



**UFAM**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA  
E APLICADA

JOSÉ DO ESPÍRITO SANTO JÚNIOR

O ENVOLVIMENTO DE POLIMORFISMOS DOS GENES *IL4* e *IL13* EM PERFIS DE  
CITOCINAS TH2 EM INDIVÍDUOS COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR  
*Leishmania guyanensis* NO ESTADO DO AMAZONAS

MANAUS  
2023

JOSÉ DO ESPÍRITO SANTO JÚNIOR

**O ENVOLVIMENTO DE POLIMORFISMOS DOS GENE *IL4* e *IL13* EM PERFIS DE  
CITOCINAS TH2 EM INDIVÍDUOS COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR  
*Leishmania guyanensis* NO ESTADO DO AMAZONAS**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Imunologia ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).  
Área de concentração: Imunologia

RAJENDRANATH RAMASAWMY

MANAUS  
2023

## Ficha Catalográfica

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

E77e Espírito Santo Júnior, José do  
O envolvimento de polimorfismos dos genes IL4 e IL13 em perfis de citocinas Th2 em indivíduos com leishmaniose cutânea causada por *Leishmania guyanensis* no estado do Amazonas / José do Espírito Santo Júnior . 2023  
155 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Leishmaniose. 2. Variantes genéticas. 3. SNV - Single Nucleotide Variant. 4. Reposta anti-inflamatória tipo 2. I. Ramasawmy, Rajendranath. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Aos meus pais José do Espírito Santo e Djanira Leal das Neves dedico esta conquista. O apoio deles durante esta jornada tornou tudo mais fácil. Gratidão eterna.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por proporcionar forças e abençoar todos os meus dias durante esta jornada.

Aos meus pais, Djanira Leal das Neves e José do Espírito Santo que sempre se fizeram presentes apesar da distância, sendo meus principais incentivadores e apoiadores. E nos momentos mais difíceis eles foram os pilares para seguir em frente e não desistir. A vocês dedico todo o meu amor, carinho e gratidão, vocês são meu referencial de caráter, honestidade, mansidão, sabedoria e perseverança. Com vocês aprendi que sempre haverá obstáculos durante a caminhada, mas com fé, persistência e muita força de vontade sempre poderei vencer, o segredo é nunca desistir. Aos meus irmãos Edson Galdino do Espírito Santo e Danielle Quintanilla pelo apoio e companheirismo.

A minha querida e amada esposa Maria de Nazaré Mota da Silva que sempre esteve ao meu lado, incentivando-me a nunca desistir e sempre correr atrás dos meus sonhos, me dando toda atenção, carinho e amor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rajendranath Ramasawmy, por me conceder a oportunidade de fazer o mestrado e doutorado, pela orientação, suporte, incentivo, ensinamentos e por confiar no meu trabalho.

Aos queridos colegas de trabalho, Josué Lacerda, Cilana Chagas, Tirza Mesquita, Felipe Jules, Lener Santos, Hector Gracterol, Tuany Arruda, Jussara Farrapo, Letícia Almeida e João Araújo.

À Unidade de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (UPCCB) e ao Laboratório de Virologia da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), pelo apoio e acesso, proporcionando a realização de minhas atividades experimentais.

À secretaria do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA), e aos seus funcionários Edson Brazão, Magda Silva e Ana Paula, por sempre estarem disponíveis em ajudar.

À Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pela oportunidade de adquirir um ensinamento de excelência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento e bolsa, possibilitando o desenvolvimento do projeto.

E a todos que indiretamente me ajudaram na realização deste projeto.

Certo dia, conversando com um colega no jardim do mosteiro onde toda a pesquisa foi realizada, disse uma frase célebre que se tornaria profética: "*Meu tempo virá.*"

Gregor Johann Mendel

## RESUMO

Leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania spp.* Eles são transmitidos ao hospedeiro por vetores flebotomíneos infectados durante o repasto sanguíneo. *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios e invadem as células fagocíticas do hospedeiro causando uma variedade de manifestações clínicas. A leishmaniose cutânea (LC) é forma mais comum da doença e afeta milhões pessoas por ano no mundo. A reposta de defesa contra o parasito é dirigida pelo sistema imune e o patrimônio genético do hospedeiro. As citocinas inflamatórias e pró-inflamatórias são mediadores chave da resposta imune adaptativa à leishmania. Enquanto IFN- $\gamma$  secretado por Th1 induz proteção, as citocinas IL-4 e IL-13 secretadas por Th2 causam suscetibilidade à LC. Neste estudo, investigamos os genes *IL4* e *IL13* e seus papéis no desenvolvimento de LC causada por *Leishmania guyanensis (L.g)* e seus efeitos nas expressões de citocinas do perfil Th2. Nove variantes cobrindo o gene *IL13* e oito variantes no gene *IL4* foram genotipadas em 855 pacientes com LC (casos) e 859 indivíduos saudáveis (controles) usando as técnicas de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) e sequenciamento nucleotídico. No gene *IL13* nenhuma das variantes foram associadas com o risco de desenvolver LC. Contudo, análises de haplótipos incluindo as nove variantes no gene *IL13* revelaram que portadores dos haplótipos H8 possuem 180% mais risco de desenvolver LC-*L.g* (Odds Ratio (OR) = 2.8 [95% Intervalo de confiança (IC) 1.7 – 4.2]; *p*-valor =  $3 \times 10^{-6}$ ). Outro haplótipo, H11 também está associado à suscetibilidade para desenvolver LC-*L.g* (OR = 2.5 [95% IC 1.5 – 4.1]; *p*-valor =  $0.5 \times 10^{-5}$ ). Em contrapartida, portadores de H10 tem 94% menos risco de desenvolver LC-*L.g* (OR = 0.06 [95% IC 0.03 – 0.14]; *p*-valor =  $1.3 \times 10^{-17}$ ). Portadores para H12 (OR = 0.04 [95% IC 0.01 – 0.15]; *p*-valor =  $1.1 \times 10^{-10}$ ) e H13 (OR = 0.07 [95% IC 0.02 – 0.2]; *p*-valor =  $2.5 \times 10^{-8}$ ). Os genótipos de rs2069744, rs20541, rs1295685, rs847 e rs848 foram correlacionados com aumento de concentrações de IL-5 entre pacientes. A variante rs20541 foi correlacionado altas concentrações de IL-13, enquanto rs2069744 e rs848 foram correlacionadas altas de concentrações de IL-4 também nos pacientes. No gene *IL4*, não se realizou análises de associação genética devido a limitação do tamanho amostral. Nossos resultados mostram que no gene *IL13* três haplótipos estão associados a resistência e dois ligados à suscetibilidade. Nossos achados sugerem a possibilidade de outra variante fora da região do gene está associada a suscetibilidade à LC-*L.g*.

**Palavras-chave:** Leishmaniose. Variantes genéticas. SNV – *Single Nucleotide Variants*.

Reposta anti-inflamatória tipo 2.

## **Abstract**

Leishmaniasis are parasitic diseases caused by protozoans of the *Leishmania* genus. They are transmitted to the host by infected phlebotomine vectors during blood meal. *Leishmania* are obligate intracellular parasites that invade host phagocytic cells causing a variety of clinical manifestations. Cutaneous leishmaniasis (CL) is most common clinical form and affect million people worldwide per year. The defense response against the parasite is driven by the host immune system and genetic background. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines are key mediators of the adaptative immune response to *Leishmania*. While IFN- $\gamma$ , secreted by Th1 cells, induces protection against the parasite, IL-4 and IL-13 cytokines secreted by Th2 cells promote susceptibility to CL. In this study, we investigated *IL4* and *IL13* genes on CL caused by *Leishmania guyanensis* (Lg-CL) and their effects on Th2 cytokines expressions. Nine variants in *IL13* gene and eight variants in *IL4* gene were genotyped in 855 patients with CL and 859 healthy controls (controls) by de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) and nucleotide sequencing. Of nine variants in *IL13* gene none was associated to developing of Lg-CL. However, haplotype analysis with nine variants of IL13 revealed that carries to H8 haplotype have 180% increased risk to develop Lg-CL (OR = 2.8 [95% IC 1.7 – 4.2]; p-value  $3 \times 10^{-6}$ ). H11 haplotype also is associated to susceptibility to increased risk to Lg-CL (OR = 2.5 [95% CI 1.5 – 4.1]; p-value  $0.5 \times 10^{-5}$ ). Conversely, carries to H10 have 94% decreased risk to develop Lg-CL (OR = 0.06 [95% CI 0.03 – 0.14]; p-value  $1.3 \times 10^{-17}$ ). H12 carries (OR = 0.04 [95% CI 0.01 – 0.15]; p-value  $1.1 \times 10^{-10}$ ) and H13 (OR = 0.07 [95% CI 0.02 – 0.2]; p-value  $2.5 \times 10^{-8}$ ). The genotypes of rs2069744, rs20541, rs1295685, rs847 and rs848 were found to be correlated with plasma IL-5 levels among the patients with Lg-CL. Additionally, rs20541 exhibited a correlation with plasma IL-13 levels among patients with Lg-CL. rs2069744 and rs848 showed a correlation with plasma IL-4 levels among patients with Lg-CL. In the *IL4* gene, genetic association analysis was not done due to limitation by sample size. In total, our study revealed the presence of three haplotypes of IL13 associated with resistance to disease development and two haplotypes linked to susceptibility. These findings indicate the possibility that there could be a variant located outside the gene region that may be associated with susceptibility.

**Key-words:** Leishmaniasis. Genetic variants. SNVs. Anti-inflammatory response type 2.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Manifestações Clínicas da Leishmaniose Tegumentar.....	27
Figura 2 – Formas de <i>Leishmania</i> (amastigota e promastigota) .....	28
Figura 3 – Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> .....	29
Figura 4 – Vetor da <i>Leishmania</i> gênero <i>Lutzomya</i> .....	30
Figura 5 – Imunidade inata e adaptativa à <i>Leishmania</i> .....	32
Figura 6 – Diferentes fenótipos de macrófagos.....	37
Figura 7 – Receptores de IL-4 e IL-13.....	39
Figura 8 – Via Sinalização dos receptores de IL-4/IL-13.....	50
Figura 9 – Localização dos genes <i>IL4</i> e <i>IL13</i> no cromossomo 5.....	56
Figura 10 – Eletroferograma das reações de sequenciamento para o gene <i>IL13</i> .....	67
Figura 11 – Eletroferograma das reações de sequenciamento para o gene <i>IL4</i> .....	68
Figura 12 – LD para os genes <i>IL4</i> e <i>IL13</i> em diferentes populações.....	70
Figura 13 – Localização das variantes nos genes <i>IL4</i> e <i>IL13</i> .....	71
Figura 14 – Desequilíbrio de ligação (LD) entre as variantes do gene <i>IL13</i> .....	75
Figura 15 – Efeito das variantes rs2069744, rs848 e rs20541 (Arg130Gln) nas concentrações de IL-13 presentes no plasma. ....	79
Figura 16 – Efeito das variantes rs2069744, rs20541, rs129685, rs848 e rs847 nas concentrações de IL-5 presente no plasma em diferentes modelos genéticos. ....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Desenho de iniciadores e Condições de PCR .....	63
Tabela 2 – Características das reações das digestões enzimáticas .....	64
Tabela 3 – Reagentes usados no sequenciamento .....	65
Tabela 4 – Características Gerais das variantes estudadas.....	72
Tabela 5 – Frequências alélicas das variantes do gene <i>IL4</i> entre casos e controles...	73
Tabela 6 – Frequências dos alelos menores (MAF) das variantes do gene <i>IL13</i> entre pacientes com LC, indivíduos saudáveis e MAF do projeto HapMap. ....	74
Tabela 7 – Distribuição de haplótipos derivado das variantes do gene <i>IL13</i> entre os pacientes com LC (casos) e controles saudáveis (controles). ....	75
Tabela 8 – Distribuição das frequências de haplótipos do gene <i>IL13</i> entre os pacientes com LC (casos) e controles saudáveis (controles) após exclusão das variantes rs2069747 e rs2069750. ....	78

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AARS</b>	Alanil tRNA sintetase
<b>AASDHPPT</b>	aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase phosphopantetheinyl transferase
<b>AP-1</b>	Sigla do inglês, <i>activating protein 1</i>
<b>AR</b>	Receptor androgênico, do inglês <i>Androgen Receptor</i>
<b>Arg1</b>	Arginase 1
<b>BAD</b>	Sigla do inglês <i>Bcl-2-associated Death Promoter</i>
<b>BALB/c</b>	Cepa de camundongos suscetíveis à <i>Leishmania</i>
<b>BCGF</b>	Fator de crescimento de células B, do inglês <i>B cell growth factor</i>
<b>Bcl</b>	Sigla do inglês <i>B-cell lymphoma</i>
<b>BSA</b>	Albumina de Soro Bovino, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
<b>BSF-1</b>	Fator estimulatório de células B, do inglês <i>B cell stimulatory factor-1</i>
<b>C3b</b>	Complemento 3b
<b>C57BL/6</b>	Cepa de camundongos resistentes à <i>Leishmania</i>
<b>CBP</b>	Proteína ligante de CREB, do inglês <i>CREB-binding protein</i>
<b>CCL</b>	Sigla do inglês, <i>CC-motif Chemokine ligand</i>
<b>CCR</b>	Sigla do inglês, <i>CC-motif Chemokine Receptor</i>
<b>CD28</b>	Grupo de diferenciação 28, do inglês <i>Cluster Differentiation</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar

<b>CEU</b>	População de Utah com ancestral Norte Europeu
<b>CFTR</b>	Sigla do inglês <i>CF transmembrane conductance regulator</i>
<b>CH3</b>	Cepa de camundongo resistente à <i>Leishmania</i>
<b>CHB</b>	População Chinesa de Han, Beijing
<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Inovação
<b>CREB</b>	Sigla do inglês <i>cAMP reponse element-binding protein</i>
<b>CRH</b>	Sigla do inglês <i>Cytokine receptor homology</i>
<b>CXCL</b>	Sigla do inglês <i>CXC-motif Chemokine Ligand</i>
<b>DC</b>	Célula Dentrítica, do inglês <i>Dentritic Cell</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Dehoxyrribonucleic Acid</i>
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
<b>EDTA</b>	Sigla do inglês <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<b>EL-4</b>	Linhagem de célula linfoma induzido de camundongos
<b>ELK1</b>	Sigla do inglês <i>ETS Like-1 protein</i>
<b>ERK</b>	Proteínas quinases reguladas por estímulos extracelulares, do inglês <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>ETS</b>	Sigla do inglês <i>E26 transformation-specific</i>
<b>FAPEAM</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
<b>FCN2</b>	Gene Ficolina 2, do inglês <i>Ficolin 2</i>
<b>FMT-HVD</b>	Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado
<b>FnIII</b>	Fibronectina tipo III

<b>FOXO</b>	Sigla do inglês <i>FOX class O proteins</i>
<b>GDP</b>	Guanosina Difosfato
<b>GLM</b>	Modelo linear geral, do inglês <i>General Linear Model</i>
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos, do inglês <i>Granulocyte Macrophage - Colony Stimulate Factor</i>
<b>GP63</b>	Glicoproteína 63
<b>Grb2</b>	Sigla do inglês <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
<b>GSK-3<math>\beta</math></b>	Sigla do inglês <i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
<b>GTP</b>	Guanosina Trifosfato
<b>H3K4m3</b>	Trimetilação de lisina 4 da histona H3
<b>HAND1</b>	Sigla do inglês <i>Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 1</i>
<b>HCl</b>	Ácido Clorídrico
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
<b>hsp70</b>	Proteína de choque de calor 70, do inglês <i>heat-shock protein 70</i>
<b>I4R</b>	Sigla do inglês <i>insulin IL4 receptor</i>
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>IC</b>	Intervalo de Confiança
<b>iC3b</b>	C3b inativo, do inglês <i>inactivated C3b</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E

<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	Inibidor do NF- $\kappa$ B, do inglês <i>Inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B</i>
<b>IKK<math>\alpha</math></b>	Sigla do inglês <i>I<math>\kappa</math>B Kinase alpha</i>
<b>IL</b>	Interleucina, exemplo IL-12, IL-4, IL-13 etc.
<b>IL-12p35</b>	Subunidade p35 da IL-12
<b>IL-12R<math>\beta</math>2</b>	Receptor beta 2 de IL-12
<b>IL-4R<math>\alpha</math></b>	Receptor alfa de IL-4
<b>ILC</b>	células linfoides do inato, do inglês <i>Innate Lymphoid Cells</i>
<b>iNOS</b>	Óxido Nítrico Sintase induzida, do inglês <i>inducible Nitric Oxide synthase</i>
<b>IRF4</b>	Fator regulatório de interferon 4, do inglês <i>Interferon Regulatory Factor 4</i>
<b>IRS</b>	Receptor de substrato de insulina, do inglês <i>Insulin Receptor Substrate</i>
<b>JAK</b>	Janus cinase, do inglês <i>Janus kinase</i>
<b>JNK</b>	Sigla do inglês, <i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
<b>JPT</b>	População Japonesa em Tóquio
<b>kb</b>	Kilo base
<b>KCl</b>	Cloreto de Potássio
<b>KD</b>	Constante de dissociação
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>LC</b>	Leishmaniose cutânea

<b>LCD</b>	Leishmaniose cutânea disseminada
<b>LCDA</b>	Leishmaniose cutânea difusa anérgica
<b>LCL</b>	Leishmaniose cutânea localizada
<b>LD</b>	Desequilíbrio de ligação, do inglês <i>Linkage Disequilibrium</i>
<b>LM</b>	Leishmaniose mucosa
<b>LmAg</b>	Antígeno de <i>Leishmania</i>
<b>lncRNA</b>	RNA longo não-codificante, do inglês <i>long non-coding RNA</i>
<b>LPDE</b>	Laboratório de Pesquisa de Doenças Endêmicas
<b>LPG</b>	Lipofosfoglicano
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>LWK</b>	População Luhya em Webuye, Quênia
<b>M1</b>	Macrófago tipo 1 ou ativação clássica
<b>M2</b>	Macrófago tipo 2 ou ativação alternativa
<b>MAF</b>	Frequência do menor alelo, do inglês <i>Minor Allele Frequency</i>
<b>MAPK</b>	Sigla do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MBL</b>	Lectina Ligante de Manose, do inglês <i>Mannose binding Lectin</i>
<b>MEK</b>	do inglês, MAPK/ERK Kinase 1
<b>MEX</b>	População com ancestral Mexicano em Los Angeles
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>miRNA</b>	micro RNA
<b>mM</b>	Mili molar
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro

<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>NET</b>	Armadilha extracelular de Neutrófilos, do inglês <i>Neutrophils Extracellular Traps</i>
<b>NF1</b>	Neurofibromina 1 gene, do inglês <i>Neurofibromin 1</i>
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Fator de Nuclear transcrição kappa B
<b>ng</b>	nanograma
<b>NK</b>	Células assassinas naturais, do inglês <i>Natural Killers cells</i>
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>nsSNV</b>	SNV não sinônimo
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OPAS</b>	Organização Pan Americana de Saúde
<b>OR</b>	<i>Odds ratio</i> ou razão de chances
<b>ORF</b>	Quadro de leitura aberta, do inglês <i>Open Reading Frame</i>
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PcG</b>	Sigla do inglês <i>Polycomb group</i>
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PDGF</b>	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas, do inglês <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
<b>PDK1</b>	Sigla do inglês <i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E 2
<b>PI3K</b>	Sigla do inglês <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>



<b>PIP</b>	Sigla inglês <i>Phosphatidylinositol</i>
<b>PKB</b>	Proteína cinase B, do inglês <i>Protein Kinase B</i>
<b>pM</b>	Pico molar
<b>qPCR</b>	PCR quantitativo
<b>RAD50</b>	Do inglês <i>RAD50 Double Strand Break Repair Protein</i>
<b>RAF</b>	Sigla do inglês <i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
<b>REL</b>	Proteína c-REL subunidade de NF- $\kappa$ B
<b>RFLP</b>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
<b>RHD</b>	Grupo sanguíneo Rh antígeno D
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
<b>ROS</b>	Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
<b>RPA70</b>	Sigla em inglês <i>Replication Protein A 70</i>
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>RTSH</b>	Sigla do inglês, <i>Reverse Two-hybrid System</i>
<b>SCOS 3</b>	Sigla do inglês <i>Supressor of Cytokine Signaling 3</i>
<b>SGS</b>	Sigla do inglês <i>Salivary Gland Sonicate</i>
<b>SH</b>	Sigla do inglês <i>Src homology</i>
<b>SINAN</b>	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
<b>SNV</b>	Variantes de único nucleotídeo, do inglês <i>Single Nucleotide Variants</i>
<b>SOS</b>	Sigla do inglês <i>Son of Sevenless</i>

<b>STAT</b>	Sigla do inglês <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
<b>TCR</b>	Receptor de células T, do inglês <i>T Cells Receptor</i>
<b>TFBS</b>	Sítio de transcrição para fator de Transcrição, do inglês <i>Transcription Factor Biding Site</i>
<b>TGF-β</b>	Fator de crescimento do tecido beta, do inglês <i>Tissue Growth Factor beta</i>
<b>Th</b>	Células T CD4+ auxiliares, do inglês <i>T CD4+ helper cells</i>
<b>TH2LCRR</b>	Sigla do inglês <i>T helper type 2 Locus Control Region Associated RNA</i>
<b>TLR</b>	Receptores tipo Toll, do inglês <i>Toll like Receptors</i>
<b>TNF-α</b>	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
<b>TPO</b>	Sigla do inglês <i>Thyroid Peroxidase</i>
<b>Treg</b>	Células T regulatórias, do inglês <i>T regulatory cells</i>
<b>TrxG</b>	Sigla do inglês <i>Trithorax group</i>
<b>TSI</b>	População de ancestrais Europeus em Toscani, Itália
<b>TSLP</b>	Linfopoietina Estromal Tímica, do inglês <i>Thymic Stromal Lymphopoietin</i>
<b>μL</b>	Micro litros
<b>μM</b>	Micro molar
<b>UTR</b>	Região não traduzida, do inglês <i>Untranslated Region</i>
<b>WDR5</b>	Sigla do inglês <i>WD repeat domain 5 protein</i>

**WSXWS**

Triptofano-Serina-Qualquer amino ácido-Triptofano-Serina

**$\chi^2$**

Qui-quadrado

**Y**

Tirosina

**$\gamma c$**

Cadeia gama comum

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	23
<b>2.1 Estado Epidemiológico da Leishmaniose</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2 Formas clínicas tegumentares</b> .....	<b>25</b>
<b>2.3 Parasito <i>Leishmania</i></b> .....	<b>27</b>
<b>2.4 Ciclo de vida da <i>Leishmania</i></b> .....	<b>29</b>
<b>2.5 Vetores da Leishmaniose</b> .....	<b>29</b>
<b>2.6 Aspectos Imunológicos</b> .....	<b>30</b>
Imunidade Inata .....	31
Imunidade adaptativa .....	34
<b>2.7 Biologia do eixo IL-4/IL-13</b> .....	<b>38</b>
Ativação e sinalização pelo IL-4R .....	41
Ativação e sinalização pelo IL-13R.....	47
<b>2.9 Efeitos de variações do tipo SNV.</b> .....	<b>49</b>
<b>2.10 Variações SNV e Leishmaniose Cutânea (LC).</b> .....	<b>54</b>
<b>2.11 Localização genômica dos <i>IL4</i> e <i>IL13</i>.</b> .....	<b>55</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>58</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>58</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>58</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>59</b>
<b>4.1 Tipo de estudo</b> .....	<b>59</b>
<b>4.2 Termos éticos</b> .....	<b>59</b>
<b>4.3 Tamanho amostral</b> .....	<b>59</b>
<b>4.4 Área de Estudo</b> .....	<b>60</b>
<b>4.5 Pacientes Grupo Caso</b> .....	<b>60</b>
<b>4.6 Grupo Controle</b> .....	<b>60</b>
<b>4.7 Critérios de inclusão e não-inclusão</b> .....	<b>61</b>
<b>4.8 Coleta de material biológico</b> .....	<b>61</b>
<b>4.9 Extração de DNA</b> .....	<b>62</b>
<b>4.10 Identificação de <i>Leishmania</i> spp.</b> .....	<b>62</b>

4.11	Quantificação do DNA extraído .....	62
4.12	Critérios de seleção dos SNVs .....	63
4.13	PCR para genotipagem .....	63
4.14	RFLP ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i> ) .....	64
4.15	Sequenciamento de nucleotídeos.....	65
4.15.1	Purificação da PCR .....	65
4.15.2	Reação de Sequenciamento.....	65
4.15.3	Purificação do produto da reação de sequenciamento.....	66
4.15.4	Análise de variantes genéticos pelo sequenciamento .....	66
4.16	Dosagem de Citocinas .....	66
4.17	Análises Estatísticas .....	66
4.18	Fluxograma de atividades .....	69
5.	RESULTADOS .....	70
4.1	Seleção das variantes.....	70
4.2	As variantes do gene <i>IL4</i> em Pacientes com LC e indivíduos saudáveis .....	73
4.3	Artigos e Publicações.....	77
6.	CONCLUSÃO .....	82
7.	REFERÊNCIAS.....	83

## 1.INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por parasitos protozoários do gênero *Leishmania* transmitidos por vetores flebotomíneos fêmeas. As principais formas clínicas da doença são: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose visceral (LV). As LC são caracterizadas por lesões na pele, enquanto LM são lesões que agridem gravemente o tecido mucoso e a LV são lesões que atingem órgãos internos sendo fatal quando não tratada adequadamente (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). Há também formas assintomáticas da infecção e as LC podem se “autocurar” espontaneamente em alguns casos (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

A leishmaniose é considerada um grave problema de saúde pública mundial. No entanto, a doença ainda não possui vacina e os tratamentos são tóxicos e de longa duração apresentando efeitos colaterais desconfortáveis (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021). Entre as formas clínicas, LC é a mais frequente no mundo sendo endêmica em 89 países e territórios (WHO, 2021). Segundo a Organização Mundial de Saúde, estima-se que ocorra 1 milhão de novos casos de LC por ano no mundo (WHO, 2021). No ano de 2021, 95% dos novos casos de LC foram reportados na região do mediterrâneo (79%) e nas américas (17%) (WHO, 2021).

Entre os países latino-americanos, o Brasil está entre os quatro países com maior número de casos e apresenta alta endemicidade para LC. Em 2021, o Brasil notificou 15.023 novos casos (MS, 2021). De acordo com o ministério da saúde (MS, 2021), o norte do Brasil é a região que apresenta o maior número de casos, onde foram reportados 6.544 novos casos em 2021. *L. guyanensis* é uma espécie endêmica da zona peri-rural de Manaus, capital do estado do Amazonas, sendo a espécie responsável por causar 95% dos casos LC na região (BENICIO et al., 2011).

O desenvolvimento da LC é complexo e multifatorial sendo influenciado fortemente pela genética do hospedeiro assim como também seu perfil imunológico. O sistema imune adaptativo do hospedeiro, coordenado por células T CD4+ *helper* 1 (Th1), atua na defesa contra o parasito por meio da liberação de citocinas inflamatórias como

fator de necrose tumoral (TNF, *tumour necrosis factor*)- $\alpha$  e interferon (IFN)- $\gamma$ , que estimulam células infectadas a eliminar a *Leishmania* por explosão respiratória (LIEW; LI; MILLOTT, 1990). No entanto, há também células Th2, secretoras de interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-13, que são incapazes de controlar o aumento da carga parasitária (WURTZ; BAJÉNOFF; GUERDER, 2004). Apesar do arquétipo Th1/Th2, células Th17 e T regulatórias (T reg) também podem controlar o desfecho da infecção (JI et al., 2005; KOSTKA et al., 2009; PEDRAZA-ZAMORA et al., 2017).

IL-13 é uma citocina expressa por células Th2, seu papel na suscetibilidade à *Leishmania* é relevante e foi demonstrado em muitos estudos (ALEXANDER et al., 2002; FELIZARDO et al., 2012; MATTHEWS et al., 2000a). Em camundongos resistentes a *L. major*, a presença de IL-13 inibiu a expressão de IFN- $\gamma$  e IL-12 e levou ao aumento da infecção, enquanto camundongos deficientes de IL-13 mostraram alta resistência a infecção por *L. major* (MATTHEWS et al., 2000a). Além do mais, a IL-13 regulou negativamente a expressão da cadeia IL-12R $\beta$ 2 em células T específicas tornando-as incapazes de responder à IL-12, o que promoveu então a suscetibilidade à infecções por *L. guyanensis* (BOURREAU et al., 2001).

A IL-4 é considerada a citocina chave da resposta Th2. Ela atua ativando o fator de transcrição STAT6 responsável por induzir a expressão de *GATA3*, regulador mestre do fenótipo Th2. IL-4 e IL-13 apresentam homologia, apresentam papéis biologicamente similares e compartilham seus receptores, no entanto, a capacidade de induzir a diferenciação Th2 é restrita a IL-4 (RADWANSKA et al., 2007; SEKI et al., 2004). IL-4 é um fator de suscetibilidade à *Leishmania* amplamente demonstrado. Os camundongos deficientes de IL-4 são altamente resistentes à infecção por *L. major* (NOBEN-TRAUTH; PAUL; SACKS, 1999). O bloqueio do receptor de IL-4, o IL-4R $\alpha$ , em camundongos conferiu resistência à infecção (RADWANSKA et al., 2007). Altos níveis de IL-4 na biópsia foram correlacionados com a alta carga parasitária em pacientes de LC infectados por *L. tropica* (KUMAR; BUMB; SALOTRA, 2009).

Variações genéticas do hospedeiro, como SNV (*Single Nucleotide Variants*) onde há troca de um único nucleotídeo, estão associadas a diversos distúrbios e doenças, inclusive ao desenvolvimento de LC (CASTELLUCCI et al., 2006; DE ARAUJO et al.,

2015a, 2015b; RAMASAWMY et al., 2013). Variações genéticas nos genes *IL4* e *IL13*, por exemplo, foram associadas a suscetibilidade à várias doenças como asma (AMIRZARGAR et al., 2009; BEGHÉ et al., 2010), dermatite atópica (LEE et al., 2020; NAMKUNG et al., 2011), alergia (ASHLEY et al., 2017; BROWN et al., 2013), câncer (SHAMOON et al., 2018; WU et al., 2009) e também aos níveis de citocinas IL-13 (WANG et al., 2018), IL-4 (HUSSEIN et al., 2013) e anticorpos IgE (ASHLEY et al., 2017; IMRAISH; ABU-THIAB; ZIHLIF, 2021) presentes no plasma.

Os genes *IL4* e *IL13* estão localizados no braço longo do cromossomo 5, na posição 31.1, onde fica localizado o *locus* Th2, um grupo de genes associados a reposta Th2. Recentes evidências demonstraram que variantes do gene *IL13* podem regular também a expressão do gene *TH2LCRR* que codifica um RNA longo não-codificante (lncRNA >200 pb) responsável por regular o perfil Th2 (LI et al., 2022). O lncRNA TH2LCRR se associa ao complexo metiltransferase-histona H3K4 para manter a epigenética dos promotores dos genes *IL4*, *IL13* e *IL15* (ALMO et al., 2018).

As IL-4 e IL-13 apresentam grande relevância para o desenvolvimento de LC. Compreender tanto a natureza genética quanto a natureza das respostas imunológicas é primordial para entender o desenvolvimento da doença e assim poder contribuir com o futuro de novos tratamentos. Neste trabalho, almejamos investigar as variantes presentes nos genes *IL4* e *IL13* e seu papel no desenvolvimento de LC causada por *L. guyanensis* e também seu envolvimento na expressão de citocinas do perfil Th2.



## 2.REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Estado Epidemiológico da Leishmaniose

A Leishmaniose é uma doença tropical negligenciada que apresenta grande diversidade epidemiológica e distribui-se amplamente pelo mundo, particularmente sob regiões de climas tropicais e subtropicais, envolvendo dentre outros aspectos os socioeconômicos, ambientais e regionais (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que ocorram um milhão de novos casos de LC por ano mundialmente (WHO, 2020). No ano de 2020, 208.357 novos casos de LC foram relatados (WHO, 2021). De acordo com a OMS, a LC é a forma mais comum da leishmaniose e também endêmica em 89 países e territórios conforme mostram dados do ano de 2020 (WHO, 2021).

Entre os 89 países endêmicos para LC, sete países representam mais de 80% dos casos globais, Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iraque, Paquistão e República Árabe da Síria e cada um deles reporta > 6.000 casos de LC (WHO, 2021). Dentre esses países, somente dois se localizam nas américas, Brasil e Colômbia.

Nas américas, foi observado uma queda no número de casos nos últimos 5 anos (2017-2021), o que é sobretudo um reflexo da diminuição de casos no Brasil (14,3%), Colômbia (20,5%), Nicarágua (71,2%) e Peru (21,6%). Entretanto, houve um aumento significativo em outros países como Argentina (85%), México (60,5%), Panamá e El Salvador (28,2%) em 2021 em relação a 2020 (OPAS, 2022).

O Brasil é endêmico para LC e apresenta alta morbidade de casos. Em 2021, foram registrados 15.023 novos casos, contudo a média de casos por ano gira em torno de 21.000 casos/ano de acordo com o ministério da saúde (MS, 2023). O Brasil possui um coeficiente de incidência de 8,6 casos/100.000 habitantes (últimos 5 anos), com destaque para a Região Norte com a maior taxa, 46,4 casos/100.000 habitantes, e em seguida vêm as Regiões Centro-Oeste (17,2 casos/10.000 habitantes) e Nordeste (8 casos/100.000 habitantes) (MS, 2023).

A Região Norte do país é predominante no número de casos de LC, somente em 2021 foram descritos 6.544 novos casos apresentando um coeficiente de incidência de 34.6 casos/100.000 habitantes, o que é significativamente mais elevado que as demais regiões (MS, 2022a). Recentemente, o Ministério da Saúde estratificou o risco de leishmaniose tegumentar nos municípios em cinco níveis: muito intenso, intenso, alto, médio e baixo nos anos de 2019 a 2021; destes municípios quatorze (Assis Brasil-AC, Xapuri-AC, Sena Madureira-AC, Presidente Figueiredo-AM, Manaus-AM, Rio Preto da Eva-AM, Almeirim-PA, Medicilândia-PA, Monte Alegre-PA, Uruará-PA, Calçoene-AP, Wenceslau Guimarães-BA, Taperoá-BA e Tesouro-MT) foram classificados como muito intensos e a cidade de Manaus-AM (269,67), Presidente Figueiredo-AM (177,00) e Rio Preto da Eva (164,33) apresentaram as maiores médias de casos (MS, 2022b).

A cidade de Manaus, capital do estado Amazonas, apresenta o segundo maior crescimento populacional do país. Após a década de implantação da Zona Franca de Manaus a taxa de crescimento populacional aumentou de 2,3% (1950) para 7,4% (1970) permanecendo em uma taxa de aproximadamente 1,5% nos dias atuais (IBGE, 2010; NAZARETH; BRASIL; TEIXEIRA, 2011). Este crescimento, devido em maioria a migração, levou a intensas atividades como ocupações territoriais irregulares, urbanização e aumento de atividade rural nas proximidades da cidade, o que proporcionou o aumento do contato humano com o ciclo de vida do parasito *Leishmania guyanensis*, que atualmente é responsável por aproximadamente 95% dos casos de LC na região (BENICIO et al., 2011; TELES; FONSECA; GONÇALVES, 2019).

Entre os anos 1981 a 2010, a cidade Manaus mostrou ênfase nos números de casos de LC com incidências alarmantes em 1985 (3.464), 1992 (3.424) e 2003 (3.968) devido aos desflorestamentos, aumento de assentamentos na periferia da cidade e fatores climáticos, respectivamente (DE GUERRA et al., 2015). O número de casos hoje em Manaus, gira em torno de 400 casos de LC por ano, 2021 foram registrados 330 casos (SINAN, 2023), com a maioria dos casos registrados oriundos das comunidades adjacentes as rodovias BR-174 e AM-010 (GUERRA et al., 2007).

## 2.2 Formas clínicas tegumentares

As espécies causadoras de leishmaniose tegumentar afetam principalmente o sistema do retículo endotelial, infectando sobretudo células fagocitárias do hospedeiro, como macrófagos e monócitos, causando diversos tipos lesões no tecido variando de acordo com a espécie (NEVES et al., 2004). A leishmaniose tegumentar apresenta formas clínicas mais diversificadas em resposta a diversos fatores, como ambiente, espécies, perfil imune e genético do hospedeiro.

As lesões do tipo leishmaniose cutânea localizada (LCL) iniciam após um período de incubação que varia em torno de uma a quatro semanas depois do repasto sanguíneo. As áreas mais frequentes para inoculação podem ser áreas do rosto, como orelhas e pescoço por estarem desprotegidas, mas também pernas, braços e costas são acometidos (TORRES-GUERRERO et al., 2017). Inicialmente, LCL é marcada por pápulas que conseqüentemente evoluem para nódulos na região de inoculação do parasito. Com o desenvolvimento, as pápulas aumentam de tamanho e surgem úlceras com bordas elevadas como observado na **Figura 1A** (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

Os números de lesões de LCL podem variar de acordo com a espécie de *Leishmania*. No caso de infecções por *L. tropica*, por exemplo, 63% dos indivíduos apresentam mais de uma lesão (SANG; NJERU; ASHFORD, 1994). As LCL podem medir de 1 a 10 mm, e podem durar de 3-5 meses ou de 15-20 anos (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A espécie *L. tropica*, responsável por causar LCL, está presente no Velho Mundo, enquanto a *L. guyanensis* está no Novo mundo. As lesões ocasionadas por *L. guyanensis* são ulcerosas, inflamadas e com bordas elevadas, podendo ocorrer uma ou múltiplas lesões (BORGES; GOMES, 2018). Interessantemente, as lesões localizadas tendem a ser auto curáveis variando de acordo com a espécie, de 3 a 9 meses nos casos da *L. mexicana*, 2 a 6 meses para *L. major*, 6 a 15 meses para *L. braziliensis*, *L. tropica* e *L. panamensis* (DOWLATI, 1996; REITHINGER et al., 2007; SOTO et al., 2002).

A leishmaniose cutânea difusa anérgica (LCDA) trata-se de uma lesão semelhante a hanseníase lepromatosa e acomete principalmente as regiões dos ombros,

tronco e face (LUPI et al., 2009). Sem ulcerações, as lesões difusas anérgicas são pápulas ou nódulos, em alguns casos, podem aparecer erupções cutâneas com aparência verrucosa ou xantomatosa (**Figura 1B**) (KEDZIERSKI, 2011). Em outros casos podem envolver a mucosa nasofaríngeal (ORDAZ-FARIAS et al., 2013). Este tipo de lesão apresenta alta carga parasitária marcada por uma alterada reposta imune com alta reação do tipo Th2 (BOMFIM et al., 1996). A não ulceração é levada em razão do alto crescimento parasitário e uma reposta imune celular anérgica (BOMFIM et al., 1996). A LCDA é rara, por exemplo, em áreas endêmicas os parasitos isolados de lesões foram introduzidos em voluntários, no entanto, todos desenvolveram LCL sugerindo que o desenvolvimento de LCDA não se trata apenas da cepa ou espécie do parasito (CONVIT; PINARDI; RONDÓN, 1972).

Lesões de leishmaniose cutânea disseminada (LCD) são diferencialmente numerosas, em centenas, se apresentando em uma mistura de nódulos, pápulas e úlceras caracterizadas por serem pleomórficas em duas ou mais regiões anatômicas (HASHIGUCHI et al., 2016). O local da infecção é marcado por rápidas metástases parasitárias favorecendo a rápida disseminação através da corrente sanguínea que pode se iniciar dentro de poucas semanas ou dias após a formação da lesão inicial (TURETZ et al., 2002). As lesões de LCD são precursoras de cerca de 40% dos casos de LM (**Figura 1 C**) (MACHADO et al., 2011).

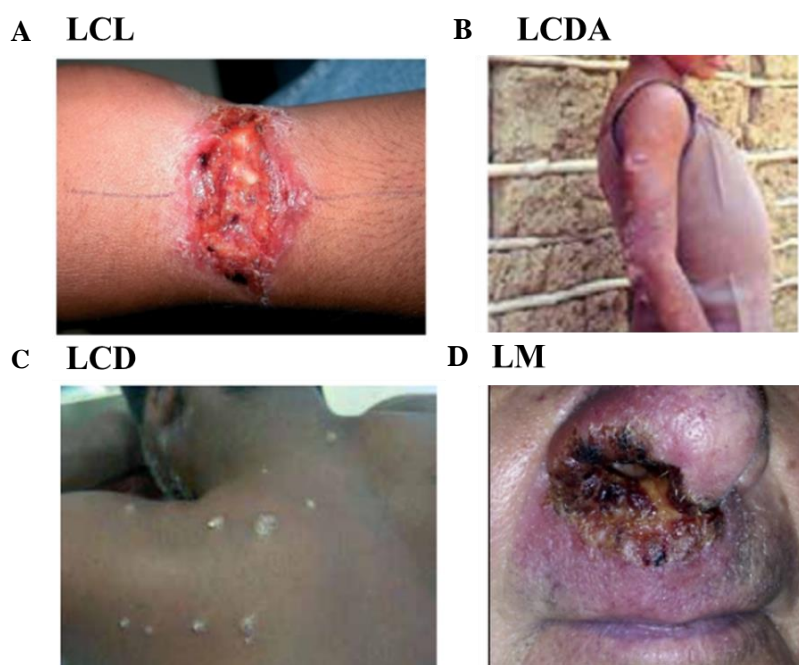
Quanto ao perfil da resposta imune, as concentrações de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  sistêmicos em pacientes com LCL foram significativamente maiores que em pacientes com LCD, o que explica a disseminação do parasito e menos capacidade para controlá-lo causando um grande número lesões ao contrário de LCL (MACHADO et al., 2011). Além disso, fatores genéticos presentes no genoma de populações oriundas de áreas endêmicas também são significativamente relacionados ao desenvolvimento de LCD (LEOPOLDO et al., 2006).

A LM é particularmente conhecida por destruir o tecido mucoso. Na fase inicial, sinais como rouquidão, congestão nasal e sangramento são notados (**Figura 1D**) (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). Posteriormente, edemas evoluem para úlceras mucopurulentas que mutilam e destroem o tecido mucoso na região do nariz, boca e

garganta (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). A LM é mais prevalente no Novo Mundo, causada pelas espécies do subgênero *Viannia*, com o maior número de casos causados pela espécie *L. (Viannia) braziliensis* (AMATO et al., 2008).

Apesar de ser caracterizada por extensa destruição do tecido, a carga parasitária encontrada na lesão é consideravelmente baixa (RIDLEY; DE MAGALHAES; MARSDEN, 1989). Lesões de pacientes com LM também apresentam alta expressão de IL-17 e alta porcentagem de células T CD4+ circulantes expressando IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , porém baixos níveis de IL-10 quando comparados aos pacientes com LCL (BACELLAR et al., 2002; BOAVENTURA et al., 2010; GAZE et al., 2006).

**Figura 1: Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar**



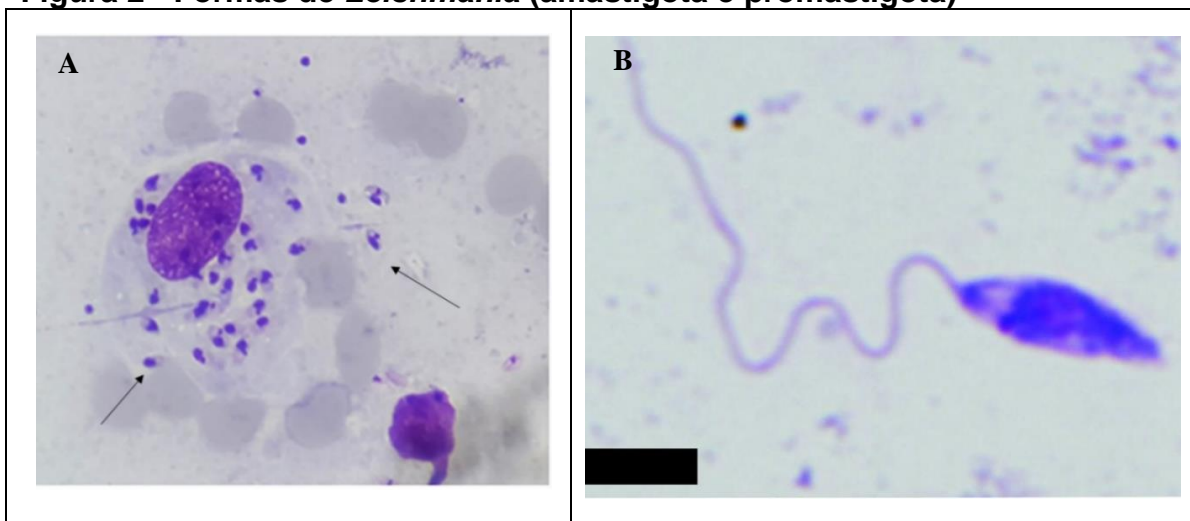
**Fonte:** LCL: (MOKNI, 2019); LCD: (MS, 2017); LCDA: (MS, 2017); LM: (CROVETTO-MARTÍNEZ et al., 2015).

### **2.3 Parasito *Leishmania***

O agente etiológico da leishmaniose é um protozoário pertencente à ordem *Kinetoplastida*, da família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania* e subgêneros *Leishmania* e *Vannia* (SIMPSON, 1987).

O parasito *Leishmania* apresenta duas formas distintas ao longo do seu ciclo de vida. As formas amastigotas, são ovais, aflagelares e obrigatoriamente intracelulares (**Figura 2A**). Amastigotas se replicam no interior de células fagocíticas do hospedeiro vertebrado por divisão binária causando lise celular. As formas promastigotas são flageladas, alongadas e infectantes para as células do hospedeiro (**Figura 2B**), se localizam no trato digestivo do flebótomo invertebrado até o momento do repasto sanguíneo (CHANG; FONG; BRAY, 1985; WALTERS, 1993).

