin. Dermatol.* 16 (2015) 99–106, <https://doi.org/10.1007/s40257-015-0114-4>.
- [2] J. Alhar, L.D. Vitor, C. Bern, M. Herrera, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. de Boer, Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence, *PLoS One* 7 (2012) 1–6, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055671>.
- [3] Pan American Health Organization, *Manual of Procedures for Surveillance and Control of Leishmaniasis in the Americas*, PAHO/WHO, 2019.
- [4] D. Paes, Leishmaniasis, *J. Infect.* 69 (2014) 510–518, <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>.
- [5] R.P. Ribeiro-Rodrigues, A.P. Sampaio, A.M. De-Cruz, E.F. Pina, G.C. Moreira, Development of real-time PCR assays for evaluation of immune response and parasite load in golden hamster (*Hamsters auratus*) infected by *Leishmania (Vivax)* *brasilensis*, *Parasit. Vectors* 9 (2016), <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1647-6>.
- [6] L.S. Sampaio, V. da Silva Santos, C.M. d'Avila-Lery, M.H. Brancalini, A.L. Souza dos Santos, S.S.C. de Oliveira, Leishmaniasis and chagas disease – neglected tropical diseases treatment updates, *Curr. Top. Med. Chem.* 19 (2019) 174–177, <https://doi.org/10.2174/15680266190300055136>.
- [7] A. Gladis, C. Vendrame, C. Boerger, L.P. Carvalho, T. Delavachia, E.M. Carvalho, O. Bacellar, Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania brasiliensis* infection, *IMC Infect. Dis.* 12 (2012) 75, <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-75>.
- [8] L.P. Carvalho, S. Passos, A. Schriefer, E.M. Carvalho, Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis, *Front. Immunol.* 3 (2012) 301, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00301>.
- [9] T.M. Campos, R. Costa, S. Passos, L.P. Carvalho, Cytotoxic activity in cutaneous leishmaniasis, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112 (2017) 733–746, <https://doi.org/10.1590/0074-02760170100>.
- [10] J.R. Lukens, J.M. Gross, T.D. Kanegrand, IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease, *Front. Immunol.* 3 (2012) 315, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00315>.
- [11] F.D. Novais, A.M. Carvalho, M.L. Clark, L.P. Carvalho, D.P. Leitão, L.E. Brodsky, E. M. Carvalho, P. Scott, CD8+ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammatory activation and IL-1 $\beta$  production, *PLoS Pathog.* 13 (2017) e1006196, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006196>.
- [12] E. Voronov, S. Dotan, L. Gavrilovskiy, R.M. White, I. Cohen, Y. Kretz, F. Bencherit, M. Elkabets, M. Hozar, J. El-Or, R.N. Apte, IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice, *Int. Immunol.* 22 (2010) 245–257, <https://doi.org/10.1093/intimm/dq906>.
- [13] M. Charney, R.P. Harrell, A. Romano, S.H. Lee, F. Ribeiro-Gomes, N. Ribeiro, K. Mayer-Barber, F. Tacchini-Gentile, D.L. Sacks, The Nlrp3 inflammasome, IL-1 $\beta$ , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice, *Eur. J. Immunol.* 46 (2016) 897–911, <https://doi.org/10.1002/eji.201546015>.
- [14] N. Masip, A. Abdell, F. Ghaffar, Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review, *Pathog. Glob. Health* 110 (2016) 247–260, <https://doi.org/10.1080/20477724.2016.1122042>.
- [15] L.A. Rothwell, The IL-1 cytokine family and its role in inflammation and fibrosis in the lung, *Semin. Immunopathol.* 38 (2016) 517–534, <https://doi.org/10.1007/s12026-016-0559-2>.
- [16] C. Garbada, C.A. Dinarello, A. Mantovani, The interleukin-1 family: back to the future, *Immunol.* 39 (2013) 1003–1018, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.010>.
- [17] P.R.L. Machado, L. Carvalho, M.L.A.S. Araújo, E.M. Carvalho, Immune response mechanisms to infection, *An. Rev. Derm. Siliog.* 79 (2004) 647–664, <https://doi.org/10.1590/S0034-5596.200400000000022>.
- [18] M. Rossi, M. Faust, How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solution!, *Int. Immunol.* 30 (2018) 103–111, <https://doi.org/10.1093/intimm/dix075>.
- [19] F. Rahmani, A.M. Harandi, S. Rafati, Biomarkers of cutaneous leishmaniasis, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8 (2018) 222, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00222>.