**Figura 2 - Formas de *Leishmania* (amastigota e promastigota)**



Fonte: (RECALDE et al., 2019) , (SADLOVA et al., 2017).

As proteínas presentes nas membranas dos promastigotas conferem propriedades infectantes que se desenvolvem no intestino do vetor flebotomíneo na fase conhecida como metaciclogênese (NEVES et al., 2004). Na sua estrutura, *Leishmania* apresenta mitocôndrias diferenciadas das outras células denominadas de cinetoplasto. Lipofosfoglicanos e glicofosfolípidios na membrana dos promastigotas estão envolvidos nos processos de reconhecimento e interação com as células do hospedeiro sendo capazes de induzir respostas imunológicas e são considerados um dos principais fatores de inibição para o fagolisossomo (DE ASSIS et al., 2012; NADERER; MCCONVILLE, 2008; NADERER; VINCE; MCCONVILLE, 2004).

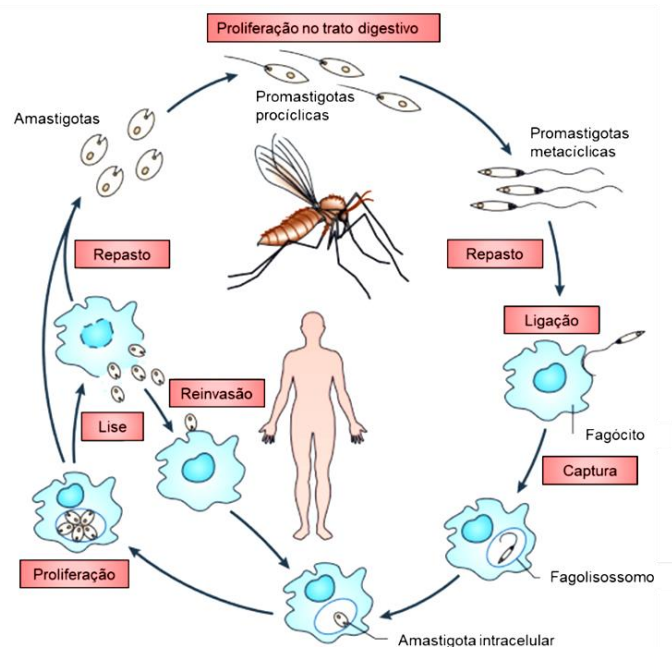
Os amastigotas possuem a capacidade de resistir ao ambiente oxidativo no fagolisossomo de macrófagos do hospedeiro facilitando sua replicação por divisão binária

(NADERER; MCCONVILLE, 2011; SACKS; KAMHAWI, 2001).

## 2.4 Ciclo de vida da *Leishmania*

O ciclo de vida do parasito inicia quando o vetor inocula formas promastigotas infectantes do parasito no hospedeiro (1). As promastigotas são fagocitadas por células fagocíticas (2), no interior do fagolisossomo, se tornam amastigotas (3) e se multiplicam por divisão binária (4) até o rompimento da célula (5), podendo ser novamente fagocitadas ou sendo ingeridas por um outro vetor (6). No vetor, as formas amastigotas se ligam à parede do intestino onde irão permanecer até se tornarem promastigotas infectantes dando assim continuidade ao ciclo (KAYE; SCOTT, 2011).

**Figura 3 - Ciclo de vida da *Leishmania***



Fonte: Kaye & Scott, 2011 (Adaptado)

## 2.5 Vetores da Leishmaniose

O vetor da leishmaniose é um inseto flebótomo pertencente à ordem Díptera, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae* que pertence ao gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (CARVALHO, M. S. L. C, BREDT; ROBERTA; MENEGHIN, DE OLIVEIRA, 2010). Durante as fases de vida, os flebátomos

sofrem metamorfose apresentando quatro estágios: ovo, larva, pupa e fase adulta (CLABORN, 2010). A **Figura 4** abaixo mostra um flebótomo do gênero *Lutzomyia*.

No Brasil, as principais espécies que estão ligadas a transmissão de *Leishmania* são *Lu. flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei* e *Lu. migonei* e dependendo da espécie podem ser encontradas em todo o território do país (MS, 2017).

No Amazonas o principal vetor transmissor de *L. guyanensis* é o *Lu. umbratilis*, ele é encontrado em alta densidade em floresta densa, tanto nas alturas das copas das árvores como no solo próximo ao tronco (MS, 2017).

**Figura 4 - Vetor da *Leishmania* do gênero *Lutzomyia***



Fonte: CBG Photography Group (2012)

## 2.6 Aspectos Imunológicos

A interação entre o parasito e o sistema imune do hospedeiro é complexa e essencial para o desfecho clínico da doença. Assim, as características imunológicas do hospedeiro desempenham um papel relevante na progressão das lesões causadas por *Leishmania* (KAYE; SCOTT, 2011).



## Imunidade Inata

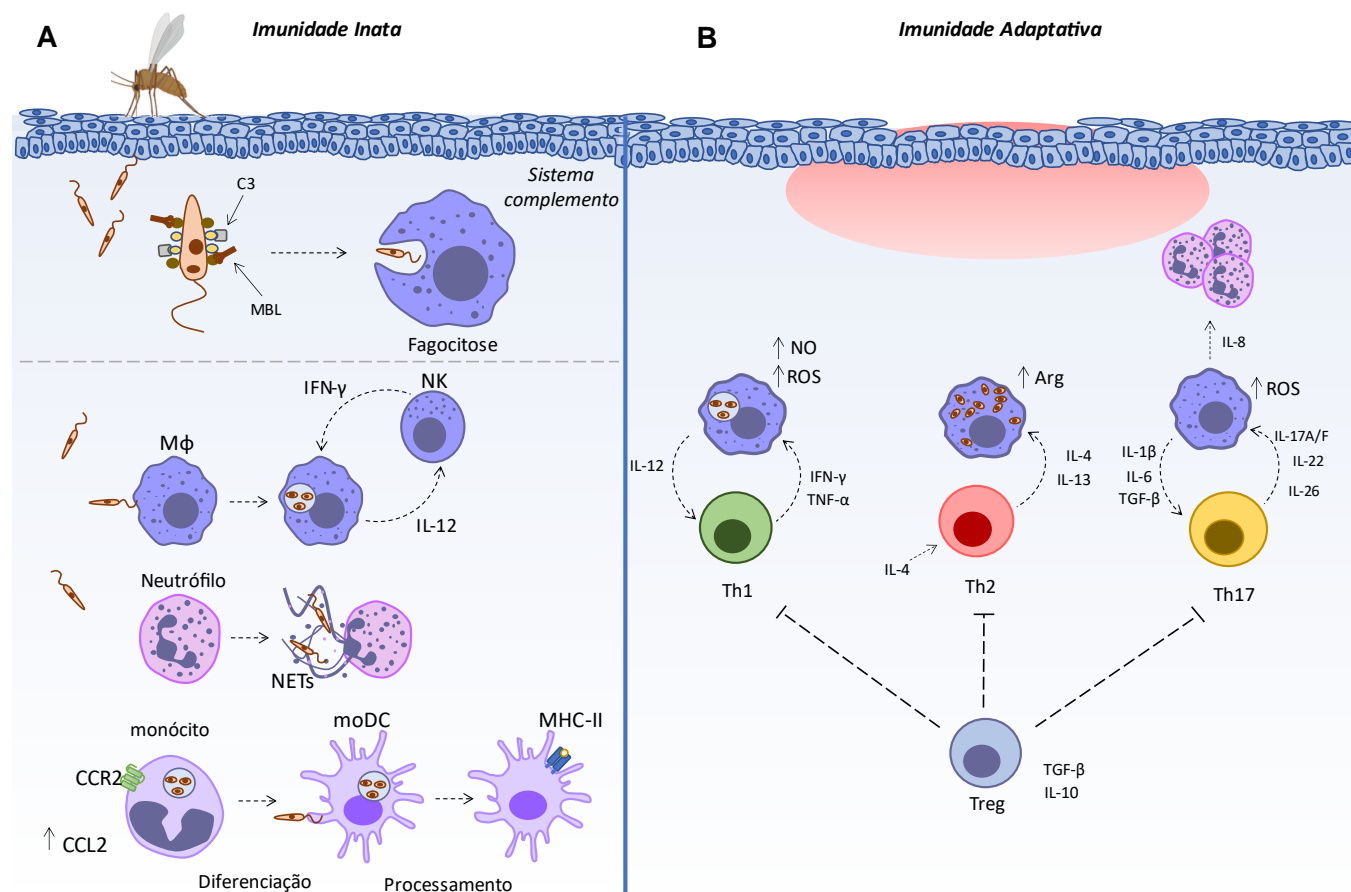
Durante a inoculação do parasito na derme, moléculas vasodilatadoras e imunomodulatórias presentes na saliva do vetor são liberadas no sangue do hospedeiro, estimulando assim a reação inflamatória local levando a ativação do sistema complemento e a produção de moléculas quimioatraentes como as quimiocinas que atuam no recrutamento das células para o tecido (CARREGARO et al., 2013).

Camundongos BALB/c pré-expostos à saliva, contendo a proteína *Salivary Gland Sonicate* (SGS), do vetor *Lutzomyia intermedia* desenvolveram anticorpos específicos contra a saliva e foram capazes de modular uma resposta imune com baixa taxa de IFN- $\gamma$  e IL-4. Ainda, os pacientes oriundos da mesma área endêmica quando examinados mostraram altos níveis de anticorpo contra saliva de *L. intermedia* (DE MOURA et al., 2007).

Além da saliva, moléculas presentes na membrana do parasito também interagem com proteínas do sistema complemento. Fragmentos C3b se ligam na membrana celular do parasito e logo se convertem em iC3b facilitando a fagocitose via receptores CR3 (**Figura 5A**) (SERRANO-COLL et al., 2021; WOZENCRAFT; BLACKWELL, 1987). A proteína MBL (do inglês, *Mannose-binding lectin*), outro membro do sistema complemento, se liga à superfície de *L. baziliensis*, contudo não é capaz de induzir efeito lítico no parasito (**Figura 5A**) (AMBROSIO; DE MESSIAS-REASON, 2005).

Receptores da membrana de células inatas presentes no local da infecção atuam no reconhecimento de estruturas padrão presentes na membrana do parasito. Tais receptores, como receptores tipo Toll (TLRs) que induzem ativação de fagócitos na tentativa de conter a infecção. Os receptores de membrana TLR4 (KROPF et al., 2004), TLR2 (BECKER et al., 2003), e também internos como TLR3 (FLANDIN; CHANO; DESCOTEAUX, 2006) e TLR9 (LIESE; SCHLEICHER; BOGDAN, 2008), ativam as células inatas na presença de *Leishmania*, e passam a produzir IL-12 ativando células NK locais a produzirem IFN- $\gamma$  ajudando a conter a infecção (**Figura 5A**), porém ainda é necessária a participação da resposta imune adaptativa (LIESE; SCHLEICHER; BOGDAN, 2008).

**Figura 5 - Imunidade Inata contra *Leishmania* spp**



Fonte: José Júnior (2023)

O contato com as células locais, no momento inicial da infecção, induz a produção de quimiocinas resultando no recrutamento de diversas células, em especial os neutrófilos que chegam rapidamente ao local da infecção (PETERS et al., 2008). Com microscopia intravital dinâmica foram observadas rápidas formações de infiltrados de neutrófilos no local de inoculação do parasito em camundongos C57BL/6 infectados com *L. major* (PETERS et al., 2008).

Os neutrófilos apresentam uma estratégia em particular, uma armadilha conhecida como NETs (*Neutrophil extracellular Traps*), no qual liberam uma rede composta por fibras, DNA, grânulos e proteínas (**Figura 5A**), que é capaz de eliminar parasitos *Leishmania* como foi demonstrado com promastigostas de *L. amazonensis*

(GUIMARAES-COSTA et al., 2009). No entanto, neutrófilos sofrem NETosis, morte celular decorrente da liberação de NETs. Neutrófilos apoptóticos fagocitados por macrófagos também podem atuar como “Cavalo de Tróia” contribuindo com o aumento da infecção por *Leishmania* (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003).

Monócitos e células dendríticas (DC) são recrutadas após a liberação de CCL2 estimulada por PDGF local. Monócitos de camundongos deficientes para CCR2 mostraram um profundo defeito na migração durante a infecção por *L. major* (GONCALVES et al., 2011). Durante a infecção uma forte ativação plaquetária foi relacionada a produção PDGF, que induziu também a liberação de CCL2 (GONCALVES et al., 2011). Então, os monócitos positivos para CCR2 foram capazes de migrar e eliminar rapidamente *L. major* (**Figura 5A**) (GONCALVES et al., 2011).

Em camundongos, o papel de CCR2 também mostrou ser essencial para a diferenciação de monócitos em células dendríticas, as células apresentadoras de antígeno profissionais (do inglês *Antigen presenting cells* - APCs) (COSTA et al., 2016) (**Figura 5A**). Monócitos CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Ly6C<sup>+</sup> da medula óssea de camundongos CCR2<sup>-/-</sup> e C57BL/6 não infectados foram corados com CFSE e transferidos para camundongos CCR2<sup>-/-</sup> infectados por *L. braziliensis*. Após a transferência, altas quantidades de células CD11c<sup>+</sup> foram encontradas em camundongos C57BL/6 do que em camundongos CCR2<sup>-/-</sup> mostrando que o *knockout* do gene *CCR2* impediu a diferenciação de monócitos em células dendríticas no local da infecção (COSTA et al., 2016).

Células dendríticas CD11c<sup>high</sup>CD11b<sup>high</sup>Gr-1<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> mostraram ser importantes na apresentação de antígenos de *L. major* no linfonodo e foram capazes de induzir respostas específicas de células T durante a fase aguda da infecção (IEZZI et al., 2006). Camundongos Irf4<sup>fl/fl</sup>CD11c-Cre específicos mostraram um aumento de respostas Th1 decorrente da liberação de IL-12 (AKBARI et al., 2014). Isso demonstrou que essas células dendríticas cumprem um papel essencial não só na apresentação antigênica, mas também na indução de repostas Th1 por liberação de IL-12 dependente da atividade de IRF4.

## Imunidade adaptativa

Com o estímulo das células dendríticas nos linfonodos próximos, células T CD4<sup>+</sup> naïves se diferenciam em células Th1 (AKBARI et al., 2014). As células Th1 medeiam o mecanismo de defesa da imunidade adaptativa controlando a replicação *Leishmania* ssp. Embora os mecanismos Th1 sejam essenciais para a defesa do hospedeiro, ainda assim uma resposta Th1 exacerbada pode trazer o aumento da lesão ao hospedeiro (ANTONELLI et al., 2005).

As células Th1 são caracterizadas pela produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , citocinas pró-inflamatórias, que quando liberadas no local da infecção ativam a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) em fagócitos infectados (**Figura 5B**). Em camundongos CH3, macrófagos derivados da medula óssea ativados por LPS/IFN- $\gamma$  eliminaram *L. amazonensis* amastigotas por meio da produção de óxido nítrico e superóxidos (MUKBEL et al., 2007). Entretanto, monócitos humanos ativados por IFN- $\gamma$  produzem espécies reativas de oxigênio e controlam a replicação de *L. braziliensis* amastigotas, mas o mesmo não foi observado com óxido nítrico (CARNEIRO et al., 2016; NOVAIS et al., 2014).

Por outro lado, células tipo Th2 são caracterizadas por propriedades anti-inflamatórias as quais são induzidas por IL-4. A ativação do fenótipo Th2 por IL-4 não é bem definida, mas acredita-se que a baixa afinidade dos receptores TCR à antígenos *Leishmania*-específicos em uma pequena população de células T podem acarretar a produção de IL-4 (HIMMELRICH et al., 2000). Células Th2 são secretoras de IL-4, IL-5 e IL-13 as quais inibem repostas inflamatórias promovendo uma resposta suscetível à infecção por *Leishmania* spp (**Figura 5B**). A resposta Th2 suscetível à *Leishmania* foi bem documentada em diversos trabalhos (KOPF et al., 1996; MOHRS et al., 1999; MURAILLE et al., 2003; STAMM et al., 1998).

Controversamente, Noben-Trauth e colaboradores demonstraram que BALB/c IL4<sup>-/-</sup> e IL-4R $\alpha$ <sup>-/-</sup> permaneceram suscetíveis à *L. major* o que levou a mais discussões sobre a imunidade suscetível de modelos murinos experimentais (NOBEN-TRAUTH; KROPF; MÜLLER, 1996). Posteriormente, foram geradas deleções de IL-4R $\alpha$  específicas para células T CD4<sup>+</sup> (T CD4<sup>+</sup> Lck<sup>cre</sup>IL-4R $\alpha$ <sup>-/lox</sup>) em camundongos BALB/c para elucidar o

papel específico da sinalização de IL-4R $\alpha$  em células T CD4<sup>+</sup> e células não T CD4<sup>+</sup>. Esses camundongos T CD4<sup>+</sup> Lck<sup>cre</sup>IL-4R $\alpha$ <sup>-/lox</sup> infectados por *L. major* mostraram resistência correlacionada com baixos níveis de IL-10 e indução da expressão de IL-12p35 mRNA, o que levou a aumentos de repostas de hipersensibilidade do tipo tardia, produção de IFN- $\gamma$ , aumento da taxa de iNOS mRNA por parasito semelhante ao fenótipo C57BL/6 resistente, contrastando com BALB/c IL-4R $\alpha$ <sup>-/lox</sup> (RADWANSKA et al., 2007). Também foi mostrado resistência de camundongos BALB/c T CD4<sup>+</sup> Lck<sup>cre</sup>IL-4R $\alpha$ <sup>-/lox</sup> contra *L. mexicana*, porém somente em camundongos fêmeas (BRYSON et al., 2011).

IL-13 apresenta um papel biológico similar a IL-4 e também confere risco à infecção por *Leishmania*. Mesmo na ausência da expressão de IL-4, camundongos C57BL/6 com alta expressão de IL-13 apresentaram suscetibilidade à *L. major*, levando a supressão de IL-12 e IFN- $\gamma$  (MATTHEWS et al., 2000b). A IL-13 mostrou ser a citocina Th2 predominante nas células mononucleares periféricas do sangue de pacientes com LC infectados por *L. guyanensis* (BOURREAU et al., 2001). Além do mais, a IL-13 provocou a regulação negativa de IL-12R $\beta$ 2 tornando assim as células T específicas não responsivas a IL-12 (BOURREAU et al., 2001).

Quanto as células Th17, produtoras de IL-17A/F, a diferenciação é induzida por IL-1 $\beta$ , IL-23, TGF- $\beta$  mais a IL-6 e possuem papel importante para o recrutamento de neutrófilos (**Figura 5B**) (KOSTKA et al., 2009; MCGEACHY et al., 2007; SANTOS et al., 2013). A ausência de IL-10 e o bloqueio IFN- $\gamma$  em camundongos C57BL/6 infectados por *L. major* levou a progressão da doença e o crescimento de lesões com baixa carga parasitária e aumento significativo de IL-17 e neutrófilos (GONZALEZ-LOMBANA et al., 2013). IL-17, citocinas indutoras do fenótipo Th17 e infiltração de neutrófilos foram detectados no sítio de infecção sustentando o envolvimento de células Th17 na gravidade da patogênese de LM (BOAVENTURA et al., 2010). Pacientes com LM infectados por *L. braziliensis* produzem altas concentrações de IL-17 no local da lesão (BACELLAR et al., 2009). Todavia, Th17 também demonstrou um papel protetor quando induzida por injeções de proteínas de *L. donovani* em camundongos BALB/c (AMIT et al., 2017).

Células Treg (T regulatórias), secretoras de IL-10 e TGF- $\beta$ , atuam inibindo respostas inflamatórias exacerbadas no local da inflamação (**Figura 5B**) (BELKAID,

2003). Camundongos BALB/c infectados por *L. panamensis* mostraram que a ausência de células Treg está associada com respostas inflamatórias exacerbadas levando ao aumento da lesão (EHRLICH et al., 2014). Em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*, o tratamento com CXCL10 reduziu significativamente a população de células T reg (CD25-Foxp3-IL-10+ e CD4+CD25+Foxp3+IL-10+), o número de parasitas e a esplenomegalia (EUFRÁSIO DE FIGUEIREDO et al., 2019).

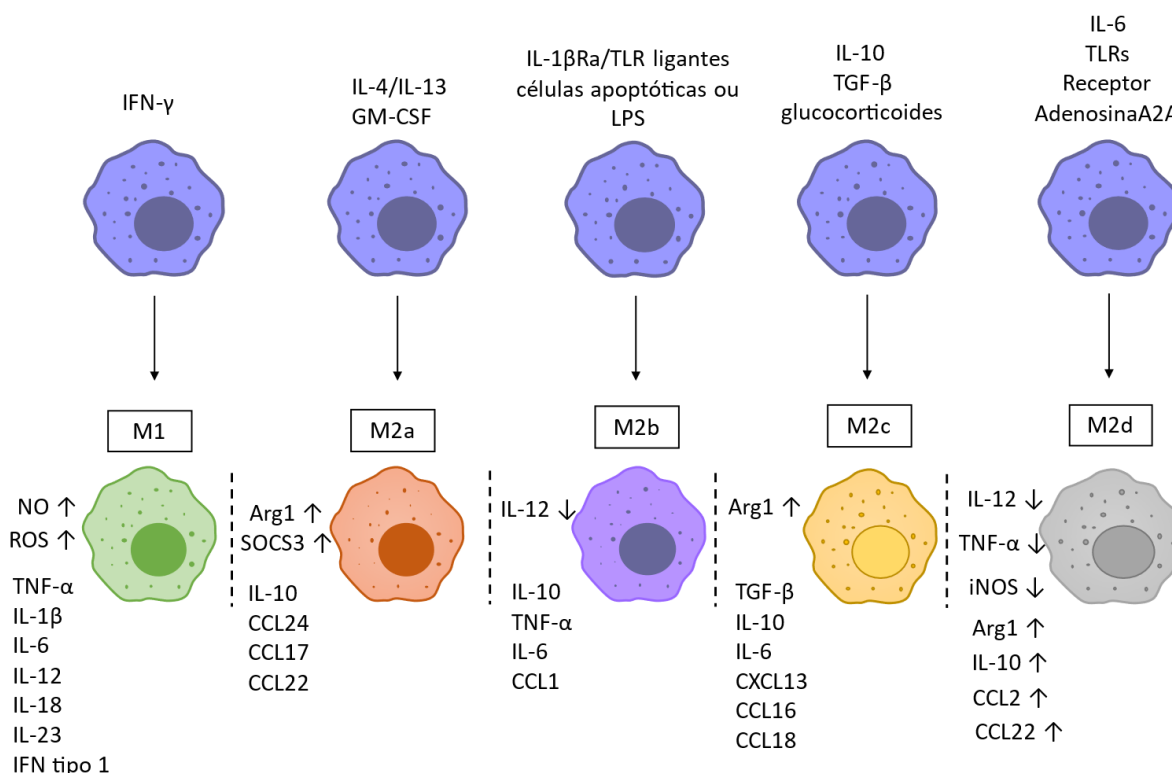
A atuação das células imunes inatas no local da infecção, em grande parte, é coordenada pelas células T CD4<sup>+</sup> efectoras (Th1, Th2, Th17 e Treg). A polarização de macrófagos em dois principais grupos, como ativação clássica (M1) e alternativa (M2), advém do estímulo de citocinas secretadas pelas células efectoras Th1 e Th2. Os macrófagos M1 atuam eliminando o parasito *Leishmania* internalizado por meio da alta produção de espécies reativas oxigênio (ROS) (**Figura 6**). A expressão de ROS (DÍAZ-GANDARILLA et al., 2013) e NO (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014; LIEW et al., 1990), e as citocinas pro-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23, e IFN tipo 1) (T OMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018) caracterizam o fenótipo M1.

No entanto, diferente dos macrófagos M1, os macrófagos M2 se subdividem em M2a, M2b, M2c e M2d (**Figura 6**) (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018). Os M2a são polarizados em resposta a IL-4/IL-13 e GM-CSF e se caracterizam pela alta expressão de arg1, IL-10, SCOS3 e produzem CCL24, CCL17, e CCL22 atuando no recrutamento de células Th2 e eosinófilos (FRATERNALE; BRUNDU, 2015). Os M2b são induzidos por IL-1 $\beta$ Ra/TLR ligantes, células apoptóticas ou LPS e secretam IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6, CCL1 e baixa expressão de IL-12 (ASAI et al., 2012; FRATERNALE; BRUNDU, 2015). O M2c é resultado do estímulo de IL-10, TGF- $\beta$  e glucocorticoides e secretam IL-10, TGF- $\beta$ , CXCL13, CCL16 e CCL18, e também expressam altos níveis de arg1 e atuam na regeneração do tecido. M2d são promovidos em resposta a IL-6, TLRs e agonistas para o receptor de adenosina A2A, expressam baixos níveis de IL-12, TNF- $\alpha$  e iNOS, porém expressam altos níveis de IL-10, CCL2, CCL22 e Arg1 (WANG et al., 2010).

A produção de ROS e NO são essenciais para controlar diferentes espécies de *Leishmania*, por exemplo, ROS mostrou controlar melhor *L. braziliensis* que NO

(CARNEIRO et al., 2016), enquanto NO teve sucesso em eliminar *L. major* (LIEW et al., 1990).

**Figura 6 - Diferentes fenótipos de macrófagos**



Fonte: José Júnior, 2023

IL-4 e IL-13 apresentam importante papel na ativação alternativa desses macrófagos em resposta a *Leishmania*. Os M2 (como M2a e M2c) que apresentam alta expressão de Arg1 inibem a ação microbicida de iNOs e regulam negativamente a expressão de enzimas produtoras de NO (ACUÑA et al., 2017). Arginase 1 age consumindo L-arginina, precursor do NO, e transformando-a em uréia e L-ornitina inibindo assim a produção de NO (ACUÑA et al., 2017). Altos níveis de Arg-1, TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub> foram encontrados no plasma de pacientes com LC infectados por *L. amazonensis* (FRANÇA-COSTA et al., 2015). Diferentes cepas de *L. mexicana* isoladas de pacientes com LC e LCD mostraram que a cepa de LCDA, mais virulenta, possuía alta atividade de Arg-1 do que a cepa de LC (WILKINS-RODRÍGUEZ et al., 2020). Análises de imuno

histoquímica das lesões de LCDA revelaram que os macrófagos altamente parasitados eram positivos para Arg-1 e negativos para NOS2 (WILKINS-RODRÍGUEZ et al., 2020).

## 2.7 Biologia do eixo IL-4/IL-13

IL-4 é uma citocina multifuncional pleiotrópica, com peso molecular de 19 kDa (em humanos). Esta citocina é expressa por células Th2, basófilos, mastócitos, NK1.1, células T NK, células T  $\gamma\delta$ , ILC2 (CHEN; PAUL, 1997; DOHERTY; BROIDE, 2019; SEDER; PAUL, 1994; YOSHIMOTO; PAUL, 1994). Sua estrutura molecular constitui-se de uma forma globular, estabilizada por três pontes dissulfeto composta de duas cadeias beta e quatro hélices antiparalelas. (WALTER et al., 1992).

Na década de 70, estudos tentavam entender a proliferação de linfócitos B com o uso de anti-imunoglobulinas (particularmente anti- $\mu$ ) em diferentes cepas de camundongos (SIECKMANN et al., 1978). Acreditava-se que havia uma célula contaminante produzindo um produto capaz de ativar a proliferação dos linfócitos. Em seguida, o sobrenadante contendo o produto foi testado em células EL-4 e mostrou ser um potencial ativador da proliferação de linfócitos B ativados por anti-IgM. Este ativador foi inicialmente chamado de fator de crescimento de células B (em inglês *B cell growth factor* - BCGF), e posteriormente, fator estimulador de células B 1 (em inglês *B cell stimulatory factor-1*, BSF-1) (OHARA; PAUL, 1985). Somente após sua clonagem, foi identificada e então nomeada como IL-4.

Quanto a IL-13, é uma citocina imunorregulatória de 17 kDa secretada principalmente por células T ativadas, mastócitos e basófilos (GORDON, 2003). Em relação a sua estrutura, IL-13 apresenta uma sequência de 112 amino ácidos quando secretada, com duas pontes disulfeto, quatro  $\alpha$ -hélices e duas folhas- $\beta$  (CHOMARAT; BANCHEREAU, 1998). IL-13 é essencial na defesa contra alergias, asma, câncer e fibrose do tecido (NGUYEN et al., 2020; NUR HUSNA et al., 2022; ROESNER; ZEITVOGEL; HERATIZADEH, 2019; SHI et al., 2021). Sua estrutura possui alta semelhança com IL-4 apresentando quatro hélices e cadeias curtas (MOY et al., 2001).

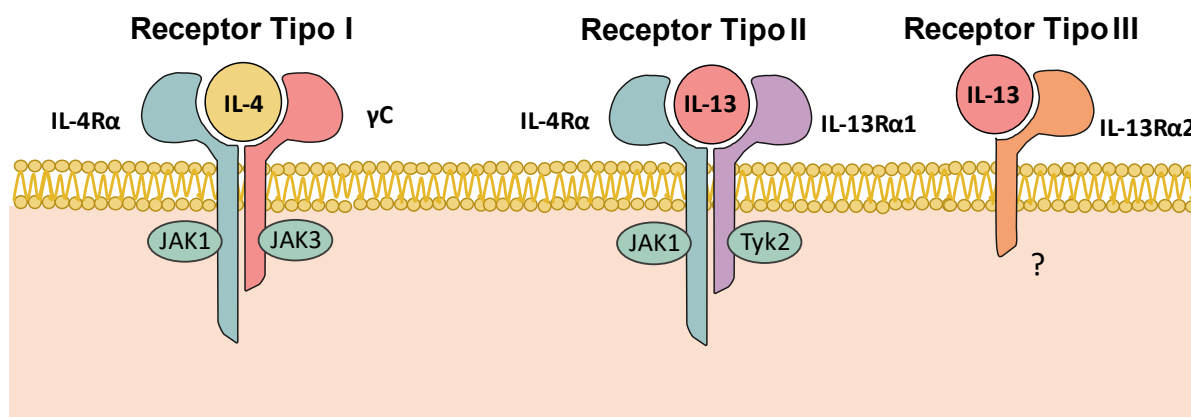
No início da década de 90, análises de bibliotecas de cDNA revelaram uma região codificante derivada de um mRNA com 1.4 kb cuja expressão era regulada por anti-CD28.



Somente em 1993 a proteína codificada por esse cDNA foi então nomeada como IL-13 em um simpósio chamado Keystone Cytokine (MINTY et al., 1993). Posteriormente ficou revelado que esta citocina desempenharia funções biologicamente semelhantes a IL-4 (CALLARD; MATTHEWS; HIBBERT, 1997).

As citocinas IL-4 e IL-13 são altamente homólogas (com 25% homologia), deste modo compartilham receptores comuns (MINTY et al., 1993). Os receptores são divididos em dois grupos principais, os receptores do tipo I são heterodímeros constituídos pelas cadeias IL-4R $\alpha$  (140 kDa) e  $\gamma$ C (60 kDa). Os receptores do tipo II são heterodímeros formados pelas cadeias IL-4R $\alpha$  e IL-13R $\alpha$ 1 (65–70 kDa), e também o receptor tipo III formado apenas por IL-13R $\alpha$ 1 (**Figura 7**) (LETZELTER; WANG; SEBALD, 1998; OBIRI et al., 1995).

**Figura 7 - Receptores de IL-4 e IL-13**



Principais características dos receptores de IL-4 e IL-13 humano. Os receptores Tipo I, II, e III, apresentam em sua região extracelular apresenta dois domínios de FnIII e um motivo WSXWS conservado próximo a membrana. No domínio citoplasmático apresentam domínios com resíduos de tirosina conservados. O receptor do tipo I, restrito à IL-4 é formado pelas unidades IL-4R $\alpha$  e  $\gamma$ C, seus resíduos de tirosina citoplasmáticos podem se ligar à JAK1, JAK3. O receptor tipo II é formado por IL-4R $\alpha$  e IL-13R $\alpha$ 1 pode se ligar à IL-4 e IL-13, seus resíduos de tirosina citoplasmáticos podem se ligar à JAK1, Tyk2. O receptor do tipo III é formado pela unidade IL-13R $\alpha$ 2, ele se liga somente à IL-13 e não possui motivos de ativação de sinalização intracelular. Fonte: José Júnior (2023)

A citocina IL-4 possui alta afinidade pela cadeia IL-4R $\alpha$  ( $K_D = 20 - 300$  pM) comparado as cadeias  $\gamma$ C e IL-13R $\alpha$ 1. A ligação entre IL-4 e IL-4R $\alpha$  leva ao recrutamento de  $\gamma$ C ou IL-13R $\alpha$ 1 para formar o complexo de ativação. A afinidade das cadeias  $\gamma$ C e IL-

13R $\alpha$ 1 ao complexo IL-4R $\alpha$ /IL-4 são semelhantes ( $K_D = 500$  nM) (MCCORMICK; HELLER, 2015).

O IL-4R $\alpha$  pertence a superfamília do receptor de hemopoiética. O seu domínio extracelular consiste em resíduos de cisteína emparelhados chamados de domínio de fibronectina tipo III e uma região próxima a membrana contendo um motivo WSXWS (que significa, Triptofano-Serina-Qualquer amino ácido-Triptofano-Serina). Na região citoplasmática, o IL4R $\alpha$  apresenta cinco resíduos de tirosina altamente conservados, uma curta cauda rica em prolina nomeada de motivo box1 e uma região acídica proximal (NELMS et al., 1999).

Outro membro da superfamília do receptor de hemopoiética, a subunidade  $\gamma_c$ , apresenta um ectodomínio dividido em dois domínios de fibronectina tipo III (FN-III), o primeiro domínio apresenta forma híbrida de dobras Ig, porém o segundo domínio apresenta o tipo comutado de dobras Ig e também apresenta um motivo WSXWS (STAUBER et al., 2006). A subunidade  $\gamma_c$  é compartilhada entre os complexos de receptores das citocinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL15, IL-21 e TSLP (Linfopoiética Estromal Tímica – do inglês *Thymic Stromal Lymphopoietin*) (ROCHMAN; SPOLSKI; LEONARD, 2009).

Partindo em específico para os receptores de IL-13, a cadeia IL-13R $\alpha$ 1, assim como outros receptores da família das citocinas, também apresenta motivos conservados de cisteína e um motivo WSXWS (CHOMARAT; BANCHEREAU, 1998). IL-13R $\alpha$ 1 possui 427 aminoácidos e baixa afinidade ( $K_D=30$ nM), porém quando em associação a IL4R $\alpha$  a afinidade é marcadamente aumentada ( $K_D=400$ pM) (HERSHEY, 2002; MCCORMICK; HELLER, 2015).

Baixas quantidades de IL-13R $\alpha$ 1 são expressas em linfócitos enquanto alta expressão desse receptor é observada tanto em células não-hematopoiéticas quanto em células mieloides (JUNTTILA, 2018). A expressão IL-13R $\alpha$ 1 é amplamente encontrada em qualquer tipo de célula, exceto em células T humanas bem como células B e T de murinos (AKAIWA et al., 2001; GRABER et al., 1998).

Outro receptor capaz de se ligar a IL-13 é a cadeia IL-13R $\alpha$ 2. Assim como IL-13R $\alpha$ 1, IL-13R $\alpha$ 2 também apresenta quatro motivos conservados de cisteína e um motivo

WSXWS e diferentemente de IL-13R $\alpha$ 1, a cadeia IL-13R $\alpha$ 2 apresenta alta afinidade para IL-13 ( $K_D=250\text{pM}$ ), no entanto IL-13R $\alpha$ 2 possui uma curta cauda citoplasmática com ausência de domínio de interação para ativação de uma via intracelular desempenhando um papel de receptor de “captura” acarretando a regulação negativa de IL-13 (LUPARDUS; BIRNBAUM; GARCIA, 2010).

A expressão da cadeia IL-13R $\alpha$ 2 é amplamente distribuída, de modo semelhante a cadeia IL-13R $\alpha$ 1. As cadeias IL-13R $\alpha$ 2 podem ser encontradas em células epiteliais respiratórias, monócitos primários e intracelularmente em monócitos cultivados (DAINES; KHURANA HERSHEY, 2002).

### **Ativação e sinalização pelo IL-4R**

Inicialmente a proteína IL-4 se liga com alta afinidade ao domínio de ligação da subunidade IL-4R $\alpha$  levando ao recrutamento da subunidade  $\gamma$ c para formar um complexo de ativação heterotrimerico IL-4R $\alpha$ /IL-4/ $\gamma$ c (PFEILSCHIFTER, 1994). A porção citoplasmática do IL-4R $\alpha$  apresenta cinco resíduos de Tirosina (Y497, Y575, Y603, Y631, Y712) com potenciais sítios para fosforilação. Tirosina cinases Src fosforilam os domínios contendo Tirosina criando sítios de ancoragem para membros da família da Janus tirosina cinases (Jak; do inglês *Janus Tyrosine Kinases*), IRS1/2 e STAT6 nas cadeias do complexo IL-4R promovendo a cascata de sinalização (NELMS et al., 1999).

A tirosina Y497 está localizada em um motivo N-terminal em um intervalo PL-(X)<sub>4</sub>-NPxYxSxSD chamado de motivo I4R (em inglês *Insulin IL4 receptor*). Quando fosforilado, este domínio é responsável por interagir IRS-1/2 o que foi demonstrado em experimentos com a truncação do receptor IL-4R humano (KEEGAN et al., 1994).

### **Via IRS1/2**

A proteína IRS1/2 apresenta 20 sítios específicos de interação para domínios SH2 (Src Homology 2). Proteínas com domínio SH2 como PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) e Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) interagem com o sítio de ancoragem de IRS1/2 fosforilado (METZ; HOUGHTON, 2011; SKOLNIK et al., 1993; YAMAUCHI et al., 1998). Essas interações conduzirão a ativação das vias PDK1 e

Ras/MAPK (VANHAESEBROECK; ALESSI, 2000; WELLS; DOWNWARD; MALLUCCI, 2007).

### **Via PI3K/Akt**

A PI3K é um heterodímero composto por um complexo p85-p110. A subunidade p85 mantém a subunidade p110 inativa (YU et al., 1998). Após a interação do domínio SH2 da subunidade de p85 com IRS, a subunidade p110 torna-se cataliticamente ativa (LAMS et al., 1994). A subunidade p110 ativa é capaz de interagir com substratos de fofatidilinositol, convertendo-os para PIP2 (do inglês *Phosphatidylinositol (4,5) -bisphosphate*) e PIP3 (do inglês *Phosphatidylinositol (3,4,5) -trisphosphate*)(METZ; HOUGHTON, 2011).

De fato, camundongos C57BL/6 knockout para subunidade p110 $\gamma$  infectados por *L. mexicana* apresentaram diminuição significativa no tamanho de lesões no tamanho das lesões, baixa carga de parasitos e baixa quantidade de células recrutadas para o local da infecção (CUMMINGS et al., 2012). Além disso, o linfonodo dos camundongos estimulados com LmAg produziram quantidades significativamente baixas de IL-10 comparado aos camundongos selvagens, no entanto, quantidades de IL-4 não apresentaram nenhuma diferença entre os grupos do estudo (CUMMINGS et al., 2012).

Com a produção de PIP3, a proteína PDK1 (do inglês *Phosphoinositide-dependent Kinase-1*) é recrutada para as proximidades dos lipídios da membrana. O domínio PH (do inglês *Pleckstrin Homology*) carboxiterminal de PDK1 se liga com alta afinidade ao PIP3 e PIP2 levando ao recrutamento de PKB/Akt para região da membrana e ativado pela interação com PDK1 (BAYASCAS et al., 2008; CURRIE et al., 1999).

Uma vez ativado, Akt irá inibir a ação pró-apoptótica de membros da família Bcl2, através da fosforilação direta do resíduo S136 em BAD (do inglês *Bcl-2-associated death promoter*) que irá atrair proteínas 14-3-3. As proteínas 14-3-3 se ligam a BAD impedindo que o complexo pró-apoptótico BAD/Bcl-XL seja formado e migre para a mitocôndria (DATTA et al., 2000). Assim como BAD, Akt fosforila o fator de transcrição FOXO, responsável por ativar genes pró-apoptóticos, levando FOXO a se ligar com proteínas 14-3-3 regulando negativamente a expressão de membros pró-apoptóticos da família Bcl-

2 (MANNING; CANTLEY, 2007). Deste modo, a via PI3K leva ao aumento de sobrevivência celular.

A morte celular programada é um mecanismo de defesa evolucionariamente conservado em plantas, insetos e mamíferos em resposta a invasão de patógenos (AMEISEN, 2002). O parasito *Leishmania donovani* inibe a apoptose e a resposta pró-inflamatória em macrófagos. A ativação de Akt em macrófagos infectados por *L. donovani* regula o eixo GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin/FOXO-1 (GUPTA et al., 2016).

A ativação de Akt também foi mostrada em células dendríticas sob infecção de *L. mexicana*. Usando camptotecina, um estimulador para apoptose, em células infectadas por promastigotas de *L. mexicana* foi possível observar a diminuição significativa da fosforilação de p38 e JNK, dois importantes fatores para apoptose (VÁZQUEZ-LÓPEZ et al., 2015). Por outro lado, no mesmo estudo, *L. mexicana* amastigotas foram capazes de induzir a fosforilação por de PI3K e Akt (VÁZQUEZ-LÓPEZ et al., 2015). O que torna a via Akt uma ferramenta para amastigotas *L. mexicana* inibir a apoptose em células dendríticas derivadas de monócitos.

Por sua vez, Akt também estimula o fator de transcrição NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor-kappa B*) através da regulação das subunidades I- $\kappa$ B (*I-kappa B*), pela fosforilação de I $\kappa$ k $\alpha$  (*I-kappa B kinase alpha*) permitindo a translocação de NF- $\kappa$ B para se ligar nos genes alvo (BOOTHBY et al., 2001; LEE et al., 2005).

### **Via Grb2/MAPK**

A Grb2 (do inglês *growth factor receptor-bound protein 2*) é uma proteína adaptadora envolvida na transdução de sinais. Sua estrutura consiste em um domínio SH2 flanqueado por dois domínios SH3 (TAKEMOTO et al., 1998). A fosforilação da Y895 de IRS-1 cria um sítio de ancoragem para SH2 de Grb2 (SKOLNIK et al., 1993). Os domínios SH3 por sua vez são responsáveis por uma interação proteína-proteína com a região rica em prolina de SOS (do inglês *Son of Sevenless*) que atua como fator de troca de guanina para Ras (CHARDIN et al., 1993).

Uma vez que Ras-GDP se torna Ras-GTP, proteínas RAF (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*) são recrutadas para região da membrana onde Ras desfosforila o resíduo

Ser259 do sítio de ligação 14-3-3 inibitório de RAF, liberando a proteína 14-3-3 promovendo uma interação Ras-RAF via domínio CRDs (do inglês *Cys-rich domain*) (DHILLON et al., 2002; LAVOIE; THERRIEN, 2015).

A fosforilação dos resíduos serina/tirosina de RAF (Tir-340, Tir-341, Ser-43, Ser-621) são essenciais para sua ativação. Após a ativação, RAF sofre mudanças conformacionais que ativam sua atividade catalítica específica para os resíduos Ser-218 e Ser-222 de proteínas MEK1 (do inglês, *MAPK/ERK Kinase 1*) (ZHENG; GUAN, 1994). As cinases MEK1 e MEK2 apresentam uma região rica em prolina fortemente responsável pela interação com RAF (CATLING et al., 1995).

Sob a forma ativada, as proteínas MEKs apresentam características de cinase de especificidade dupla fosforilando os aminoácidos Tirosina e Treonina de ERK (do inglês, *Extracellular signal-regulated kinase*) (SEGER et al., 1992).

A proteína ERK mostrou ser fortemente fosforilada em macrófagos de camundongos BALB/c sob estímulo de LPG de *L. braziliensis* com o tempo de 15 minutos de incubação. Por outro lado, a ativação de ERK não foi encontrada sob estímulos de LPG de *L. infatum* (IBRAIM et al., 2013).

A ativação da cinase ERK, é responsável pela fosforilação de diversos fatores de transcrições. O fator de transcrição Elk-1, pertence à família de fatores de transcrição com domínio de ligação de DNA ETS (do inglês, *E twenty-six*) (SHARROCKS, 2001). Elk-1 possui pelo menos nove resíduos de aminoácidos na região C-terminal, dos quais Serina 383 e Serina 389 são essenciais para atividade transcricional (CRUZALEGUI; CANO; TREISMAN, 1999). A fosforilação induzida por ERK, leva a mudanças conformacionais de Elk-1, promovendo a possibilidade de Elk-1 se ligar ao motivo de SRE (*Serum response element*) 5'CAGGA. Em consequência, Elk-1 irá promover a remodelação da cromatina e o recrutamento de coativadores da maquinaria transcricional (BESNARD et al., 2011).

Usando células RAW 264.7 transfectadas com luciferase para ETS foi observado a inibição de transcrição por ETS após infecção por *L. major*, o que se confirmou através da regulação negativa na expressão de mRNA de ETS-2 tanto em macrófagos selvagens

quanto para CD11b deficientes de camundongos BALB/c (RICARDO-CARTER et al., 2013).

AP-1 (da sigla em inglês *activating protein 1*) é um fator de transcrição nuclear heterodímero, formado principalmente pelas subunidades proteicas Fos, Jun e ATF. A subunidade JunB de AP-1 pode ativar a expressão de IL-4 e levar a diferenciação de células Th2, enquanto a subunidade JunD atua como regulador negativo (HARTENSTEIN et al., 2002; MEIXNER et al., 2004). ERK fosforila os resíduos do domínio de transativação carboxil-terminal de c-Fos e domínio N-terminal de c-Jun aumentando a atividade transcricional (MONJE; MARINISSEN; GUTKIND, 2003; WATSON et al., 1998).

A infecção de macrófagos com diferentes espécies *L. donovani*, *L. mexicana* e *L. major* levou a inativação da atividade de AP-1 alterando a ligação com DNA (CONTRERAS et al., 2010). Análises de *western blot* de AP-1 extraído de macrófagos mostraram que as subunidades de AP-1 foram degradadas após infecções por *Leishmania*. Para confirmar, foi observado em *western blot* de imunoprecipitado nuclear de macrófagos infectados a interação de GP63 com a subunidade c-Jun (CONTRERAS et al., 2010). Microscopias confocais mostraram uma considerável diminuição da intensidade de fluorescência de c-Jun, o que não foi observado para macrófagos GP63-/- infectados por *L. major* (CONTRERAS et al., 2010).

Após a fosforilação de c-Fos e c-Jun por ERK, AP-1 é formado e translocado para o núcleo, onde com Elk-1 levará a ativação da expressão de genes de proteínas reguladoras do ciclo celular (ciclina D1, ciclina A, ciclina E, p53, p21Cip1, p16Ink4a e p19ARF) responsáveis pelo crescimento, proliferação e diferenciação celular (SHAULIAN; KARIN, 2002).

### **Via Stat6**

STAT6 é um fator de transcrição que atua na diferenciação e proliferação celular. STAT6 pertencente à família STAT (*signal transducer and activator of transcription*), composta por sete membros (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6) (DARNELL, 1997).

O engajamento de IL-4 com seu receptor leva a ativação de Jak1 e Jak3, que fosforilam os resíduos de aminoácidos na cauda citoplasmática de IL-4R $\alpha$ . Este evento recruta STAT6 para região próxima a cauda do receptor, no qual se liga ao domínio I4R fosforilado por meio do domínio SH2 (WANG; ZAMORANO; KEEGAN, 1998). A ligação de STAT6 na subunidade IL-4R $\alpha$  dispõe a região C-terminal para ser fosforilada por outras cinases intracelulares, o que leva STAT6 a se dissociar da cadeia IL-4R $\alpha$ . Com o resíduo Tir641 da região C-terminal fosforilado, STAT6 se liga ao domínio SH2 de outro STAT6 formando um dímero ativo (MAITI et al., 2005). O dímero STAT6 ativo apresenta um potencial para se ligar a regiões específicas dos genes alvo (HEBENSTREIT et al., 2006).

A migração do dímero de STAT6 para o núcleo ocasionará o recrutamento de co-fatores que atuam em conjunto com o dímero STAT6 levando a formação de uma maquinaria transcricional proteica necessária para ativação do *locus* alvo. Co-fatores CBP e p300 atuam juntamente com STAT6 servindo como ponte para RNA polimerase, além de outros co-fatores como p100, p/CIP e SRC-1 que estabelecem interações com o dímero STAT6 no núcleo (ARIMURA et al., 2004; LITTERST; PFITZNER, 2002; MCDONALD; REICH, 1999; SHANKARANARAYANAN et al., 2001; VÄLINEVA et al., 2005).

A presença de STAT6 é crítica para uma gama de funções celulares, incluindo a diferenciação de células Th2. STAT6 regula positivamente a expressão de Gata3, regulador mestre da diferenciação Th2 (ONODERA et al., 2010). STAT6 medeia o recrutamento e troca do complexo PcG (*Polycomb group*), para TrxG (*Trithorax group*) no *locus* do gene *GATA3* tornando a cromatina permissiva para transcrição através de indução da metilação e acetilação das histonas H3-K4Me3 e H3-K9Ac observado em células Th2 (ONODERA et al., 2010).

Camundongos BALB/c *knockout* para STAT6 (STAT6<sup>-/-</sup>) apresentam mais resistência contra infecção de *L. major* (KAUFFMANN et al., 2018). Em infecção por *L. mexicana*, camundongos BALB/c STAT6<sup>-/-</sup> apresentaram respostas Th1, com alta produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ , e lesões menores contendo baixa carga de parasitos comparados ao STAT6<sup>+/+</sup> (ROSAS et al., 2005).



### **Ativação e sinalização pelo IL-13R**

Os receptores de IL-13 contêm um módulo CRH (Homologia do receptor de citocina, em inglês *Cytokine receptor homology*), formado por dois domínios FnIII (do inglês, *fibronectin type III*). Resíduos de aminoácidos presentes no CRH interagem com IL-13. Análises de mutagênese baseada em homologia revelaram que os resíduos de aminoácidos Tir-207, Asp-271, Tir-315, e Asp-318 no CRH de hIL-13R $\alpha$ 2, do mesmo modo Leu-319 e Tir-321 no CRH de hIL-13R $\alpha$ 1 são essenciais para a ligação a IL-13 (ARIMA et al., 2002). Além disso, o domínio D1, um dos domínios de FnIII, mostrou um papel crítico na ligação e transdução de sinal de hIL-13R $\alpha$ 1 ao se ligar a IL-13, mas não IL-4 (ARIMA et al., 2002).

A ativação do complexo receptor IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1 por IL-13 ou IL-4, leva a fosforilação dos domínios de ancoragem intracelulares de IL-4R $\alpha$  e IL-13R $\alpha$ 1 resultando no recrutamento de proteínas da família Janus cinase. O domínio citoplasmático de IL-13R $\alpha$ 1 humano apresenta dois resíduos de tirosina, Y402 e Y405, no qual servem como sítio de ancoragem para tirosinocinasas. Controversamente, análises usando receptor quimérico para IL-13R $\alpha$ 1, com domínio citoplasmático composto pela cadeia  $\gamma$ c, mostrou uma baixa fosforilação de IRS-2 em resposta a IL-13 (HELLER et al., 2012). Isto sugere uma forte implicação dos domínios extracelulares e transmembranas na indução do sinal em contraste ao intracelular.

Proteínas da família Janus cinase, especialmente JAK1 e Tyk2 migram para as proximidades da cauda citoplasmática dos receptores de IL-4/IL-13 após a ativação. A proteína JAK-1 e JAK-3 se liga aos domínios citoplasmáticos de IL-4R $\alpha$ , enquanto Tyk2 se liga a IL-13R $\alpha$ 1 levando a fosforilação e a ativação da via IRS2 (WELHAM et al., 1995). Através de análises de *Immunoblotting* constatou-se que IL-13 falhou em aumentar a fosforilação de Jak-3, diferentemente de ativações por estímulos de IL-4 (WELHAM et al., 1995).

A fosforilação de Tyk2 por meio do receptor IL-13R $\alpha$ 1 pode ocorrer tanto em células hematopoiéticas quanto em não hematopoiéticas (KEEGAN et al., 1995). Outra molécula ativada por estímulos de IL-13 é conhecida como p170, no qual é equivalente

a 4PS ativada por IL-4. A proteína p170 interage com a subunidade p85 de PI3K através do domínio SH2, ativando a via PI3K (WELHAM et al., 1995). A fosforilação de Tyk2 e JAK1, resultará em uma via similar a ativada por IL-4 descrita anteriormente, no qual compreende o recrutamento de STAT6 para as proximidades dos domínios intracelulares do receptor IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1 e em seguida a fosforilação e ativação de STAT6. Além de ativar também as vias MAPK e PI3K resultando em funções biológicas semelhantes a IL-4 usando o mesmo complexo receptor IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1 (CALLARD; MATTHEWS; HIBBERT, 1997).

A fosforilação de STAT6 no resíduo Y641 é necessária para a interação com outra unidade de STAT6 formando assim um dímero capaz de se ligar ao DNA. Estruturas cristalinas do complexo STAT1-DNA mostraram que o domínio SH2 fosfotirosina possui um papel importante na estrutura do domínio de ligação ao DNA contribuindo na estabilização da interação STAT-DNA (CHEN et al., 1998).

O receptor IL-13R $\alpha$ 2 possui uma curta cauda citoplasmática com ausência de motivos de sinalização e não se associa a um segundo receptor. Além disso, IL-13 se liga com alta afinidade a IL-13R $\alpha$ 2 (LUPARDUS; BIRNBAUM; GARCIA, 2010). Apesar de não apresentar nenhuma sinalização, IL-13R $\alpha$ 2 parece regular a sinalização de IL-4 através de uma interação com o receptor IL-4R $\alpha$ .

Em células epiteliais humanas das vias respiratórias, a alta expressão do receptor IL-13R $\alpha$ 2 reduziu a fosforilação de STAT6 dependente de IL-13 e IL-4 (ANDREWS et al., 2013). Enquanto isso, a expressão de IL-13R $\alpha$ 2 com ausência da curta cauda citoplasmática afetou somente a sinalização ativada por IL-13, sem interferir na via de IL-4 (ANDREWS et al., 2013). Análises usando RTSH (do inglês, *Reverse Two-hybrid System*) também demonstrou que a cauda citoplasmática do receptor IL-4R $\alpha$  interage com a curta cauda citoplasmática de IL-13R $\alpha$ 2 (ANDREWS et al., 2013). Juntos esses resultados mostram o papel de IL-13R $\alpha$ 2 na regulação da sinalização de IL-4.

Citocinas pró-inflamatórias também apresentaram relações com IL-13R $\alpha$ 2. Fibroblastos do pulmão incubados com IL-4, TNF- $\alpha$  e IL-17 analisados por qPCR revelaram que a combinação TNF- $\alpha$  e IL-17 resultou na alta expressão de IL-13R $\alpha$ 2 em

contraste a IL-13R $\alpha$ 1 que diminuiu a expressão na presença de TNF- $\alpha$  (BADALYAN et al., 2014).

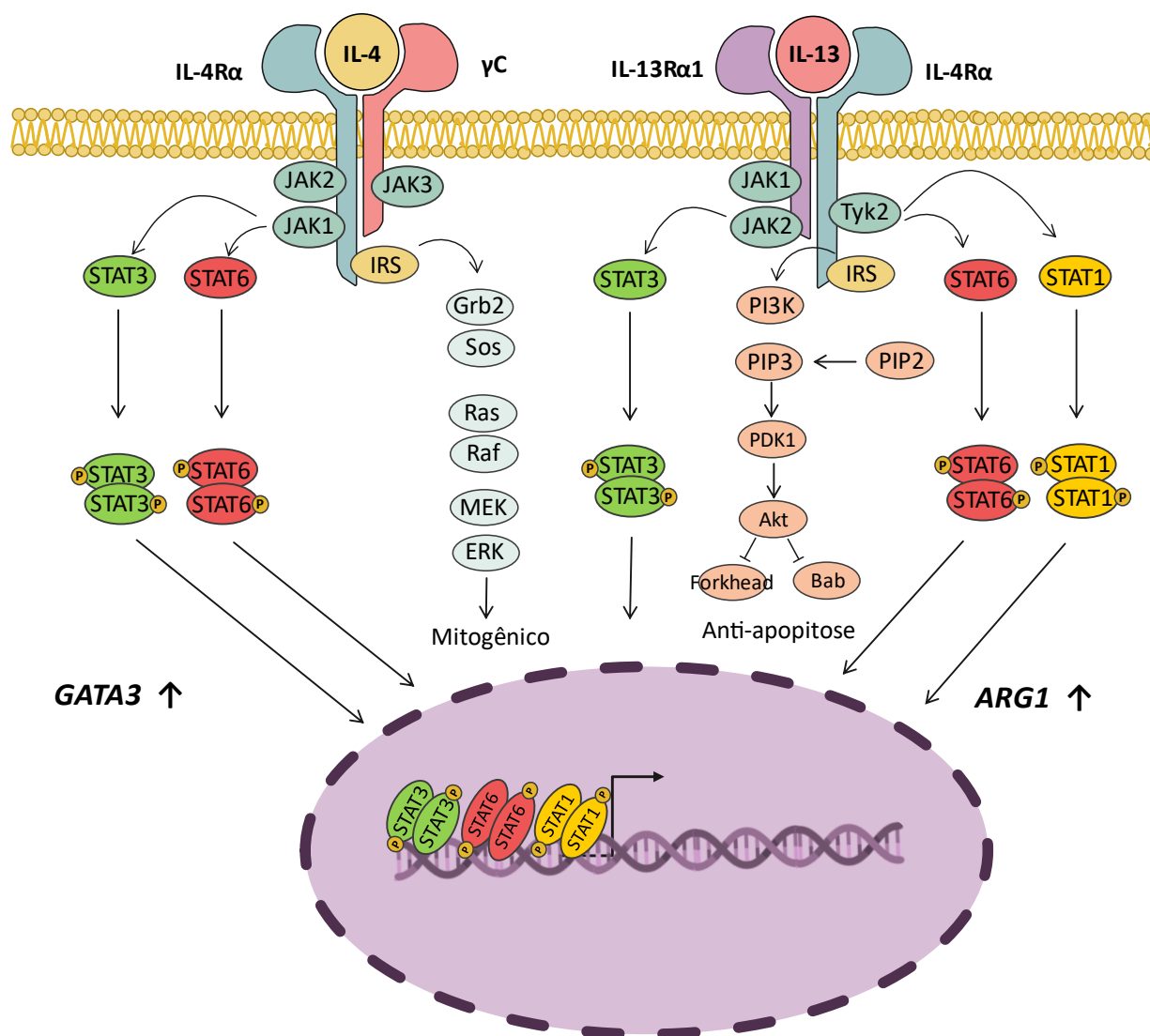
Evidências a respeito de uma sinalização para o receptor IL-13R $\alpha$ 2 surgiram. Em experimentos *in vivo*, fibroses induzidas por bleomicina revelaram o envolvimento da sinalização de IL-13R $\alpha$ 2 induzida por IL-13, que ativou as subunidades de AP-1, c-Jun e Fra-2, e se mostrou necessário para a expressão de TGF- $\beta$ 1 (FICHTNER-FEIGL et al., 2006). Em outro estudo, IL-13R $\alpha$ 2 foi capaz de formar um complexo com quitinase3-tipo 1 (Chi311, *Chitinase3-like 1*), no qual também envolve IL-13. Esta interação foi capaz de regular a fosforilação de ERK1/2, Akt, translocação de  $\beta$ -catenina, acúmulo de c-Fos nuclear e ativação da produção de TGF- $\beta$ 1 durante a metástase de melanoma *in vivo* (HE et al., 2013). Apesar dessas evidências ainda não é totalmente claro como acontece a indução de sinais por IL-13R $\alpha$ 2, pela razão de conter apenas 17 aminoácidos em sua curta cauda citoplasmática, porém acredita-se que um adaptador intracelular possa estar envolvido. A **Figura 8** sumariza a via de sinalização dos receptores de IL-4/IL-13.

## 2.9 Efeitos de variações do tipo SNV.

Os estudos de fatores genéticos do sistema imune foram iniciados por Burton a aproximadamente 65 anos atrás onde o mesmo identificou a agamaglobulinemia como a primeira imunodeficiência (OCHSA; HITZIGB, 2012). Com isso, o avanço da biologia molecular permitiu elucidar e identificar o impacto de fatores genéticos nas funções do sistema imune, de limitações na formação de células a mutações que afetam as funções celulares essenciais para o sistema imunológico, o que leva o hospedeiro à suscetibilidade a diferentes microrganismos.

A variação de um único nucleotídeo ou variação de nucleotídeo único (do inglês, SNV – *single nucleotide variant*) é a mais simples variação do DNA. Essas simples variações ocorrem em uma frequência de 0,1% em dois indivíduos selecionados aleatoriamente (SHASTRY, 2009). Cerca de 50% das SNVs são encontrados em regiões não codificantes das quais 25% levam a mutações não-sinônimas e outras 25% a mutações sinônimas (HALUSHKA et al., 1999).

Figura 8 - Esquematização da via de sinalização IL-4/IL13



Com ativação dos receptores tipo I e II, proteínas da família Janus (JAK2, JAK1, JAK3, Tyk2) e IRS migram e se ligam na região intracelular dos receptores. Inicia-se então uma cascata de sinalizações composta por três vias principais compondo as proteínas Grb2, PI3K e STAT. Grb2 ativará a proteína Ras que levará a ativação de ERK, que induzirá a transcrição de genes responsáveis pelo controle do ciclo celular aumentando a divisão celular. A via de PI3K resultará na ativação Akt que inibirá fatores pro-apoptose aumentando a expressão de genes anti-apoptóticos levando ao aumento da sobrevivência celular. A via de STATs apresenta três vias distintas, STATs fosforilados formarão homodímeros e se translocarão para o núcleo celular para induzir genes alvo. STAT6 induz a expressão de GATA3 responsável pela diferenciação do fenótipo Th2. Fonte: José Júnior (2023).

As SNVs podem influenciar a atividade promotora regulando a expressão gênica, a conformação do mRNA afetando a estabilidade e a eficiência traducional essencial para atividade celular, podendo assim se tornar responsável pela suscetibilidade à doenças, repostas a drogas, evolução genômica e influenciar indiretamente a expressão fenotípica de doenças com ou sem outros fatores (KRAWCZAK et al., 2007; KRAWCZAK; REISS; COOPER, 1992; LOHRER; TANGEN, 2000; SHASTRY, 2009).

Os SNVs impactam causando mudanças traducionais por diferentes maneiras. SNVs podem alterar a eficiência do processo de *splicing*, no qual ocorre a retirada dos íntrons para formação do RNA mensageiro maduro, podendo causar assim diferentes níveis e isoformas de mRNA (ROBERT; PELLETIER, 2018). A troca de base G para C no íntron 3 do gene *TPO* presente no sítio de *splicing* resultou em um encurtamento da região 5' linha (região montante do códon iniciador do quadro de leitura aberta – ORF em inglês, *Open reading frame*) perdendo o códon AUG iniciador. Isso faz com que a tradução ocorra a partir do próximo códon AUG gerando uma proteína truncada, porém inteiramente funcional, mas com os níveis superiores à da proteína gerada pelo mRNA normal (WIESTNER et al., 1998).

Além do envolvimento no processo de *splicing*, as conformações estruturais de mRNAs também podem ser afetados pela presença de SNVs (SHEN; BASILION; STANTON, 1999). As estruturas secundárias do RNA compreendem características como *stem-loops* (BAO et al., 2020), complexos RNA-proteína (FLORES; ATAIDE, 2018) e G-quadruplexes (FAY; LYONS; IVANOV, 2017) importantes para suas funções biológicas. Mudanças nessas estruturas de RNA levam a diferentes formas alélicas de mRNA, podendo influenciar no processo de *splicing*, controle traducional e regulação (SHEN; BASILION; STANTON, 1999). Com sondagem enzimática de fragmentos alélicos de mRNA por nucleases S1 mostrou-se que a presença do alelo U no mRNA de alanil tRNA sintetase (AARs) gera diferentes padrões de clivagem à aproximadamente 14 nucleotídeos de distância do SNV (nucleotídeo 999) comparado a presença do alelo C, também foi similarmente observado em mRNA da proteína RPA70 onde foram detectadas intensas clivagens de S1 a 18 nucleotídeos de distância do alelo U (nucleotídeo 1656) quando comparado ao alelo C (SHEN; BASILION; STANTON, 1999).

Experimentos demonstraram que a troca de G por C na posição 7 na estrutura G-quadruplexes dentro da região 5' linha no RNAm AASDHPPT (aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase) foram associadas com o aumento dos níveis de proteínas, porém os níveis de expressão de RNAm permanecem sem alteração (BEAUDOIN; PERREAULT, 2010). Isso demonstra como variantes SNVs podem alterar a eficácia de tradução de RNAm.

SNVs também afetam a tradução através da alteração no padrão de leitura do mRNA. A troca de um nucleotídeo na região 5' pode gerar um novo códon iniciador AUG a montante do códon iniciador do ORF principal e inserir uma nova sequência de leitura que pode ser traduzida, tais alterações são conhecidas como uAUG in-Frame. Esta mutação redireciona a síntese de proteína para um novo sítio gerando uma proteína com região N-terminal estendida.

Entretanto, se uma mutação criar um uAUG iniciador fora do ORF principal, proteínas 43s PICs podem ler o novo códon iniciador criando um uORF fora do ORF principal fazendo com que os ribossomos não sintetizem o ORF principal diminuindo a produção da proteína, esta mutação é denominada uORF out-of-Frame. Como foi demonstrado, indivíduos com  $\beta$ -talassemia e distonia dopa responsiva com mutação a 26 e 22 nucleotídeos de distância do início do gene possuem um novo codón iniciador que diminui a produção das proteínas  $\beta$ -globina e GTP ciclohidrolase 1, respectivamente (ARMATA et al., 2013; CAI et al., 1992).

Outra importante influência, é a presença de SNVs em regiões regulatórias, que podem causar um impacto relevante para o fenótipo, como por exemplo, nas regiões promotoras. A região promotora de um gene é composta pela sequência de DNA que define o início da transcrição e também abriga os sítios de ligação para fatores de transcrição (NATURE, 2014).

Um estudo computacional revelou que de 34.858 SNVs mapeados para 13.723 regiões promotoras, 2.078 (5.9%) desses SNVs estavam localizados em sítios de ligação para fatores de transcrição e 1.969 (5.6%) possuem dois alelos e introduzem um novo sítio de ligação, sendo os SNVs de transversão, tipo de SNV onde ocorre a troca de uma

purina por uma pirimidina, os mais abundantes na região do sítio de início transcricional (GUO; JAMISON, 2005).

Variantes da região promotora dos genes *TNFA* ( -857 C/T), *IL8* ( -845 T/C) e *IL10* (-592 C/A) foram associados com aumento do risco ao câncer gástrico, com *IL10* -592 C/A associado ao aumento do risco a gastrite crônica e portadores do alelo C para *IL8* -845 tiveram um aumento significativo da expressão do gene em ambos os grupos, câncer gástrico e gastrite crônica, o que foi reforçado em análises *in silico* demonstrando que o alelo C -845 é responsável por sítios de ligação de dois fatores de transcrição, REL e CREB, envolvidos na expressão do gene (DE OLIVEIRA et al., 2015).

Trocas de nucleotídeos na região intrônica também pode regular de maneira importante o processo de *splicing*, atrapalhando sítios de *splicing* existentes, criando sítios novos ou ativar novas sequências de transcritos, que são sequências não canônicas ou pseudo sítios de *splicing* (ANNA; MONIKA, 2018). Estas alterações podem influenciar a ligação de aumentadores e silenciadores de *splicing* ou alterar a estrutura secundária de pré-mRNA impedindo a ligação de elementos do spliceossoma (ANNA; MONIKA, 2018). Estes tipos de efeitos foram encontrados nos genes, *CFTR* c.1525-1G>A (RAMALHO et al., 2003), *NF1* c.1845+1G>A (FANG et al., 2001), *AR* c.2450-118A>G (KÄNSÄKOSKI et al., 2016).

Apesar das variantes intrônicas, variantes no éxon também podem regular o processo de *splicing*. Como por exemplo a variante 3362A>G *NF1* que dá origem a duas isoformas, um troca o aminoácido Glu por Gly na proteína e a outra com ausência do éxon 20 (XU et al., 2014).

Mais recentemente, de acordo com análises *in silico* foi demonstrado que a variante c.1012C>G (p.Leu338Val) presente no gene *RHD*, codificante da proteína antígeno D do grupo sanguíneo Rh, interrompeu o *splicing* afetando a expressão da proteína (RAUD et al., 2021).

Em suma, todos esses efeitos causados por variações genéticas do tipo SNV mostram o quão relevante é o papel desse tipo de variação, em diferentes localizações de um gene, para regulação de vias de importância biológica e, em particular, para o sistema imunológico.

## 2.10 Variações SNV e Leishmaniose Cutânea (LC).

Muitos estudos tem sido realizados para investigar o papel das variações genéticas em genes da resposta imune e seu papel na regulação do desfecho clínico da LC. Sobre tudo estudos de variações genéticas em genes de citocinas, pois elas desempenham papel na regulação da inflamação, imunidade e hematopoiese.

Com citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12, muitos estudos trazem resultados de variações causando suscetibilidade à LC. Um haplótipo específico no gene *IFNG*, por exemplo, foi associado a suscetibilidade à LC causada por *L. guyanensis* e também foi correlacionado a baixos níveis de IFN- $\gamma$  circulante no plasma (DA SILVA et al., 2020). Na população da Arábia Saudita, o alelo A da variante TNF -308 A/G (rs1800629) conferiu suscetibilidade a infecção por *L. tropica*, mas não para *L. major* (AHMED et al., 2020). Apesar do importante papel de IL-12 para LC, a variante *IL12B*+1188 (rs17875322) não foi associada a LC causada por *L. braziliensis* (DE JESUS FERNANDES COVAS et al., 2013).

Variações genéticas em citocinas do tipo Th2, em particular IL-4, também foram alvo de estudos. O alelo C e o genótipo C/C da variante IL-4 -590 C/T (rs2243250) foi mais presente em pacientes com LC comparado ao grupo assintomático na população iraniana conferindo risco a infecção (KAMALI-SARVESTANI et al., 2006). Outro estudo mostrou que o alelo C da variante rs2070874 C/T no gene *IL4* está associada ao fenótipo DTH-, considerado um marcador suscetibilidade à LV causada por *L. chagasi* em uma população no nordeste do Brasil (JERONIMO et al., 2007). Ainda assim, mais estudos sobre os genes Th2 (IL-13, IL-4 e IL-5) são necessários para se conhecer o papel desses genes sobre a doença.

Quanto a variações nos genes que codificam citocinas do tipo Th17 (IL-17, IL-22), o alelo A da variante rs2275913 A/G no gene *IL17A* mostrou fraca associação com suscetibilidade à LC causada por *L. braziliensis*, porém altas cargas parasitárias foram encontradas nos portadores do alelo A reforçando o papel de *IL17A* na suscetibilidade (GONÇALVES DE ALBUQUERQUE et al., 2019). Enquanto isso, um haplótipo TAAA/TAAG de variantes (rs2227501, rs2227503, rs2227513 e rs1026786) do gene *IL22* foram associadas à suscetibilidade a VL (KALANI et al., 2021). No gene de IL-1 $\beta$ , citocina



que estimula a diferenciação de Th17, o alelo C da variante *IL1Brs16944* T/C confere risco à infecção por *L. guyanensis* (DA SILVA et al., 2019).

Células T reg, secretam citocina IL-10 e o fator de crescimento TGF- $\beta$ , que regulam negativamente a expressão de outras citocinas. Foi demonstrado que alelo C da variante *IL10-819C/T* confere suscetibilidade à infecção por *L. braziliensis*, e também o genótipo *IL10-810C/C* foi associado com altos níveis de IL-10 quando comparado aos demais genótipos mostrando assim um papel importante do gene *IL10* para o desenvolvimento de lesões em pacientes infectados por *L. braziliensis*. Para o gene *TGFB1*, genótipos G/C e C/C da variante -1082A/G presente na região promotora também conferiu risco à LC causada por *L. braziliensis* (SHEHADEH et al., 2019).

Genes de receptores de células do sistema imune também mostram relevância no desenvolvimento da doença. O alelo T da variante rs11805303 T/C do gene *IL23R* mostrou aumento de 80 a 200% de risco para o desenvolvimento de LC causada por *L. guyanensis* e homens portadores do genótipo rs11805303 T/T apresentaram altos níveis de IL-17 circulantes no plasma (SANTOS DA SILVA et al., 2022). No receptor de quimiocina, CXCR1 (*IL8RA*), o alelo C comum da variante CXCR1 rs2854386 foi associado ao desenvolvimento de LC em pacientes infectados por *L. braziliensis* e o alelo G raro foi associado com o desenvolvimento de LM (CASTELLUCCI et al., 2010).

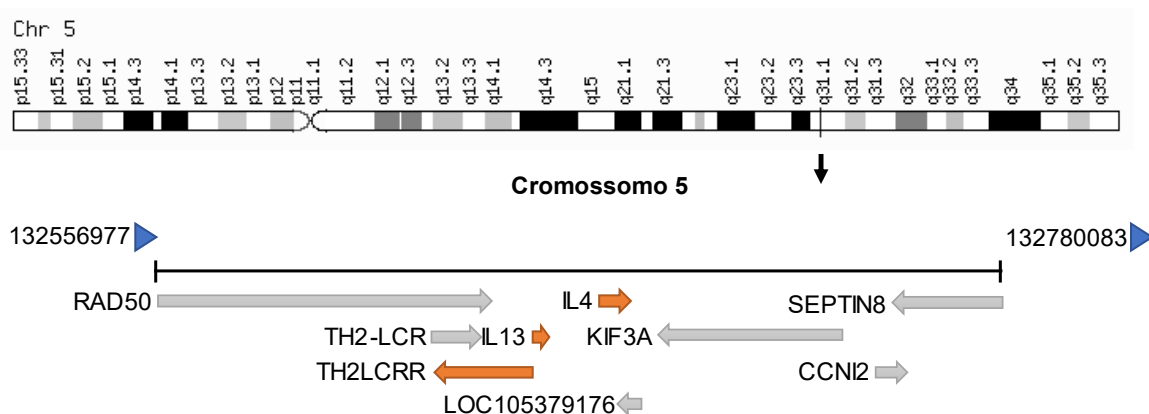
Com participação também do sistema complemento, no gene da proteína MBL (o gene *MBL2*), foi demonstrado que o alelo C da variante *MBL2 -221X/Y* confere um alto risco de desenvolver LC causada por *L. guyanensis* (DE ARAUJO et al., 2015a). Na população árabe da Síria, um haplótipo AGACG presente nos éxons 6 e 8 do gene *FCN2*, codificante da proteína Ficolin-2, foi associado com a suscetibilidade à LC e também relacionado a altos níveis de Ficolin-2 no soro dos participantes (ASSAF et al., 2012).

## **2.11 Localização genômica dos *IL4* e *IL13*.**

Os genes *IL4* e *IL13* estão localizados no cromossomo 5, no braço longo, na banda 31.1 onde formam um *cluster* genes tipo Th2, mais conhecido como *locus* Th2. O gene *IL4* mede 8.690 pb de comprimento, enquanto o gene *IL13* mede 4.589 pb. *IL4* e *IL13* estão próximos a uma distância de 12.8 Kb. Outro gene, o *TH2LCRR*, codifica um

RNA longo não codificante (lncRNA) que está próximo ao gene *IL13* a uma curta distância de 368 pb. O gene *IL13* está sobreposto à região promotora do gene *TH2LCRR*. A localização dos genes *IL4*, *IL13* e *TH2LCRR* podem ser visualizadas na figura abaixo:

**Figura 9 - Localização dos genes *IL4* e *IL13* no cromossomo 5**



Fonte: genecard.com (2023); José Júnior (2023) (elaborado com dados do NCBI)

Variantes genéticas do tipo SNV presentes nos genes *IL4*, *IL13* e *TH2LCRR* apresentam importantes implicações para a resposta imune Th2. Variantes no gene *IL4* foram associadas à suscetibilidade a asma (LIU; LI; LIU, 2012), rinite alérgica (MOH'D AL-RAWASHDEH et al., 2020), tuberculose (QI et al., 2014) e LC (KIRIK et al., 2020). No gene *IL13* variantes foram associadas à dermatite atópica (LEE et al., 2020), rinite alérgica (WANG et al., 2003), Lupus (WANG et al., 2018), asma (TSAI et al., 2013) e foram correlacionadas com o aumento da expressão de IL-13 no plasma (KIESLER et al., 2009; WANG et al., 2018).

O TH2LCRR é um lncRNA é considerado antisense do gene *RAD50*, pois ele se encontra sobreposto aos éxons e íntrons de *RAD50* e é transcrito no sentido oposto a este gene (AUNE; CROOKE; SPURLOCK, 2016). O TH2LCRR se liga ao WDR5, um componente do complexo enzimático H3K4 metiltransferase, e a depleção do TH2LCRR inibi o recrutamento do componente WDR5 para regiões aumentadoras e promotoras dos genes *IL4* e *IL13* impedindo formação de sítios de metilação (AUNE; CROOKE; SPURLOCK, 2016). Recentemente foi revelado que a região UTR do gene *IL13* atua

como um aumentador para o gene *TH2LCRR* e foi demonstrado que variantes presentes nesta região podem alterar a afinidade para fatores de transcrição (LI et al., 2022).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Investigar o papel dos genes *IL4* e *IL13* no desenvolvimento da LC causada por *L. guyanensis*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar frequências alélicas e genótípicas das variantes genéticas dos *IL4* e *IL13* em indivíduos saudáveis e pacientes com LC;
- Realizar teste de associação genética das variantes à LC;
- Analisar o efeito das variantes nas concentrações de citocinas Th2 circulantes do plasma;
- Analisar o desequilíbrio de ligação entre as variantes;
- Testar a associação dos haplótipos de *IL4* e *IL13* com o risco à LC e seus efeitos nas concentrações de citocinas Th2.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Tipo de estudo

Este é um estudo caso-controle de análise de associação genética, consistindo na comparação das frequências de alelos e genótipos de variantes entre pacientes casos e controles, sendo ambos constituídos por indivíduos não aparentados. Através do cálculo de razão de chances, *odds ratio* (OR), será estimada a força da associação. O valor OR indicará quantas vezes um indivíduo portador do alelo ou genótipo da variante estudada é mais suscetível à LC causada pela *L. guyanensis* do que um indivíduo não portador do mesmo.

### 4.2 Termos éticos

Este projeto faz parte de um projeto maior intitulado “Polimorfismos Genéticos dos Genes Envolvidos na Resposta Imune e na Cicatrização das Lesões em Pacientes com Leishmaniose Cutânea em uma População Caso-Controle de Manaus, Amazonas.” coordenado pelo Dr. e Prof<sup>o</sup> Rajendranath Ramasawmy e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), sob o seguinte número CAAE: 09995212.0.0000.0005. Este estudo foi financiado pelo CNPq e FAPEAM.

### 4.3 Tamanho amostral

O tamanho amostral deste estudo foi calculado usando o Genetic Power calculator desenvolvido por Harvard University (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc>) assumindo os critérios de acordo com frequência do menor alelo 5%, prevalência da doença 5%, completo desequilíbrio de ligação compreendendo um marcador e um traço 1, taxa caso-controle 1 e 5% de taxa de erro do tipo 1 para *odds ratio* (OR) de 1.5 para heterosigosidade e 2.0 para homosigosidade. Este modelo genético gerou um tamanho amostral de aproximadamente 789 casos e 789 controles com resultado de 80% de poder.

#### **4.4 Área de Estudo**

Os indivíduos recrutados são provenientes de regiões endêmicas nas proximidades do município de Manaus, rodovias AM-010 Manaus – Itacoatiara; e BR-174 Manaus – Boa Vista. Algumas das localidades utilizadas para o estudo: BR-174 - Ramal do Pau-Rosa e Ramal da Cooperativa e suas vicinais (Km 21); AM-010 - Ramal Água Branca I (Km 32) e Ramal Água Branca II (Km 35), Ramal do Leão (Km 37). Estas regiões ao longo dos anos sofreram desmatamento devido ao aumento da população, atividades agropecuárias e criação de novos assentamentos. Indivíduos provenientes destas áreas habitavam área de risco de exposição ao protozoário *Leishmania guyanensis*.

#### **4.5 Pacientes Grupo Caso**

Os pacientes que constituem o grupo caso foram recrutados na FMT-HVD, considerado um centro de referência no tratamento de leishmaniose tegumentar americana. O diagnóstico clínico foi realizado com apoio de médicos especializados, onde foram admitidos apenas pacientes com no máximo seis lesões cutâneas ulceradas.

As confirmações foram realizadas microscopias direta de material escarificado das lesões corado com GIEMSA para identificar formas amastigotas de *Leishmania*. Após o diagnóstico positivo, foram explicadas informações sobre o projeto aos pacientes com LC e foram convidados a participar do estudo. Os pacientes que aceitaram participar responderam um questionário para coletar informações pessoais e quadro clínico do paciente por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

#### **4.6 Grupo Controle**

O grupo controle é constituído por indivíduos provenientes das mesmas regiões dos pacientes. O recrutamento foi realizado mediante visita de um grupo técnico as áreas endêmicas. Foram explicadas informações sobre a natureza do projeto aos indivíduos, e os voluntários que aceitaram participar do estudo foram examinados por um médico especialista. Após a verificação pelo médico especialista, somente os indivíduos saudáveis sem sinal ou histórico para lesões de leishmaniose foram incluídos. Antes da

coleta do material biológico, foi aplicado o TCLE para o consentimento dos participantes com formulário para coleta de informações pessoais. Os indivíduos incluídos neste estudo não apresentam parentesco entre si e com os pacientes integrantes do grupo caso.

#### **4.7 Critérios de inclusão e não-inclusão**

Todos voluntários que recrutados neste estudo estiveram sob os seguintes critérios:

- Tempo de moradia nas áreas endêmicas igual ou superior a 5 anos;
- Não apresentar sinal ou histórico de LC (para o grupo de controles saudáveis)
- Confirmação de diagnóstico feito por exame direto através de microscopia (para o grupo caso);
- Faixa etária entre 12 a 65 anos para ambos os grupos;
- Pacientes ou indivíduos que apresentarem evidência de doença subjacente grave (cardíaca, renal, hepática, pulmonar e infecciosa), imunodeficiência ou anticorpos positivos para HIV e mulheres gestantes ou que estejam amamentando não foram incluídos neste estudo.

#### **4.8 Coleta de material biológico**

Foram coletadas amostras de 5mL de sangue periférico em tubo contendo anti-coagulante EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético) de todos pacientes e dos controles. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa em Doenças Endêmicas (LPDE) da FMT-HVD onde foram processadas a separação do creme leucocitário e plasma através de centrifugação com 2.000 rotações por minuto (RPM) por 10 minutos. Amostras de biópsias das lesões de pacientes também foram coletadas e armazenadas à -80°C para identificação de espécies de *Leishmania*.

#### 4.9 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada da camada de leucócitos (Buffy Coat) usando o método de “*salting-out*” (Sambrook, 1986). Após a extração de DNA, as amostras foram eluídas em água livre de nucleases e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.10 Identificação de *Leishmania* spp

O DNA de biópsias lesionais dos pacientes foi extraído usando o kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) conforme as instruções do fabricante. Os iniciadores hsp70 senso (5' GAC GGT GCC TGC CTA CTT CAA 3') e hsp70 anti-senso (5' CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3'), específicos foram utilizados em PCR para discriminação de espécies. O produto da PCR foi testado em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídio.

Reações de sequenciamento de nucleotídeos foram realizadas para identificação das espécies contendo um volume total de 10 $\mu\text{L}$  com os seguintes reagentes, 0,15 $\mu\text{L}$  BigDye, 2,0 $\mu\text{L}$  Tampão 5X, 2,85 $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O, 1 $\mu\text{L}$  de Primer (senso ou anti-senso) e 4 $\mu\text{L}$  de produto de PCR purificado.

A ciclagem utilizada foi 94 $^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto, seguido de 20 ciclos de: 96 $^{\circ}\text{C}$  por 10 segundos, 55 $^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos e 60 $^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos, seguido de mais 15 ciclos de: 96 $^{\circ}\text{C}$  por 10 segundos, 55 $^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos e 60 $^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos. As amostras foram analisadas pelo sequenciador ABI 3130XL DNA Sequencer (Applied Biosystems™). Os alinhamentos das sequências editadas foram comparados com as sequências de referência para identificação das espécies do *GenBank*.

#### 4.11 Quantificação do DNA extraído

O volume de 1  $\mu\text{L}$  de amostras de DNA extraídas foram verificadas em espectrofotômetro NanoDrop ND- 2000 (Thermo Scientific) com comprimentos de onda 260 e 280 nm para quantificação em ng/ $\mu\text{L}$  e determinação de pureza.



#### 4.12 Critérios de seleção dos SNVs

As variantes foram selecionadas usando bancos de dados públicos do projeto HapMap Project disponíveis na plataforma SNPinfo Web Server (<https://snpinf.niehs.nih.gov/>) (XU; TAYLOR, 2009) que possui ferramentas para seleção de variantes. As variantes foram selecionadas de acordo com a taxa de frequência global de menor alelo igual ou maior que 10% ( $MAF \geq 0.10$ ), marcadores *tag* que representam blocos de variantes em desequilíbrio de ligação, predição de função e localização genômica. Os marcadores *tag* foram escolhidos prioritariamente afim de reduzir o número de variantes estudadas. Mais detalhes da seleção estão descritos nos resultados.

#### 4.13 PCR para genotipagem

Os primers para os genes *IL13* e *IL4* foram desenhados de maneira a cobrir os fragmentos alvos com *tag* SNVs. As condições de ciclagem estão descritas com mais detalhes na **Tabela 1**.

**Tabela 1 - Desenho de iniciadores e Condições de PCR**

SNVs	Iniciadores	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Ciclagem	pb
<i>IL13rs1881457</i>	F: 5'-GCTCCGGGAGTTGCACAGACC-3' R: 5'-CCAGGCTTGCCACCCCTCTCTTCC-3'	2.0	95°C 5 min, 40x (95° 15 seg, 68°C 15 seg, 72°C 30 seg) e 72°C 7 min	275
<i>IL13rs1295687</i>	F: 5'-CCAGCTCCTACTCAGCCATTCC-3' R: 5'-CAGAAATGGGTTTCATCGTACCTGCC-3'	2.0	95°C 5 min, 40x (95° 15 seg, 61°C 15 seg, 72°C 30 seg) e 72°C 7 min	293
<i>IL13rs2069744</i>	F: 5'-GCCAGGCTGGCCAACACCAGAGAGT-3' R: 5'-GTGGCCTGGGCCACTGTTGAC-3'	1.0	95°C 5 min, 45x (95° 15 seg, 62°C 15 seg, 72°C 30 seg) e 72°C 7 min	137
<i>IL13rs2069747</i>	F: 5'-CCCTCTCACACCCACCCTGCACC-3' R: 5'-ACAGATGTGGAAATTGAGGCC-3'	1.0	95°C 5 min, 45x (95° 15 seg, 61°C 15 seg, 72°C 30 seg) e 72°C 7 min	191
<i>IL13rs20541</i>	F: 5'-GGCTGAGGTCTAAGCTAAGGAA-3' R: 5'-ACCAAATCGAGGTGGCCAG-3'	1.5	95°C 5 min, 35x (95° 15 seg, 58°C 15 seg, 72°C 30 seg) e 72°C 5 min	129
<i>IL13rs1295685</i> <i>IL13rs848</i> <i>IL13rs2069750</i> <i>IL13rs847</i>	F: 5'-GGCAACTGAGGCAGACAGCAG-3' R: 5'-CAGGCCTATCTGTCACAAACT-3'	1.5	95°C 5 min, 45x (95° 15 seg, 61°C 15 seg, 72°C 30 seg) e 72°C 7 min	459
<i>IL4rs2243246</i>	F: 5'-GAAGGTCAGAGACCAAGGGAA-3' R: 5'-GGACCCCACTCACTCAGG-3'	1.0	95°C 5 min, 45x (95° 15 seg, 62°C 15 seg, 72°C 30 seg) e 72°C 5 min	145
<i>IL4rs2243250</i>	F: 5'-CACCTAACTTGGGAGAATCATGGT-3' R: 5'-GGCTTCTTCCAAGTACAGGTGG-3'	1.0	95°C 5 min, 45x (95° 15 seg, 57°C 15 seg, 72°C 30 seg) e 72°C 5 min	
<i>IL4rs2227284</i> <i>IL4rs2243260</i> <i>IL4rs2243261</i>	F: 5'-CACTGGTCTAGGTCCTGGGC-3' R: 5'-GGTCTTGACCAGCCTCACTG-3'	1.0	95°C 5 min, 45x (95° 15 seg, 58.5°C 15 seg, 72°C 30 seg) e 72°C 5 min	336
<i>IL4rs2243267</i> <i>IL4rs2243268</i> <i>IL4rs9282745</i>	F: 5'-GGATTCTGGTGCCTCAGTCTGGG-3' R: 5'-CAGCAGCGCTGTCCAAGCAGC-3'	1.0	95°C 5 min, 38x (95° 15 seg, 62°C 15 seg, 72°C 30 seg) e 72°C 5 min	501

Fonte: José Júnior (2023). Nota: pb - pares de base; mM - mili molar; SNVs - *single nucleotide variants*.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 1µL de DNA genômico (50 ng/µL), 2,5 µL de Tampão de reação 10X sem MgCl<sub>2</sub> (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 0,5 µL de cada iniciador senso e antisenso (0,1 µM cada), 1 µL dNTP 10mM (0.2 mM cada), 0,1 µL (1U/µL) de *taq* DNA polimerase e água destilada autoclavada adicionada de acordo com o volume final da reação.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Mastercycler® ep gradient S (Ependorf, Germany). As reações foram otimizadas para concentrações de MgCl<sub>2</sub> e temperatura de anelamento de acordo com as sequências dos iniciadores e o tamanho do produto amplificado.

Os diferentes tamanhos de fragmentos de PCR amplificados foram testados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com Brometo de Etídio e visualizados sob luz ultra violeta em fotodocumentador.

#### 4.14 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

As digestões enzimáticas foram realizadas com enzimas de restrição específicas para o sítio de clivagem de cada marcador. Os detalhes das reações de digestão estão descritos na **Tabela 2**.

**Tabela 2 - Características das reações das digestões enzimáticas**

SNVs	Enzimas de restrição	Temperatura ótima	Sítios de restrição	Produtos de PCR (pb)	Fragmentos (pb)
<i>IL13rs1295687</i>	<i>Ddel</i>	37°C	5'...C <sup>▼</sup> TNAG...3'	293	C:187+92+14 G:142+92+45+14
<i>IL13rs2069744</i>	<i>Hinfl</i>	37°C	5'...G <sup>▼</sup> ANTC...3'	137	C:114+23 T:137
<i>IL13rs2069747</i>	<i>NcoI</i>	37°C	5'...C <sup>▼</sup> CATGG...3'	191	C:121+70 T:191
<i>IL4rs2243250</i>	<i>Avall</i>	37°C	5'...G <sup>▼</sup> GWCC...3'	145	C:126+22 T: 145
<i>IL4rs2243246</i>	<i>HpaII</i>	37°C	5'...C <sup>▼</sup> CGG...3'	145	C: 144+31 T: 145

**pb:** pares de bases

As reações enzimáticas foram realizadas em um volume final de 20 µL, contendo 10 µL de produto de PCR, 2 µL de Tampão de reação Cutsmart 10x (50 mM de Acetato

de Potássio, 20 mM de Tris-acetato, 10 mM de Acetato de Magnésio e 100 µg/mL de BSA) e 2 U de enzima de restrição. As reações foram incubadas por 2h em banho Maria à temperatura específica para cada enzima. Após as digestões os produtos foram aplicados em gel de eletroforese 3,5% corado com Brometo de Etídio para separação dos fragmentos. Os fragmentos separados foram visualizados por luz ultravioleta e fotodocumentados.