- [20] L.B. Ray, K. Fawcett, R.P. Harrell, F. Tacchini-Gentile, Survival mechanisms used by some *Leishmania* species to escape neutrophil killing, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1558, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01558>.
- [21] R.M. Soares, E.M. Carvalho, M.E. Wilson, Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis, *Int. J. Med. Sci.* 18 (2017), <https://doi.org/10.3390/ijms18061296>.
- [22] D. Sacks, N. Nobro-Traub, The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice, *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 845–858, <https://doi.org/10.1038/15905>.
- [23] G. Gupta, S. Oghara, A.R. Sankar, Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis, *Adv. Appl. Microbiol.*, Academic Press Inc, 2013, pp. 155–184, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00005-3>.
- [24] J. Alexander, F. Brombacher, T. helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? *Front. Immunol.* 3 (2012) 80, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00080>.
- [25] O. Bacellar, H. Lessa, A. Schriefer, P. Machado, A.R. De Jesus, W.D. Dutra, E. J. Gollob, E.M. Carvalho, Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients, *Infect. Immun.* 70 (2002) 6734–6740, <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.6734-6740.2002>.
- [26] J.E. Allen, T.A. Wyne, Evolution of Th2 immunity: a rapid repair response to tissue destructive pathogens, *PLoS Pathog.* 7 (2011) e1002003, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002003>.
- [27] R.C. Bittar, R.S. Nogueira, R. Viçosa-Gonçalves, V. Pinho-Ribeiro, M.S. Martins, M. P. Oliveira-Nieto, S.G. Coutinho, A.M. De-Cruz, T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Vivax)* *brasilensis*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102 (2007) 625–630, <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007000500060>.
- [28] V.S. Braverman, C.S. Sampaio, C.R. Cardoso, J. De Andrade, W.L.C. Dos Santos, J. Claret, J.S. Silva, V.M. Borges, M. Baral-Nieto, C.J. Brodsky, A. Baral, Human mucosal leishmaniasis: neutrophil infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines, *Eur. J. Immunol.* 40 (2010) 2800–2806, <https://doi.org/10.1002/eji.200940115>.
- [29] O. Bacellar, D. Faria, M. Nascimento, T.M. Cardoso, E.J. Gollob, W.D. Dutra, P. Scott, E.M. Carvalho, Interleukin 17 production among patients with american cutaneous leishmaniasis, *J. Infect. Dis.* 200 (2009) 75–78, <https://doi.org/10.1093/infdis/jin380>.
- [30] A.F. Almeida, Avaliação da produção de citocinas Th17, Th1 e Th2 por linfócitos T em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (Master's thesis), Retrieved from, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Brazil, 2013, <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/4448>.
- [31] S. Lopez Kettka, S. Dinges, K. Griesewank, Y. Isenhardt, M.C. Udey, E. von Stebut, IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice, *J. Immunol.* 182 (2009) 3039–3046, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0713598>.
- [32] R.D. Pinheiro, Leishmaniose tegumentar americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia, *Infarma-Coleção Farmacoterapia* 16 (2004) 79–82 (Accessed 23 April 2020), <http://www.infarma.com.br/journal/infarmaterapia/article/view/infarmaterapia160204079>.
- [33] A. Walli, T.D. Kanegrand, Function and regulation of IL-1 in inflammatory diseases and cancer, *Immunol. Rev.* 281 (2018) 124–137, <https://doi.org/10.1111/imr.12615>.
- [34] P. Hider, Y. Carmi, G. Gurtman, A. Brailman, I. Cohen, E. Voronov, M.R. White, C. A. Dinarello, R.N. Apte, IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation, *J. Immunol.* 187 (2011) 4835–4843, <https://doi.org/10.1093/jimmunol/187.10.4835>.
- [35] R.N. Apte, E. Voronov, Is interleukin-1 a good or bad "guy" in tumor immunobiology and immunotherapy? *Immunol. Rev.* 222 (2008) 222–241, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0655.2008.00615.x>.
- [36] J.E. Sims, D.S. Smith, The IL-1 family: regulation of immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 89–102, <https://doi.org/10.1038/nri2691>.
- [37] S.J. Kunkel, J. Kunkel, A. Kunkel, M.C. Udey, E. von Stebut, Distinct roles for IL-1 receptor type 1 signaling in early versus established *Leishmania* major infections, *J. Invest. Dermatol.* 126 (2006) 1582–1589, <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700305>.
- [38] P. Scott, F.D. Novais, Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis, (n.d.), <https://doi.org/10.1038/nri2616>.
- [39] Y. Chang, S.H. Chang, G.J. Martison, X.D. Yang, B. Nuvola, H.S. Kang, L. Ma, S. S. Wawonich, A.M. Jerns, Q. Tian, C. Dong, Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling, *Immunity* 30 (2009) 576–587, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.02.007>.
- [40] C. Cayrol, J.P. Girard, IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy, *Curr. Opin. Immunol.* 31 (2014) 30–37, <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.09.004>.
- [41] A.R. Malofsky, A.K. Savage, R.M. Lockley, Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury, and inflammation, *Immunol.* 42 (2015) 1005–1019, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.006>.
- [42] O. Rotstein, J.P. Gangneux, C. Piquet-Pellier, C. Maman, A.N.J. McKenzie, C. Guiguen, M. Samson, F. Robert-Garnier, The IL-23/ST2 axis is associated with human visceral leishmaniasis and suppresses Th1 responses in the livers of BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*, *MBio* 4 (2013), <https://doi.org/10.1128/mbio.00383-13>.
- [43] D. Bursacchi, P. Italiani, S. Wull, M.U. Martin, The family of the interleukin-1 receptors, *Immunol. Rev.* 281 (2018) 197–222, <https://doi.org/10.1111/imr.12606>.
- [44] M.F. Nold, C.A. Nold-Petry, J.A. Zeppe, R.E. Palmer, P. Butler, C.A. Dinarello, IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity, *Nat. Immunol.* 11 (2010) 1014–1022, <https://doi.org/10.1038/ni.1944>.
- [45] F.L. Van De Vordet, A.K. Stockman, G. Wu, A.N. Boeckmann, T. Azan, M. G. Nemes, L.A.B. Joosten, J.W.M. Van Der Meer, R. Hao, Y. Kalishnikov, C. A. Dinarello, IL-38 binds to the IL-36 receptor and has biological effects on immune cells similar to IL-36 receptor antagonist, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 2001–2006, <https://doi.org/10.1073/pnas.1121534109>.

- [46] X. Yuan, X. Peng, Y. Li, M. Li, Role of IL-38 and its related cytokines in inflammation, *Mediators Inflamm.* 2015 (2015) 807976, <https://doi.org/10.1155/2015/807976>.
- [47] T. Garraud, M. Harel, M.A. Bouter, L. Le Goff, F. Blanchard, The enigmatic role of IL-38 in inflammatory diseases, *Cytokine Growth Factor Rev.* 39 (2018) 26–35, <https://doi.org/10.1016/j.cytgr.2018.01.001>.
- [48] C.A. Dinarello, The IL-1 family of cytokines and receptors in rheumatic diseases, *Nat. Rev. Rheumatol.* 15 (2019) 612–632, <https://doi.org/10.1038/s41584-019-0277-6>.
- [49] C.A. Dinarello, Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family, *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009) 519–550, <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.020908.132612>.
- [50] E.A. Fernández-Pigam, C. Rangel-Fazares, V. Espinoza-Mateos, K. Carrillo-Sánchez, N. Salazar-Guerra, G. Carrada-Pigam, S. March-Mérez, I. Becker, Disease severity in patients infected with *Leishmania mexicana* relates to IL-1 $\beta$ , *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (2012) e1523, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001523>.
- [51] A. Iwasaki, The importance of CD11b+ dendritic cells in CD4+ T cell activation in vivo with help from interleukin 1, *J. Exp. Med.* 198 (2002) 185–190, <https://doi.org/10.1084/jem.20020737>.
- [52] E. Von Stebut, J.M. Eberhart, V. Belkaid, S.L. Kestka, K. Möller, J. Knop, C. Sunderkotter, M.C. Udey, Interleukin 1 $\alpha$  promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice, *J. Exp. Med.* 198 (2005) 191–199, <https://doi.org/10.1084/jem.20050150>.
- [53] T.R. Hawn, A. Gintsky, D.M. Underhill, F.S. Buckner, S. Akira, A. Ademi, *Leishmania major* activates IL-1 $\alpha$  expression in macrophages through a MyD88-dependent pathway, *Microbes Infect.* 4 (2002) 763–771, [https://doi.org/10.1016/S1366-6579\(02\)00546-4](https://doi.org/10.1016/S1366-6579(02)00546-4).