#### 4.15 Sequenciamento de nucleotídeos

##### 4.15.1 Purificação da PCR

Para purificação dos produtos de PCR foi utilizado Polietileno Glicol a 20% (PEG 8000, Promega) para precipitação DNA. O produto foi lavado com etanol 80%. Após a purificação o produto foi quantificado em espectrofotômetro para adequação da reação de sequenciamento.

##### 4.15.2 Reação de Sequenciamento

As reações de sequenciamento dos fragmentos foram realizadas por eletroforese capilar utilizando o método de Sanger no equipamento ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As reações foram preparadas usando os mesmos iniciadores utilizados na PCR e o Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). As concentrações de DNA usadas para reação de sequenciamento obedeceram às recomendações da Applied Biosystems. O volume final da reação foi de 10 µL contendo os reagentes e volumes descritos na **Tabela 3**.

**Tabela 3 - Reagentes usados no sequenciamento**

Reagentes	Volume na reação
BigDye® Terminator v 3.1 (Applied Biosystems)	0,15 µL
Tampão BigDye 5x	2 µL
Iniciador a 3,3 µM (Senso ou Anti-senso)	1 µL

O programa de termociclagens utilizados nas reações de sequenciamento seguiu as recomendações do fabricante (Applied Biosystems).

#### **4.15.3 Purificação do produto da reação de sequenciamento**

As purificações dos produtos foram realizadas de acordo com o protocolo de purificação EtOH/EDTA/Acetato de Sódio recomendado pelo fabricante (Applied Biosystems).

#### **4.15.4 Análise de variantes genéticas pelo sequenciamento**

As sequências dos nucleotídeos foram analisadas pelo software Sequencing Analysis (Applied Biosystems, v5.3.1), alinhadas com as sequências de referência para o gene estudado pelo software Geneious (Biomatters, v6.0.5) para montagem dos *contigs* e identificação das variantes. A **Figura 10** mostra o eletroferograma para as variantes do gene *IL13*, a **Figura 11** mostra o eletroferograma para variantes presentes

#### **4.16 Dosagem de Citocinas**

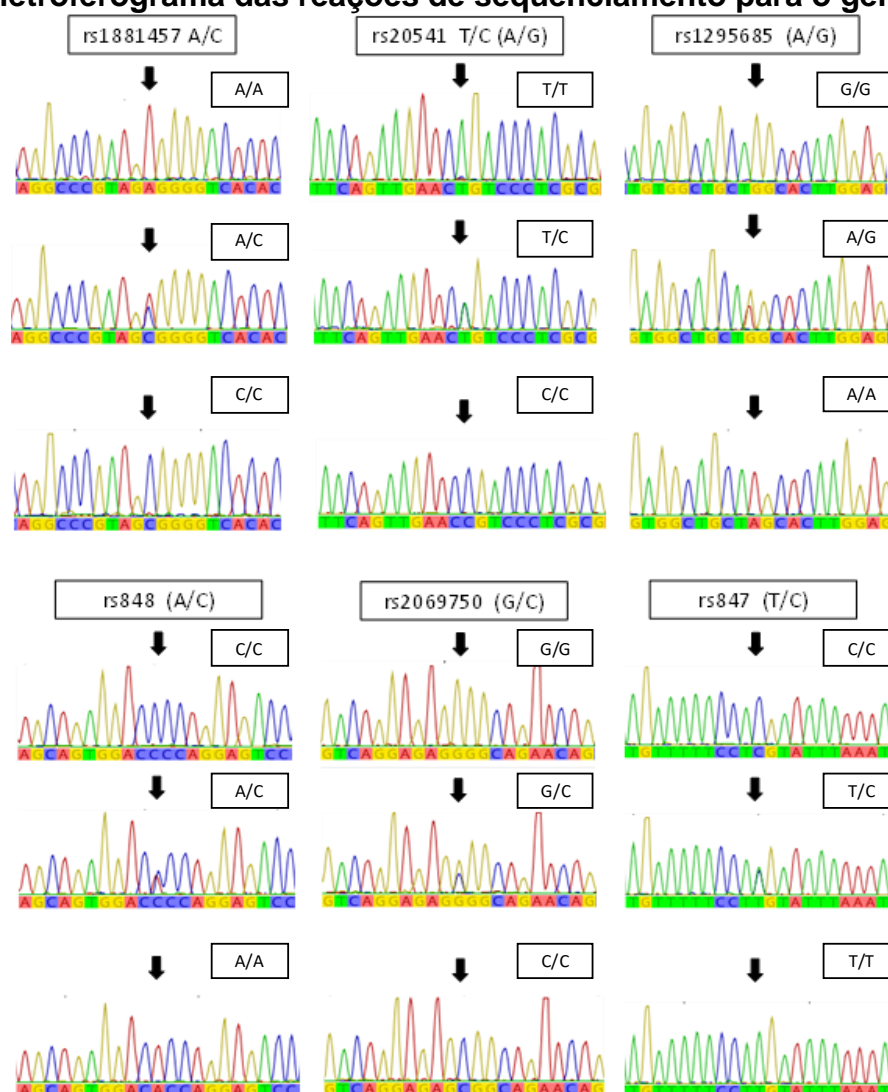
Os níveis de citocinas IL-4, IL-13 e IL-5 circulantes foram dosados do plasma de indivíduos (400 casos e 400 controles) por meio de imunensaio multiplexado com microesferas em um analisador Luminex (Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Os imunensaios foram feitos em microplacas de 96 poços contendo microesferas revestidas por anticorpos monoclonais contra os diferentes respectivos alvos.

#### **4.17 Análises Estatísticas**

Os alelos e genótipos das variantes estudadas foram determinados por contagem direta. A associação das variantes à LC e a correlação das concentrações de citocinas do plasma entre os genótipos foram realizadas pelo pacote SNPAssoc 2.0-2 (GONZÁLEZ et al., 2007) usando o programa estatístico R 4.2.2 (<https://www.R-project.org/>). Testes de regressão logística foram empregados para as comparações das variantes entre caso e controle, assumindo modelos de herança (codominante, dominante e recessivo) com

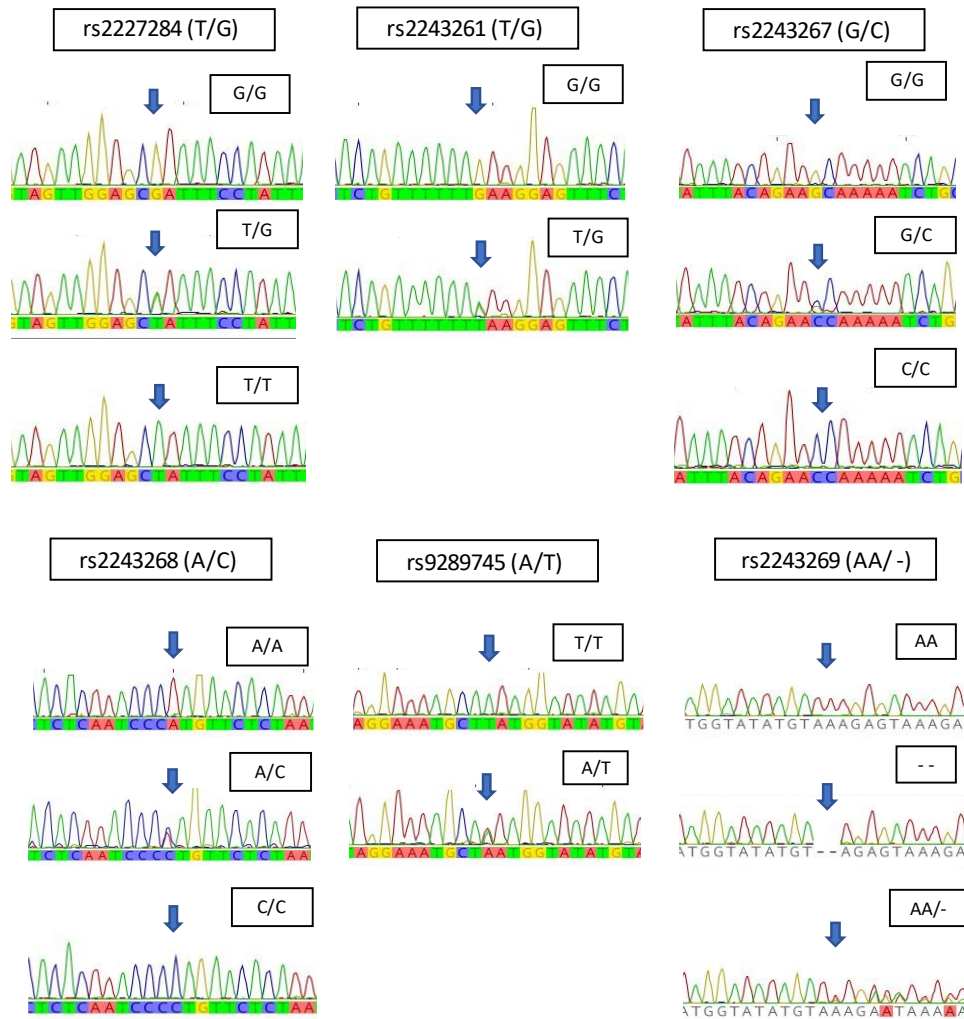
*odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC). Testes de análises de traços quantitativos usando modelo de regressão linear geral (GLM) foram empregados para comparar as concentrações de citocinas entre os genótipos. As análises de haplótipos foram realizadas pelo software Haploview 4.2. O desequilíbrio de ligação entre as variantes foi estimado usando os coeficientes  $D'$  e  $R^2$ . A frequência dos haplótipos foram estimadas por algoritmo EM (expectation-maximization) e o teste  $\chi^2$  e OR com IC 95% foi usado para comparar os haplótipos entre os grupos de pacientes com LC e controles

**Figura 10 - Eletroferograma das reações de sequenciamento para o gene *IL13***



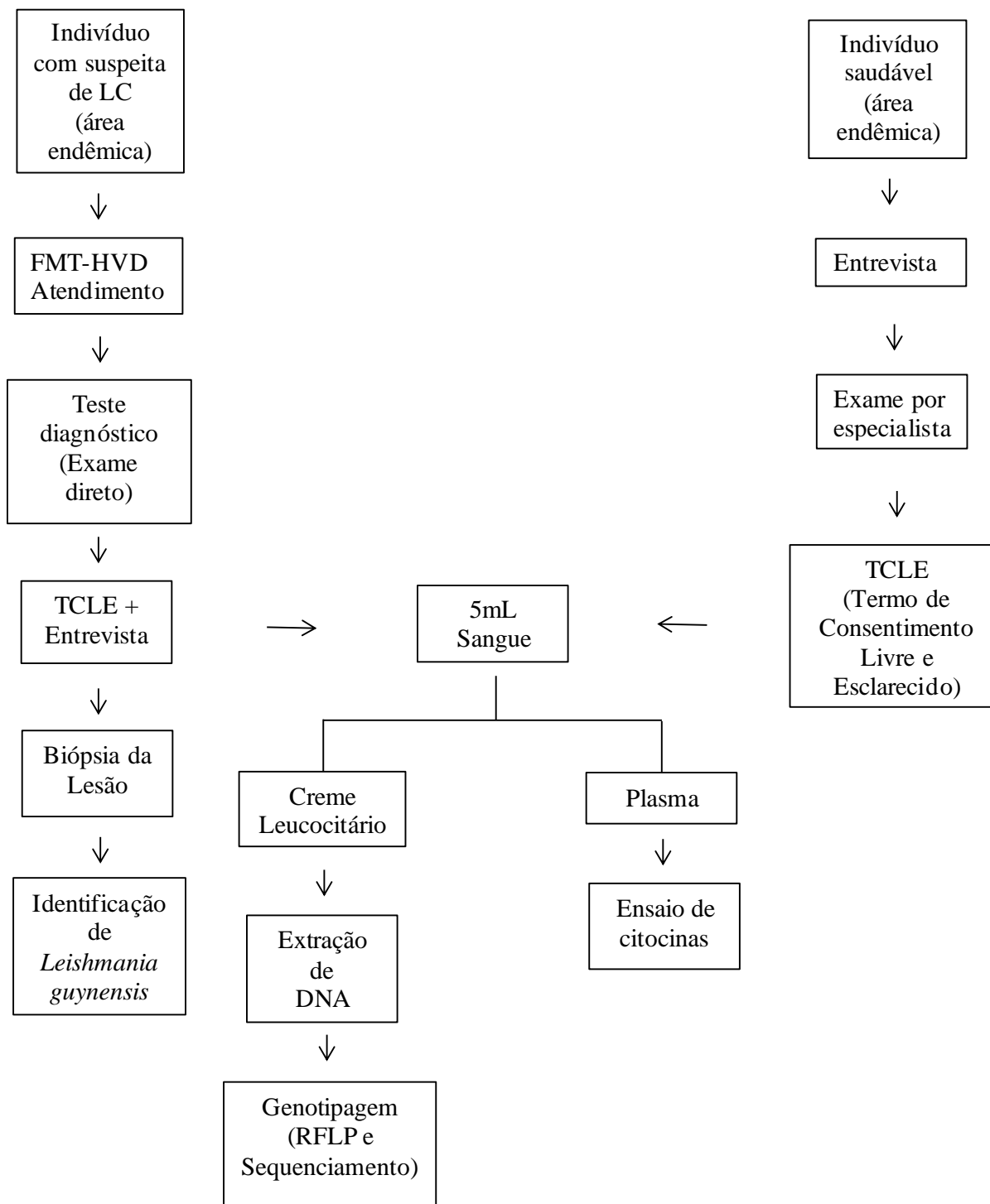
Fonte: José Júnior (2023)

**Figura 11 - Eletroferograma das reações de sequenciamento para o gene *IL4***



Fonte: José Júnior (2023)

#### 4.18 Fluxograma de atividades

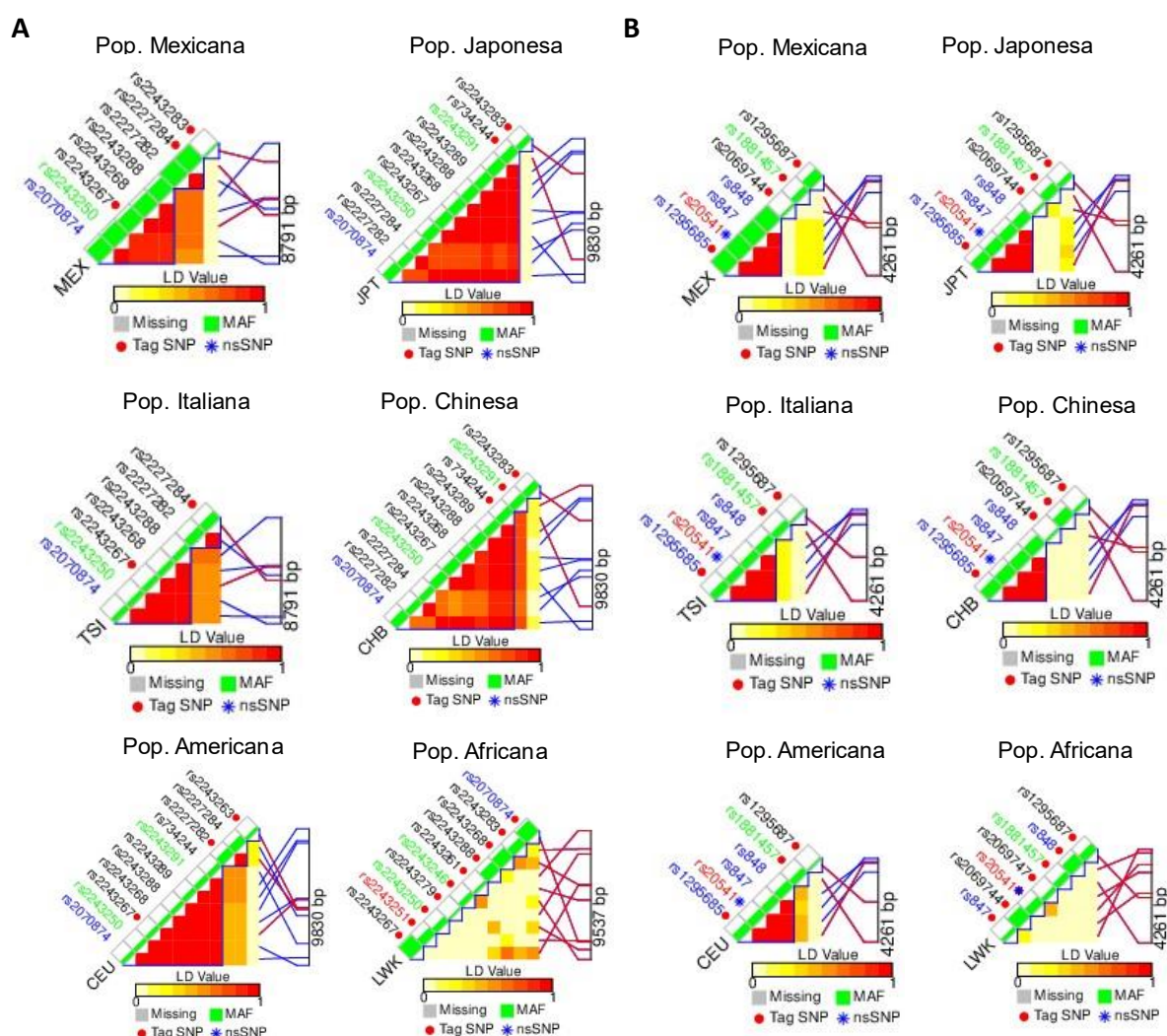


## 5. RESULTADOS

### 4.1 Seleção das variantes

Para a seleção das variantes dos genes *IL4* e *IL13*, consultas foram realizadas quanto as características de desequilíbrio de ligação (LD) das variantes em diferentes populações a partir do banco de dados do projeto HapMap usando ferramentas de bioinformática do SNPinfo Web Server (Figura 12).

Figura 12 - LD para os genes *IL4* e *IL13* em diferentes populações



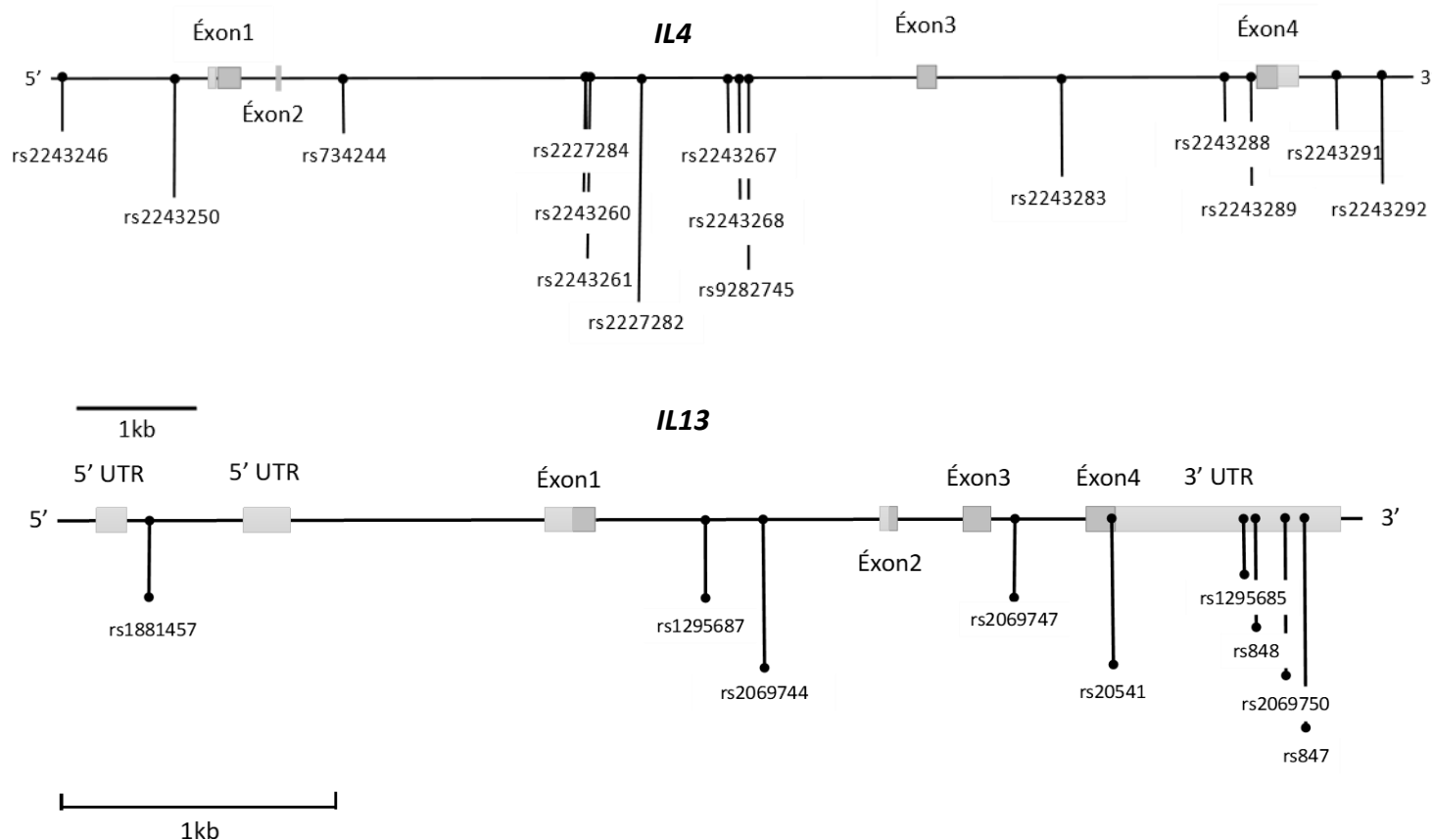


Fonte: <https://snpinfo.niehs.nih.gov/> (Adaptado, 2023). MAF: frequência do menor alelo; nsSNP: variante não-sinônima.

As populações pesquisadas foram: italiana (TSI, Toscani - Itália), mexicana (MEX, México), chinesa (CHB, Beijing - China) e japonesa (JPT, Tóquio - Japão), americana (CEU, Utah - EUA ancestral norte e oeste europeu) e africana (LWK, Webuye - Quênia) mostradas na Figura 12. A população amazonense incluída neste estudo apresenta uma miscigenação de ancestrais nativos americanos, africanos e europeus, com ancestralidade de aproximadamente 50 a 70% nativos americanos, 40 a 50% europeus e 10% africano (RUIZ-LINARES et al., 2014).

Após a busca, as variantes *IL4*rs2243267, *IL4*rs2227284 e *IL13*rs1295685 mostraram ser importantes marcadores *Tag* nas populações consultadas, formando bloco com demais variantes.

**Figura 13 - Localização genômica das variantes nos genes *IL4* e *IL13***



Fonte: José Júnior (2023) (as figuras foram elaboradas a partir de dados do NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)

Parâmetros como localização genômica e frequência do menor alelo também foram utilizados. As variantes foram selecionadas nas diferentes regiões dos genes (região promotora, 5'UTR, íntrons, éxons e 3'UTR) de modo a cobrir todo gene. O resultado da seleção de variantes selecionadas nos genes *IL4* e *IL13* podem ser visualizadas na Figura 13 e mais detalhes sobre as variantes são observadas na Tabela 4.

**Tabela 4 - Características Gerais das variantes estudadas**

Gene	rsID	Alelos	Posição no Cromossomo	Região do gene	Tag SNVs	MAF Global	Predição de Função
<i>IL13</i>	rs1881457	A>C	132656717	5' UTR	*	C = 19%	TFBS
<i>IL13</i>	rs1295687	C>G	132658770	Intron1	*	C = 17%	TFBS
<i>IL13</i>	rs2069744	C>T	132658977	Intron1	*	T = 17%	TFBS
<i>IL13</i>	rs2069747	C>T	132659914	Intron3		T = 5%	-
<i>IL13</i>	rs20541	A>G	132660272	Exon4		A = 23%	nsSNV
<i>IL13</i>	rs1295685	A>G	132660753	3'UTR	*	A = 17%	miRNA
<i>IL13</i>	rs848	A>C	132660808	3'UTR		A = 37%	miRNA
<i>IL13</i>	rs2069750	G>C	132660905	3'UTR		C = 12%	miRNA
<i>IL13</i>	rs847	T>C	132660977	3'UTR		T = 19%	miRNA
<i>IL4</i>	rs2243246	T>C	132672716	2KB		T = 14%	TFBS
<i>IL4</i>	rs2243250	C>T	132673462	2KB		T = 49%	TFBS
<i>IL4</i>	rs734244	C>T	132675034	Intron2	*	T = 42%	-
<i>IL4</i>	rs2227284	T>G	132677033	Intron2	*	T = 35%	-
<i>IL4</i>	rs2243260	A>T	132677058	Intron2		T = 0%	-
<i>IL4</i>	rs2243261	G>T	132677114	Intron2		T = 8%	-
<i>IL4</i>	rs2227282	C>G	132677487	Intron2		G = 35%	-
<i>IL4</i>	rs2243267	G>C	132678194	Intron2	*	C = 38%	-
<i>IL4</i>	rs2243268	A>C	132678271	Intron2		C = 34%	-
<i>IL4</i>	rs9282745	A>T	132678308	Intron2		A = 4%	-
<i>IL4</i>	rs2243283	C>G	132680901	Intron3	*	G = 15%	-
<i>IL4</i>	rs2243288	A>G	132682252	Intron3		G = 48%	-
<i>IL4</i>	rs2243289	A>G	132682440	Intron3		G = 35%	-
<i>IL4</i>	rs2243291	G>C	132683291	2KB		C = 53%	-
<i>IL4</i>	rs2243292	T>C	132683529	2KB		C = 2%	-

Fonte: José Júnior (2023). UTR: região não traduzida, \*: marcadores *Tag*, TFBS: sítio de ligação de fator de transcrição.

Também consultamos se as variantes nos genes *IL4* e *IL13* apresentavam funções e observamos que variantes no gene *IL13* podem criar ou afetar sítios de ligação de fatores de transcrições (rs1881457, rs1295687, rs2069744). A variante rs1295687 C/G pode afetar o sítio de ligação fator de transcrição CREB (Core score: C = 0.6; G = 0.8,

sendo considerado afetante o score de diferença  $\geq 2$  entre os alelos). Também variantes apresentaram possibilidades afetar a ligação de miRNAs (rs1295685, rs848, rs2069750, rs847). A variante rs1295685 A/G pode afetar os sítios de ligação de hsa-miR-302b, hsa-miR-302c, hsa-miR-621 (Score de diferença entre alelos igual à 16) e a rs2069750 G/C pode afetar a ligação do mmu-miR-207 (Score = 20). Também incluímos uma variante não sinônima (rs20541) presente no éxon 4 que altera o aminoácido arginina (Arg) por glutamina (Glu) no códon 130. Enquanto, no gene *IL4* somente as variantes rs2243246, rs2243250 e rs2070874 mostraram possibilidade de afetar a ligação de fatores de transcrição. A variante rs2243246 pode afetar a ligação do fator de transcrição HAND1 (Core Score = 3, Matrix Score = 2 de diferenças entre os alelos).

#### 4.2 As variantes do gene *IL4* em Pacientes com LC e indivíduos saudáveis

Entre as variantes estudadas para o gene *IL4*, somente a variante rs2243250 (C/T) apresentou desvio do equilíbrio Hardy-Weinberg. As frequências alélicas de cada variante estão escritas na **Tabela 5**.

**Tabela 5 - Frequências alélicas das variantes do gene *IL4* entre casos e controles**

<i>IL4</i> SNVs	Alelos	Casos (%)	Controles (%)
rs2243246	T	887 (98%)	845 (97%)
	C	17 (2%)	23 (3%)
rs2243250	C	665 (49%)	712 (52%)
	T	673 (51%)	646 (47%)
rs2227284	G	14 (40%)	45 (31%)
	T	22 (60%)	99 (69%)
rs2243261	G	35 (97%)	138 (96%)
	T	1 (3%)	6 (4%)
rs2243267	C	256 (70%)	185 (42%)
	G	109 (30%)	251 (58%)
rs2243268	A	105 (61%)	263 (60%)
	C	172 (39%)	173 (40%)
rs9282745	T	156 (100)	427 (98%)
	A	0 (0)	9 (2%)
rs2243269	AA	0 (0)	268 (61%)
	-	0 (0)	168 (39%)

Fonte: José Júnior (2023)

Das oito variantes presentes no gene *IL4*, diferenças foram observadas para variante rs2243267 (A/G), o alelo C foi mais presente nos casos (C = 256, 70%) do que nos controles (C = 185, 42%) e o alelo G mais presente nos controles (G = 251, 58%) do que nos casos (G = 109, 30%). Apesar dessa diferença observada não foi possível realizar teste estatísticos de associação genética para revelar a significância e a associação com LC, devido ao baixo n amostral genotipado. Observamos também uma variante tipo deleção/inserção rs2243269 (AA/-) com apenas 12pb de distância da variante rs9282745 (T/A). A variante tipo deleção/inserção rs2243269 (AA/-) deleta dois nucleotídeos AA e têm uma frequência de 20% (de acordo com ALFA Allele Project.).

#### 4.3 As variantes do gene *IL13* em Pacientes com LC e indivíduos saudáveis

Nove variantes presentes no gene *IL13* foram genotipadas em 855 pacientes com LC e 859 indivíduos saudáveis. As frequências dos alelos menores (MAF) para as variantes genotipadas tanto para pacientes com LC quanto para indivíduos saudáveis e o MAF global das variantes do banco de dados do projeto HapMap podem ser visualizadas na **Tabela 6**.

**Tabela 6 - Frequências dos alelos menores (MAF) das variantes do gene *IL13* entre pacientes com LC, indivíduos saudáveis e MAF do projeto HapMap.**

Região do gene	Marcadores	Alelos	Pacientes com LC (%)	Indivíduos saudáveis (%)	Global MAF	p-valor
promotor	rs1881457	C	379 (22%)	359 (21%)	19%	n.s.
Íntron1	rs1295687	G	287 (18%)	284 (18%)	17%	n.s.
Íntron1	rs2069744	T	190 (11%)	215 (13%)	17%	n.s.
Íntron3	rs2069747	T	26 (2%)	22 (1%)	5%	n.s.
Éxon4	rs20541	T	620 (36%)	654(38%)	23%	n.s.
3' UTR	rs1295685	A	631 (36%)	648 (38%)	17%	n.s.
3' UTR	rs848	A	720 (42%)	766 (45%)	37%	n.s.
3' UTR	rs2069750	C	29 (2%)	48 (3%)	12%	n.s.
3' UTR	rs847	T	650 (38%)	662 (39%)	19%	n.s.

Fonte: José Júnior (2023). MAF: frequência do menor alelo (minor allele frequency); n.s.: não significante, UTR: região não traduzida (untranslated region).

Todas as variantes não apresentaram desvio para o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As comparações das frequências entre os grupos foram realizadas baseando-

se em diferentes modelos genéticos. As frequências de cada genótipo e as comparações estatísticas podem ser visualizadas com mais detalhes na tabela suplementar no **Anexo 10**. No entanto, as análises estatísticas mostram que não existe associação das nove variantes com suscetibilidade ou proteção à LC causada por *L. guyanensis*.

#### 4.4 Desequilíbrio de Ligação (LD) e análise de haplótipos

As análises de desequilíbrio de ligação (LD) foram realizadas por Haploview 4.2 e o resultados podem ser observados na **Figura 14**.

Entre as nove variantes estudadas, foi observado um forte desequilíbrio de ligação apenas entre as variantes rs20541, rs1295685, rs848 e rs847, indicando associação entre elas. As rs1295685, rs848 e rs847 formam então um bloco distinto em comparação as demais variantes.

As análises de haplótipos também foram conduzidas no Haploview 4.2 para comparar as frequências dos haplótipos entre os pacientes com LC e indivíduos saudáveis. Um total de 48 haplótipos foram identificados a partir das nove variantes. Uma linha de corte foi aplicada para manter os haplótipos com frequência  $\geq 0.1\%$  resultando num total de 14 haplótipos. Os haplótipos foram identificados com H1 a H14. Esses haplótipos são apresentados na **Tabela 7**.

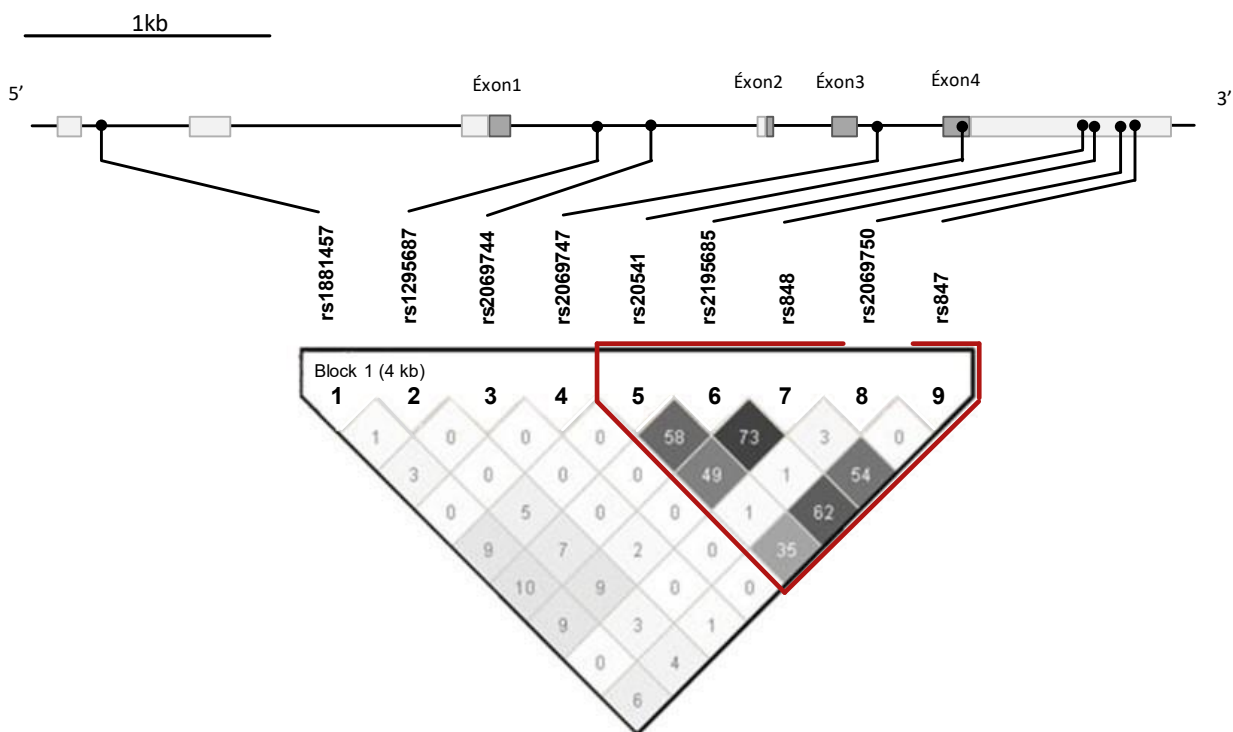
**Tabela 7 - Distribuição de haplótipos derivado das variantes do gene *IL13* entre os pacientes com LC (casos) e controles saudáveis (controles)**

Hap	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	Casos (%)	Controles (%)	$\chi^2$	OR IC 95%	p-valor
H 1	A	C	C	C	C	G	C	G	C	648 (38)	612 (37)	1.5	1.09 [0.9-1.2]	0.21
H 2	A	G	C	C	T	A	A	G	T	127 (7.6)	130 (7.8)	0.03	0.98 [0.7-1.2]	0.85
H 3	C	C	C	C	T	A	A	G	T	131 (7.9)	118 (7.1)	0.72	1.1 [0.8-1.4]	0.39
H 4	A	C	C	C	T	A	A	G	T	133 (8)	115 (7)	1.46	1.2 [0.9-1.5]	0.22
H 5	C	C	C	C	C	G	C	G	C	75 (4.5)	65 (4)	0.71	1.1 [0.82-1.6]	0.33
H 6	A	C	T	C	C	G	C	G	C	61 (3.7)	57 (3.4)	0.14	1.1 [0.73-1.5]	0.70
H 7	A	G	C	C	C	G	C	G	C	63 (3.8)	43 (2.6)	4.02	1.4 [0.9-2.2]	0.04
H 8	A	C	C	C	T	G	C	G	C	77 (4.6)	29 (1.8)	21.8	2.8 [1.7-4.2]	3.0E-6
H 9	C	C	T	C	T	A	A	G	T	48 (3)	51 (3.1)	0.10	0.9 [0.6-1.3]	0.74
H 10	A	C	C	C	C	G	C	G	T	6 (0.4)	88 (5.3)	73	0.06 [0.03-0.14]	1.3E-17
H 11	A	C	C	C	C	A	A	G	T	58 (3.4)	23 (1.4)	15.1	2.5 [1.5-4.1]	0.72E-5
H 12	A	G	C	C	T	A	A	G	C	2 (0.1)	46 (2.8)	41.6	0.04 [0.01-0.15]	1.1E-10
H 13	C	C	C	C	T	A	A	G	C	3 (0.2)	38 (2.3)	31	0.07 [0.02-0.2]	2.5E-8
H 14	A	C	C	C	C	G	A	G	C	16 (1)	21 (1.2)	0.56	0.8 [0.4-1.4]	0.45

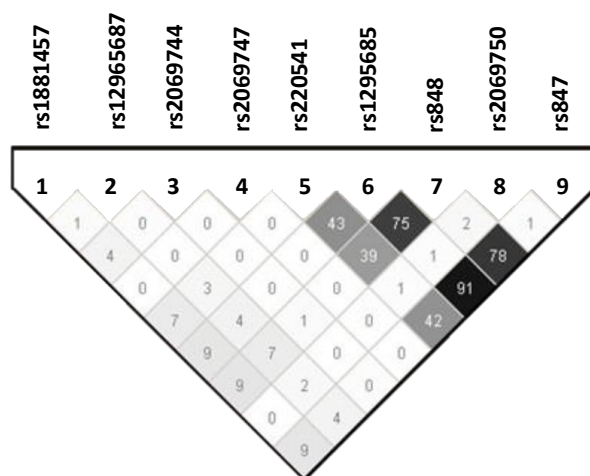
Fonte: José Júnior (2023). Nota:  $\chi^2$ : Qui-quadrado; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; p-valor < 0.05 são considerados significantes.

**Figura 14 - Desequilíbrio de ligação (LD) entre as variantes do gene *IL13***

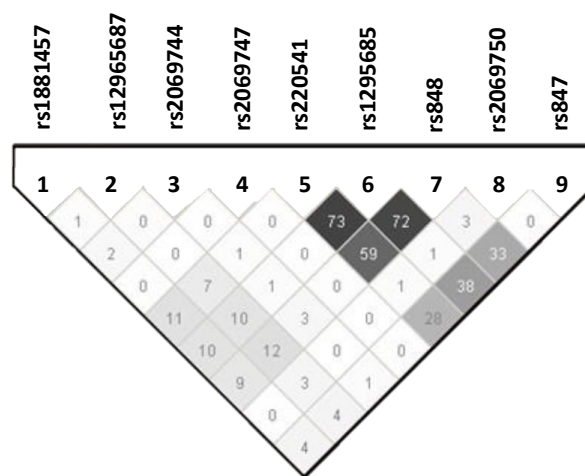
**A**



**B**



**C**



Fonte: José Júnior (2023). Nota: Figura 14A: Gráfico LD e mapa do gene em total (pacientes com LC + indivíduos saudáveis), a forma destacada em vermelho representa um bloco em desequilíbrio ligação formado pelas variantes rs20541, rs1295685, rs848 e rs847. Figura 14B: Gráfico LD em pacientes com LC e Figura 14C: Gráfico LD em indivíduos saudáveis. Todos os gráficos exibem o coeficiente  $R^2$ .

A frequências dos haplótipos mostram diferenças entre os grupos de pacientes com LC e indivíduos saudáveis. Os haplótipos H10 (5.3%), H12 (2.8%) e H13 (2.3%) foram mais frequentes nos indivíduos saudáveis do que nos pacientes com LC (H10 (0.4%), H12 (0.1%) e H13 (0.2%)).

Os testes estatísticos mostram que o portador para H10 tem 94% menos risco de desenvolver (OR = 0.06 [95% IC 0.03 – 0.14];  $p$ -valor =  $1.3 \times 10^{-17}$ ). Os portadores de H12 (OR = 0.04 [95% IC 0.01 – 0.15];  $p$ -valor =  $1.1 \times 10^{-10}$ ) e H13 (OR = 0.07 [95% IC 0.02 – 0.2];  $p$ -valor  $2.5 \times 10^{-8}$ ) mostraram conferir proteção contra LC. Por outro lado, portadores de H8 mostraram ter 180% mais risco para desenvolver LC (OR = 2.8 [95% IC 1.7 – 4.2];  $p$ -valor =  $3 \times 10^{-6}$ ). Do mesmo modo, H11 também mostrou conferir suscetibilidade à LC (OR = 2.5 [95% IC 1.5 – 4.1];  $p$ -valor =  $0.5 \times 10^{-5}$ ).

Aos observamos as frequências de SNV 4 (rs2069747) de SNV 8 (rs2069750) que foram aproximadamente 2%, nós resolvemos excluir essas duas variantes da análise. Consequentemente, calculamos novamente as frequências para os haplótipos e atualizamos os resultados agora mostrados na **Tabela 8**.

Um total de 15 haplótipos foram observados e identificados de H1' a H15'. Os testes estatísticos mostraram que os haplótipos H8' (ACCTGCC) e H11' (ACCCAAT) estão associados à suscetibilidade para desenvolver LC sugerindo que os portadores desses apresentam, 180 e 170% mais risco, respectivamente. Em contraste, os haplótipos H10' (ACCCGCT), H13' (AGCTAAC) e H14' (CCCTAAC) mostraram uma diminuição do risco de 93%, 96 % e 93% respectivamente, para o desenvolvimento de LC.

#### **4.5 Correlação dos genótipos das variantes com as concentrações das citocinas IL-13, IL-4 e IL-5 presentes no plasma.**

As citocinas produzidas pelo perfil Th2 (IL-4, IL-13 e IL-5), foram dosadas a partir do plasma de pacientes com LC (400) e indivíduos saudáveis (400) em concentrações de picograma por mililitros (pg/mL) usando o equipamento Luminex e transformadas em

escala log (log(pg/mL)) para comparações entre os genótipos afim de saber se há correlação entre as variantes do gene *IL13* e as concentrações das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 presentes no plasma.

**Tabela 8 - Distribuição das frequências de haplótipos do gene *IL13* entre os pacientes com LC (casos) e controles saudáveis (controles) após exclusão das variantes rs2069747 e rs2069750**

H	V1	V2	V3	V5	V6	V7	V9	Casos (%)	Controles (%)	$\chi^2$	OR IC 95%	p-valor
1'	A	C	C	C	G	C	C	640 (3.8)	597 (35)	2.1	1.1 [0.9-1.2]	0.14
2'	A	C	C	T	A	A	T	137 (8.1)	117 (7)	1.6	1.2 [0.9-1.5]	0.21
3'	A	G	C	T	A	A	T	123 (7.3)	124 (7.4)	0.01	0.9 [0.7-1.2]	0.89
4'	C	C	C	T	A	A	T	130 (7.7)	116 (6.9)	0.76	1.1 [0.8-1.4]	0.38
5'	C	C	C	C	G	C	C	74 (4.4)	66 (4)	0.53	1.1 [0.8-1.5]	0.50
6'	A	C	T	C	G	C	C	63 (3.7)	58 (3.5)	0.18	1.1 [0.7-1.5]	0.69
7'	A	G	C	C	G	C	C	64 (3.8)	43 (2.6)	4.1	1.5 [1.0-2.2]	0.04
8'	A	C	C	T	G	C	C	75 (4.4)	29 (1.8)	23	2.8 [1.8-4.3]	7.1E-6
9'	C	C	T	T	A	A	T	49 (2.9)	50 (3)	0.02	1.0 [0.6-1.4]	0.91
10'	A	C	C	C	G	C	T	7 (0.4)	90 (5.4)	73	0.07 [0.03-0.15]	6.1E-18
11'	A	C	C	C	A	A	T	56 (3.3)	21 (1.3)	16	2.7 [1.6-4.4]	7.9E-5
12'	A	C	C	C	G	A	C	21 (1.2)	28 (1.7)	1	0.7 [0.4-1.4]	0.29
13'	A	G	C	T	A	A	C	2 (0.1)	46 (2.7)	41	0.04 [0.01-0.15]	1.4E-10
14'	C	C	C	T	A	A	C	3 (0.2)	38 (2.3)	30	0.07 [0.02-0.2]	3.3E-8
15'	A	G	C	C	G	A	C	18 (1.1)	22 (1.3)	0.4	0.8 [0.4-1.5]	0.47

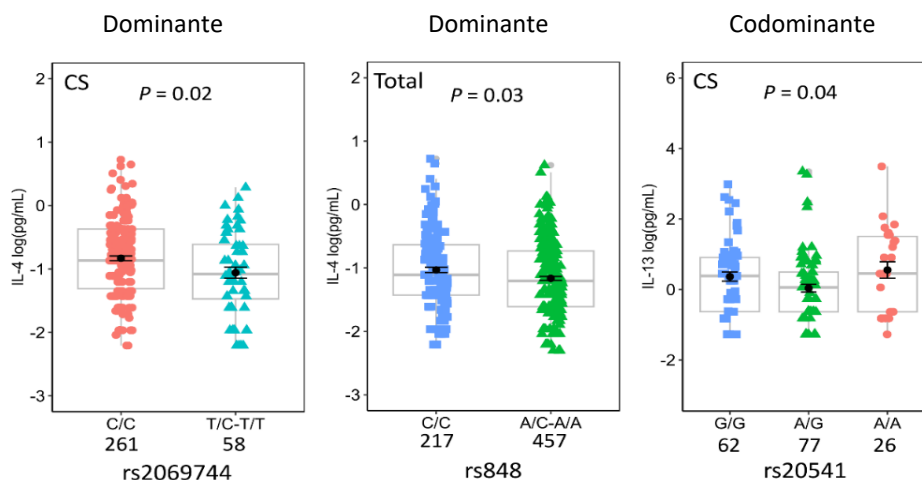
Fonte: José Júnior (2023). Nota:  $\chi^2$ : Qui-quadrado; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; p-valor < 0.05 são considerados significantes.