- [54] K. Kato-Nes, S.L. Kestka, S. Dinges, V. Iwakura, M.C. Udey, E. Von Stebut, A role for leukocyte-derived IL-1 $\alpha$  in DC homeostasis revealed by increased susceptibility of IL-1RA-deficient mice to cutaneous leishmaniasis, *J. Invest. Dermatol.* 131 (2011) 1659–1668, <https://doi.org/10.1038/jid.2011.94>.
- [55] D.S. Lima-Junior, D.L. Costa, V. Carregosa, L.D. Cunha, A.L.N. Silva, T.M.P. Menezes, F.R.S. Guterres, M. Bellio, K.R. Borucki, R.A. Flavell, M.T. Bozza, J.S. Silva, D. S. Zamboni, Inflammation-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*, *Nat. Med.* 19 (2013) 909–915, <https://doi.org/10.1038/nm.3221>.
- [56] K. Shibuya, D. Robinson, F. Zantzi, S.R. Hartley, S.E. Macneela, C. Sonoma, C. A. Hunter, K.M. Murphy, A. O'Garra, IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  are required for IL-12-induced development of Th1 cells producing high levels of IFN- $\gamma$  in BALB/c but not C57BL/6 mice, *J. Immunol.* 160 (1998) 1708–1716 (Accessed 23 April 2020), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466428>.
- [57] A.K. Gupta, K. Ghosh, S. Pali, J. Barua, P.K. Das, A. Uhl, *Leishmania donovani* inhibits inflammation-dependent macrophage activation by exploiting the negative regulatory protein A20 and UCP2, *FASEB J.* 31 (2017) 5087–5101, <https://doi.org/10.1096/fj.201706070>.
- [58] M.A. Hartley, R.D. Evers, M. Rauli, P. Castiglioni, N. Inoue, C. Desponds, L.F. Lys, S.M. Beverley, S.K. Drexler, N. Patel, *Leishmania guyanensis* parasites block the activation of the inflammasome by inhibiting maturation of IL-1 $\beta$ , *Microb. Cell* 5 (2018) 127–149, <https://doi.org/10.15698/mic2018.03.016>.
- [59] J.H. Lee, D.H. Cha, H.J. Park, IL-18 and cutaneous inflammatory diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 29257–29269, <https://doi.org/10.3390/ijms161229172>.
- [60] G.M. Meneses, K. Takada, M. Rodríguez-Sosa, S. Akira, J.R. David, A. R. Sanoskar, Genetically resistant mice lacking IL-18 gene develop Th1 response and control cutaneous leishmaniasis major infection, *J. Immunol.* 164 (2000) 5890–5893, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.11.5890>.
- [61] L.M.A. Sousa, M.R.H. Carneiro, L.M. dos Santos, C.C. Natale, M.E. Resende, D. M. Meser, L.Q. Vieira, IL-18 contributes to susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection by macrophage-independent mechanisms, *Cytokine* 74 (2012) 327–330, <https://doi.org/10.1016/j.cyt.2015.01.021>.
- [62] A. Deyakar, S. Chandrasekaran, S.V. Kuchipudi, S.K. Kalangi, Cytokines: Key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: Opportunities for novel diagnostics and immunotherapy, *Front. Immunol.* 10 (2019) 676, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00676>.
- [63] X.Q. Wei, B.P. Leung, W. Niedhals, D. Piedrafita, G.J. Feng, M. Sweet, I. Dobbie, A. J. Smith, F.Y. Liew, Altered immune responses and susceptibility to *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus* infection in IL-18-deficient mice, *J. Immunol.* 163 (1999) 2821–2828 (Accessed 23 April 2020), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10453027>.
- [64] L.F. Castellano, D.C. Filipe, L. Argente, H. Dossena, A. Prata, A. Demein, V. Rodrigues, Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- $\gamma$  production, *Hum. Immunol.* 70 (2009) 283–290, <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.01.007>.
- [65] P. Kropf, S. Hentz, R. Klemens, I. Müller, Signaling through the T1/ST2 molecule is not necessary for Th2 differentiation but is important for the regulation of type 1 responses in nonhealing *Leishmania major* infection, *Infect. Immun.* 71 (2003) 1961–1971, <https://doi.org/10.1128/iai.71.4.1961-1971.2003>.
- [66] R. Kakkar, R.T. Lee, The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker, *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 827–840, <https://doi.org/10.1038/nrd2660>.
- [67] P. Kropf, L.R. Schopf, C.L. Chung, D. Xu, F.Y. Liew, J.P. Sykes, I. Müller, Expression of Th2 cytokines and the stable Th2 marker ST2L in the absence of IL-4 during *Leishmania major* infection, *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 3621–3628, [https://doi.org/10.1002/ejci.1521-4141\(199911\)29:11<3621::AID-EJIM3621>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/ejci.1521-4141(199911)29:11<3621::AID-EJIM3621>3.0.CO;2-Z).
- [68] J. Schmitt, A. Ouyang, E. Odham, Y. Song, E. Murphy, T.K. McClanahan, G. Zarowski, M. Wocheff, J. Qiu, X. Li, D.M. Gorman, J.F. Kaul, R.A. Kastelein, IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines, *Immunity* 23 (2005) 479–490, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.09.015>.
- [69] P.C. Melby, F.J. Andrade-Narvaez, R.J. Darnell, G. Valencia-Pacheco, V.V. Tryon, A. Palomo-Celis, Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis, *Infect. Immun.* 62 (1994) 837–842, <https://doi.org/10.1128/iai.62.3.837-842.1994>.
- [70] U.K. Al-Abed, Serum cytokine production in patients with Cutaneous Leishmaniasis before and after treatment, *Int. J. Med. Sci.* 9 (2011) 55–60.
- [71] G. Casono-Dittmar, F.J. Tapia, M.A. Sánchez, M. Yamamura, K. Uyemura, R. I. Modlin, R.R. Bloom, J. Corbett, Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction, *Clin. Exp. Immunol.* 91 (2000) 500–505, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1999.tb05031.x>.
- [72] F.T. Silveira, R. Lainson, C.F.P. Corbett, Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – a review, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99 (2004) 239–251, <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000300001>.
- [73] G.K. Kanara, A. Raj, R. Kumar, K. Arishol, H. Kanab, M.A. Ansari, R.A. Bumb, P. Salotra, Analysis of localized immune responses reveals presence of Th17 and Treg cells in cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*, *BMC Immunol.* 14 (2013), <https://doi.org/10.1186/1471-2175-14-52>.
- [74] W. Kamsuan-nhai, L. Naevar, V. Lhri, M. Albert, H. Louis, Protein biomarkers discriminate *Leishmania major*-infected and non-infected individuals in areas endemic for cutaneous leishmaniasis, *BMC Infect. Dis.* (2016) 1–10, <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1458-6>.
- [75] D. Santos, T.M. Campos, M. Saldanha, S.C. Oliveira, M. Nascimento, D.S. Zamboni, P.R. Machado, S. Arrada, P. Sout, E.M. Carvalho, L.P. Carvalho, IL-1 $\beta$  production by intermediate monocytes is associated with immunopathology in cutaneous leishmaniasis, *J. Invest. Dermatol.* 138 (2018) 1107–1115, <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.11.020>.
- [76] J.C. dos Santos, R. Heineha, R.S. Gomes, M.S.M.A. Dams, F. Real, R.A. Mortara, S.T. Kesting, C.A. Dinarello, L.A.R. Joosten, F. Rêbeiro-Dias, Cytokines and microbicidal molecules regulated by IL-32 in THP-1-derived human macrophages infected with New World *Leishmania* species, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (2017), <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005413>.
- [77] R.S. McGwin, A.R. Sanoskar, Leishmaniasis clinical syndromes and treatment, *QJM* 107 (2014) 7–14, <https://doi.org/10.1093/qjmed/hut116>.
- [78] I. Lakhal-Nassar, B.M. Slika, N.E. Aronson, M.A. Maronich, The immunology of a healing response in cutaneous leishmaniasis treated with localized heat or systemic antimonial therapy, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9 (2015) e0004178, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004178>.
- [79] A. Koçyigit, S. Gur, M.S. Gürel, V. Bulut, M. Uluhançlı, Antimonial therapy induces circulating proinflammatory cytokines in patients with cutaneous leishmaniasis, *Infect. Immun.* 70 (2002) 6589–6591, <https://doi.org/10.1128/iai.70.12.6589-6591.2002>.
- [80] M. Shab, M. Mohajeri, S.A.A. Shamsian, H. Nafarvian, S.M.J. Yazdangar, Comparison of Th1 and Th2 responses in non-healing and healing patients with cutaneous leishmaniasis, *Rep. Biochem. Mol. Biol.* 1 (2013) 43–48 (Accessed 23 April 2020), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24980706>.