Após as comparações, observamos que a variante rs2069744, localizada no íntron 1 do gene (**Figura 13**), foi correlacionada com as concentrações de IL-4 circulantes no plasma dos pacientes LC (CS) em modelo genético dominante (**Figura 15**). E a variante rs848, localizada na região 3'UTR (**Figura 13**), foi correlacionada com concentrações de IL-4 entre a população total (pacientes LC + controles saudáveis) em modelo genético dominante (**Figure 15**). Os portadores homozigotos para o genótipo CC de rs2069744 e rs848 apresentaram correlação para altas concentrações de IL-4 presente no plasma.



De todas as variantes, somente a variante rs20541 (Arg130Gln), localizada no éxon 4 (**Figura 13**), mostrou correlação com as concentrações de IL-13, e essa associação foi encontrada especialmente nos pacientes com LC (**Figura 15**).

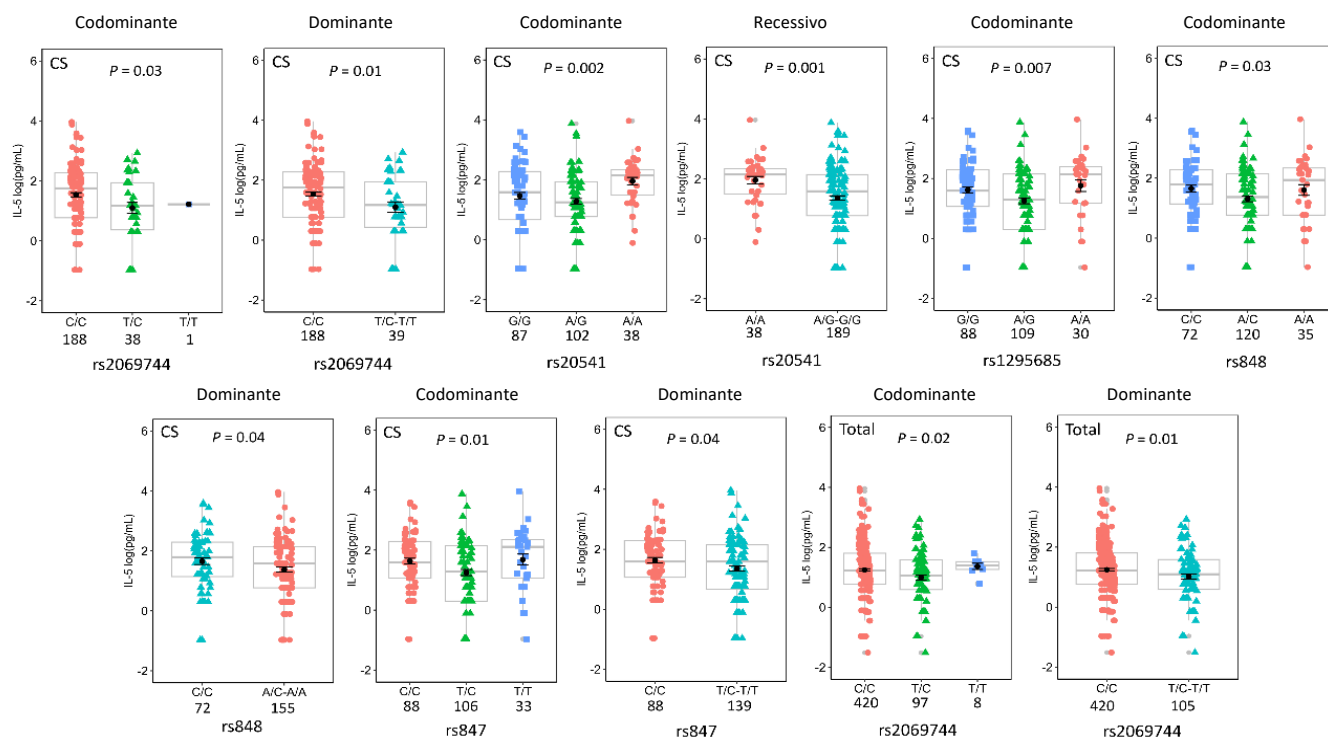
**Figura 15 - Efeito das variantes rs2069744, rs848 e rs20541 (Arg130Gln) nas concentrações de IL-13 presentes no plasma**



Fonte: José Júnior (2023). Nota: As variantes rs2069744 e rs848 e as comparações de concentrações de IL-4 presentes no plasma baseada em modelo genético dominante e a variante rs20541 (Arg130Gln) e as comparações de concentrações de IL-13 presentes no plasma em modelo codominante. As análises foram calculadas por modelo linear geral (GLM) ajustadas por sexo e idade assumindo distribuição log normal usando o pacote estatístico SNPAssoc no software R. Os pontos em preto representam a média em log(pg/mL) e barras de erro representando o erro padrão da média (SEM) acompanhados de gráficos de caixa em cor cinza. Os gráficos foram feitos no software R usando o pacote de visualização ggplot2.

Foram observadas correlações de cinco variantes específicas com concentrações de IL-5 presente no plasma pacientes com LC. As comparações das variantes rs2069744 (intron 1), rs20541 (éxon 4), rs1295685, rs848, rs847 (variantes da região 3'UTR) e as concentrações de IL-5 podem ser visualizadas na **Figura 16**. Os indivíduos homozigotos para os genótipos CC de rs2069744, AA de rs20541, AA de 1295685, AA de rs848 e TT de rs847 foram correlacionados com alta concentrações de IL-5 presente no plasma.

**Figura 16 - Efeito das variantes rs2069744, rs20541, rs129685, rs848 e rs847 nas concentrações de IL-5 presente no plasma em diferentes modelos genéticos**



Fonte: José Júnior (2023). Nota: Correlação das concentrações de IL-5 no plasma e as variantes rs2069744, rs20541, rs129685, rs848 e rs847. As análises foram calculadas por modelo linear geral (GLM) ajustadas por sexo e idade assumindo distribuição log normal usando o pacote estatístico SNPAssoc no software R. Os pontos em preto representam a média em log(pg/mL) e barras de erro representando o erro padrão da média (SEM) acompanhados de gráficos de caixa em cor cinza. Os gráficos foram feitos no software R usando o pacote de visualização ggplot2.

## 4.6 Artigos e Publicações

Artigo 1 - Artigo completo produzido e submetido à revista *Frontiers in Immunology* com o título: A fine mapping of single nucleotide variants of *IL13* gene in patients with *Leishmania guyanensis*-cutaneous leishmaniasis and plasma cytokines IL-4, IL-5 and IL-13. O artigo como autor principal consultado no **Anexo 1**.

Outros artigos também foram publicados durante o período do curso:

Artigo 2 - *TREM1* rs2234237 (Thr25Ser) Polymorphism in Patients with Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania guyanensis*: A Case-Control Study in

the State of Amazonas, Brazil. O artigo publicado como autor principal consultado no anexo 2.

Artigo 3 - Variants of *NOD2* in *Leishmania guyanensis*-infected patients with cutaneous leishmaniasis and correlations with plasma circulating pro-inflammatory cytokines. O artigo publicado como co-autor pode ser consultado no anexo 3.

Artigo 4 - Distinct plasma chemokines and cytokines signatures in *Leishmania guyanensis*-infected patients with cutaneous leishmaniasis. O artigo como co-autor pode ser consultado no anexo 4.

Artigo 5 - *IL-23R* Variant rs11805303 Is Associated With Susceptibility to the Development of Cutaneous Leishmaniasis in *Leishmania guyanensis*-Infected Individuals. O artigo publicado como co-autor pode ser consultado no anexo 5.

Artigo 6 - Variants of *MIRNA146A* rs2910164 and *MIRNA499* rs3746444 are associated with the development of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania guyanensis* and with plasma chemokine IL-8. O artigo publicado como co-autor pode ser consultado no anexo 6.

Artigo 7 - Single nucleotide polymorphisms of the genes *IL-2*, *IL-2RB*, and *JAK3* in patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (V.) guyanensis* in Manaus, Amazonas, Brazil. O artigo publicado pode ser consultado no anexo 7.

Artigo 8 - A Single Haplotype of *IFNG* Correlating With Low Circulating Levels of Interferon- $\gamma$  Is Associated With Susceptibility to Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania guyanensis*. O artigo publicado pode ser consultado no anexo 8.

Artigo 9 - A polymorphism in the *IL1B* gene (rs16944 T/C) is associated with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania guyanensis* and plasma cytokine interleukin receptor antagonist. O artigo publicado pode ser consultado no anexo 9.

## 6. CONCLUSÃO

Para saber o papel do gene *IL4* na infecção de *L. guyanensis* são necessários mais experimentos para se obter um n amostral adequado para realizar testes estatísticos confiáveis afim de obter os resultados. Quando ao gene *IL13*, apesar das nove variantes não estarem associadas à LC, três haplótipos estão associados a resistência e dois ligados à suscetibilidade. Nossos achados sugerem a possibilidade de outra variante fora da região do gene está associada a suscetibilidade à LC-*L.g.*

## 7. REFERÊNCIAS

- ACUÑA, S. M. et al. Arginase expression modulates nitric oxide production in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–21, 2017.
- AHMED, A. A. et al. TNF- $\alpha$  - 308 G/A and IFN- $\gamma$  + 874 A/T gene polymorphisms in Saudi patients with cutaneous leishmaniasis. **BMC Medical Genetics**, v. 21, n. 1, p. 1–9, 2020.
- AKAIWA, M. et al. Localization of human interleukin 13 receptor in non-haematopoietic cells. **Cytokine**, v. 13, n. 2, p. 75–84, 2001.
- AKBARI, M. et al. IRF4 in Dendritic Cells Inhibits IL-12 Production and Controls Th1 Immune Responses against *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 5, p. 2271–2279, 2014.
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Immunotherapy in treatment of leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 233, n. December 2020, p. 80–86, 2021.
- ALEXANDER, J. et al. An essential role for IL-13 in maintaining a non-healing response following *Leishmania mexicana* infection. **European Journal of Immunology**, v. 32, n. 10, p. 2923–2933, 2002.
- ALMO, M. M. et al. The role of long noncoding RNAs in human T CD3+ cells. **Journal of Immunological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 32–36, 2018.
- AMATO, V. S. et al. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**, v. 105, n. 1, p. 1–9, 2008.
- AMBROSIO, A. R.; DE MESSIAS-REASON, I. J. T. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Interaction of mannose-binding lectin with surface glycoconjugates and complement activation. An antibody-independent defence mechanism. **Parasite Immunology**, v. 27, n. 9, p. 333–340, 2005.
- AMEISEN, J. C. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. p. 367–393, 2002.
- AMIRZARGAR, A. A. et al. Polymorphisms in IL4 and IL4RA confer susceptibility to asthma. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 19, n. 6, p. 433–438, 2009.
- AMIT, A. et al. Immunization with *Leishmania donovani* protein disulfide isomerase DNA construct induces Th1 and Th17 dependent immune response and protection against experimental visceral leishmaniasis in Balb/c mice. **Molecular Immunology**, v. 82, p.

104–113, 2017.

ANDREWS, A. L. et al. The association of the cytoplasmic domains of interleukin 4 receptor alpha and interleukin 13 receptor alpha 2 regulates interleukin 4 signaling. **Molecular BioSystems**, v. 9, n. 12, p. 3009–3014, 2013.

ANNA, A.; MONIKA, G. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. **Journal of Applied Genetics**, v. 59, n. 3, p. 253–268, 2018.

ANTONELLI, L. R. V. et al. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 101, n. 2, p. 226–230, 2005.

ARIMA, K. et al. Upregulation of IL-13 concentration in vivo by the IL13 variant associated with bronchial asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, n. 6, p. 980–987, 2002.

ARIMURA, A. et al. The transcriptional co-activator p/CIP (NCoA-3) is up-regulated by STAT6 and serves as a positive regulator of transcriptional activation by STAT6. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 30, p. 31105–31112, 2004.

ARMATA, I. A. et al. Dopa-Responsive Dystonia: Functional Analysis of Single Nucleotide Substitutions within the 5' Untranslated GCH1 Region. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 7–11, 2013.

ASAI, A. et al. CCL1 released from M2b macrophages is essentially required for the maintenance of their properties. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 4, p. 859–867, 2012.

ASHLEY, S. E. et al. Genetic variation at the Th2 immune gene IL13 is associated with IgE-mediated paediatric food allergy. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 47, n. 8, p. 1032–1037, 2017.

ASSAF, A. et al. Genetic evidence of functional ficolin-2 haplotype as susceptibility factor in cutaneous leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–7, 2012.

AUNE, T. M.; CROOKE, P. S.; SPURLOCK, C. F. Long noncoding RNAs in T lymphocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 99, n. 1, p. 31–44, 2016.

BACELLAR, O. et al. Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 70, n. 12, p. 6734–6740, 2002.

BACELLAR, O. et al. IL-17 Production in Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 200, n. 1, p. 75–78, 2009.

BADALYAN, V. et al. TNF- $\alpha$ /IL-17 synergy inhibits IL-13 bioactivity via IL-13R $\alpha$ 2

induction. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, n. 4, p. 975- 978.e5, 2014.

BAO, C. et al. mRNA stem-loops can pause the ribosome by hindering A-site tRNA binding. **eLife**, v. 9, p. 1–67, 2020.

BAYASCAS, J. R. et al. Mutation of the PDK1 PH Domain Inhibits Protein Kinase B/Akt, Leading to Small Size and Insulin Resistance. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 10, p. 3258–3272, 2008.

BEAUDOIN, J. D.; PERREAULT, J. P. 5'-UTR G-quadruplex structures acting as translational repressors. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 20, p. 7022–7036, 2010.

BECKER, I. et al. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 130, n. 2, p. 65–74, 2003.

BEGHÉ, B. et al. Polymorphisms in IL13 pathway genes in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 65, n. 4, p. 474–481, 2010.

BELKAID, Y. The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in Leishmania infection. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 3, n. 6, p. 875–885, 2003.

BENICIO, E. DE A. et al. Combining diagnostic procedures for the management of leishmaniasis in areas with high prevalence of Leishmania guyanensis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1141–1144, 2011.

BESNARD, A. et al. Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain. **Frontiers in Neuroscience**, v. 5, n. MAR, p. 1–11, 2011.

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, 2010.

BOMFIM, G. et al. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 84, n. 2, p. 188–194, 1996.

BOOTHBY, M. et al. IL-4 signaling, gene transcription regulation, and the control of effector T cells. **Immunologic Research**, v. 23, n. 2–3, p. 179–191, 2001.

BORGES, A. F.; GOMES, R. S. Leishmania ( Viannia ) guyanensis in tegumentary leishmaniasis. n. July 2017, p. 1–10, 2018.

BOURREAU, E. et al. Interleukin (IL)-13 is the predominant Th2 cytokine in localized cutaneous leishmaniasis lesions and renders specific CD4+ T cells unresponsive to IL-

12. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 6, p. 953–959, 2001.

BROWN, P. et al. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in key cytokines may modulate food allergy phenotypes. **Eur Food Res Technol**, v. 235, n. 5, p. 971–980, 2013.

BRYSON, K. J. et al. BALB/c mice deficient in CD4+ T cell il-4 $\alpha$  expression control *Leishmania mexicana* load although female but not male mice develop a healer phenotype. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 1, 2011.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CAI, S. et al. Two novel beta-thalassemia mutations in the 5' and 3' noncoding regions of the beta-globin gene [see comments]. **Blood**, v. 79, n. 5, p. 1342–1346, 1992.

CALLARD, R. E.; MATTHEWS, D. J.; HIBBERT, L. M. Interleukin 4 and interleukin 13: Same response, different receptors. **Biochemical Society Transactions**, v. 25, n. 2, p. 451–455, 1997.

CARNEIRO, P. P. et al. The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2016.

CARREGARO, V. et al. Dual effect of *Lutzomyia longipalpis* saliva on *Leishmania braziliensis* infection is mediated by distinct saliva-induced cellular recruitment into BALB/c mice ear. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, 2013.

CARVALHO, M. S. L. C, BREDT, A.; ROBERTA, E.; MENEHIN, DE OLIVEIRA, C. Phlebotominae Fauna (Diptera: Psychodidae) in Areas of Transmission of American Cutaneous Leishmaniasis in the Federal District, Brazil, from 2006 to 2008  
Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 19, n. 3, p. 227–237, 2010.

CASTELLUCCI, L. et al. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **J Infect Dis**, v. 194, n. 4, p. 519–527, 2006.

CASTELLUCCI, L. et al. CXCR1 and SLC11A1 polymorphisms affect susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil: Affect case-control and family-based study. **BMC Medical Genetics**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2010.

CATLING, A. D. et al. A proline-rich sequence unique to MEK1 and MEK2 is required for raf binding and regulates MEK function. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 10, p. 5214–5225, 1995.



- CHANG, K. P.; FONG, D.; BRAY, R. S. Biology of Leishmania and leishmaniasis. In: Leishmaniasis. **Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam**, v. 1, p. 1–30, 1985.
- CHARDIN, P. et al. Human Sos1: A guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. **Science**, v. 260, n. 5112, p. 1338–1343, 1993.
- CHEN, H.; PAUL, W. E. Cultured NK1.1+ CD4+ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1. **The Journal of Immunology**, v. 159, n. 5, p. 2240 LP – 2249, 1 set. 1997.
- CHEN, X. et al. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. **Cell**, v. 93, n. 5, p. 827–839, 1998.
- CHOMARAT, P.; BANCHEREAU, J. Interleukin-4 and interleukin-13: Their Similarities and Discrepancies. **Intern. Rev. Immunol**, v. 16, n. 214, p. 205–226, 1998.
- CLABORN, D. The biology and control of leishmaniasis vectors. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 127, 2010.
- CONTRERAS, I. et al. Leishmania-induced inactivation of the macrophage transcription Factor AP-1 Is Mediated by the Parasite Metalloprotease GP63. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 10, 2010.
- CONVIT, J.; PINARDI, M. E.; RONDÓN, A. J. Diffuse cutaneous leishmaniasis: A disease due to an immunological defect of the host. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 4, p. 603–610, 1972.
- COSTA, D. L. et al. CCR2 signaling contributes to the differentiation of protective inflammatory dendritic cells in Leishmania braziliensis infection . **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 2, p. 423–432, 2016.
- CROVETTO-MARTÍNEZ, R. et al. Mucocutaneous leishmaniasis must be included in the differential diagnosis of midline destructive disease: Two case reports. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 119, n. 1, p. e20–e26, 2015.
- CRUZALEGUI, F. H.; CANO, E.; TREISMAN, R. ERK activation induces phosphorylation of Elk-1 at multiple S/T-P motifs to high stoichiometry. **Oncogene**, v. 18, n. 56, p. 7948–7957, 1999.
- CUMMINGS, H. E. et al. Critical role for phosphoinositide 3-kinase gamma in parasite invasion and disease progression of cutaneous leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 4, p. 1251–1256, 2012.
- CURRIE, R. A. et al. Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. **Biochemical**

**Journal**, v. 337, n. 2–3, p. 575–583, 1999.

DA SILVA, G. A. V. et al. A polymorphism in the IL1B gene (rs16944 T/C) is associated with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania guyanensis* and plasma cytokine interleukin receptor antagonist. **Cytokine**, v. 123, n. August 2018, p. 154788, 2019.

DA SILVA, G. A. V. et al. A single haplotype of IFNG correlating with low circulating levels of interferon- $\gamma$  is associated with susceptibility to cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania guyanensis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 2, p. 274–281, 2020.

DAINES, M. O.; KHURANA HERSHEY, G. K. A novel mechanism by which interferon- $\gamma$  can regulate interleukin (IL)-13 responses. Evidence for intracellular stores of IL-13 receptor  $\alpha$ -2 and their rapid mobilization by interferon- $\gamma$ . **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 12, p. 10387–10393, 2002.

DARNELL, J. E. STATs and gene regulation. **Science**, v. 277, n. 5332, p. 1630–1635, 1997.

DATTA, S. R. et al. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. **Molecular Cell**, v. 6, n. 1, p. 41–51, 2000.

DE ARAUJO, F. J. et al. Functional variations in MBL2 gene are associated with cutaneous leishmaniasis in the Amazonas state of Brazil. **Genes and Immunity**, v. 16, n. 4, p. 284–288, 2015a.

DE ARAUJO, F. J. et al. Polymorphisms in the TOLLIP gene influence susceptibility to cutaneous leishmaniasis caused by *leishmania guyanensis* in the amazonas state of Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1–10, 2015b.

DE ASSIS, R. R. et al. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 9, p. 1354–1365, 2012.

DE GUERRA, J. A. O. et al. Tegumentary leishmaniasis in the state of amazonas: What have we learned and what do we need? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. July 2014, p. 12–19, 2015.

DE JESUS FERNANDES COVAS, C. et al. Candidate gene case-control and functional study shows macrophage inhibitory factor (MIF) polymorphism is associated with cutaneous leishmaniasis. **Cytokine**, v. 61, n. 1, p. 168–172, 2013.

DE MOURA, T. R. et al. Enhanced *Leishmania braziliensis* infection following pre-exposure to sandfly saliva. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, n. 2, 2007.

DE OLIVEIRA, J. G. et al. Influence of functional polymorphisms in TNF- $\alpha$ , IL-8, and IL-

10 cytokine genes on mRNA expression levels and risk of gastric cancer. **Tumor Biology**, v. 36, n. 12, p. 9159–9170, 2015.

DHILLON, A. S. et al. Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. **EMBO Journal**, v. 21, n. 1–2, p. 64–71, 2002.

DÍAZ-GANDARILLA, J. A. et al. PPAR Activation Induces M1 Macrophage Polarization via cPLA 2 -COX-2 Inhibition , Activating ROS Production against *Leishmania mexicana*. **BioMed Research International**, v. 2013, n. Special Issue, p. 13, 2013.

DOHERTY, T. A.; BROIDE, D. H. Airway innate lymphoid cells in the induction and regulation of allergy. **Allergology International**, v. 68, n. 1, p. 9–16, 2019.

DOWLATI, Y. Cutaneous leishmaniasis: Clinical aspect. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 425–431, 1996.

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 1–12, 2014.

EHRlich, A. et al. The Immunotherapeutic Role of Regulatory T Cells in *Leishmania (Viannia) panamensis* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 6, p. 2961–2970, 2014.

EUFRÁSIO DE FIGUEIREDO, W. M. et al. CXCL10 treatment promotes reduction of IL-10+ regulatory T (Foxp3+ and Tr1) cells in the spleen of BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*. **Experimental Parasitology**, v. 207, n. October, p. 107789, 2019.

FANG, L. J. et al. A novel mutation in the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene promotes skipping of two exons by preventing exon definition. **Journal of Molecular Biology**, v. 307, n. 5, p. 1261–1270, 2001.

FAY, M. M.; LYONS, S. M.; IVANOV, P. RNA G-Quadruplexes in Biology: Principles and Molecular Mechanisms. **Journal of Molecular Biology**, v. 429, n. 14, p. 2127–2147, 2017.

FELIZARDO, T. C. et al. Lack of signaling by IL-4 or by IL-4/IL-13 has more attenuating effects on *Leishmania amazonensis* dorsal skin - than on footpad-infected mice. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 1, p. 48–57, 2012.

FICHTNER-FEIGL, S. et al. IL-13 signaling through the IL-13 $\alpha$ 2 receptor is involved in induction of TGF- $\beta$ 1 production and fibrosis. **Nature Medicine**, v. 12, n. 1, p. 99–106, 2006.

FLANDIN, J. F.; CHANO, F.; DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon- $\gamma$ -primed macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 2, p. 411–420,

2006.

FLORES, J. K.; ATAIDE, S. F. Structural changes of RNA in complex with proteins in the SRP. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 5, n. FEB, p. 1–8, 2018.

FRANÇA-COSTA, J. et al. Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 3, p. 426–435, 2015.

FRATERNALE, A.; BRUNDU, S. Polarization and Repolarization of Macrophages. **Journal of Clinical and Cellular Immunology**, v. 06, n. 02, p. 1–10, 2015.

GAZE, S. T. et al. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 63, n. 1, p. 70–78, 2006.

GONÇALVES DE ALBUQUERQUE, S. DA C. et al. Study of association of the rs2275913 IL-17A single nucleotide polymorphism and susceptibility to cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Cytokine**, v. 123, n. December 2018, p. 154784, 2019.

GONCALVES, R. et al. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 6, p. 1253–1265, 2011.

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

GONZÁLEZ, J. R. et al. SNPAssoc: An R package to perform whole genome association studies. **Bioinformatics**, v. 23, n. 5, p. 644–645, 2007.

GORDON, S. ALTERNATIVE ACTIVATION OF MACROPHAGES. v. 3, n. January, 2003.

GRABER, P. et al. The distribution of IL-13 receptor  $\alpha$ 1 expression on B cells, T cells and monocytes and its regulation by IL-13 and IL-4. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 12, p. 4286–4298, 1998.

GUERRA, J. A. DE O. et al. Leishmaniose tegumentar americana em crianças: aspectos epidemiológicos de casos atendidos em Manaus, Amazonas, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 9, p. 2215–2223, 2007.

GUIMARAES-COSTA, A. B. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 16, p. 6748–6753, 2009.

GUO, Y.; JAMISON, D. C. The distribution of SNPs in human gene regulatory regions. **BMC Genomics**, v. 6, p. 1–11, 2005.

GUPTA, P. et al. Leishmania donovani inhibits macrophage apoptosis and pro-inflammatory response through AKT-mediated regulation of  $\beta$ -catenin and FOXO-1. **Cell Death and Differentiation**, v. 23, n. 11, p. 1815–1826, 2016.

HALUSHKA, M. K. et al. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. **Nature Genetics**, v. 22, n. 3, p. 239–247, 1999.

HARTENSTEIN, B. et al. Th2 cell-specific cytokine expression and allergen-induced airway inflammation depend on JunB. **EMBO Journal**, v. 21, n. 23, p. 6321–6329, 2002.

HASHIGUCHI, Y. et al. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: Clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. **Tropical Medicine and Health**, v. 44, n. 1, p. 1–9, 2016.

HE, C. H. et al. Chitinase 3-like 1 regulates cellular and tissue responses via IL-13 receptor  $\alpha 2$ . **Cell Reports**, v. 4, n. 4, p. 830–841, 2013.

HEBENSTREIT, D. et al. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 17, n. 3, p. 173–188, 2006.

HELLER, N. M. et al. The extracellular and transmembrane domains of the  $\gamma C$  and interleukin (IL)-13 receptor  $\alpha 1$  chains, not their cytoplasmic domains, dictate the nature of signaling responses to IL-4 and IL-13. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 38, p. 31948–31961, 2012.

HERSHEY, G. K. K. IL-13 receptors and signaling pathways : An evolving web. **J ALLERGY CLIN IMMUNOL**, p. 677–690, 2002.

HIMMELRICH, H. et al. In BALB/c Mice, IL-4 Production During the Initial Phase of Infection with Leishmania major Is Necessary and Sufficient to Instruct Th2 Cell Development Resulting in Progressive Disease . **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 9, p. 4819–4825, 2000.

HUSSEIN, Y. M. et al. Influence of interleukin-4 gene polymorphisms and interleukin-4 serum level on susceptibility and severity of rheumatoid arthritis in Egyptian population. **Cytokine**, v. 61, n. 3, p. 849–855, 2013.

IBGE. Atlas nacional do Brasil Milton Santos / IBGE, Diretoria de Geociências. In: [s.l: s.n.]. p. 307.

IBRAIM, I. C. et al. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from Leishmania braziliensis and Leishmania infantum trigger different innate immune responses in murine macrophages. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2013.

- IEZZI, G. et al. Lymph Node Resident Rather Than Skin-Derived Dendritic Cells Initiate Specific T Cell Responses after *Leishmania major* Infection . **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 2, p. 1250–1256, 2006.
- IMRAISH, A.; ABU-THIAB, T.; ZIHLIF, M. IL-13 and FOXO3 genes polymorphisms regulate IgE levels in asthmatic patients. **Biomedical Reports**, v. 14, n. 6, p. 1–7, 2021.
- JERONIMO, S. M. B. et al. Genes at human chromosome 5q31 . 1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. p. 539–551, 2007.
- JL, J. et al. CD4+CD25+ Regulatory T Cells Restrain Pathogenic Responses during *Leishmania amazonensis* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 11, p. 7147–7153, 2005.
- JUNTTILA, I. S. Tuning the cytokine responses: An update on interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, 2018.
- KALANI, M. et al. Interleukine-22 gene variants are associated with susceptibility to visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 226–227, n. November 2020, p. 108122, 2021.
- KAMALI-SARVESTANI, E. et al. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Iranian patients. **Cytokine**, v. 35, n. 3–4, p. 159–165, 2006.
- KÄNSÄKOSKI, J. et al. Complete androgen insensitivity syndrome caused by a deep intronic pseudoexon-activating mutation in the androgen receptor gene. **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 1–7, 2016.
- KAUFFMANN, F. et al. STAT6 mediates footpad immunopathology in the absence of IL-12p40 following infection of susceptible BALB/c mice with *Leishmania major*. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAR, p. 1–11, 2018.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.
- KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis. **Human Vaccines**, v. 7, n. 11, p. 1204–1214, 2011.
- KEEGAN, A. D. et al. An IL-4 receptor region containing an insulin receptor motif is important for IL-4-mediated IRS-1 phosphorylation and cell growth. **Cell**, v. 76, n. 5, p. 811–820, 1994.
- KEEGAN, A. D. et al. Similarities and differences in signal transduction by interleukin 4 and interleukin 13: Analysis of Janus kinase activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 17, p. 7681–7685, 1995.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KIESLER, P. et al. An allergy-associated polymorphism in a novel regulatory element enhances IL13 expression. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 23, p. 4513–4520, 2009.

KIRIK, F. E. et al. Association of cytokine gene polymorphisms with susceptibility to cutaneous leishmaniasis in a Turkish population. **Parasite Immunology**, v. 42, n. 11, p. 1–9, 2020.

KOPF, B. M. et al. IL-4-deficient Balb/c Mice Resist Infection with Leishmania major. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. September, 1996.

KOSTKA, S. L. et al. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **J Immunol**, v. 182, n. 5, p. 3039–3046, 2009.

KRAWCZAK, M. et al. Single Base-Pair Substitutions in Exon–Intron Junctions of Human Genes: Nature, Distribution, and Consequences for mRNA Splicing. **Hum Mutation**, v. 2, n. 28, p. 150–158, 2007.

KRAWCZAK, M.; REISS, J.; COOPER, D. N. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: Causes and consequences. **Human Genetics**, v. 90, n. 1–2, p. 41–54, 1992.

KROPF, P. et al. Toll-Like Receptor 4 Contributes to Efficient Control of Infection with the Protozoan Parasite Leishmania major. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 1920–1928, 2004.

KUMAR, R.; BUMB, R. A.; SALOTRA, P. Correlation of parasitic load with interleukin-4 response in patients with cutaneous leishmaniasis due to Leishmania tropica. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 239–246, 2009.

LAMS, K. et al. The Phosphatidylinositol3-Kinase Serine Kinase Phosphorylates IRS-1. **The Journal of biological chemistry**, p. 20648–20652, 1994.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210–214, 2003.

LAVOIE, H.; THERRIEN, M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 5, p. 281–298, 2015.

LEE, E. et al. Association of IL13 genetic polymorphisms with atopic dermatitis: Fine mapping and haplotype analysis. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 125, n. 3, p. 287–293, 2020.

LEE, S. O. et al. Requirement for NF- $\kappa$ B interleukin-4-induced androgen receptor activation in prostate cancer cells. **Prostate**, v. 64, n. 2, p. 160–167, 2005.

LEOPOLDO, P. T. G. et al. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, p. 1–6, 2006.

LETZELTER, F.; WANG, Y.; SEBALD, W. The interleukin-4 site-2 epitope determining binding of the common receptor  $\gamma$  chain. **European Journal of Biochemistry**, v. 257, n. 1, p. 11–20, 1998.

LI, Y. K. et al. Convergent Evidence Supports TH2LCRR as a Novel Asthma Susceptibility Gene. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 66, n. 3, p. 283–292, 2022.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. **Immunobiology**, v. 213, n. 3–4, p. 377–387, 2008.

LIEW, F. Y. et al. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **The Journal of Immunology**, v. 144, n. 12, p. 4794–4797, 15 jun. 1990.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  synergizes with IFN- $\gamma$  in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **The Journal of Immunology**, v. 145, n. 12, p. 4306 LP – 4310, 15 dez. 1990.

LITTERST, C. M.; PFITZNER, E. An LXXLL motif in the transactivation domain of STAT6 mediates recruitment of NCoA-1/SRC-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 39, p. 36052–36060, 2002.

LIU, S.; LI, T.; LIU, J. Interleukin-4 rs2243250 polymorphism is associated with asthma among Caucasians and related to atopic asthma. **Cytokine**, v. 59, n. 2, p. 364–369, 2012.

LOHRER, H. D.; TANGEN, U. Investigations into the molecular effects of single nucleotide polymorphism. **Pathobiology**, v. 68, n. 6, p. 283–290, 2000.

LUPARDUS, P. J.; BIRNBAUM, M. E.; GARCIA, K. C. Molecular Basis for Shared Cytokine Recognition Revealed in the Structure of an Unusually High Affinity Complex between IL-13 and IL-13R $\alpha$ 2. **Structure**, v. 18, n. 3, p. 332–342, 2010.

LUPI, O. et al. Tropical dermatology: Tropical diseases caused by protozoa. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 60, n. 6, p. 897–925, 2009.

MACHADO, P. R. et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.



105, n. 8, p. 438–444, 2011.

MAITI, N. R. et al. Serine phosphorylation of Stat6 negatively controls its DNA-binding function. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 25, n. 9, p. 553–563, 2005.

MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1261–1274, 2007.

MATTHEWS, D. J. et al. IL-13 Is a Susceptibility Factor for Leishmania major Infection. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 3, p. 1458–1462, 2000a.

MATTHEWS, D. J. et al. IL-13 Is a Susceptibility Factor for Leishmania major Infection. **The Journal of Immunology**, 2000b.

MCCORMICK, S. M.; HELLER, N. M. Commentary: IL-4 and IL-13 receptors and signaling. **Cytokine**, v. 75, n. 1, p. 38–50, 2015.

MCDONALD, C.; REICH, N. C. Cooperation of the transcriptional coactivators CBP and p300 with Stat6. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 19, n. 7, p. 711–722, 1999.

MCGEACHY, M. J. et al. TGF- $\beta$  and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. **Nature Immunology**, v. 8, n. 12, p. 1390–1397, 2007.

MEIXNER, A. et al. JunD regulates lymphocyte proliferation and T helper cell cytokine expression. **EMBO Journal**, v. 23, n. 6, p. 1325–1335, 2004.

METZ, H. E.; HOUGHTON, A. M. G. Insulin receptor substrate regulation of phosphoinositide 3-kinase. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 2, p. 206–211, 2011.

MINTY, A. et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. **Nature**, v. 362, n. 6417, p. 248–50, 1993.

MOH'D AL-RAWASHDEH, B. et al. Association of IL-4 Polymorphisms with Allergic Rhinitis in Jordanian Population. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 56, n. 4, p. 1–9, 2020.

MOHRS, M. et al. Differences Between IL-4- and IL-4 Receptor  $\alpha$ -Deficient Mice in Chronic Leishmaniasis Reveal a Protective Role for IL-13 Receptor Signaling. 1999.

MOKNI, M. Cutaneous leishmaniasis. **Annales de Dermatologie et de Venereologie**, v. 146, n. 3, p. 232–246, 2019.

MONJE, P.; MARINISSEN, M. J.; GUTKIND, J. S. Phosphorylation of the Carboxyl-Terminal Transactivation Domain of c-Fos by Extracellular Signal-Regulated Kinase

Mediates the Transcriptional Activation of AP-1 and Cellular Transformation Induced by Platelet-Derived Growth Factor. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 19, p. 7030–7043, 2003.

MOY, F. J. et al. Solution Structure of Human IL-13 and Implication for Receptor Binding. p. 219–230, 2001.

MS. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. [s.l: s.n.]. v. 2º edição

MS. Casos de leishmaniose tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2021 Região. p. 2021, 2021.

MS. Coeficiente de detecção de casos de Leishmaniose Tegumentar por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015. **Sinan/SVS/MS**, p. 2015, 2022a.

MS. **Estratificação De Risco De Leishmaniose Tegumentar Por Município De Infecção Entre 2018 a 2020 No Brasil**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/arquivos/estratificacaolt18a20.pdf/view>>.

MS, M. DA S. **Leishmaniose Tegumentar (LT)**. Disponível em: <[https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt#:~:text=Leishmaniose Tegumentar %28LT%29 A Leishmaniose Tegumentar é uma,leishmanias envolvidas na ocorrência de casos de LT.>](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt#:~:text=Leishmaniose Tegumentar%28LT%29 A Leishmaniose Tegumentar é uma,leishmanias envolvidas na ocorrência de casos de LT.>)>. Acesso em: 15 mar. 2023.

MUKBEL, R. M. et al. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 4, p. 669–675, 2007.

MURAILLE, E. et al. Genetically Resistant Mice Lacking MyD88-Adapter Protein Display a High Susceptibility to *Leishmania major* Infection Associated with a Polarized Th2 Response. **The Journal of Immunology**, p. 4237–4241, 2003.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*-macrophage interaction: A metabolic perspective. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 301–308, 2008.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. Intracellular growth and pathogenesis of *Leishmania* parasites. **Essays in Biochemistry**, v. 51, p. 81–95, 24 out. 2011.

NADERER, T.; VINCE, J. E.; MCCONVILLE, M. J. Surface Determinants of *Leishmania* Parasites and their Role in Infectivity in the Mammalian Host. **Current Molecular Medicine**, v. 4, p. 649–665, 2004.

NAMKUNG, J. H. et al. Association of polymorphisms in genes encoding IL-4, IL-13 and their receptors with atopic dermatitis in a Korean population. **Experimental Dermatology**, v. 20, n. 11, p. 915–919, 2011.

- NATURE. **Scitable by Nature Education**. Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/definition/promoter-259/>>. Acesso em: 20 ago. 2022.
- NAZARETH, T.; BRASIL, M.; TEIXEIRA, P. Manaus: Crescimento Populacional E Migrações Nos Anos 1990. **Revista Paranaense de Desenvolvimento**, v. 15, n. 3, p. 488–502, 2011.
- NELMS, K. et al. THE IL-4 RECEPTOR: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. **Annual Review of Immunology**, v. 17, n. 1, p. 701–738, 1999.
- NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11° ed. [s.l: s.n.].
- NGUYEN, J. K. et al. The IL-4/IL-13 Axis in Skin Fibrosis and Scarring: Mechanistic Concepts and Therapeutic Targets. v. 312, n. 2, p. 81–92, 2020.
- NOBEN-TRAUTH, N.; KROPF, P.; MÜLLER, I. Susceptibility to *Leishmania major* infection in Interleukin-4-deficient mice. **Science**, v. 271, n. 5251, p. 987–990, 1996.
- NOBEN-TRAUTH, N.; PAUL, W. E.; SACKS, D. L. IL-4- and IL-4 Receptor-Deficient BALB/c Mice Reveal Differences in Susceptibility to. 1999.
- NOVAIS, F. O. et al. Human classical monocytes control the intracellular stage of *leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 8, p. 1288–1296, 2014.
- NUR HUSNA, S. M. et al. IL-4/IL-13 axis as therapeutic targets in allergic rhinitis and asthma. **PeerJ**, v. 10, 2022.
- OBIRI, N. I. et al. Receptor for IL-13 interaction with interleukin 4 by a mechanism that does not involve the common gamma chain shared by receptors for interleukins 2,4,7,9, and 15. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 14, p. 8797–8804, 1995.
- OCHSA, H. D.; HITZIGB, W. H. History of primary immunodeficiency diseases. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 12, n. 6, p. 577–587, 2012.
- OHARA, J.; PAUL, W. E. Production of a monoclonal antibody to and molecular characterization of B-cell stimulatory factor-1. **Nature**, v. 315, n. 6017, p. 333–336, 1985.
- ONODERA, A. et al. STAT6-mediated displacement of polycomb by trithorax complex establishes long-term maintenance of GATA3 expression in T helper type 2 cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 11, p. 2493–2506, 2010.
- OPAS. LEISHMANIOSES: Informe epidemiológico das Américas. p. 1–12, 2022.
- ORDAZ-FARIAS, A. et al. Case report: Transient success using prolonged treatment

with miltefosine for a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis infected with *Leishmania mexicana mexicana*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 1, p. 153–156, 2013.

PEDRAZA-ZAMORA, C. P. et al. Th17 cells and neutrophils: Close collaborators in chronic *Leishmania mexicana* infections leading to disease severity. **Parasite Immunology**, 2017.

PETERS, N. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 21, p. 970–974, 2008.

PFEILSCHIFTER, J. Cytokines and signal transduction. **The Clinical Investigator**, v. 72, p. 713–714, 1994.

QI, H. et al. Rs2243268 and rs2243274 of Interleukin-4 (IL-4) gene are associated with reduced risk for extrapulmonary and severe tuberculosis in Chinese Han children. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 23, p. 121–128, 2014.

RADWANSKA, M. et al. Deletion of IL-4R $\alpha$  on CD4 T cells renders BALB/c mice resistant to *Leishmania major* infection. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 5, p. 0619–0629, 2007.

RAMALHO, A. S. et al. Transcript analysis of the cystic fibrosis splicing mutation 1525-1G>A shows use of multiple alternative splicing sites and suggests a putative role of exonic splicing enhancers. **Journal of medical genetics**, v. 40, n. 7, p. 1–8, 2003.

RAMASAWMY, R. et al. The -2518 bp promoter polymorphism at CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 31, n. 3, p. 477–479, 2013.

RAUD, L. et al. Missense RHD single nucleotide variants induce weakened D antigen expression by altering splicing and/or protein expression. **Transfusion**, v. 61, n. 8, p. 2468–2476, 2021.

RECALDE, O. D. S. et al. First molecular report of leishmania (*leishmania*) *amazonensis* and leishmania (*viannia*) *guyanensis* in paraguayan inhabitants using high-resolution melt-PCR. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 4, p. 780–788, 2019.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, 2007.

RICARDO-CARTER, C. et al. *Leishmania major* inhibits IL-12 in macrophages by signalling through CR3 (CD11b/CD18) and down-regulation of ETS-mediated transcription. **Parasite Immunology**, v. 35, n. 12, p. 409–420, 2013.

RIDLEY, D. S.; DE MAGALHAES, A. V.; MARSDEN, P. D. Histological analysis and the pathogenesis of mucocutaneous leishmaniasis. **The Journal of Pathology**, v. 159, n. 4, p. 293–299, 1989.

ROBERT, F.; PELLETIER, J. Exploring the Impact of Single-Nucleotide Polymorphisms on Translation. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. October, p. 1–11, 2018.

ROCHMAN, Y.; SPOLSKI, R.; LEONARD, W. J. New insights into the regulation of T cells by  $\gamma$ c family cytokines. **Nat Rev Immunol**, v. 23, n. 1, p. 480–490, 2009.

ROESNER, L. M.; ZEITVOGEL, J.; HERATIZADEH, A. Common and different roles of IL-4 and IL-13 in skin allergy and clinical implications. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 19, n. 4, p. 319–327, 2019.

ROSAS, L. E. et al. Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. **International Immunology**, v. 17, n. 10, p. 1347–1357, 2005.

RUIZ-LINARES, A. et al. Admixture in Latin America: Geographic Structure, Phenotypic Diversity and Self-Perception of Ancestry Based on 7,342 Individuals. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 9, 2014.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. MOLECULAR ASPECTS OF PARASITE-VECTOR AND VECTOR-HOST INTERACTIONS IN LEISHMANIASIS. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 55, p. 453–83, 2001.

SADLOVA, J. et al. *Leishmania donovani* development in *Phlebotomus argentipes*: Comparison of promastigote-and amastigote-initiated infections. **Parasitology**, v. 144, n. 4, p. 403–410, 2017.

SANG, D.; NJERU, W.; ASHFORD, R. A zoonotic focus of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica* at Utut, Rift Valley Province, Kenya. **TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE**, p. 35–37, 1994.

SANTOS, C. D. S. et al. CD8+granzyme B+-mediated tissue injury vs. CD4+IFN $\gamma$ -mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 6, p. 1533–1540, 2013.

SANTOS DA SILVA, L. et al. IL-23R Variant rs11805303 Is Associated With Susceptibility to the Development of Cutaneous Leishmaniasis in *Leishmania guyanensis*-Infected Individuals. **The Journal of infectious diseases**, v. 225, n. 1, p. 163–171, 2022.

SEDER, R. A.; PAUL, W. E. ACQUISITION OF L YMPHOKINE- PRODUCING PHENOTYPE BY CD4 +T CELLS. **Cell**, 1994.

SEGER, R. et al. Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 20, p. 14373–14381, 1992.

SEKI, N. et al. IL-4-Induced GATA-3 Expression Is a Time-Restricted Instruction Switch for Th2 Cell Differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 10, p. 6158–6166, 2004.

SERRANO-COLL, H. et al. Innate immune response: Ally or enemy in cutaneous leishmaniasis? **Pathogens and Disease**, v. 79, n. 5, p. 1–6, 2021.