- [81] Y. Tashiri, C. Aghajegh, S.F. Brynjolfsson, N. Masoudzadeh, V. Moshayekhi, S. Ghazizadeh, M. Ommen, S.S. Nikou, A. Mithani, S. Rafati, A.M. Harandi, Profiling inflammatory response in lesions of cutaneous leishmaniasis patients using a non-invasive sampling method combined with a high-throughput protein detection assay, *Cytokine* 130 (2020) 155056, <https://doi.org/10.1016/j.cyt.2020.155056>.
- [82] C. Ovalle-Bracho, C. Franco-Muñoz, D. Landolfo-Barbosa, D. Restrepo-Montoya, C. Clarjio-Ramirez, Changes in macrophage gene expression associated with leishmaniasis (*Viannia*) *brasilensis* infection, *PLoS One* 10 (2015) e0128934, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128934>.
- [83] K. Nakaneishi, T. Yoshimura, H. Tsumai, H. Okamura, Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses, *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 423–474, <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.423>.
- [84] Z.C. Yuan, W.D. Xu, X.Y. Liu, X.Y. Liu, A.F. Huang, L.C. Su, Biology of IL-36 signaling and its role in systemic inflammatory diseases, *Front. Immunol.* 16 (2019), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02532>.
- [85] K.J. Bryson, X.Q. Wei, J. Alexander, Interleukin-18 enhances a Th2 biased response and susceptibility to *Leishmania mexicana* in BALB/c mice, *Microbes Infect.* 10 (2008) 834–839, <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.03.004>.
- [86] X.Q. Wei, W. Niedhals, D. Xu, Z.Y. Luo, R.G.J. Pollock, J.M. Brewer, Host genetic background determines whether IL-18 deficiency results in increased susceptibility or resistance to murine *Leishmania major* infection, *Immunol. Lett.* 94 (2004) 25–37, <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.04.001>.
- [87] K. Ohaki, T. Ohno, N. Kajiwara, H. Saito, S. Nakai, IL-33 and IL-33 receptors in host defense and disease, *Allergol. Int.* 59 (2010) 143–160, <https://doi.org/10.2332/allergolint.09-RAI-0196>.

E.A.S. Amaral et al.



Ester Amorim is a biologist graduated from the Federal University of Pernambuco in 2018. During graduation, she started her scientific initiation in 2016 at Aggeu Magalhães Institute (IAM/FIOCRUZ/PE) where she studied polymorphisms and epigenetic regulation in inflammation caused by atherosclerotic diseases. Now she is a master student at the Federal University of Pernambuco and focus on the gene regulation of IL-1 cytokines in leishmaniasis.



Aquila Alcântara de França is a nursing student at the Federal University of Pernambuco. He works as a scientific initiation student in the areas of immunology and parasitology, focusing on studying the IL-1 family on cutaneous leishmaniasis. He reads together with master students at the Federal University of Pernambuco and at the Aggeu Magalhães Institute (IAM/FIOCRUZ/PE).

Cytokine and Growth Factor Reviews 57 (2021) 85–92



Valéria Régio Alves Pereira has a PhD in Cellular and Molecular Biology from the Oswaldo Cruz Foundation (2003). Currently she is a Senior Technologist in Public Health and responsible for the Flow Cytometry Core unit at Aggeu Magalhães Institute (IAM/FIOCRUZ/PE). She is part of the Ethics Committee in Human Research of IAM and a professor on the Post-Graduation programs of Therapeutic Innovation (UFPE) and Health Biosciences and Biotechnology (IAM). She leads the research group of Immunology of Infectious and Parasitic Diseases, has expertise in immunology with emphasis in Immunoparasitology, acting mainly on the studies of the cellular and humoral responses of individuals who are susceptible to infectious and parasitic diseases in different stages of the pathological process, mainly with leishmaniasis.



Maria Carolina Accioly Brelau-de-Castro graduated in Biomedicine from the Federal University of Pernambuco (UFPE), has a master's degree in Sciences from the Aggeu Magalhães Institute (IAM) and a doctorate (2013) and post-doctorate (2015) in Therapeutic Innovation from UFPE. She is currently a professor at UFPE and at the postgraduate program in Therapeutic Innovation, from the same University. She is a collaborator of IAM and a member of their flow cytometry core unit. She has experience in the fields of Immunology and Parasitology and her research group is focused on the development of immunological biomarkers and vaccines for infectious and parasitic diseases, mainly working with leishmaniasis.