SHAMOON, L. et al. Association study on IL-4 , IL-4R  $\alpha$  and IL-13 genetic polymorphisms in Swedish patients with colorectal cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 487, n. August, p. 101–106, 2018.

SHANKARANARAYANAN, P. et al. Acetylation by Histone Acetyltransferase CREB-binding Protein/p300 of STAT6 Is Required for Transcriptional Activation of the 15-Lipoxygenase-1 Gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 46, p. 42753–42760, 2001.

SHARROCKS, A. D. The ETS-domain transcription factor family. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 11, p. 827–837, 2001.

SHASTRY, B. S. Single Nucleotide Polymorphisms: Impact on Gene Function & Phenotype. In: **Single Nucleotide Polymorphisms: Methods & Protocols**. [s.l: s.n.]. v. 578p. 1–22.

SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. **Nature Cell Biology**, v. 4, n. 5, p. E131–E136, 2002.

SHEHADEH, F. V. B. et al. Tgf- $\beta$ 1 polymorphism in american tegumentary leishmaniasis in a southern brazilian population. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, n. August 2018, p. 0–3, 2019.

SHEN, L. X.; BASILION, J. P.; STANTON, J. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 14, p. 7871–7876, 1999.

SHI, J. et al. Involvement of IL-4, IL-13 and their receptors in pancreatic cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 1–16, 2021.

SIECKMANN, D. G. et al. ANTI-IMMUNOGLOBULIN I . Parameters of the Proliferative Response Although thymus-independent ( B ) lymphocytes of mice bear large amounts of membrane immunoglobulin ( Ig ) ( 1 ), it has been difficult to demonstrate directly that membrane Ig is. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 147, p. 814–829, 1978.

SIMPSON, L. the Mitochondrial Genome of Kinetoplastid Protozoa : **Molecular Biology**, 1987.

SINAN. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltaam.def>>. Acesso em: 15 mar. 2023.

SKOLNIK, E. Y. et al. The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 5, p. 1929–1936, 1993.

SOTO, J. M. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with a topical antileishhmanial drug (WR279396): Phase 2 pilot study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 2, p. 147–151, 2002.

STAMM, L. M. et al. Mice with STAT6-Targeted Gene Disruption Develop a Th1 Response and Control Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 11, p. 6180–6188, 1998.

STAUBER, D. J. et al. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: Paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 8, p. 2788–2793, 2006.

TAKEMOTO, Y. et al. Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) association with hemopoietic specific protein 1: Linkage between Lck and Grb2. **Journal of Immunology**, v. 161, n. 2, p. 625–630, 1998.

TELES, G.; FONSECA, F.; GONÇALVES, M. American Tegumentary Leishmaniasis in the Brazilian Amazon from 2010 to 2014. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. November 2018, p. 1–8, 2019.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. October, p. 1–12, 2018.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: A review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 1–15, 2017.

TSAI, C. H. et al. Interleukin-13 Genetic Variants, Household Carpet Use and Childhood Asthma. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

TURETZ, M. L. et al. Disseminated leishmaniasis: A new and emerging form of leishmaniasis observed in Northeastern Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 12, p. 1829–1834, 2002.

VÄLINEVA, T. et al. The transcriptional co-activator protein p100 recruits histone acetyltransferase activity to STAT6 and mediates interaction between the CREB-binding

protein and STAT6. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 15, p. 14989–14996, 2005.

VANHAESEBROECK, B.; ALESSI, D. R. The PI3K-PDK1 connection: More than just a road to PKB. **Biochemical Journal**, v. 346, n. 3, p. 561–576, 2000.

VÁZQUEZ-LÓPEZ, R. et al. Leishmania mexicana amastigotes inhibit p38 and JNK and activate PI3K/AKT: Role in the inhibition of apoptosis of dendritic cells. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 11, p. 579–589, 2015.

WALTER, M. R. et al. Crystal structure of recombinant human interleukin-4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 28, p. 20371–20376, 1992.

WALTERS, L. L. Leishmania Differentiation in Natural and Unnatural Sand Fly Hosts. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 196–196, 1993.

WANG, H. Y.; ZAMORANO, J.; KEEGAN, A. D. A role for the insulin-interleukin (IL)-4 receptor motif of the IL-4 receptor  $\alpha$ -chain in regulating activation of the insulin receptor substrate 2 and signal transducer and activator of transcription 6 pathways: Analysis by mutagenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 16, p. 9898–9905, 1998.

WANG, M. et al. A common IL-13 Arg130Gln single nucleotide polymorphism among Chinese atopy patient with allergic rhinitis. **Human Genetics**, v. 113, n. 5, p. 387–390, 2003.

WANG, Q. et al. Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. **Cell Research**, v. 20, n. 6, p. 701–712, 2010.

WANG, R. et al. Association of interleukin 13 gene polymorphisms and plasma IL 13 level with risk of systemic lupus erythematosus. **Cytokine**, v. 104, n. September, p. 92–97, 2018.

WATSON, A. et al. Phosphorylation of c-jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 2, p. 751–762, 1998.

WELHAM, M. J. et al. **Interleukin-13 signal transduction in lymphohemopoietic cells: Similarities and differences in signal transduction with interleukin-4 and insulin** **Journal of Biological Chemistry**, 1995.

WELLS, V.; DOWNWARD, J.; MALLUCCI, L. Functional inhibition of PI3K by the  $\beta$ GBP molecule suppresses Ras-MAPK signalling to block cell proliferation. **Oncogene**, v. 26, n. 55, p. 7709–7714, 2007.

WHO. Global leishmaniasis surveillance: 2019-2020, a baseline for the 2030 roadmap.



**Weekly epidemiological record**, v. 35, p. 401–419, 2021.

WIESTNER, A. et al. An activating splice donor mutation in the thrombopoietin gene causes hereditary thrombocythaemia. **Nature Genetics**, v. 18, n. 3, p. 231–236, 1998.

WILKINS-RODRÍGUEZ, A. A. et al. Differential Regulation of L-Arginine Metabolism through Arginase 1 during Infection with *Leishmania mexicana* Isolates Obtained from Patients with Localized and Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 88, n. 7, 2020.

WOZENCRAFT, A. O.; BLACKWELL, J. M. Increased infectivity of stationary-phase promastigotes of *Leishmania donovani*: Correlation with enhanced C3 binding capacity and CR3-mediated attachment to host macrophages. **Immunology**, v. 60, n. 4, p. 559–563, 1987.

WU, J. et al. Promoter polymorphisms of IL2, IL4, and risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population. **Molecular Carcinogenesis**, v. 48, n. 7, p. 626–632, 2009.

WURTZ, O.; BAJÉNOFF, M.; GUERDER, S. IL-4 mediated inhibition of IFN- $\gamma$  production by CD4+ T cells proceeds by several developmentally regulated mechanisms. **International Immunology**, v. 16, n. 3, p. 501–508, 2004.

XU, W. et al. Fifty-four novel mutations in the NF1 gene and integrated analyses of the mutations that modulate splicing. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 34, n. 1, p. 53–60, 2014.

XU, Z.; TAYLOR, J. A. SNPinfo: Integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 2, p. 600–605, 2009.

YAMAUCHI, T. et al. Growth hormone and prolactin stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1, -2, and -3, their association with p85 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), and concomitantly PI3-kinase activation via JAK2 kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 25, p. 15719–15726, 1998.

YOSHIMOTO, T.; PAUL, W. E. CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 4, p. 1285–1295, 1994.

YU, J. et al. Regulation of the p85/p110 Phosphatidylinositol 3'-Kinase: Stabilization and Inhibition of the p110 $\alpha$  Catalytic Subunit by the p85 Regulatory Subunit. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 3, p. 1379–1387, 1998.

ZHENG, C.; GUAN, K.-L. Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 5, p. 1123–1131, 1994.

# **ANEXO 1**

# A fine mapping of single nucleotide variants of IL13 gene in patients with Leishmania guyanensis-cutaneous leishmaniasis and plasma cytokines IL-4, IL-5 and IL-13

José E. Junior<sup>1, 2</sup>, Josué L. Souza<sup>2, 3</sup>, Lener S. Silva<sup>2, 3</sup>, Cilana C. Silva<sup>4, 5</sup>, Tuanny A. Nascimento<sup>2, 4</sup>, Mara L. Souza<sup>4</sup>, Alyne F. Cunha<sup>6</sup>, Jacqueline S. Batista<sup>6</sup>, José P. Neto<sup>7</sup>, Marcus V. Guerra<sup>4, 5</sup>, Rajendranath Ramasawmy<sup>1, 2, 3, 4, 5, 8\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, Brazil, <sup>2</sup>Faculdade de Medicina, Universidade Nilton Lins, Brazil, <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazonia Legal (Rede Bionorte), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil., Brazil, <sup>4</sup>Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Brazil, <sup>5</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil, Brazil, <sup>6</sup>Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas, Brazil, <sup>7</sup>Faculdade de Ciência Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil, Brazil, <sup>8</sup>Genomic Health Surveillance Network: Optimization of Assistance and Research in The State of Amazonas - REGESAM, Brazil

**Submitted to Journal:**

Frontiers in Immunology

**Specialty Section:**

Parasite Immunology

**Article type:**

Original Research Article

**Manuscript ID:**

1232488

**Received on:**

31 May 2023

**Journal website link:**

[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)

---

### **Conflict of interest statement**

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

### **Author contribution statement**

JJ, JLS, and RR contributed for data curation. JJ, MG, and RR take responsibility for the integrity of the work as a whole, from inception to published article. JJ, and RR were responsible for study design and conception and drafted the manuscript. JJ, JLS, LSS, CCL, TAN, MLS, AFC, JSB, and JPMN were responsible for PCR and nucleotide sequencing. JJ, JLS, MG, and RR collected and cleaned the data for formal analysis. JJ and JLS were responsible for statistical analysis. JJ and RR interpreted the results and drafted the manuscript. MG and RR supervised the whole work. All authors revised the manuscript for important intellectual content.

### **Keywords**

*Leishmania guyanensis*, IL-13, Single nucleotide variants, cutaneous leishmaniasis, susceptibility

### **Abstract**

Word count: 341

Leishmaniasis, a neglected disease, remains a significant health burden in 97 countries worldwide. The outcome of *Leishmania*-infection and disease progression is influenced by various factors, including the cytokine milieu, the skin microbiota at the infection site, the specific *Leishmania* species involved, the genetic background of the host, and the parasite load. It is interesting to note that in endemic areas of leishmaniasis, only a fraction of infected individuals actually develops the disease. Notably, overexpression of IL-13 in naturally resistant C57BL/6 mice renders them susceptible to *L. major*-infection. We investigated nine single nucleotide variants (SNV) (rs1881457 A>C, rs1295687, rs2069744 and rs2069747, rs20541 A>G, rs1295685 A>G, rs848 A>C, rs2069750 G >C and rs847 T>C) that spanned over the entire gene IL13 in patients with *L. guyanensis* cutaneous leishmaniasis (Lg-CL) to determine whether these SNVs are associated with susceptibility/protection against the development of Lg-CL. None of the SNVs are associated with susceptibility/protection against the development of Lg-CL. Haplotype analysis which included the nine SNVs revealed that carriers of H10 had a 94% likelihood of experiencing a decreased risk of developing Lg-CL (OR=0.06 [95% confidence interval (CI) 0.03-0.14]; p-value  $1.3 \times 10^{-17}$ ). Likewise, carriers of H12 (OR=0.04 [95% CI 0.01-0.15]; p-value  $1.1 \times 10^{-10}$ ) and H13 (OR=0.07 [95% CI 0.02-0.2]; p-value  $2.5 \times 10^{-8}$ ) may provide protection against the development of Lg-CL. Conversely, carriers of H8 have 180% increased likelihood of developing Lg-CL (OR=2.8 [95% CI 1.7-4.2]; p-value  $3 \times 10^{-6}$ ). Similarly, H11 is associated susceptibility to the development of Lg-CL (OR= 2.5 [95% CI 1.5-4.1]; p-value  $0.5 \times 10^{-5}$ ). The genotypes of rs2069744, rs20541, rs1295685, rs847 and rs848 were found to be correlated with plasma IL-5 levels among the patients with Lg-CL. Additionally, rs20541 exhibited a correlation with plasma IL-13 levels among patients with Lg-CL. rs2069744 and rs848 showed a correlation with plasma IL-4 levels among patients with Lg-CL. In total, our study revealed the presence of three haplotypes of IL13 associated with resistance to disease development and two haplotypes linked to susceptibility. These findings indicate the possibility that there could be a variant located outside the gene region that may be associated with susceptibility.

### **Contribution to the field**

Leishmaniasis, a neglected disease, continues to pose health burden in 97 countries worldwide. The outcome of *Leishmania*-infection and disease progression is influenced by various factors, including the cytokine milieu, the skin microbiota at the infection site, the specific *Leishmania* species involved, the genetic background of the host, and the parasite load. The immunological response of the infected individual plays a crucial role in the clinical manifestation of the infection caused by *Leishmania*. Interestingly, in endemic areas of leishmaniasis, only a fraction of infected individuals actually develops the disease. The gene IL13 has been found to have a relevant role in regulating the immunological response. In this study, we studied genetic polymorphisms across the entire gene IL13 and demonstrated that three haplotypes of the gene contribute to protection against disease development, while two haplotypes of the gene contribute to susceptibility. It is worth mentioning this is the first study in human cutaneous leishmaniasis to establish such association. This study contributes to our understanding why some individuals develop the disease.

### **Funding information**

This research was funded by the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq), grant number 404181/2012-0 to Rajendranath Ramasawmy, Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), grant number 06200151/2020 and 01.02.016301.03393/2021-80 to Rajendranath Ramasawmy and FAPEAM RESOLUÇÃO N. 002/2008, 007/2018 e 005/2019 -

PRÓ-ESTADO. Financial supports were also provided in the form of grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (POSGRAD Program #008/2021 and #005/2022), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (PDPG Emergencial de Consolidação Estratégica Program). JESJ, JLS, LSS and CCS have fellowships from FAPEAM and CAPES (Master and PhD students). The funders had no role in the study's design, data collection and analysis, the decision to publish or the preparation of the manuscript.

### ***Ethics statements***

#### ***Studies involving animal subjects***

Generated Statement: No animal studies are presented in this manuscript.

#### ***Studies involving human subjects***

Generated Statement: The studies involving human participants were reviewed and approved by reviewed and approved by Research Ethics Committee of the Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

#### ***Inclusion of identifiable human data***

Generated Statement: No potentially identifiable human images or data is presented in this study.

#### ***Data availability statement***

Generated Statement: The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

In review

1 **A fine mapping of single nucleotide variants of *IL13* gene in patients**  
 2 **with *Leishmania guyanensis*-cutaneous leishmaniasis and plasma**  
 3 **cytokines IL-4, IL-5 and IL-13**

4  
 5 **José do Espírito Santo Junior<sup>1,2</sup>, Josué Lacerda de Souza <sup>2,3</sup>, Lener Santos da**  
 6 **Silva<sup>2,3</sup>, Cilana Chagas da Silva<sup>4,5</sup>, Tuanny Arruda do Nascimento<sup>2,4</sup>, Mara Lúcia**  
 7 **Gomes de Souza<sup>4</sup>, Alyne Farias da Cunha<sup>6</sup>, Jacqueline da Silva Batista<sup>6</sup>, José Pereira**  
 8 **de Moura Neto<sup>7</sup>, Marcus Vinitius de Farias Guerra<sup>4,5</sup> and Rajendranath**  
 9 **Ramasawmy<sup>1,2,3,4,5,8</sup>**

10 <sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências  
 11 Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil.

12 <sup>2</sup>Faculdade de Medicina Nilton Lins, Universidade Nilton Lins, Manaus, Brazil.

13 <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazonia Legal  
 14 (Rede Bionorte), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil.

15 <sup>4</sup>Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil.

16 <sup>5</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do  
 17 Amazonas, Manaus, Brazil.

18 <sup>6</sup>Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, Brazil

19 <sup>7</sup>Faculdade de Ciência Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus,  
 20 Brazil

21 <sup>8</sup>Genomic Health Surveillance Network: Optimization of Assistance and Research in The  
 22 State of Amazonas – REGESAM, Manaus, Amazonas, Brazil.

23 **Corresponding author:** Rajendranath Ramasawmy

24 Faculdade de Medicina - Universidade Nilton Lins

25 Manaus/Amazonas. Brazil.

26 Email: [ramasawm@gmail.com](mailto:ramasawm@gmail.com)

27

28 **Keywords:** *Leishmania guyanensis*; IL-13; Single nucleotide variants; Cutaneous  
 29 leishmaniasis; susceptibility;

30

63

64 **1 Introduction**

65 *Leishmania* (*L.*) is an obligate intracellular vector-borne protozoan parasite  
 66 transmitted to humans through the bite of infected female sandflies. In the old world, the  
 67 transmission is primarily by the *Phlebotomus* spp., while in the new world, it is mainly  
 68 done by *Lutzomyia* spp. Leishmaniasis is an endemic disease in 97 countries worldwide,  
 69 putting nearly one billion people at risk of *L.*-infection (1). It is a neglected disease that  
 70 affects approximately 12 million individuals in tropical and subtropical countries, ranking  
 71 as the ninth-largest infectious disease burden according to the World Health Organization  
 72 (1). Leishmaniasis causes approximately 2.4 million disability-adjusted life years lost  
 73 (TDR Disease watch focus) and is the second highest cause of mortality and the fourth  
 74 leading cause of morbidity among tropical diseases (2).

75 Leishmaniasis infection causes a wide spectrum of clinical manifestations  
 76 depending on the *Leishmania* species (*L. spp.*). The clinical outcomes may range from  
 77 asymptomatic self-healing lesions to cutaneous leishmaniasis (CL), diffuse CL, and  
 78 disseminated CL, as well as severe mucocutaneous leishmaniasis (ML) in cases of  
 79 tegumentary leishmaniasis. Additionally, it can lead to a complicated form known as  
 80 visceral leishmaniasis, (VL) which, if left untreated, can be fatal. Cutaneous leishmaniasis  
 81 (CL), the most common form of the disease found in more than 88 countries, affects  
 82 approximately 0.7 to 1.2 million individuals annually (3) and causes 41,700 DALYs (4).

83 The development of T helper 1 (Th1) response and the production of  
 84 proinflammatory cytokines (IL-12, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-1 $\beta$ ) during early *L.*-  
 85 infection are beneficial to the host as they lead to the activation of macrophages and  
 86 parasite killing. In contrast, a Th2 response (IL-4, IL-5, and IL-13) promotes parasite  
 87 persistence and disease development (5,6). IFN- $\gamma$  activates resting macrophages through  
 88 the classical activation pathway, leading to their transformation into M1 macrophages.  
 89 This activation inhibits pathogens multiplication and facilitates killing through the  
 90 production of nitric oxide, reactive oxygen species and lysosomal enzymes (7). In  
 91 contrast, IL-4 and IL-13 activate resting macrophages to become alternative activated  
 92 macrophages, also known as M2 macrophages, which exhibit anti-inflammatory  
 93 properties (7). Studies conducted on animal model of leishmaniasis have suggested that  
 94 achieving cure in leishmaniasis requires finely regulated cellular immune response and a  
 95 delicate balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines (8,9).

96 Murine experimental models have demonstrated the significance of IL-13 in  
 97 leishmaniasis. Overexpression of IL-13 in C57BL/6 mice, which are typically resistant to  
 98 *L. major* infection, renders them susceptible to infection, irrespective of IL-4 expression  
 99 (10). Conversely, BALB/c mice, known to be susceptible to *L. major* infection, exhibit  
 100 resistance when the *IL13* gene is deleted (10). Exogenous IL-13 has been demonstrated  
 101 to exert a hypoalgesic effect on mice infected with *L. major* and exacerbate the course of  
 102 infection (11). Furthermore, the administration of exogenous IL-13 has been shown to  
 103 increase the parasite burden and significantly decrease IFN- $\gamma$  levels (12). Absence of IL-  
 104 13 in mice infected with *L. amazonensis* significantly reduced paw swelling at the site of  
 105 infection (13). Genetic mapping studies conducted in murine models have identified a  
 106 genomic region that encompasses the *IL4* and *IL13* genes as a susceptibility region for  
 107 leishmaniasis (14-16). In human, *IL4* and *IL13* are located on the long arm of  
 108 chromosome five (5q.31-33).

64 The outcome of *L.*-infection and the progression of disease development depend  
65 on various factors, including the cytokine milieu (17), the skin microbiota at the site of  
66 infection, the specific *L. spp.*, the genetic background of the host (18), and the parasite  
67 load (19). IL-13 has been observed in the majority of biopsy specimens taken from  
68 patients with *Lg-Cl* (20). In this manuscript, we performed a fine mapping of single  
69 nucleotide variants (SNV) covering the whole gene of *IL13* to identify whether variants  
70 of *IL13* are associated with protection/susceptibility to *Lg-CL* or correlated with plasma  
71 cytokines IL-13, IL-4 and IL-5. We found that SNVs of *IL13* are not associated with  
72 protection/susceptibility to *Lg-CL*.

## 118 2 Materials and methods

### 119 2.1 Study population

120 The study involved 1714 unrelated individuals from the same endemic region of  
121 CL caused by *L. guyanensis*, as previously described (21-23). The research was conducted  
122 at the Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), which  
123 serves as the reference center for tropical diseases. All participants were residents of the  
124 perirural area of Manaus, the capital city of the Amazonas state, Brazil. Specifically, they  
125 were from communities such as Pau-Rosa, Cooperativa, Água-Branca, Leão, and  
126 Brasileirinho, situated in the vicinity of BR-174 and AM-010 which have become of  
127 endemic areas of *L. guyanensis*- infection due to human encroachment. The population  
128 represents an admixture of Native American (50 to 60%), European (40 to 50%), and  
129 African (approximately 10%) ancestries (24).

### 130 2.2 Ethical statements

131 This study adhered to the principles outlined in the Declaration of Helsinki and  
132 received approval from the Research Ethics Committee of the Fundação de Medicina  
133 Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado under the file number CAAE:09995212.0.0000.0005.  
134 Written informed consent was obtained from all participants for the collection of  
135 biological samples and subsequent analysis. In the case of participants under the age 18,  
136 written informed consent was provided the parent/guardian for the collection biological  
137 samples and subsequent analysis.

### 138 2.3 Sample size calculations

139 The calculation for sample size for a case-control study investigating the  
140 immunogenetics of *Lg-Cl* has been previously described (25). In summary, the effective  
141 sample size determined, using the Genetic Power calculator of Harvard University  
142 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc>) taking into account multiple gene inputs for  
143 a trait. The calculation was based on several assumptions, including a minor allele  
144 frequency of 5%, disease prevalence of 5%, complete linkage disequilibrium between the  
145 marker and the trait, a case-control ratio of 1, a type I error rates of 5% and an odds ratio  
146 of 1.5 and 2.0 for heterozygosity and homozygosity, respectively. To achieve 80% power,  
147 the genetic allelic model indicated that a sample size of 789 for cases and 789 for controls  
148 would be required

149

150



## 120           2.4     **Collection of Biological Samples and DNA isolation**

121 Five mL of peripheral blood was obtained from each participant through venipuncture  
 122 and collected into Vacutainers containing EDTA (Becton Dickinson, Sao Paulo, Brazil).  
 123 The blood samples were used for both genomic DNA isolation, which was performed  
 124 using the proteinase K salting-out method (26) and measurement of plasma circulating  
 125 cytokines.

## 126           2.5     **Identification of *Leishmania* species**

127 Prior to collecting biopsy specimens from the skin ulcer lesion of all the patients  
 128 with CL to identify the *Leishmania* sp. Identification, the presence of the parasite was  
 129 confirmed by examining Giemsa-stained lesion scarifications under a microscope. For all  
 130 patients with CL, DNA extracted from the biopsy specimens were subjected to  
 131 *Leishmania vianna*-specific PCR with discrimination between *L. braziliensis* and *L.*  
 132 *guyanensis* following previously established protocols (27, 28). To identify the  
 133 *Leishmania* sp., direct nucleotide sequencing of a fragment of the HSP70 gene (233bp)  
 134 and mini exon genes (227bp) was performed (29). This sequencing was conducted using  
 135 the kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermofisher, MA USA) following  
 136 the manufacturer's recommended protocols.

## 137           2.6     **Alleles discrimination of the single nucleotide variants of *IL13* gene**

138 Nine SNVs were selected for the study. The primers for Polymerase Chain  
 139 Reaction (PCR), amplification cycling conditions and the size of the PCR products are  
 140 listed in **Supplementary Table 1**. Specifically, PCR was conducted in a final volume of  
 141 25µL comprising the optimal concentration of MgCl<sub>2</sub> in mmol/L, 0.2 pmol/L each of  
 142 forward and reverse primer, 40µmol/L of each dNTP, 50ng of DNA, 1 unit of *Taq*  
 143 *polymerase* and 2.5µL of 10X *Taq* polymerase buffer containing 500mmol/L KCl and 100  
 144 mmol/L Tris-HCL. PCR reactions were conducted using the Applied Biosystem Veriti  
 145 Thermal Cycler.

146 The genotypes of SNVs rs1295687, rs2069744 and rs2069747 were determined  
 147 using PCR- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The sizes of the  
 148 generated PCR were 279 base pair (bp) for rs1295687, 137bp for rs2069744 and 191bp  
 149 for rs2069747. A volume of 10 µL of the PCR products was digested with the respective  
 150 restriction enzymes: *Dde* I, *Hinf* I and *Nco* I. In the presence of the C allele of rs1295687,  
 151 the enzyme *Dde* I cleave the 297bp fragment into 187bp and 92bp while in the presence  
 152 of G allele into 142, 92 and 45bp. Similarly, for rs2069744, *Hinf* I cleave the 137bp  
 153 fragment into 114 and 23bp when the C allele was present and it remained uncut when  
 154 the T allele was present. Finally, for the rs1295687, *Nco* I cut the 191bp fragment into  
 155 121 and 70bp in the presence of the C allele and uncut for the T allele.

156 For the SNVs located in the 3' untranslated region (3'UTR), we designed a pair  
 157 of primers that flank four SNVs: rs1295685 A>G, rs848 A>C, rs2069750 G >C and rs847  
 158 T>C, which generated a of 459bp PCR fragment. The sizes of the PCR products of the  
 159 SNV rs1881457 A>C in the promoter region and the rs20541 A>G in exon were 275bp  
 160 and 210 bp, respectively. After PCR amplifications, the PCR products were purified using  
 161 a 20% PEG purification method following the protocols described elsewhere (30, 31).  
 162 The purified amplicons were subjected to sequencing using either the forward or reverse  
 163 primers of each fragment. The sequencing reactions were performed using the BigDye

120 Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher, MA USA) according to the  
121 manufacturer's protocol in the Applied Biosystem Veriti Thermal Cycler. The resulting  
122 sequencing products were analyzed using run the ABI 3130XL automatic DNA Sequencer  
123 with POP-7 as the sequencing polymer. Nucleotides reading were obtained using the  
124 Sequencing Analysis software (Applied Biosystems, v5.3.1), and only high-quality  
125 sequences were utilized for SNP analyses.

## 126 **2.7 Assay of circulating plasma cytokines IL-4, IL-5 and IL-13 by** 127 **Luminex**

128 IL-4, IL-5 and IL-13 cytokines levels in the plasma were measured using the  
129 Human Cytokine Grp I Panel 27-Plex kit (Bio-Rad, USA) through a multiplex cytokine  
130 assay. The assay was conducted following the manufacturer's instruction on the Bio-plex  
131 200 Protein Array System (Luminex Corporation, USA).

## 132 **2.8 Statistical analysis**

133  
134 Genotypes and alleles frequencies were calculated using gene counting method.  
135 Hardy-Weinberg equilibrium was assessed by comparing observed frequencies to  
136 expected frequencies of the genotypes. Statistical comparison of genotypes and alleles  
137 between patients with CL and HC was conducted using chi-square analysis, including odd  
138 ratio and 95 % confidence interval. Inheritance models (codominant, dominant, recessive,  
139 and overdominant models) were analyzed using the R software version 4.0.0 of the  
140 SNPassoc package. The effects of genotypes on circulating plasma cytokine levels of IL-  
141 4, IL-5 and IL-13 were assessed using the Generalized Linear Model for quantitative traits  
142 in the R software version 4.0.0 of the SNPassoc package. The ggplot2 of the package was  
143 utilized to visualize the results. Linkage disequilibrium, as well as comparisons of  
144 haplotypes, was performed using the Haploview software 4.2.

## 219 **3 Results**

### 220 **3.1 Characteristics of study population**

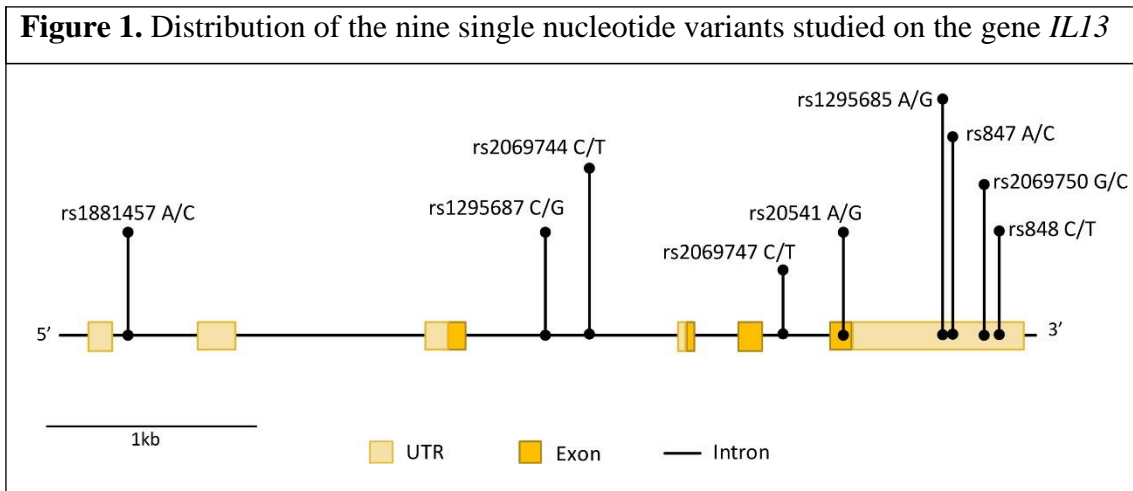
221 Out of the 1,714 individuals included in the study, 855 were diagnosed with *Lg*-  
222 CL while the remaining 859 individuals who had no history and scar of leishmaniasis,  
223 were considered healthy controls (HC). The HC were selected from the same endemic  
224 area of the patients with *Lg*-CL and underwent thorough physical examinations by  
225 physicians to ensure the absence any previous history of leishmaniasis. They shared the  
226 same socio-epidemiological environment and had resided in the endemic area for over  
227 five years. The majority of the participants in this study. All the participants were  
228 unrelated individuals and most of them were agricultural or farm workers. All patients

221 included in the study presented with active CL and had fewer than or equal to six ulcer  
 222 skin lesions. Among the patients with *Lg-CL*, 639 were male with a mean age of (mean  $\pm$   
 223 standard error of the mean)  $34.4 \pm 0.53$  years, while the remaining 216 female participants  
 224 had a mean age of  $37.5 \pm 1.05$  years. In the HC group, there were 591 male participants,  
 225 with a mean age of  $42 \pm 0.72$  years and 268 female participants, with a mean age of  
 226  $40 \pm 1.02$  years. All the participants were free of HIV, cardiac, renal, or diabetic diseases.  
 227 Male HC participants were slightly older than male patients with *Lg-CL* ( $p < 0.0001$ ).

### 228 3.2 SNVs selection and genotyping

229 Nine SNVs spanning the whole gene of *IL13* were investigated as shown in Figure  
 230 1. The SNVs were selected from the public database of the HapMap Project SNPinfo  
 231 Web Server (<https://snpinfo.niehs.nih.gov>) based on their minor allele frequencies of  $\geq$   
 232 5% with function prediction. These SNVs are tag SNP chosen from different populations  
 233 according to the LD TAG SNP selection in linkage loci. The SNV rs1881457 A>C is  
 234 situated in the promoter region which is predicted to have binding sites for several  
 235 transcription factors. Additionally, the SNVs rs1295687 C > G and rs2069744 C > T  
 236 within the intron I also correspond to transcription factor binding sites. The rs20541 A>G  
 237 is a missense mutation located in exon 4. The four SNVs (rs1295685 A>G, rs848 A>C,  
 238 rs2069750 G > C and rs847 T>C in the 3' untranslated region (3'UTR) are likely to bind  
 239 several miRNAs. These four SNVs in the 3'UTR also interact with the promoter of the  
 240 long non-coding RNA, T helper type 2 locus control region associated RNA (*TH2LCRR*).  
 241 Among the SNVs, the SNVs rs1295687, rs2069744 and rs2069747 were genotyped using  
 242 PCR-RFLP while the remaining SNVs were analyzed by direct nucleotide sequencing.

**Figure 1.** Distribution of the nine single nucleotide variants studied on the gene *IL13*



221 The minor allele frequencies (MAF) of the nine SNVs among the patients with  
 222 *Lg-CL*, healthy controls and global MAF from the HapMap project are presented in Table  
 223 1. All the SNVs were in Hardy-Weinberg equilibrium. The genotype frequencies and  
 224 statistical comparisons, based on different genetics models, between patients with *Lg-CL*  
 225 and healthy controls are provided in **Supplementary Table 2**. Importantly, none of the  
 226 SNVs demonstrated any association with susceptibility or protection against the  
 227 development of *Lg-CL*.

**Table 1:** Minor allele frequencies (MAF) of the single nucleotide variants among the patients with *Lg-CL*, healthy controls and global MAF from HapMap project.

Gene region	Markers	Alleles	Patients with CL (%)	Healthy Controls (%)	Global MAF	<i>p</i> -value
<b>promoter</b>	rs1881457	C	379 (22%)	359 (21%)	19%	n.s.
<b>Intron1</b>	rs1295687	G	287 (18%)	284 (18%)	17%	n.s.
<b>Intron1</b>	rs2069744	T	190 (11%)	215 (13%)	17%	n.s.
<b>Intron3</b>	rs2069747	T	26 (2%)	22 (1%)	5%	n.s.
<b>Exon4</b>	rs20541	T	620 (36%)	654(38%)	23%	n.s.
<b>3' UTR</b>	rs1295685	A	631 (36%)	648 (38%)	17%	n.s.
<b>3' UTR</b>	rs848	A	720 (42%)	766 (45%)	37%	n.s.
<b>3' UTR</b>	rs2069750	C	29 (2%)	48 (3%)	12%	n.s.
<b>3' UTR</b>	rs847	T	650 (38%)	662 (39%)	19%	n.s.

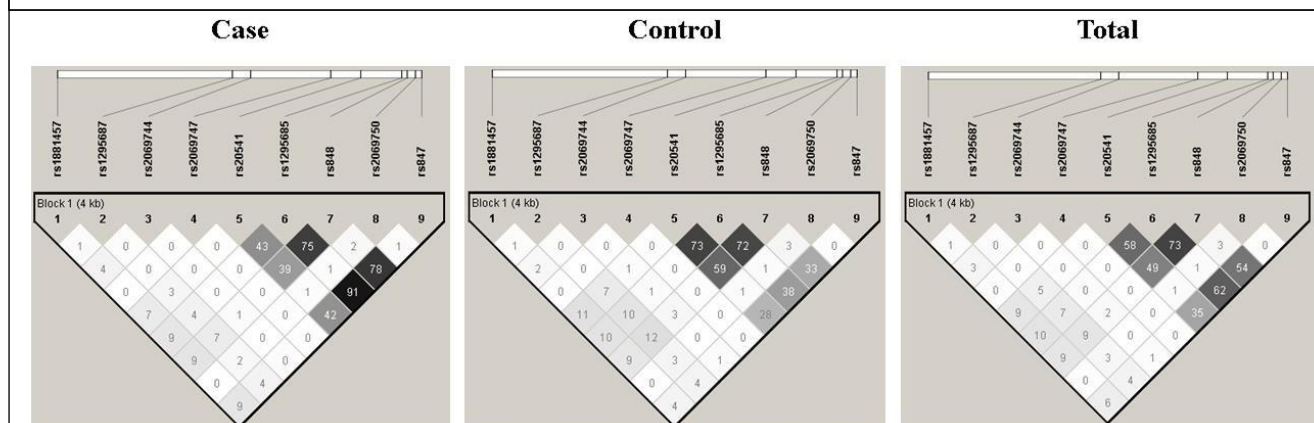
228

229

### 3.3 Linkage disequilibrium and Haplotype analysis

230 The LD analysis was performed on the nine SNVs using the Haploview Software  
 231 V4.2 and the results are presented in Figure 2. Among the SNVs, namely rs20541,  
 232 rs1295685, rs848 and rs847, a strong LD was observed, indicating association with each  
 233 other. These SNVs form a distinct block in comparison to the remaining SNVs.

**Figure 2.** Linkage disequilibrium structure among the nine single nucleotide variants of the *IL13*.



234

**Table 2.** The distribution of the haplotypes frequencies as derived from the nine single nucleotide variants of the IL13 gene among the patients with *Lg-CL* (cases) and healthy controls (HC).

Hap	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	Cases (%)	HC (%)	X2	OR	CI 95%	p.value
H 1	A	C	C	C	C	G	C	G	C	648 (38)	612 (37)	1.5	1.09	0.9-1.2	0.21
H 2	A	G	C	C	T	A	A	G	T	127 (7.6)	130 (7.8)	0.03	0.98	0.7-1.2	0.85
H 3	C	C	C	C	T	A	A	G	T	131 (7.9)	118 (7.1)	0.72	1.1	0.8-1.4	0.39
H 4	A	C	C	C	T	A	A	G	T	133 (8)	115 (7)	1.46	1.2	0.9-1.5	0.22
H 5	C	C	C	C	C	G	C	G	C	75 (4.5)	65 (4)	0.71	1.1	0.82-1.6	0.33
H 6	A	C	T	C	C	G	C	G	C	61 (3.7)	57 (3.4)	0.14	1.1	0.73-1.5	0.70
H 7	A	G	C	C	C	G	C	G	C	63 (3.8)	43 (2.6)	4.02	1.4	0.9-2.2	0.04
H 8	A	C	C	C	T	G	C	G	C	77 (4.6)	29 (1.8)	21.8	2.8	1.7-4.2	3.0E-6
H 9	C	C	T	C	T	A	A	G	T	48 (3)	51 (3.1)	0.10	0.9	0.6-1.3	0.74
H 10	A	C	C	C	C	G	C	G	T	6 (0.4)	88 (5.3)	73	0.06	0.03-0.14	1.3E-17
H 11	A	C	C	C	C	A	A	G	T	58 (3.4)	23 (1.4)	15.1	2.5	1.5-4.1	0.72E-5
H 12	A	G	C	C	T	A	A	G	C	2 (0.1)	46 (2.8)	41.6	0.04	0.01-0.15	1.1E-10
H 13	C	C	C	C	T	A	A	G	C	3 (0.2)	38 (2.3)	31	0.07	0.02-0.2	2.5E-8
H 14	A	C	C	C	C	G	A	G	C	16 (1)	21 (1.2)	0.56	0.8	0.4-1.4	0.45

222265

223 Haplotype analysis was conducted using the Haploview software V4.2 to assess  
 224 the haplotype frequencies from the nine SNVs among the patients with *Lg-CL* and HC. A  
 225 total of 38 haplotypes were identified without applying a threshold of frequency.  
 226 However, when frequency limit to 0.1 % was set, a total of 14 haplotypes were observed  
 227 and designated as H1 to H14. These haplotypes are presented in Table 2.

228 The distribution of haplotypes exhibits notable difference between the patients  
 229 with *Lg-CL* and HC. Among the HC, there is an increased occurrence of H10 (5.3%), H12  
 230 (2.8%) and H13 (2.3%) when compared to the patients with *Lg-CL* (H10 (0.4%), H12  
 231 (0.1%) and H13 (0.2%). Analysis indicates a 94% likelihood that the presence of H10  
 232 may decrease the risk of developing *Lg-CL* in carriers of this haplotype (OR = 0.06 [95%  
 233 confidence interval (CI) 0.03 – 0.14]; p-value  $1.3 \times 10^{-17}$ ). Similarly, H12 (OR = 0.04  
 277 [95% CI 0.01 – 0.15]; p-value  $1.1 \times 10^{-10}$ ) and H13 (OR = 0.07 [95% CI 0.02 – 0.2]; p-  
 278 value  $2.5 \times 10^{-8}$ ) provide protection against the development of *Lg-CL*. By contrast,  
 279 carriers of H8 have 180% increased likelihood of developing *Lg-CL* (OR = 2.8 [95% CI  
 280 1.7 – 4.2]; p-value  $3 \times 10^{-6}$ ). Similarly, H11 is associated susceptibility to the development  
 281 of *Lg-CL* (OR = 2.5 [95% CI 1.5 – 4.1]; p-value  $0.5 \times 10^{-5}$ ).

282 Since the MAF of SNV4 (rs2069747) and SNV8 (rs2069750) were approximately  
 283 two percent, we decided to exclude these SNVs from further analysis. Consequently, we  
 284 recalculated the haplotype frequencies, and the updated results are as shown in **Table 3**.  
 285 A total of 15 haplotypes was observed and labeled as H1' to H15'.

286

287

288

282

**Table 3.** Distribution of the haplotypes frequencies of the IL13 gene among the patients with Lg-CL (cases) and healthy controls (HC) as identified after excluding the single nucleotide variants rs2069747 and rs2069750.

H	V1	V2	V3	V5	V6	V7	V9	Cases (%)	HC (%)	X2	OR	CI 95%	p.value
1'	A	C	C	C	G	C	C	640 (3.8)	597 (35)	2.1	1.1	0.9-1.2	0.14
2'	A	C	C	T	A	A	T	137 (8.1)	117 (7)	1.6	1.2	0.9-1.5	0.21
3'	A	G	C	T	A	A	T	123 (7.3)	124 (7.4)	0.01	0.9	0.7-1.2	0.89
4'	C	C	C	T	A	A	T	130 (7.7)	116 (6.9)	0.76	1.1	0.8-1.4	0.38
5'	C	C	C	C	G	C	C	74 (4.4)	66 (4)	0.53	1.1	0.8-1.5	0.50
6'	A	C	T	C	G	C	C	63 (3.7)	58 (3.5)	0.18	1.1	0.7-1.5	0.69
7'	A	G	C	C	G	C	C	64 (3.8)	43 (2.6)	4.1	1.5	1-2.2	0.04
8'	A	C	C	T	G	C	C	75 (4.4)	29 (1.8)	23	2.8	1.8-4.3	7.1E-6
9'	C	C	T	T	A	A	T	49 (2.9)	50 (3)	0.02	1	0.6-1.4	0.91
10'	A	C	C	C	G	C	T	7 (0.4)	90 (5.4)	73	0.07	0.03-0.15	6.1E-18
11'	A	C	C	C	A	A	T	56 (3.3)	21 (1.3)	16	2.7	1.6-4.4	7.9E-5
12'	A	C	C	C	G	A	C	21 (1.2)	28 (1.7)	1	0.7	0.4-1.4	0.29
13'	A	G	C	T	A	A	C	2 (0.1)	46 (2.7)	41	0.04	0.01-0.15	1.4E-10
14'	C	C	C	T	A	A	C	3 (0.2)	38 (2.3)	30	0.07	0.02-0.2	3.3E-8
15'	A	G	C	C	G	A	C	18 (1.1)	22 (1.3)	0.4	0.8	0.4-1.5	0.47

289

290 Haplotype H8' (ACCTGCC) and H11' (ACCCAAT) are both associated with  
 291 susceptibility to the development of Lg-CL, with an increased likelihood of 180 and 170%  
 292 respectively. Conversely, H10' (ACCCGCT), H13' (AGCTAAC) and H14' (CCCTAAC)  
 293 showed a decreased likelihood of 93%, 96 % and 93% respectively, in developing Lg-CL.

### 294 3.4 Correlation of SNVs genotypes with plasma cytokines IL-13, IL-4 and 295 IL-5

296 The mean and standard error of the mean of circulating plasma levels of IL-4, IL-  
 297 5 and IL-13 according to the genotypes and based on different genetics models in  
 298 picogram/mL are given in **Supplementary Table 3, 4 and 5**. The rs2069744, situated in  
 299 the intronic region, demonstrated solely a correlation with plasma IL-4 levels among the  
 300 patients with Lg-CL in a dominant genetic model. Likewise, rs848, situated in the 3'UTR,  
 301 displayed a correlation with plasma IL-4 levels among the entire study population  
 302 (including patients with Lg-CL and HC) in a dominant genetic model (Figure 3). The  
 303 homozygous genotype CC of rs2069744 and of rs848 exhibited a correlation with  
 304 elevated levels of IL-4. Notably, only rs20541 demonstrates a correlation with plasma IL-  
 305 13, and this association is observed specifically in patients with Lg-CL (Fig. 3).

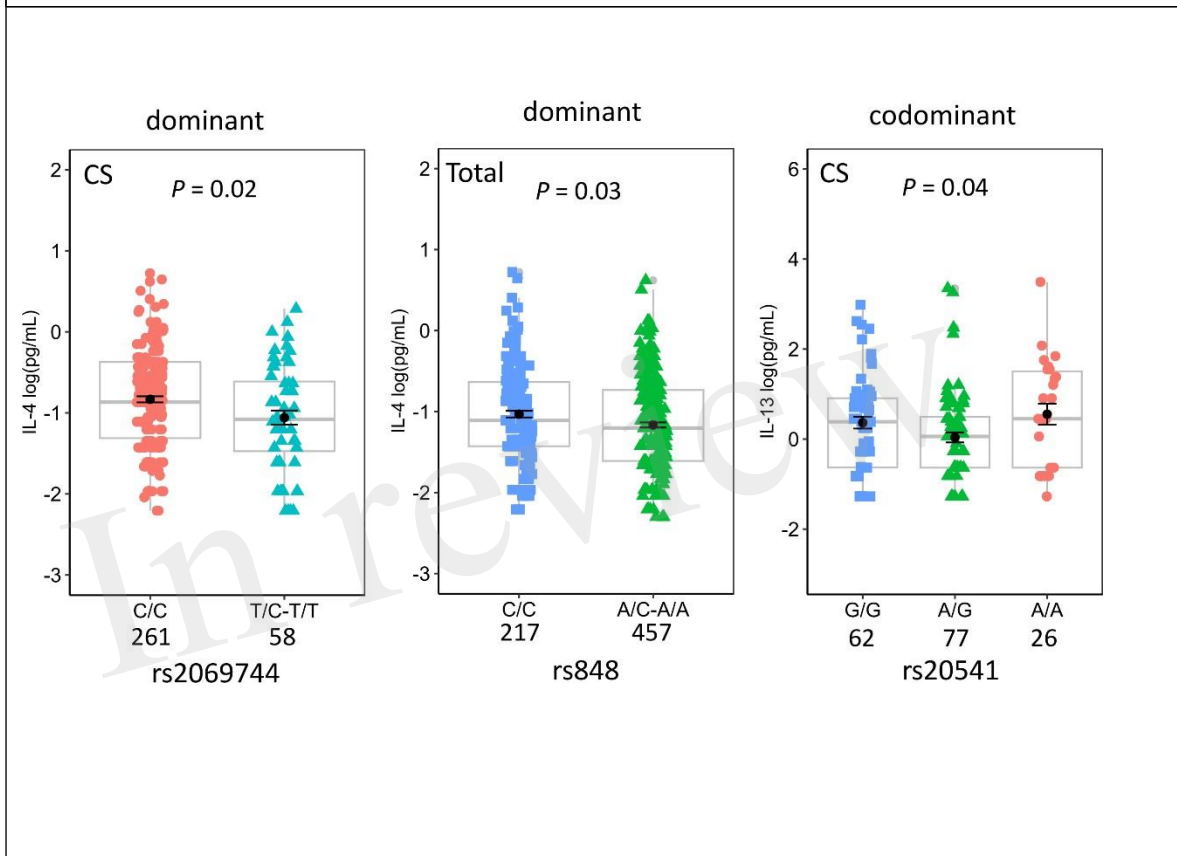
306

307

308

309

**Figure 3.** Effects of genotypes rs2069744 and rs848 on circulating plasma IL-4 based on a dominant genetic model, while rs20541 on IL-13 in the codominant model. Analysis was performed by unpaired parametric T- test in dominant model and by the Anova one-way parametric in the codominant model using the Generalized Linear Model of the R package. P is the *p*-value adjusted for age and sex. The bar represents the mean expressed in log (picogram/mL) while the error bar is the standard error of the mean.



310

311 The association between specific genetic variants and plasma IL-5 levels among  
 312 patients with *Lg*-CL is observed with several SNVs, including rs2069744, rs20541 (in the  
 313 exonic region) and three SNVs in the 3'UTR, namely rs1295685, rs848 and rs 847. These  
 314 associations are illustrated in Figure 4. The homozygous genotype CC of rs2069744, AA  
 315 of rs20541, AA of rs1295685, AA of rs848 and TT of rs847 are correlated with higher  
 316 mean levels of IL-5.

317

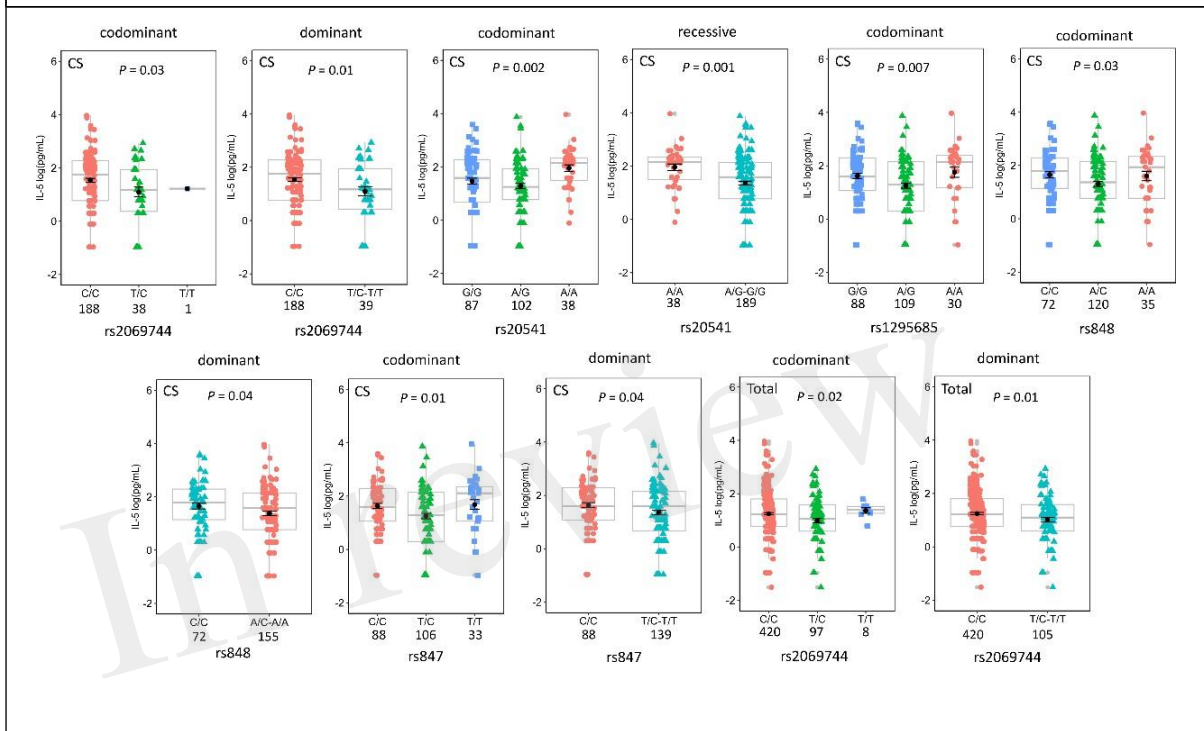
318

318

319

311321

**Figure 4.** Effects of genotypes rs2069744, rs20541, rs129685, rs848 and rs847 on circulating plasma IL-5 based on different genetic model. Analysis was performed by unpaired parametric T- test in dominant and recessive model and by the Anova one-way parametric in the codominant model using the Generalized Linear Model of the R package. P is the *p*-value adjusted for age and sex. The bar represents the mean expressed in log (picogram/mL) while the error bar is the standard error of the mean.



312

## 313 4 Discussion

314 The current cross-sectional study was designed to examine the genetic  
 315 susceptibility by focusing on SNVs in the *IL13* gene in individuals with *Lg*-CL and to  
 316 assess their impact on the regulation of circulating plasma cytokine IL-4, IL-5 and IL-13.  
 317 IL-13 is a significant Th2 cytokine and shares important similarities with IL-4. Th1 and  
 318 Th2 cytokines play crucial role in the immunopathogenesis of CL, with Th1 cytokines  
 319 associated with resistance and Th2 cytokines with susceptibility to infection.

320 Among the nine SNVs studied, the genotype of rs2069744, situated in the intronic  
 321 region 1, showed correlation with circulating plasma cytokines IL-4 and IL-5 among the  
 322 patients with *Lg*-CL and with IL-5 in the entire study population. The rs20541 is a non-  
 323 synonymous variant (Arg130Gln) that results from the substitution of the amino acid  
 324 arginine with glutamine at codon 110. The G allele yield arginine while A allele,  
 325 glutamine. This variant has been associated with total IgE concentrations in several  
 326 studies (32-37). Gln130 has been demonstrated to exhibit higher activity on primary  
 327 effector cells involved in human allergic inflammation compared to the common Arg130.  
 328 This finding led the authors to suggest that the increased allergic inflammation is likely  
 329 due to enhanced IL-13 mediated Th2 effector functions, rather Th2 differentiation (36).



311 This gain of function variant has been demonstrated to be associated with increased *IFNG*  
 312 gene expression in peripheral blood (37). This 130Gln variant has been shown to display  
 313 reduced affinity with its receptor IL-13R $\alpha$ 2, resulting in its decreased clearance (38). In  
 314 this study, homozygous carriers with the AA (Gln130) genotype appear to exhibit a  
 315 correlation with elevated plasma IL-5 and IL-13 levels.

316 The SNVs rs1295685, rs848 and rs847 located in the 3'UTR region of the *IL13*  
 317 gene have been demonstrated to interact with the promoter region and thereby regulating  
 318 the expression of the long non-coding RNA T helper type 2 locus control region  
 319 associated RNA (Th2LCRR) (39). Th2LCRR is transcribed as an antisense of the RAD50  
 320 gene (40). Th2LCRR is situated in the same chromosomal region of IL-4, IL-5 and IL-13  
 321 on chromosome 5 and maintains epigenetics effects on the promoters of IL-4, IL-5 and IL-  
 322 13, thereby influencing the regulation of T cell polarization. (41). The SNVs rs1295685,  
 323 rs848 and rs847 exhibit weak LD with rs20541 in our population, whereas they display a  
 324 strong LD in European population (39). Li et al 2022 demonstrated that haplotypes  
 325 containing the GCC sequence of the 3'UTR of IL13, when inserted in plasmid pGL3  
 326 promoter exhibited higher luciferase activity compared to the haplotypes with AAT  
 327 sequence. Conversely, the haplotypes with ACC, GAC and GCT sequence displayed very  
 328 low activity. Additionally, the G allele of rs1295685 was found to be associated with  
 329 higher expression of *TH2LCRR* compared to the A allele (39). Interestingly, our study  
 330 showed two haplotypes bearing the GCC sequence of the three SNVs in the 3'UTR, (H8'  
 331 ACCTGCC; OR=2.8 [CI 95% 1.8 – 4.3], p-value  $7 \times 10^{-6}$  and H7' AGCCGCC; OR=1.5  
 332 [CI 95% [1.0 – 2.2], p-value 0.04). Conversely, haplotype containing the GCT sequence  
 333 of the 3'UTR revealed significant association with protection against disease  
 334 development (H10' ACCCGCT; OR=0.07 [CI 95% [0.03 – 0.15], p-value  $6 \times 10^{-18}$ ).  
 335 *TH2LCRR* is known to regulate the expression of IL-4, IL-5 and IL-13 (42). It influences  
 336 the expression of Th2 cytokine genes through histones modification and there is a positive  
 337 correlation between *TH2LCRR* and *IL4*, *IL5* and *IL13* (40). *TH2LCRR* knockout mice  
 338 show a significant reduction in Th2 cytokines (43). In this study, the SNVs rs1295685,  
 rs848 and rs847 are correlated with plasma IL-5.

369 *L. major* infected BALB/c mice display a persistent Th2 response with high levels  
 370 of IL-4 and IL-13 in contrast to C57BL/6 mice and develop ulcerative skin lesions (44).  
 371 Several studies have reported an accumulation of eosinophils at the infection site in  
 372 murine models of CL (45-50). Eosinophils are known to produce IL-4 and IL-13 which  
 373 can contribute to the maintenance of TH2 cells and subsequently may promote parasites  
 374 persistence by deactivating M1 macrophages in susceptible individuals. In fact, a study  
 375 conducted on genetically resistant C57BL/6 mice infected with *L. major* Seidman strain  
 376 reported the deactivation of M1 macrophages by eosinophil-derived IL-4, rendering these  
 377 mice susceptible to infection (46). In naturally resistant C57BL/6 mice infected with *L.*  
 378 *major* Seidman strain, a progressive course of infection is observed despite the  
 379 development of Th1 cells (51), while in mice with a specific deletion of IL-4 and IL-13  
 380 in eosinophils showed clinical amelioration, indicating the role of these cytokines in  
 381 promoting disease progression (46).

382 In summary, the present study provides the first evidence in a large sample of  
 383 patients with *Lg-CL* that individual SNVs of IL13 are not associated with  
 384 protection/susceptibility to *Lg-CL*. However, haplotypes associated with high Th2  
 385 cytokines levels are found to be associated with susceptibility to *Lg-CL* disease  
 386 development. Our study identified three haplotypes of IL13 linked to resistance and two  
 387 haplotypes linked to susceptibility. These findings suggest the potential presence of a

388 variant located outside the *IL13* gene region that may contribute to susceptibility with *Lg-*  
389 *CL*.

### 390 **Acknowledgements**

391 The authors would like to thank all patients and individuals from the endemic  
392 areas for participating in this work.

### 393 **Funding**

394 This research was funded by the Brazilian Council for Scientific and  
395 Technological Development (CNPq), grant number 404181/2012-0 to Rajendranath  
396 Ramasawmy, Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), grant  
397 number 06200151/2020 and 01.02.016301.03393/2021-80 to Rajendranath Ramasawmy  
398 and FAPEAM RESOLUÇÃO N. 002/2008, 007|2018 e 005|2019 – PRÓ-ESTADO.  
399 Financial supports were also provided in the form of grants from Fundação de Amparo à  
400 Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (POSGRAD Program #008/2021 and  
401 #005/2022), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)  
402 and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (PDPG  
403 Emergencial de Consolidação Estratégica Program). JESJ, JLS, LSS and CCS have  
404 fellowships from FAPEAM and CAPES (Master and PhD students). The funders had no  
405 role in the study's design, data collection and analysis, the decision to publish or the  
406 preparation of the manuscript.

407

### 408 **References**

- 409 1. World Health Organisation. Leishmaniasis (2022). Available at:  
410 <https://www.who.int/news-room/fact-heets/detail/leishmaniasis> (Accessed April, 2023).
- 411 2. Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden  
412 attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* (2008) 2 (10):e313.  
413 doi:10.1371/journal.pntd.0000313.
- 414 3. Alvar J, Vélez ID, Bern C, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates  
415 of its incidence. *PLoS One.* (2012) 7 (5):e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671.
- 416 4. GBD 2013 DALYs and HALE Collaborators, Murray CJ, Barber RM, et al.  
417 Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and  
418 injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990-2013: quantifying  
419 the epidemiological transition. *Lancet.* (2015) 386 (10009):2145-2191.  
420 doi:10.1016/S0140-6736(15)61340-X.
- 421 5. Gabriel Á, Valério-Bolas A, Palma-Marques J, et al. Cutaneous Leishmaniasis:  
422 The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic  
423 Disease. *J Immunol Res.* 2019;2019:2603730. Published (2019) Dec 1.  
424 doi:10.1155/2019/2603730.
- 425 6. Hurdal R, Brombacher F. The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous  
426 Leishmaniasis. *Immunol Lett.* (2014) 161 (2):179-183. doi:10.1016/j.imlet.2013.12.022.

7. Colin S, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage phenotypes in  
428 atherosclerosis. *Immunol Rev.* (2014) 262 (1):153-166. doi:10.1111/imr.12218.
- 429 8. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+  
430 regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature.* (2002)  
431 420 (6915):502-507. doi:10.1038/nature01152.
- 432 9. Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4(+)  
433 CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of  
434 concomitant immunity. *J Exp Med.* (2004) 200 (2):201-210. doi:10.1084/jem.20040298.
- 435 10. Matthews DJ, Emson CL, McKenzie GJ, Jolin HE, Blackwell JM, McKenzie AN.  
436 IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. *J Immunol.* (2000) 164  
437 (3):1458-1462. doi:10.4049/jimmunol.164.3.1458.
- 438 11. Karam MC, Merckbawi R, El-Kouba JE, Bazzi SI, Bodman-Smith KB. In  
439 *Leishmania major*-induced inflammation, interleukin-13 reduces hyperalgesia, down-  
440 regulates IL-1 $\beta$  and up-regulates IL-6 in an IL-4 independent mechanism. *Exp Parasitol.*  
441 (2013) 134 (2):200-205. doi:10.1016/j.exppara.2013.02.005.
- 442 12. Zaatar MT, Simaan Y, Karam MC. Exogenous IL-13 exacerbates *Leishmania*  
443 *major* infection and abrogates acquired immunity to re-infection. *Parasitol Res.* (2022)  
444 121 (7):2009-2017. doi:10.1007/s00436-022-07539-y.
- 445 13. Felizardo TC, Gaspar-Elsas MI, Lima GM, Abrahamsohn IA. Lack of signaling  
446 by IL-4 or by IL-4/IL-13 has more attenuating effects on *Leishmania amazonensis* dorsal  
447 skin--than on footpad-infected mice. *Exp Parasitol.* (2012) 130 (1):48-57.  
448 doi:10.1016/j.exppara.2011.09.015.
- 449 14. Roberts M, Mock BA, Blackwell JM. Mapping of genes controlling *Leishmania*  
450 *major* infection in CXS recombinant inbred mice. *Eur J Immunogenet.* (1993) 20 (5):349-  
451 362. doi:10.1111/j.1744-313x.1993.tb00154.x.
- 452 15. Blackwell JM. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice  
453 and man. *Parasitology.* (1996) 112 Suppl:S67-S74.
- 454 16. Beebe AM, Mauze S, Schork NJ, Coffman RL. Serial backcross mapping of  
455 multiple loci associated with resistance to *Leishmania major* in mice. *Immunity.* (1997)  
456 6 (5):551-557. doi:10.1016/s1074-7613(00)80343-x.
- 457 17. von Stebut E, Udey MC. Requirements for Th1-dependent immunity against  
458 infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect.* (2004) 6 (12):1102-1109.  
459 doi:10.1016/j.micinf.2004.05.024.
- 460 18. Sakthianandeswaren A, Elso CM, Simpson K, et al. The wound repair response  
461 controls outcome to cutaneous leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2005) 102  
462 (43):15551-15556. doi:10.1073/pnas.0505630102.
- 463 19. Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H. Establishment of stable,  
464 cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*.  
465 *Science.* (1992) 257 (5069):539-542. doi:10.1126/science.1636090.

- 466 20. Bourreau E, Prévot G, Pradinaud R, Launois P. Interleukin (IL)-13 is the  
467 predominant Th2 cytokine in localized cutaneous leishmaniasis lesions and renders  
468 specific CD4+ T cells unresponsive to IL-12. *J Infect Dis.* (2001) 183 (6):953-959.  
469 doi:10.1086/319249.
- 470 21. de Araújo Santos F J, da Silva LS, Júnior, J. do, Ramos de Mesquita, T. G., de  
471 Souza, M. L., de Andrade Júnior, et al. Single nucleotide polymorphisms of the genes IL-  
472 2, IL-2RB, and JAK3 in patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (v.)  
473 *guyanensis* in Manaus, Amazonas, Brazil. *PLoS One.* (2019) 14 (8):e0220572. Published  
474 2019 Aug 8. doi:10.1371/journal.pone.0220572.
- 475 22. Junior J do ES, de Mesquita TGR, Oliveira da Silva DL, Jules de Araújo F,  
476 Lacerda de Souza J, Carneiro de Lacerda T, et al. TREM1 rs2234237 (Thr25Ser)  
477 Polymorphism in Patients with Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania*  
478 *guyanensis*: A Case-Control Study in the State of Amazonas, Brazil. *Pathogens.* (2021)  
479 10 (4):498. Published 2021 Apr 20. doi:10.3390/pathogens10040498.
- 480 23. de Mesquita TGR, Junior J do ES, de Lacerda TC, Queiroz KLGD, Júnior CM da  
481 S, Neto JP de M, et al. Variants of MIRNA146A rs2910164 and MIRNA499 rs3746444  
482 are associated with the development of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania*  
483 *guyanensis* and with plasma chemokine IL-8. *PLoS Negl Trop Dis.* (2021) 15  
484 (9):e0009795. Published 2021 Sep 20. doi:10.1371/journal.pntd.0009795.
- 485 24. Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuña-Alonzo V, Quinto-Sanchez M, Jaramillo C,  
486 Arias W, et al. Admixture in Latin America: Geographic Structure, Phenotypic Diversity  
487 and Self-Perception of Ancestry Based on 7,342 Individuals. *PLoS Genet.* (2014) 10  
488 (9):e1004572. Published 2014 Sep 25. doi:10.1371/journal.pgen.1004572.
- 489 25. da Silva LS, Santo JDE, de Mesquita TGR, Santos VAM, de Souza JL, de Araújo  
490 FJ, et al. IL-23R variant rs11805303 is associated with susceptibility to the development  
491 of cutaneous leishmaniasis in *Leishmania guyanensis*-infected individuals. *J Infect Dis.*  
492 (2022) 225 (1):163-171. doi:10.1093/infdis/jiab320.
- 493 26. Sambrook J, Russel DW (2021). *Molecular cloning a laboratory manual.* Cold  
494 Spring Harbor Laboratory Press.
- 495 27. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I.  
496 Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR  
497 amplification of the minixon sequence and subsequent restriction fragment length  
498 polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* (2003) 41 (7):3147-3153.  
499 doi:10.1128/JCM.41.7.3147-3153.2003.
- 500 28. Garcia L, Kindt A, Bermudez H, et al. Culture-independent species typing of  
501 neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock  
502 protein 70 genes. *J Clin Microbiol.* (2004) 42 (5):2294-2297.  
503 doi:10.1128/JCM.42.5.2294-2297.2004.
- 504 29. da Silva GAV, de Mesquita TGR, de Souza Encarnação HV, et al. A polymorphism  
505 in the IL1B gene (rs16944 T/C) is associated with cutaneous leishmaniasis caused by  
506 *Leishmania guyanensis* and plasma cytokine interleukin receptor antagonist. *Cytokine.*  
507 (2019) 123 :154788. doi:10.1016/j.cyto.2019.154788.

- 508 30. Paithankar KR, Prasad KS. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and  
509 ethanol. *Nucleic Acids Res.* (1991) 19 (6):1346. doi:10.1093/nar/19.6.1346.
- 510 31. Lis JT. Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced 511  
precipitation. *Methods Enzymol.* (1980) 65 (1):347-353. doi:10.1016/s0076- 512 6879(80)65044-7.
- 513 32. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, et al. A large-scale, consortium-based  
514 genomewide association study of asthma. *N Engl J Med.* (2010) 363 (13):1211-1221.  
515 doi:10.1056/NEJMoa0906312.
- 516 33. Weidinger S, Gieger C, Rodriguez E, et al. Genome-wide scan on total serum IgE  
517 levels identifies FCER1A as novel susceptibility locus. *PLoS Genet.* (2008) 4  
518 (8):e1000166. doi:10.1371/journal.pgen.1000166.
- 519 34. Liu X, Beaty TH, Deindl P, et al. Associations between total serum IgE levels and  
520 the 6 potentially functional variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German  
521 children: the German Multicenter Atopy Study. *J Allergy Clin Immunol.* (2003) 112  
522 (2):382-388. doi:10.1067/mai.2003.1635.
- 523 35. Bottema RW, Reijmerink NE, Kerkhof M, et al. Interleukin 13, CD14, pet and  
524 tobacco smoke influence atopy in three Dutch cohorts: the allergenic study. *Eur Respir J.*  
525 (2008) 32 (3):593-602. doi:10.1183/09031936.00162407.
- 526 36. Vladich FD, Brazille SM, Stern D, Peck ML, Ghittoni R, Vercelli D. IL-13  
527 R130Q, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector  
528 mechanisms essential for human allergic inflammation. *J Clin Invest.* (2005) 115 (3):747-  
529 754. doi:10.1172/JCI22818.
- 530 37. Smolkova B, Tulinska J, Palkovicova Murinova L, et al. Impact of interleukin 13  
531 (IL13) genetic polymorphism Arg130Gln on total serum immunoglobulin (IgE) levels  
532 and interferon (IFN)- $\gamma$  gene expression. *Clin Exp Immunol.* (2017) 188 (1):45-52.  
533 doi:10.1111/cei.12923.
- 534 38. Arima K, Umeshita-Suyama R, Sakata Y, et al. Upregulation of IL-13  
535 concentration in vivo by the IL13 variant associated with bronchial asthma. *J Allergy Clin*  
536 *Immunol.* (2002) 109 (6):980-987. doi:10.1067/mai.2002.124656.
- 537 39. Li YK, Zhang XX, Yang Y, et al. Convergent Evidence Supports TH2LCRR as a  
538 Novel Asthma Susceptibility Gene. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (2022) 66 (3):283-292.  
539 doi:10.1165/rcmb.2020-0481OC.
- 540 40. Spurlock CF 3rd, Tossberg JT, Guo Y, Collier SP, Crooke PS 3rd, Aune TM.  
541 Expression and functions of long noncoding RNAs during human T helper cell  
542 differentiation. *Nat Commun.* 2015;6:6932. Published (2015) Apr 23.  
543 doi:10.1038/ncomms7932.
- 544 41. Aune TM, Crooke PS 3rd, Spurlock CF 3rd. Long noncoding RNAs in T  
545 lymphocytes. *J Leukoc Biol.* (2016) 99 (1):31-44. doi:10.1189/jlb.1RI0815-389R.

- 546 42. Lee GR, Spilianakis CG, Flavell RA. Hypersensitive site 7 of the TH2 locus  
547 control region is essential for expressing TH2 cytokine genes and for long-range  
548 intrachromosomal interactions. *Nat Immunol.* (2005) 6 (1):42-48. doi:10.1038/ni1148.
- 549 43. Koh BH, Hwang SS, Kim JY, et al. Th2 LCR is essential for regulation of Th2  
550 cytokine genes and for pathogenesis of allergic asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2010)  
551 107 (23):10614-10619. doi:10.1073/pnas.1005383107.
- 552 44. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to  
553 *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* (2002) 2 (11):845-858. doi:10.1038/nri933.
- 554 45. Sasse C, Barinberg D, Obermeyer S, Debus A, Schleicher U, Bogdan C.  
555 Eosinophils, but Not Type 2 Innate Lymphoid Cells, Are the Predominant Source of  
556 Interleukin 4 during the Innate Phase of *Leishmania major* Infection. *Pathogens.* (2022)  
557 11 (8):828. Published 2022 Jul 25. doi:10.3390/pathogens11080828.
- 558 46. Lee SH, Chaves MM, Kamenyeva O, et al. M2-like, dermal macrophages are  
559 maintained via IL-4/CCL24-mediated cooperative interaction with eosinophils in  
560 cutaneous leishmaniasis. *Sci Immunol.* (2020) 5 (46):eaaz4415.  
561 doi:10.1126/sciimmunol.aaz4415.
- 562 47. Beil WJ, Meinardus-Hager G, Neugebauer DC, Sorg C. Differences in the onset  
563 of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice.  
564 *J Leukoc Biol.* (1992) 52 (2):135-142. doi:10.1002/jlb.52.2.135.
- 565 48. Grimaldi G Jr, Soares MJ, Moriearty PL. Tissue eosinophilia and *Leishmania*  
566 *mexicana mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. *Parasite*  
567 *Immunol.* (1984) 6 (5):397-408. doi:10.1111/j.1365-3024.1984.tb00811.x.
- 568 49. Pompeu ML, Freitas LA, Santos ML, Khouri M, Barral-Netto M. Granulocytes in  
569 the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A 570 quantitative  
570 approach. *Acta Trop.* (1991) 48 (3):185-193. doi:10.1016/0001-571706x(91)90046-m.
- 572 50. de Oliveira Cardoso F, de Souza Cda S, Mendes VG, Abreu-Silva AL, Gonçalves  
573 da Costa SC, Calabrese KS. Immunopathological studies of *Leishmania amazonensis*  
574 infection in resistant and in susceptible mice. *J Infect Dis.* (2010) 201 (12):1933-1940.  
575 doi:10.1086/652870.
- 576 51. Anderson CF, Mendez S, Sacks DL. Nonhealing infection despite Th1  
577 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J Immunol.*  
578 (2005) 174 (5):2934-2941. doi:10.4049/jimmunol.174.5.2934.

Figure 1.TIF

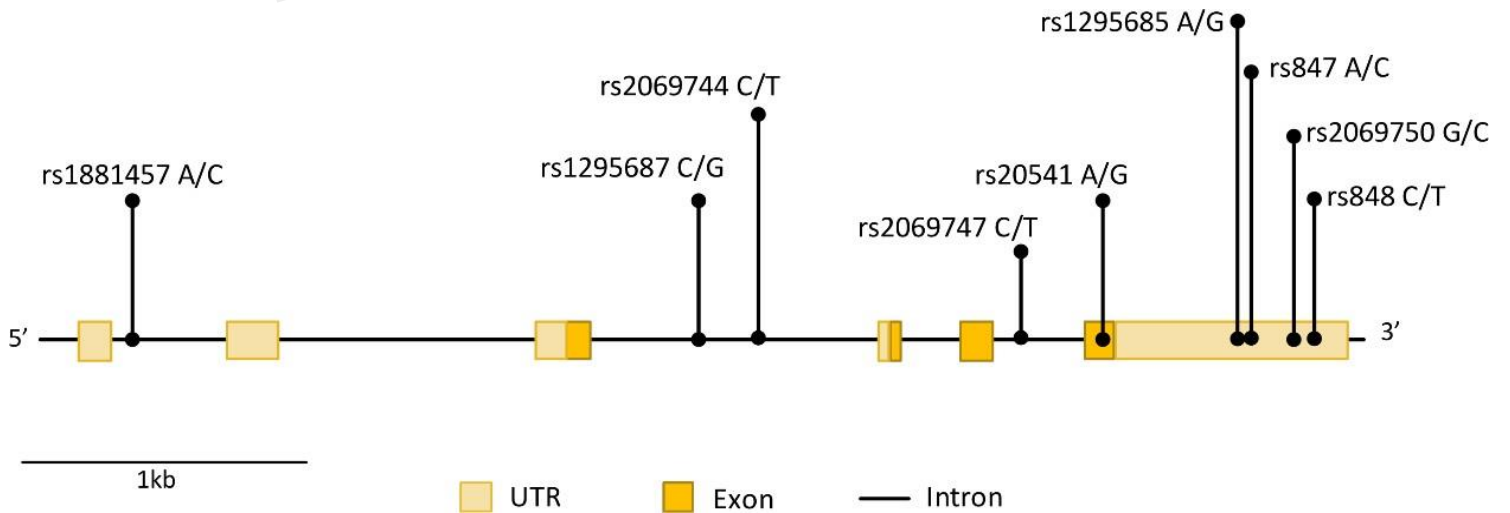


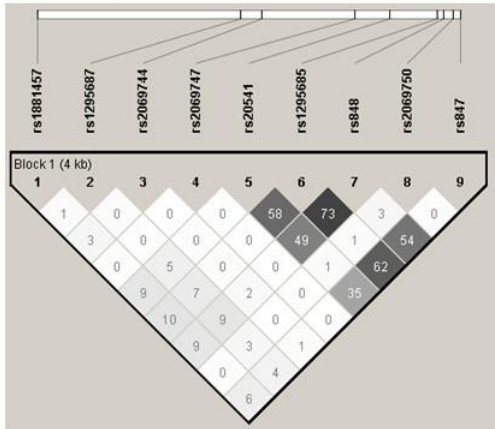
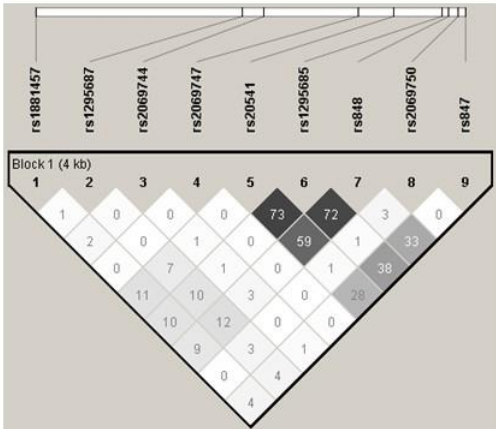
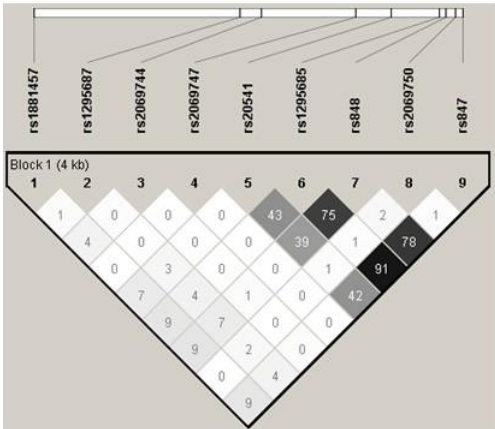
Figure 2.TIFF

In review

**Case**

**Control**

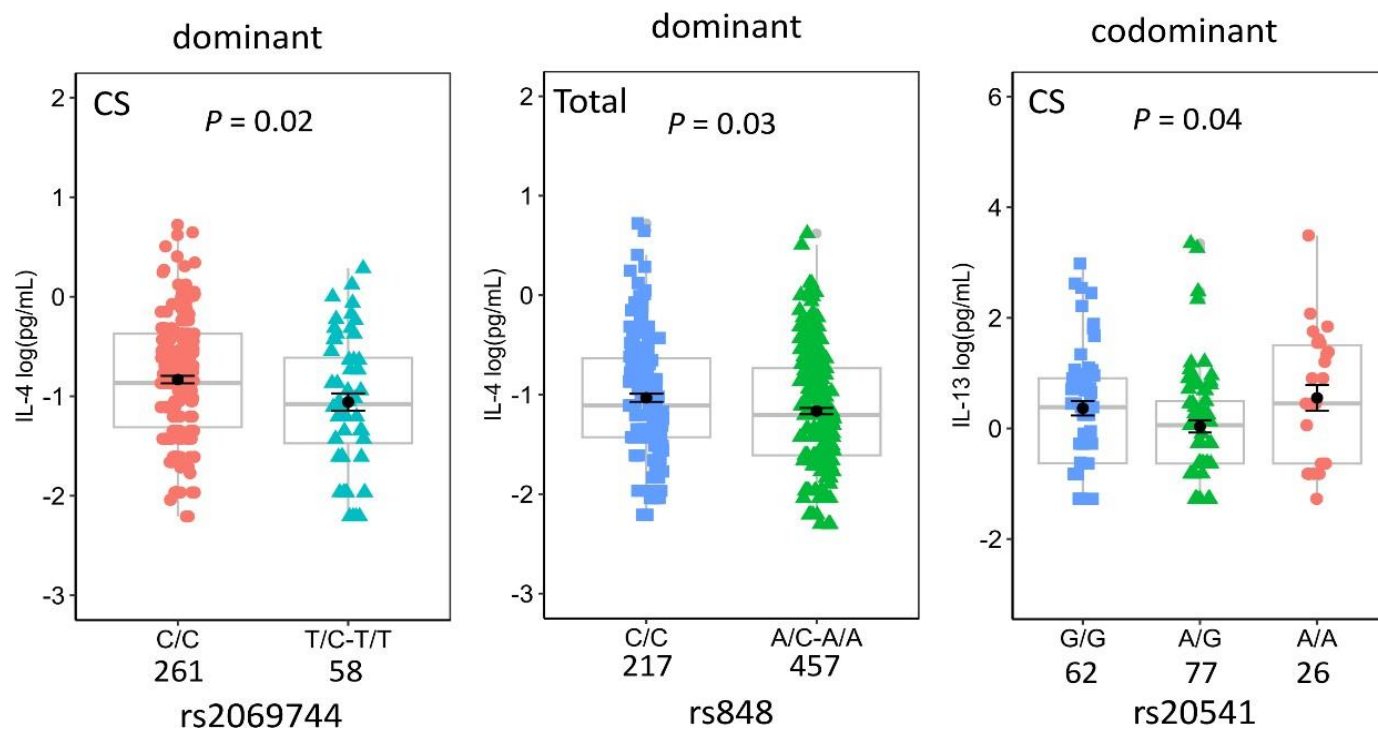
**Total**





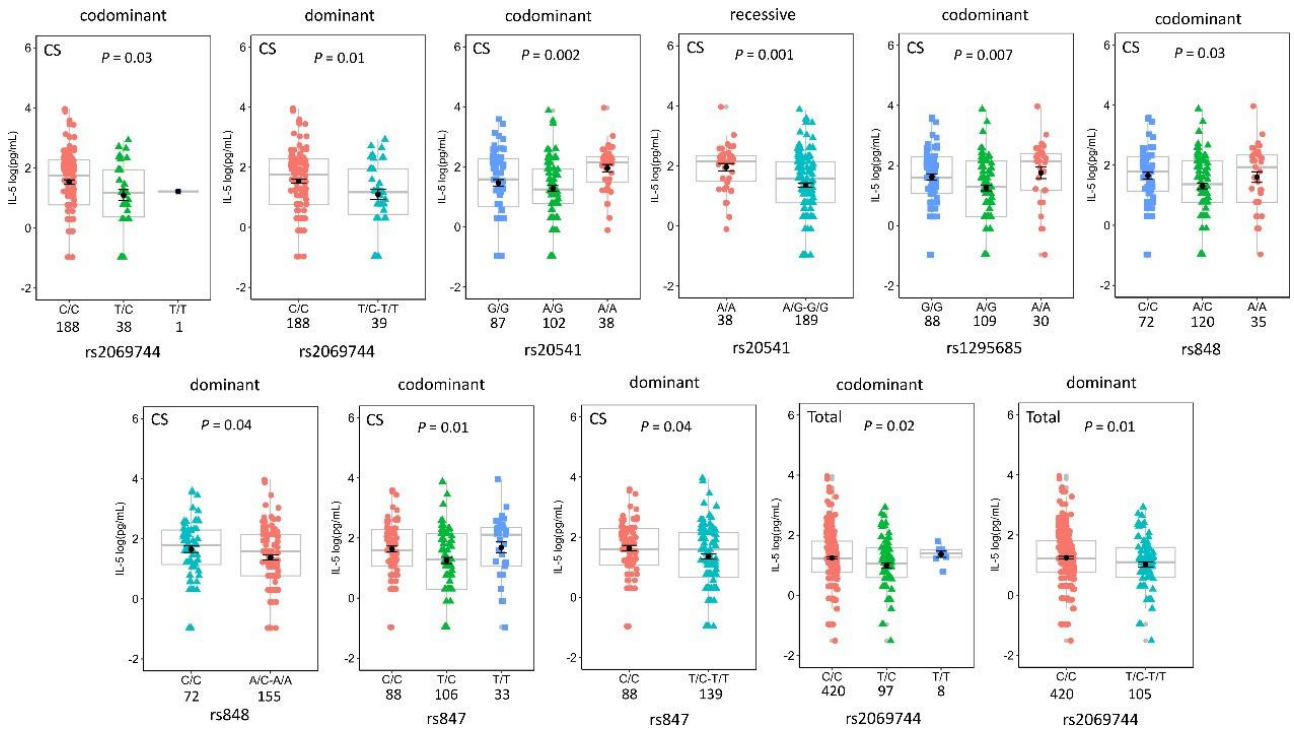
F  
i  
g  
u  
r  
e  
  
3  
·  
T  
I  
F

In review



F  
i  
g  
u  
r  
e  
  
4  
·  
T  
I  
F



In review



# **ANEXO 2**

## Article

# TREM1 rs2234237 (Thr25Ser) Polymorphism in Patients with Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania guyanensis*: A Case-Control Study in the State of Amazonas, Brazil

José do Espírito Santo Júnior <sup>1,2</sup> , Tirza Gabrielle Ramos de Mesquita <sup>3,4</sup>, Luan Diego Oliveira da Silva <sup>2</sup>, Felipe Jules de Araújo <sup>2,3</sup>, Josué Lacerda de Souza <sup>2</sup>, Thaís Carneiro de Lacerda <sup>2,3</sup>, Lener Santos da Silva <sup>3,4</sup>, Cláudio Marcello da Silveira Júnior <sup>4</sup>, Kryslayane Guimarães Duarte Queiroz <sup>4</sup>, Diogo Matos dos Santos <sup>2</sup>, Cilana Chagas da Silva <sup>4</sup>, Héctor David Graterol Sequera <sup>3,4</sup>, Melissa Tamayo Hermida <sup>2</sup>, Mara Lúcia Gomes de Souza <sup>3,4</sup> , Marcus Vinitius de Farias Guerra <sup>3,4</sup> and Rajendranath Ramasawmy <sup>1,2,3,4,5,\*</sup>



**Citation:** do Espírito Santo Júnior, J.; Gabrielle Ramos de Mesquita, T.; Diego Oliveira da Silva, L.; Jules de Araújo, F.; Lacerda de Souza, J.; Carneiro de Lacerda, T.; Santos da Silva, L.; Marcello da Silveira Júnior, C.; Layane Guimarães Duarte Queiroz, K.; dos Santos, D.M.; et al. *TREM1* rs2234237 (Thr25Ser) Polymorphism in Patients with Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania guyanensis*: A Case-Control Study in the State of Amazonas, Brazil. *Pathogens* **2021**, *10*, 498. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040498>

Academic Editors: Lawrence S. Young and Yasuyuki Goto

Received: 21 January 2021  
Accepted: 14 April 2021  
Published: 20 April 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas, Manaus 69080-900, AM, Brazil; sdjunior.biol@gmail.com
  - <sup>2</sup> Faculdade de Medicina Nilton Lins, Universidade Nilton Lins, Manaus 69058-030, AM, Brazil; luandiego.oliveira@gmail.com (L.D.O.d.S.); felipejules86@gmail.com (F.J.d.A.); josue.com@live.com (J.L.d.S.); thaisbelo3@gmail.com (T.C.d.L.); diogomsanttos@gmail.com (D.M.d.S.); mlss\_th@hotmail.com (M.T.H.)
  - <sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus 69040-000, AM, Brazil; tirzagabi@gmail.com (T.G.R.d.M.); lener.santos77@gmail.com (L.S.d.S.); hector.graterol4@gmail.com (H.D.G.S.); maralgsouza@gmail.com (M.L.G.d.S.); mvfguerra@fmt.am.gov.br (M.V.d.F.G.)
  - <sup>4</sup> Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Manaus 69040-000, AM, Brazil; claudiomarc99@gmail.com (C.M.d.S.J.); kryslayane@gmail.com (K.L.G.D.Q.); cilanasilva15@gmail.com (C.C.d.S.)
  - <sup>5</sup> Genomic Health Surveillance Network: Optimization of Assistance and Research in the State of Amazonas (REGESAM), Manaus 69040-000, AM, Brazil
- \* Correspondence: ramasawm@gmail.com; Tel.: + 55-92-98135-7425

**Abstract:** Background: Leishmaniasis is an infectious disease caused by *Leishmania* parasites. A Th1 immune response is necessary in the acute phase to control the pathogen. The triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-1 is a potent amplifier of inflammation. Our aim is to identify whether the *TREM1* variant rs2234237 A/T (Thr25Ser) is associated with the disease development of cutaneous leishmaniasis (CL) in *Leishmania guyanensis*-infected individuals. The effects of the rs2234237 genotypes on plasma cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1 and TNF- $\alpha$  are also investigated. Methods: 838 patients with CL and 818 healthy controls (HCs) living in the same endemic areas were genotyped by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism. Plasma cytokines were assayed in 400 patients with CL and 400 HCs using the BioPlex assay. Results: The genotypes' and alleles' frequencies were similar in both patients with CL (AA = 618, 74%; AT = 202, 24%; TT = 18, 2%) and in HCs (AA = 580, 71%; AT = 220, 27%; TT = 18, 2%). Rs2234237 showed a modest effect on plasma IL-10 that disappeared when correction of the *p*-value was applied. Plasma IL-10 by rs2234237 genotypes were (mean  $\pm$  SEM; AA = 2.91 pg/mL  $\pm$  0.14; AT = 2.35 pg/mL  $\pm$  0.12; TT = 3.14 pg/mL  $\pm$  0.56; *p* = 0.05). Conclusion: The *TREM1* rs2234237 (Thr25Ser) seems to have no influence on the susceptibility or resistance to *L. guyanensis* infections.

**Keywords:** triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1); polymorphism; cytokines; cutaneous leishmaniasis; *Leishmania guyanensis*; Amazonas

## 1. Introduction

*Leishmania* infections cause a broad spectrum of clinical manifestations. The clinical outcome depends on the *Leishmania* spp. and may range from asymptomatic, self-healing or non-healing skin lesions, classified as cutaneous leishmaniasis (CLs), to severe destructive mucosal lesions (MLs) or visceral leishmaniasis (VLs) that may even be fatal [1]. According

# **ANEXO 3**

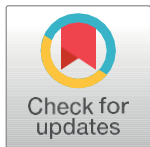
## RESEARCH ARTICLE

# Variants of *NOD2* in *Leishmania guyanensis*-infected patients with cutaneous leishmaniasis and correlations with plasma circulating pro-inflammatory cytokines

Tirza Gabrielle Ramos de Mesquita<sup>1,2</sup>, José do Espírito Santo Junior<sup>3,4</sup>, Josué Lacerda de Souza<sup>3,4</sup>, Lener Santos da Silva<sup>5</sup>, Tuanny Arruda do Nascimento<sup>4</sup>, Mara Lúcia Gomes de Souza<sup>3</sup>, Marcus Vinitius de Farias Guerra<sup>1,2</sup>, Rajendranath Ramasawmy<sup>1,2,4,5,6\*</sup>

**1** Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil, **2** Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil, **3** Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, **4** Faculdade de Medicina Nilton Lins, Universidade Nilton Lins, Manaus, Brazil, **5** Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazonia Legal (Rede Bionorte), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil, **6** Genomic Health Surveillance Network: Optimization of Assistance and Research in The State of Amazonas – REGESAM, Manaus, Amazonas, Brazil

\* [ramasawm@gmail.com](mailto:ramasawm@gmail.com)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Mesquita TGRd, Junior JdES, Souza JLd, Silva LSd, Nascimento TAd, Souza MLGd, et al. (2023) Variants of *NOD2* in *Leishmania guyanensis*-infected patients with cutaneous leishmaniasis and correlations with plasma circulating pro-inflammatory cytokines. PLoS ONE 18(2): e0281814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281814>

**Editor:** Albert Schriefer, Universidade Federal da Bahia, BRAZIL

**Received:** August 30, 2022

**Accepted:** February 1, 2023

**Published:** February 16, 2023

**Copyright:** © 2023 Mesquita et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

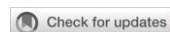
**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its [Supporting information](#) files.

**Funding:** This research was funded by the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq), grant number 404181/2012-0 to Rajendranath Ramasawmy, Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), grant number 06200151/2020 and

## Abstract

Leishmaniasis, a group of vector-borne diseases, are caused by the protozoan intracellular parasite *Leishmania* (*L.*) and are transmitted by the phlebotomine sandflies. A wide range of clinical manifestations in *L.* infection is observed. The clinical outcome ranges from asymptomatic, cutaneous leishmaniasis (CL) to severe mucosal leishmaniasis (ML) or visceral leishmaniasis (VL), depending on the *L.* species. Interestingly, only a fraction of *L.*-infected individuals progress to disease development, suggesting a key role of host genetics in the clinical outcome. *NOD2* plays a critical role in the control of host defense and inflammation. The *NOD2*-*RIK2* pathway is involved in developing a Th1- type response in patients with VL and C57BL/6 mice infected with *L. infantum*. We investigated whether variants in the *NOD2* gene (R702W rs2066844, G908R rs2066845, and L1007fsinsC rs2066847) are associated with susceptibility to CL caused by *L. guyanensis* (*Lg*) in 837 patients with *Lg*-CL and 797 healthy controls (HC) with no history of leishmaniasis. Both patients and HC are from the same endemic area of the Amazonas state of Brazil. The variants R702W and G908R were genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and L1007fsinsC was by direct nucleotide sequencing. The minor allele frequency (MAF) of L1007fsinsC was 0.5% among the patients with *Lg*-CL and 0.6% in the healthy controls group. R702W genotypes frequencies were similar in both groups. Only 1% and 1.6% were heterozygous for G908R among the patients with *Lg*-CL and HC, respectively. None of the variants revealed any association with susceptibility to the development of *Lg*-CL. Correlations of genotypes with the level of plasma cytokines revealed that individuals with the mutant alleles of R702W tend to have low levels of IFN- $\gamma$ . G908R heterozygotes

# **ANEXO 4**



## OPEN ACCESS

 EDITED BY  
 Mohd Adnan,  
 University of Hail, Saudi Arabia

 REVIEWED BY  
 Tatjana Keesen,  
 Federal University of Paraíba, Brazil  
 Ahmad Khosravi,  
 Kerman University of Medical  
 Sciences, Iran

 \*CORRESPONDENCE  
 Rajendranath Ramasawmy  
 ramasawm@gmail.com

 SPECIALTY SECTION  
 This article was submitted to  
 Parasite Immunology,  
 a section of the journal  
 Frontiers in Immunology

 RECEIVED 28 June 2022  
 ACCEPTED 08 August 2022  
 PUBLISHED 25 August 2022

 CITATION  
 Mesquita TGRd, Junior JdES,  
 Silva LDOd, Silva GAV, Araujo FJd,  
 Pinheiro SK, Kerr HKA, Silva LSd,  
 Souza LMd, Almeida SAd,  
 Queiroz KLGD, Souza JLD, Silva CCd,  
 Sequera HDG, Souza MLGd,  
 Barbosa AN, Pontes GS, Guerra MVdF  
 and Ramasawmy R (2022) Distinct  
 plasma chemokines and cytokines  
 signatures in *Leishmania guyanensis*-  
 infected patients with  
 cutaneous leishmaniasis.  
*Front. Immunol.* 13:974051.  
 doi: 10.3389/fimmu.2022.974051

 COPYRIGHT  
 © 2022 Mesquita, Junior, Silva, Silva,  
 Araujo, Pinheiro, Kerr, Silva, Souza,  
 Almeida, Queiroz, Souza, Silva, Sequera,  
 Souza, Barbosa, Pontes, Guerra and  
 Ramasawmy. This is an open-access  
 article distributed under the terms of  
 the [Creative Commons Attribution  
 License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution  
 or reproduction in other forums is  
 permitted, provided the original  
 author(s) and the copyright owner(s)  
 are credited and that the original  
 publication in this journal is cited, in  
 accordance with accepted academic  
 practice. No use, distribution or  
 reproduction is permitted which does  
 not comply with these terms.

# Distinct plasma chemokines and cytokines signatures in *Leishmania guyanensis*-infected patients with cutaneous leishmaniasis

 Tirza Gabrielle Ramos de Mesquita<sup>1,2</sup>,  
 José do Espírito Santo Júnior<sup>3,4</sup>, Luan Diego Oliveira da Silva<sup>4</sup>,  
 George Allan Villarouco Silva<sup>3</sup>, Felipe Jules de Araújo<sup>1,4</sup>,  
 Suzana Kanawati Pinheiro<sup>1,2</sup>, Herllon Karillos Athaydes Kerr<sup>1</sup>,  
 Lener Santos da Silva<sup>1,2</sup>, Luciane Macedo de Souza<sup>1</sup>,  
 Samir Assad de Almeida<sup>4</sup>,  
 Krys Layane Guimarães Duarte Queiroz<sup>2</sup>,  
 Josue Lacerda de Souza<sup>3,4</sup>, Cilana Chagas da Silva<sup>2</sup>, Hector  
 David Graterol Sequera<sup>1,2</sup>, Mara Lúcia Gomes de Souza<sup>1,2</sup>,  
 Anderson Nogueira Barbosa<sup>5</sup>, Gemilson Soares Pontes<sup>3,5,6</sup>,  
 Marcus Vinitius de Farias Guerra<sup>1,2</sup>  
 and Rajendranath Ramasawmy<sup>1,2,4,6\*</sup>
<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil, <sup>2</sup>Department of Molecular Biology, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil, <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, <sup>4</sup>Faculdade de Medicina Nilton Lins, Universidade Nilton Lins, Manaus, Brazil, <sup>5</sup>Department of Virology, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil, <sup>6</sup>Genomic Health Surveillance Network: Optimization of Assistance and Research in The State of Amazonas – REGESAM, Manaus, Amazonas, Brazil

The immunopathology associated with Leishmaniasis is a consequence of inflammation. Upon infection with *Leishmania*, the type of host-immune response is determinant for the clinical manifestations that can lead to either self-healing or chronic disease. Multiple pathways may determine disease severity. A comparison of systemic immune profiles in patients with cutaneous leishmaniasis caused by *L. guyanensis* and healthy individuals with the same socio-epidemiological characteristics coming from the same endemic areas as the patients is performed to identify particular immune profile and pathways associated with the progression of disease development. Twenty-seven plasma soluble circulating factors were evaluated between the groups by univariate and multivariate analysis. The following biomarkers pairs IL-17/IL-9 ( $\rho=0,829$ ), IL-17/IL-12 ( $\rho=0,786$ ), IL-6/IL-1ra ( $\rho=0,785$ ), IL-6/IL-12 ( $\rho=0,780$ ), IL-1 $\beta$ /G-CSF ( $\rho=0,758$ ) and IL-17/MIP-1 $\beta$



# **ANEXO 5**

# IL-23R Variant rs11805303 Is Associated With Susceptibility to the Development of Cutaneous Leishmaniasis in *Leishmania guyanensis*-Infected Individuals

Lener Santos da Silva,<sup>1,2</sup> José do Espírito Santo Júnior,<sup>1,3</sup> Tirza Gabrielle Ramos de Mesquita,<sup>1,2</sup> Veronica Alice Marinho Santos,<sup>1</sup> Josué Lacerda de Souza,<sup>1,3</sup> Felipe Jules de Araújo,<sup>1,2</sup> Cláudio Marcello da Silveira Júnior,<sup>1</sup> Cilana Chagas da Silva,<sup>1</sup> Kryslayane Guimarães Duarte Queiroz,<sup>1</sup> Héctor David Graterol Sequera,<sup>1,2</sup> Marcus Vinitius de Farias Guerra,<sup>1</sup> Mara Lúcia Gomes de Souza,<sup>1</sup> and Rajendranath Ramasawmy<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Viera Dourado, Manaus, Amazona, Brazil, <sup>2</sup>Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, <sup>3</sup>Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, and <sup>4</sup>Faculdade de Medicina, Universidade Nilton Lins, Manaus, Amazonas, Brazil

**Background.** Emerging evidence suggests that the interleukin (IL) 17/IL-23 axis may play a role in the pathogenesis of leishmaniasis. Our aim was to investigate whether the *IL-23R* variant rs11805303 is a risk factor for the development of cutaneous leishmaniasis (CL) in *Leishmania guyanensis*-infected individuals.

**Methods.** We genotyped by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism the rs11805303 C/T in 828 patients with CL and 806 healthy individuals. Plasma tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL-6, interferon- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , and IL-17 were measured with the Bioplex assay.

**Results.** The distribution of the genotypes differed between patients with CL and healthy controls with a common odds ratio of 1.78 ( $P = 2.2 \times 10^{-11}$ ) for the disease-associated T allele. *Leishmania guyanensis*-infected individuals homozygous for the T allele show a 200% increased risk of progressing to disease development, with a 95% confidence interval ranging from 81% to 400% ( $P = 9.9 \times 10^{-6}$ ) in comparison to individuals homozygous for the C allele. Males homozygous for the T allele have higher plasma levels of IL-17 compared with heterozygous or homozygous CC individuals.

**Conclusions.** The present association of the *IL-23R* variant rs11805303 with the development of CL suggests that the IL-17/IL-23 axis may play an important role in the pathogenesis of CL.

**Keywords.** cutaneous leishmaniasis; *Leishmania guyanensis*; *IL23R* variant; susceptibility.

Leishmaniasis is caused by infection with the intracellular protozoan parasite *Leishmania*. The clinical manifestations of *Leishmania* infection depend on the genetic background of the host, the vector, the site of infection, the skin microbiota, and the *Leishmania* species [1–4]. The clinical outcome may range from asymptomatic, self-healing to nonhealing cutaneous lesions known as cutaneous leishmaniasis (CL), to a severe disfiguring condition classified as mucosal leishmaniasis (ML), to fatal visceral leishmaniasis if the infection goes untreated.

*Leishmania* species infect phagocytes cells like macrophages. Interferon gamma (IFN- $\gamma$ )-activated macrophages control the replication of the parasite, suggesting that a Th1 response is needed to avoid disease development. However, an imbalanced

overexaggerated immune Th1 response liberating high IFN- $\gamma$  and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) may contribute to the pathogenesis associated with *Leishmania* infection despite the presence of very few parasites in the lesions [5, 6].

Naive CD4<sup>+</sup> T helper cells can differentiate into several subsets of T helpers upon entering in contact with antigens. In the presence of interleukin (IL) 12, naive CD4<sup>+</sup> T-helper cells differentiate into Th1 cells to mediate cellular immunity and produce IFN- $\gamma$ . When stimulated with IL-4, these cells progress to Th2 cells and are involved in humoral immunity producing IL-4, IL-5, and IL-13 while upon exposition to tumor growth factor beta (TGF- $\beta$ ), IL-6 and IL-23 evolve to Th17 cells that produce IL-17. IL-23, a heterodimeric cytokine comprised of IL-23p19 and IL-12p40, is the main cytokine that, upon binding to its receptor, IL-23 receptor (IL-23R), is involved in the differentiation and maintenance of CD4<sup>+</sup> T helper cells, the IL-17-producing effector Th17 cells [7]. Th17 cells secrete IL-17, TNF- $\alpha$ , and IL-6 but not IFN- $\gamma$  and IL-4.

The Th17 pathway plays key role in controlling acute microbial infections [8, 9]. IL-23R is described as the essential component for the terminal differentiation of Th17 cells [7]. IL-23R

Received 18 March 2021; editorial decision 13 June 2021; accepted 15 June 2021; published online June 17, 2021.

Correspondence: Rajendranath Ramasawmy, PhD, Faculdade de Medicina, Universidade Nilton Lins, Av Prof Nilton Lins, Parque Larangeiras, Manaus, Amazonas, CEP 69058030, Brazil (ramasawm@gmail.com).

The Journal of Infectious Diseases® 2021;XX:0–0

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: journals.permissions@oup.com. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab320>

# **ANEXO 6**

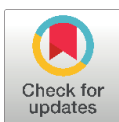
## RESEARCH ARTICLE

## Variants of *MIRNA146A* rs2910164 and *MIRNA499* rs3746444 are associated with the development of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania guyanensis* and with plasma chemokine IL-8

Tirza Gabrielle Ramos de Mesquita<sup>1,2</sup>, José do Espírito Santo Junior<sup>3,4</sup>, Thais Carneiro de Lacerda<sup>1,4</sup>, Krys Layane Guimarães Duarte Queiroz<sup>2</sup>, Cláudio Marcello da Silveira Junior<sup>2</sup>, Jose Pereira de Moura Neto<sup>5</sup>, Lissianne Augusta Matos Gomes<sup>4</sup>, Mara Lucia Gomes de Souza<sup>2</sup>, Marcus Vinitius de Farias Guerra<sup>1,2,6</sup>, Rajendranath Ramasawmy<sup>1,2,4,6</sup>

**1** Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, **2** Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil, **3** Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, **4** Faculdade de Medicina Nilton Lins, Universidade Nilton Lins, Manaus, Amazonas, Brazil, **5** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, **6** Genomic Health Surveillance Network: Optimization of Assistance and Research in The State of Amazonas—REGESAM, Manaus, Amazonas, Brazil

\* ramasawm@gmail.com



### OPEN ACCESS

**Citation:** de Mesquita TGR, Junior JdES, de Lacerda TC, Queiroz KLGD, Júnior CMdS, Neto JPdM, et al. (2021) Variants of *MIRNA146A* rs2910164 and *MIRNA499* rs3746444 are associated with the development of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania guyanensis* and with plasma chemokine IL-8. *PLoS Negl Trop Dis* 15(9): e0009795. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009795>

**Editor:** Claudia Ida Brodskyn, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-FIOCRUZ/BA, BRAZIL

**Received:** May 24, 2021

**Accepted:** September 7, 2021

**Published:** September 20, 2021

**Peer Review History:** PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009795>

**Copyright:** © 2021 de Mesquita et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### Abstract

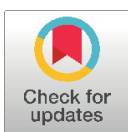
*Leishmania* are intracellular protozoan parasites that cause a wide spectrum of clinical manifestations in genetically susceptible individuals with an insufficient or balanced Th1 immune response to eliminate the parasite. miRNAs play important regulatory role in numerous biological processes including essential cellular functions. miR146-a acts as an inhibitor of interleukin 1 receptor associated kinase 1 (IRAK1) and tumour necrosis factor (TNF) receptor associated factor 6 (TRAF6) present in the toll-like receptors pathway while miR499a modulates TGF- $\beta$  and TNF signalling pathways. Here, we investigated whether *MIRNA146A* rs2910164 and *MIRNA499* rs3746444 variants are associated with the development of *L. guyanensis* (*Lg*)-cutaneous leishmaniasis (CL). The variants *MIR146A* rs2910164 and *MIR499A* rs3746444 were assessed in 850 patients with *Lg*-CL and 891 healthy controls by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Plasma cytokines were measured using the BioPlex assay. Carriers of rs2910164 CC genotype have 30% higher odds of developing CL (OR<sub>adj</sub><sub>age/sex</sub> = 1.3 [95% CI 0.9–1.8]; P<sub>adj</sub><sub>age/sex</sub> 0.14) compared to individuals with the genotype GG (OR<sub>adj</sub><sub>age/sex</sub> = 0.77 [95%CI 0.56–1.0]; P<sub>adj</sub><sub>age/sex</sub> 0.14) if exposed to *Lg*-infection. Heterozygous GC individuals also showed lower odds of developing CL (OR<sub>adj</sub><sub>age/sex</sub> = 0.77 [95%CI 0.5–1.1]; P<sub>adj</sub><sub>age/sex</sub> 0.09). Homozygosity for the allele C is suggestive of an association with the development of *Lg*-CL among exposed individuals to *Lg*-infection. However, the odds of developing CL associated with the CC genotype was evident only in male individuals

# **ANEXO 7**

## RESEARCH ARTICLE

# Single nucleotide polymorphisms of the genes *IL-2*, *IL-2RB*, and *JAK3* in patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (V.) guyanensis* in Manaus, Amazonas, Brazil

Felipe Jules de Araujo Santos<sup>1,2</sup>, Lener Santos da Silva<sup>1,2</sup>, José do Espírito Santo Junior<sup>3</sup>, Tirza Gabrielle Ramos de Mesquita<sup>1,2</sup>, Mara Lucia Gomes de Souza<sup>2</sup>, Moacir Couto de Andrade Junior<sup>4,5</sup>, Sinesio Talhari<sup>1,2</sup>, Rajendranath Ramasawmy<sup>1,2,3,6</sup>



**1** Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, **2** Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil, **3** Programa de Pós-graduação de Imunologia Básica, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil, **4** Post-Graduation Department, Nilton Lins University, Manaus, Amazonas, Brazil, **5** Department of Food Technology, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas, Brazil, **6** Faculdade de Medicina, Nilton Lins University, Manaus, Amazonas, Brazil

\* ramasawm@gmail.com

## OPEN ACCESS

**Citation:** de Araujo Santos FJ, da Silva LS, Júnior JdES, Ramos de Mesquita TG, de Souza MLG, de Andrade Júnior MC, et al. (2019) Single nucleotide polymorphisms of the genes *IL-2*, *IL-2RB*, and *JAK3* in patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (V.) guyanensis* in Manaus, Amazonas, Brazil. PLoS ONE 14(8): e0220572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220572>

**Editor:** Narasimha Reddy Parine, King Saud University, SAUDI ARABIA

**Received:** March 8, 2019

**Accepted:** July 18, 2019

**Published:** August 8, 2019

**Copyright:** © 2019 de Araujo Santos et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq) to RR (grant number: 404181/2012-0) and the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas to RR (grant number: 062.01954/2015). The funders had no

## Abstract

Leishmaniasis is a disease caused by intracellular protozoan parasites of the genus *Leishmania*. In endemic areas, only a portion of exposed subjects develops cutaneous leishmaniasis (CL), suggesting that the genetic inheritance of the host plays a vital role in both resistance and susceptibility to the disease. Interleukin-2 (IL-2) is a cytokine that plays a central role in the regulation of the immune response in infection through the axis IL-2/IL-2R (receptor) complex, triggering a series of intracellular events, among which the signaling of Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK-STAT). The present study aimed at verifying the possible relationship between single nucleotide polymorphism (s) (SNP s) in the genes *IL-2*, *IL-2RB*, and *JAK3* in subjects with CL caused by *Leishmania guyanensis* in the city of Manaus, state of Amazonas, Brazil. 820 patients with CL and 850 healthy subjects (control group) coming from the same endemic areas as the patients were examined. The SNPs -2425G/A (rs4833248) and -330 T/G (rs2069762), located in the *IL-2* gene promoter region, seem to influence the expression of the gene and the SNP +10558G/A (rs1003694) and +13295T/C (rs3212760) located in the 3rd intron of the *IL-2RB* gene and the 13th intron of the *JAK3* gene, respectively, were studied by PCR-RFLP. Genotypes and alleles frequencies were obtained by direct counting. For the comparison between the two groups, the  $\chi^2$  test with OR (odds ratio) and the 95% confidence interval (CI) were used. Similar genotypes and alleles frequencies for the different SNPs were observed in both patients with CL and healthy controls. Comparison of genotypic and allelic frequency between patients with CL and healthy subjects did not show any difference. These polymorphisms do not predict susceptibility to, or protection against the development of CL caused by *L. guyanensis* in the Amazonas.

# **ANEXO 8**

# A Single Haplotype of *IFNG* Correlating With Low Circulating Levels of Interferon- $\gamma$ Is Associated With Susceptibility to Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania guyanensis*

George A. V. da Silva,<sup>1</sup> Tirza G. Mesquita,<sup>2</sup> Victor C. Souza,<sup>3</sup> José do Espírito Santo Junior,<sup>1</sup> Mara Lúcia Gomes de Souza,<sup>4</sup> Anette Chrusciak Talhari,<sup>4</sup> Sinésio Talhari,<sup>4,5</sup> Felipe G. Naveca,<sup>3</sup> and Rajendranath Ramasawmy<sup>1,4,5</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, Manaus, Brazil; and <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Amazonas, Manaus, Brazil; <sup>3</sup>Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ Amazônia, Amazonas, Manaus, Brazil; and <sup>4</sup>Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil; and <sup>5</sup>Faculdade de Medicina, Universidade Nilton Lins, Amazonas, Manaus, Brazil

(See the Editorial commentary by Petersen et al on pages 282–3.)

**Background.** Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) plays an important role in the control of *Leishmania* infection. Blockade of IFN- $\gamma$  signaling in mice increases lesion size and parasite load. In endemic areas of Leishmaniasis, only a fraction of the population develops the disease. This suggests that host genetics may play a role in this response. We investigated whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *IFNG* may be associated with elevated or decrease risk in the development of cutaneous leishmaniasis (CL). **Methods.** We assessed 9 SNP and cytosine-adenine (CA) repeats in *IFNG* by nucleotide sequencing in 647 patients with CL caused by *Leishmania guyanensis* and 629 controls. Circulating plasma IFN- $\gamma$  levels were also assayed in 400 patients with CL and 400 controls. **Results.** The rs2069705TT genotype is associated with elevated risk of developing CL compared with the rs2069705CC genotype (OR, 1.7; 95% CI, 1.3–2.4;  $P = .0008$ ). There is a 70% chance that this genotype raises the risk of developing CL. In a dominant model, carriers of the rs2069705T allele compared with the rs2069705CC genotype showed a 50% (range, 20–100%) increased risk of developing CL (OR, 1.5; 95% CI, 1.2–2.0;  $P = .0004$ ). Haplotype analysis showed 1 haplotype (H1) associated with low levels of IFN- $\gamma$  presented an increased risk of 60% of developing CL (OR, 1.6; 95% CI, 1.3–1.9;  $P = 5 \times 10^{-5}$ ) compared with non-H1. **Conclusions.** *IFNG* variant rs2069705 seems to be a genetic modifier of clinical outcome of *Leishmania* infection; individuals with the H1 haplotype, associated with low levels of IFN- $\gamma$ , have a 60% risk of developing CL.

**Keywords.** polymorphisms; haplotype; interferon-gamma; *Leishmania guyanensis*; cutaneous leishmaniasis.

Leishmaniasis affects more than 12 million people worldwide and remains a major health problem in the tropical and subtropical regions of Asia, the Middle East, sub-Saharan Africa, and South America [1]. *Leishmania* is transmitted by sand flies and displays a wide spectrum of clinical manifestations in humans, ranging from asymptomatic, spontaneously healing skin lesions, to more chronic cutaneous leishmaniasis (CL) or mucocutaneous lesions. *Leishmania* also causes the life-threatening visceral leishmaniasis (VL), which can be fatal in the absence of treatment or at a rate of 5–15% even with treatment.

Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) plays an important role in the control of *Leishmania* infection. Blockade of IFN- $\gamma$  signaling in mice

increases lesion size and parasite load [2]. *IFNG* knockout mice are susceptible to *Leishmania major*, *Leishmania donovani*, and *Leishmania braziliensis* infections [2–4]. In human, circulating levels of IFN- $\gamma$  are higher in asymptomatic and cured subjects than in patients with active VL [5]. An intralesional cytokine study of biopsy specimens from patients with CL caused by *Leishmania guyanensis* infection distinguished patients into 3 categories: Patients with a predominance of T-helper (Th) 2 cytokines (interleukin [IL]-4 and IL-13) developed lesions earlier than patients with a predominance of Th1 cytokines, while patients with similar Th1 and Th2 cytokines showed lesions intermediate to Th1 and Th2 patients [6]. In patients infected with *L. braziliensis*, high expressions of IFN- $\gamma$  and IL-10 are observed in late lesions compared with earlier lesions [7]. Optimal levels of tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  and IFN- $\gamma$  are cited to control the parasite and lesions healing while high levels IFN- $\gamma$  are correlated with the severe forms of leishmaniasis [7–9].

In areas of endemic Leishmaniasis, only a proportion of individuals exposed to the *Leishmania*-carrying Phlebotomine sand flies develop disease, demonstrating that the host genetic background

Received 5 April 2019; editorial decision 27 June 2019; accepted 22 August 2019; published online November 13, 2019.

Correspondence: R. Ramasawmy, Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado, Av Pedro Teixeira, 25, Dom Pedro, Manaus, Amazonas, Brazil CEP 69.040-000 (ramasawmy@gmail.com).

Clinical Infectious Diseases® 2020;71(2):274–81

© The Author(s) 2019. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: journals.permissions@oup.com.  
DOI: 10.1093/cid/ciz810



# **ANEXO 9**



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

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

## A polymorphism in the IL1B gene (rs16944 T/C) is associated with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania guyanensis* and plasma cytokine interleukin receptor antagonist

George Allan Villarouco da Silva<sup>a</sup>, Tirza Gabrielle Ramos de Mesquita<sup>b</sup>, Helia Valeria de Souza Encarnação<sup>b</sup>, José do Espírito Santo Junior<sup>a</sup>, Karolina da Costa Sabino<sup>b</sup>, Isaac de Aguiar Neres<sup>b</sup>, Salim Assad de Almeida<sup>c</sup>, Mara Lúcia Gomes de Souza<sup>b</sup>, Sinésio Talhari<sup>b,c</sup>, Rajendranath Ramasawmy<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada-PPGIBA, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil

<sup>b</sup> Universidade do Estado do Amazonas/Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil

<sup>c</sup> Faculdade de Medicina, Universidade de Nilton Lins, Manaus, Amazonas, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Cutaneous Leishmaniasis  
*Leishmania guyanensis*  
 Amazonas  
 Single nucleotide polymorphism, Interleukin-1 beta and Interleukin-1 receptor antagonist

### ABSTRACT

Nod-like Receptor Protein3 (NLRP3) inflammasome in macrophages infected with *Leishmania* sp. enhances the secretion of IL-1 $\beta$ . Excess IL-1 $\beta$  production is linked to disease severity in patients with cutaneous leishmaniasis (CL) caused by *L. mexicana*. Blockade of the NLRP3 inflammasome in cell cultures from skin biopsies of patients with CL caused by *L. braziliensis* inhibited the release of IL-1 $\beta$ . We hypothesized that common single nucleotide polymorphisms in the IL1B and in its receptor antagonist IL1RN genes may be predictive of CL caused by *L. guyanensis*. The SNPs -511T/C (rs16944) and +3954C/T (rs1143634) of the IL1B and IL1RN VNTR (rs2234663) were assessed in 881 patients with CL and 837 healthy controls by PCR-RFLP and direct PCR respectively. Plasma cytokines levels were also assayed. The plasma levels of IL-1 $\beta$  were higher in patients compared to control subjects. In contrast, increased plasma levels of IL-1Ra were observed in controls. The rs16944 C/C genotype was more common among the patients (OR = 1.5 [95%CI 1.1–2.0]; P = 0.004) and the C allele suggests susceptibility to CL (OR = 1.2 [95%CI 1.1–1.4]; P = 0.003). The rs16944 C/C genotype shows a tendency to correlate with lower levels of the IL-1Ra cytokine. Low levels of IL-1Ra cytokine and rs16944 C/C genotype seem to confer susceptibility to *L. guyanensis*-infection in the Amazonas.

### 1. Introduction

Leishmaniasis, an infectious vector-borne disease caused by *Leishmania* species, affects more than 12 million people worldwide and remains a major health problem in the tropical and subtropical regions of Asia, the Middle East, sub-Saharan Africa and South America [1]. Over 20 different *Leishmania* species are identified to cause Leishmaniasis. The disease is transmitted by sand fly, the phlebotomines. *Leishmania*-infection displays a wide spectrum of clinical manifestations. It ranges from asymptomatic, spontaneously healing skin lesions, to more chronic cutaneous (CL) or mucocutaneous lesions (ML) and the life threatening visceral leishmaniasis (VL) that can be fatal in the absence of treatment or to 5–15% even with treatment.

CL is the most common with 0.7 to 1.2 million of new cases each

year. In Brazil, the estimated annual incidence of CL cases is around 72,000 to 119,000 [2]. *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiff* and *L. linbergi* are the major species causing CL in Brazil. *L. guyanensis* is the main etiological agent of CL in the Amazonas.

Extensive studies in *L.* major-infected murine model of CL demonstrated that the clinical course of the disease depends mainly on the balance of pro-inflammatory cytokines produced by Th1 cells and anti-inflammatory cytokines produced by Th2 cells and subsets of regulatory T cells [3].

*Leishmania* species can activate the NLRP3 inflammasome in infected macrophages and enhance the secretion of interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) [4,5]. IL-1 $\beta$  production due to NLRP3 confer resistance in C57BL/6 to *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. infantum chagasi* but not to *L.* major infection [5]. In contrast, knockout C57BL/6 mice for any

\* Corresponding author at: Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Av Pedro Teixeira, 25, Dom Pedro, Manaus, Amazonas CEP 69.040-000, Brazil.

E-mail address: [ramasawm@gmail.com](mailto:ramasawm@gmail.com) (R. Ramasawmy).

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154788>

Received 9 August 2018; Received in revised form 10 May 2019; Accepted 22 July 2019  
 1043-4666/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

# **ANEXO 10**

**Tabela Suplementar 1 - Comparações das frequências genótípicas das variantes do gene *IL13* em diferentes modelos genéticos.**

Marcadores	Pacientes com LC (N)	%	Controles (N)	%	OR.adj	[IC]	Adj. $\rho$ -valor	AIC
<b>rs1881457</b>								
<b>Codominante</b>								
A/A	529	61.9	540	67.9	1.00		0.3012	2311
A/C	273	31.9	279	32.5	1.05	[0.85 - 1.29]		
C/C	53	6.2	40	4.7	0.73	[0.47 - 1.14]		
<b>Dominante</b>								
A/A	529	61.9	540	62.9	1.00		0.9653	2312
A/C-C/C	326	38.1	319	37.1	1.00	[0.81 - 1.22]		
<b>Recessivo</b>								
A/A-A/C	802	93.8	819	95.3	1.00		0.1369	2309
C/C	53	6.2	40	4.7	0.72	[0.47 - 1.11]		
<b>Subdominante</b>								
A/A-C/C	582	68.1	580	67.5	1.00		0.5000	2311
A/C	273	31.9	279	32.5	1.07	[0.87 - 1.32]		
<b>rs1295687</b>								
<b>Codominante</b>								
C/C	593	69.4	587	68.3	1.00		0.7015	2313
C/G	228	26.7	239	27.8	1.08	[0.87 - 1.35]		
G/G	34	4.0	33	3.8	0.91	[0.55 - 1.51]		
<b>Dominante</b>								
C/C	593	69.4	587	68.3	1.00		0.5835	2311
C/G-G/G	262	30.6	272	31.7	1.06	[0.86 - 1.31]		
<b>Recessive</b>								
C/C-C/G	821	96.0	826	96.2	1.00		0.6566	2311
G/G	34	4.0	33	3.8	0.89	[0.54 - 1.47]		
<b>Subdominante</b>								
C/C-G/G	627	73.3	620	72.2	1.00		0.4447	2311
G/C	228	26.7	239	27.8	1.09	[0.88 - 1.35]		
<b>rs2069744</b>								
<b>Codominante</b>								
C/C	679	79.4	663	77.2	1.00		0.3279	2311
T/C	162	18.9	178	20.7	1.13	[0.89 - 1.44]		
T/T	14	1.6	18	2.1	1.54	[0.75 - 3.14]		
<b>Dominante</b>								
C/C	679	79.4	663	77.2	1.00		0.2098	2310
T/C-T/T	176	20.6	196	22.8	1.16	[0.92 - 1.47]		

<b>Recessivo</b>								
<b>C/C-T/C</b>	841	98.4	841	97.9	1.00		0.2659	2310
<b>T/T</b>	14	1.6	18	2.1	1.50	[0.73 - 3.06]		
<b>Subdominante</b>								
<b>C/C-T/T</b>	693	81.1	681	79.3	1.00		0.3596	2311
<b>T/C</b>	162	18.9	178	20.7	1.12	[0.88 - 1.43]		
<b>rs2069747</b>								
<b>Codominante</b>								
<b>C/C</b>	829	97.0	837	97.4	1.00		0.5512	2311
<b>C/T</b>	26	3.0	22	2.6	0.84	[0.46 - 1.51]		
<b>rs20541</b>								
<b>Codominante</b>								
<b>G/G</b>	358	41.9	341	39.7	1.00		0.3940	2312
<b>A/G</b>	374	43.7	382	44.5	1.09	[0.88 - 1.34]		
<b>A/A</b>	123	14.4	136	15.8	1.22	[0.91 - 1.63]		
<b>Dominante</b>								
<b>G/G</b>	358	38.5	341	39.7	1.00		0.2647	2310
<b>A/G-A/A</b>	497	58.1	518	60.3	1.12	[0.92 - 1.36]		
<b>Recessive</b>								
<b>G/G-A/G</b>	732	85.6	723	83.4	1.00		0.2596	2310
<b>A/A</b>	123	14.4	136	15.8	1.17	[0.89 - 1.53]		
<b>Subdominante</b>								
<b>G/G-A/A</b>	481	56.3	477	55.5	1.00		0.7723	2311
<b>A/G</b>	374	43.7	382	44.5	1.03	[0.85 - 1.25]		
<b>rs1295685</b>								
<b>Codominante</b>								
<b>G/G</b>	346	40.5	337	39.2	1.00		0.7496	2313
<b>A/G</b>	387	45.3	396	46.1	1.08	[0.87 - 1.33]		
<b>A/A</b>	122	14.3	126	14.7	1.09	[0.81 - 1.46]		
<b>Dominante</b>								
<b>G/G</b>	346	40.5	337	39.2	1.00		0.4500	2311
<b>A/G-A/A</b>	509	59.5	522	60.8	1.08	[0.89 - 1.32]		
<b>Recessivo</b>								
<b>G/G-A/G</b>	733	85.7	733	85.3	1.00		0.7447	2311
<b>A/A</b>	122	14.3	126	14.7	1.05	[0.80 - 1.38]		
<b>Subdominante</b>								
<b>G/G-A/A</b>	468	54.7	463	53.9	1.00		0.6086	2311
<b>A/G</b>	387	45.3	936	46.1	1.05	[0.87 - 1.28]		
<b>rs848</b>								
<b>Codominante</b>								
<b>C/C</b>	293	34.3	268	31.2	1.00		0.2996	2311

<b>A/C</b>	404	47.3	416	48.4	1.14	[0.91 - 1.42]		
<b>A/A</b>	158	18.5	175	20.4	1.23	[0.93 - 1.62]		
<b>Dominante</b>								
<b>C/C</b>	293	34.3	268	31.2	1.00		0.1513	2310
<b>A/C-A/A</b>	562	65.7	591	68.8	1.16	[0.95 - 1.43]		
<b>Recessivo</b>								
<b>C/C-A/C</b>	697	81.5	684	79.6	1.00		0.2942	2310
<b>A/A</b>	158	18.5	175	20.4	1.14	[0.89 - 1.46]		
<b>Subdominante</b>								
<b>C/C-A/A</b>	451	52.7	443	51.6	1.00		0.6052	2311
<b>A/C</b>	404	47.3	416	48.4	1.05	[0.87 - 1.28]		
<b>rs2069750</b>								
<b>Codominante</b>								
<b>G/G</b>	825	96.5	813	94.6	1.00		0.3147	2311
<b>G/C</b>	29	3.4	45	5.2	1.45	[0.89 - 2.37]		
<b>C/C</b>	1	0.1	1	0.1	1.13	[0.07 - 18.3]		
<b>Dominante</b>								
<b>G/G</b>	825	96.5	813	94.6	1.00		0.1308	2309
<b>G/C-C/C</b>	30	3.5	46	5.4	1.44	[0.89 - 2.33]		
<b>Recessivo</b>								
<b>G/G-G/C</b>	854	99.9	858	99.9	1.00		0.9382	2312
<b>C/C</b>	1	0.1	1	0.1	1.12	[0.07 - 18.0]		
<b>Subdominante</b>								
<b>G/G-C/C</b>	826	96.6	814	94.8	1.00		0.1290	2309
<b>G/C</b>	29	3.4	45	5.2	1.45	[0.89 - 2.37]		
<b>rs847</b>								
<b>Codominante</b>								
<b>C/C</b>	336	39.3	331	38.5	1.00		0.8594	2313
<b>T/C</b>	388	45.4	394	45.9	1.05	[0.85 - 1.30]		
<b>T/T</b>	131	15.3	184	15.9	1.06	[0.80 - 1.42]		
<b>Dominante</b>								
<b>C/C</b>	336	39.3	331	38.5	1.00		0.5841	2311
<b>T/C-T/T</b>	519	60.7	528	61.5	1.06	[0.87 - 1.29]		
<b>Recessivo</b>								
<b>C/C-T/C</b>	724	84.7	725	84.4	1.00		0.8094	2312
<b>T/T</b>	131	15.3	134	15.6	1.03	[0.79 - 1.35]		
<b>Subdominante</b>								
<b>C/C-T/T</b>	467	54.6	465	54.1	1.00		0.7185	2311
<b>T/C</b>	388	45.4	394	45.9	1.04	[0.85 - 1.26]		

Fonte: José Júnior (2023). Nota: OR.adj: odds ratio ajustado por sexo e idades; IC: intervalo de confiança; adj.p-valor: p-valor ajustado por sexo e idade; AIC: *Akaike criterium information*.  $p < 0.05$  são considerados significativos.









<b>rs1295685</b>															
<b>Codominante</b>															
G/G	88	1.620	0.09530	0.007098	640.2	120	1.0402	0.06101	0.6629	663.1	208	1.286	0.05697	0.10187	1356
A/G	109	1.255	0.09877			136	0.9911	0.06631			245	1.109	0.05781		
A/A	30	1.759	0.19470			42	0.9254	0.11108			72	1.273	0.11395		
<b>Dominante</b>															
G/G	88	1.620	0.09530	0.050615	644.4	120	1.0402	0.06101	0.4614	661.4	208	1.286	0.05697	0.08577	1356
A/G-A/A	139	1.364	0.08954			178	0.9756	0.05693			317	1.146	0.05169		
<b>Recessivo</b>															
G/G-A/G	197	1.418	0.07031	0.086457	645.3	256	1.0141	0.04531	0.4553	661.4	453	1.190	0.04093	0.51817	1359
A/A	30	1.759	0.19470			42	0.9254	0.11108			72	1.273	0.11395		
<b>Subdominante</b>															
G/G-A/A	118	1.655	0.08635	0.002002	638.6	162	1.0104	0.05356	0.8383	661.9	280	1.282	0.05137	0.03298	1354
A/G	109	1.255	0.09877			136	0.9911	0.06631			245	1.109	0.05781		
<b>rs848</b>															
<b>Codominante</b>															
C/C	72	1.655	0.10815	0.031222	643.3	93	1.0321	0.07377	0.8883	663.7	165	1.304	0.06717	0.18066	1358
A/C	120	1.307	0.09231			147	0.9916	0.06077			267	1.133	0.05406		
A/A	35	1.605	0.18129			58	0.9782	0.09465			93	1.214	0.09505		
<b>Dominante</b>															
C/C	72	1.655	0.10815	0.037124	643.9	93	1.0321	0.07377	0.6406	661.7	165	1.304	0.06717	0.08546	1356
A/C-A/A	155	1.374	0.08269			205	0.9878	0.05103			360	1.154	0.04698		
<b>Recessivo</b>															
C/C-A/C	192	1.438	0.07139	0.354357	647.5	240	1.0073	0.04685	0.7738	661.8	432	1.198	0.04226	0.91401	1359
A/A	35	1.605	0.18129			58	0.9782	0.09465			93	1.214	0.09505		
<b>Subdominante</b>															
C/C-A/A	107	1.638	0.09341	0.008808	641.3	151	1.0114	0.05803	0.8372	661.9	258	1.271	0.05490	0.09312	1356
A/C	120	1.307	0.09231			147	0.9916	0.06077			267	1.133	0.05406		
<b>rs2069750</b>															
<b>Codominante</b>															
G/G	217	1.462	0.06887	0.7503	648.2	280	1.0188	0.04369	0.107	659.3	497	1.212	0.04005	0.287	1358
C/G	10	1.488	0.22411			18	0.7347	0.12901			28	1.004	0.13246		
<b>rs847</b>															
<b>Codominante</b>															
C/C	88	1.635	0.09408	0.010496	641.0	113	1.0304	0.06430	0.6869	663.2	201	1.295	0.05863	0.09651	1356
T/C	106	1.252	0.10150			140	1.0045	0.06270			246	1.111	0.05686		
T/T	33	1.684	0.18335			45	0.9205	0.11534			78	1.244	0.11020		
<b>Dominante</b>															
C/C	88	1.635	0.09408	0.036051	643.9	113	1.0304	0.06430	0.5984	661.6	201	1.295	0.05863	0.05888	1356
T/C-T/T	139	1.355	0.08985			185	0.9841	0.05503			324	1.143	0.05069		
<b>Recessivo</b>															
C/C-T/C	194	1.426	0.07114	0.178232	646.5	253	1.0160	0.04496	0.4097	661.2	447	1.194	0.04110	0.71044	1359
T/T	33	1.684	0.18335			45	0.9205	0.11534			78	1.244	0.11020		
<b>Subdominante</b>															
C/C-T/T	121	1.648	0.08436	0.002562	639.1	158	0.9991	0.05646	0.9371	661.9	279	1.281	0.05219	0.03522	1355
T/C	106	1.252	0.10150			140	1.0045	0.06270			246	1.111	0.05686		

Fonte: José Júnior (2023). Nota: me: média de log (picograma por mililitro); se: erro padrão da média; p-valor: ajustado por sexo e idade; AIC: Akaike Information Criterion para cada modelo. p-valor < 0.05 são considerados significantes.



G/G	62	0.3659	0.13142	0.04101	487.2	103	-0.7473	0.14824	0.7491	887.0	165	-0.3290	0.11277	0.2580	1441
A/G	77	0.0372	0.11068			113	-0.8583	0.12532			190	-0.4954	0.09249		
A/A	26	0.5534	0.23525			35	-0.6773	0.20620			61	-0.1528	0.17270		
<b>Dominante</b>															
G/G	62	0.3659	0.13142	0.22209	490.3	103	-0.7473	0.14824	0.7166	885.5	165	-0.3290	0.11277	0.5561	1441
A/G-A/A	103	0.1675	0.10364			148	-0.8155	0.10725			251	-0.4121	0.08198		
<b>Recessivo</b>															
A/G-G/G	139	0.1838	0.08565	0.09093	488.9	216	-0.8054	0.09626	0.6149	885.4	355	-0.4181	0.07213	0.2121	1440
A/A	26	0.5534	0.23525			35	-0.6773	0.20620			61	-0.1528	0.17270		
<b>Subdominante</b>															
G/G-A/A	88	0.4213	0.11539	0.01600	485.9	138	-0.7295	0.12204	0.4755	885.1	226	-0.2814	0.09456	0.1426	1439
A/G	77	0.0372	0.11068			113	-0.8583	0.12532			190	-0.4954	0.09249		
<b>rs1295685</b>															
<b>Codominante</b>															
G/G	70	0.2300	0.12336	0.6822	493.0	101	-0.7653	0.15615	0.9098	887.4	171	-0.3579	0.11139	0.7709	1443
A/G	74	0.2006	0.11715			118	-0.8253	0.11607			192	-0.4299	0.09164		
A/A	21	0.4284	0.27247			32	-0.7184	0.22171			53	-0.2640	0.18724		
<b>Dominante</b>															
G/G	70	0.2300	0.12336	0.9138	491.8	101	-0.7653	0.15615	0.8465	885.6	171	-0.3579	0.11139	0.7974	1442
A/G-A/A	95	0.2509	0.10903			150	-0.8025	0.10255			245	-0.3940	0.08239		
<b>Recessivo</b>															
G/G-A/G	144	0.2149	0.08468	0.3909	491.1	219	-0.7976	0.09517	0.7577	885.5	363	-0.3960	0.07136	0.5771	1441
A/A	21	0.4284	0.27247			32	-0.7184	0.22171			53	-0.2640	0.18724		
<b>Subdominante</b>															
G/G-A/A	91	0.2758	0.11340	0.6410	491.6	133	-0.7540	0.12964	0.6914	885.5	224	-0.3357	0.09572	0.5313	1441
A/G	74	0.2006	0.11715			118	-0.8253	0.11607			192	-0.4299	0.09164		
<b>rs848</b>															
<b>Codominante</b>															
C/C	58	0.2540	0.13983	0.7868	493.3	81	-0.7944	0.17888	0.5107	886.3	139	-0.3569	0.12695	0.6947	1443
A/C	82	0.1990	0.10851			122	-0.8618	0.12027			204	-0.4354	0.09153		
A/A	25	0.3553	0.24616			48	-0.5873	0.16023			73	-0.2645	0.14393		
<b>Dominante</b>															
C/C	58	0.2540	0.13983	0.8845	491.8	81	-0.7944	0.17888	0.9495	885.6	139	-0.3569	0.12695	0.8183	1442
A/C-A/A	107	0.2355	0.10071			170	-0.7843	0.09767			277	-0.3903	0.07735		
<b>Recessivo</b>															
C/C-A/C	140	0.2218	0.08571	0.5477	491.5	203	-0.8349	0.10134	0.2664	884.4	343	-0.4036	0.07481	0.4827	1441
A/A	25	0.3553	0.24616			48	-0.5873	0.16023			73	-0.2645	0.14393		
<b>Subdominante</b>															
C/C-A/A	83	0.2845	0.12193	0.5684	491.5	129	-0.7173	0.12706	0.4145	884.9	212	-0.3251	0.09672	0.4524	1441
A/C	82	0.1990	0.10851			122	-0.8618	0.12027			204	-0.4354	0.09153		
<b>rs2069750</b>															
<b>Codominante</b>											395	-0.3792	0.06917	0.957	1442
G/G	159	0.25168	0.08353	0.5484	491.5	236	-0.8042	0.09141	0.4273	885	21	-0.3788	0.22912		
C/G	6	-0.01364	0.36546			15	-0.5248	0.28387							
<b>rs847</b>															
<b>Codominante</b>															
C/C	71	0.2152	0.12251	0.7279	493.2	96	-0.8082	0.16281	0.8098	887.2	167	-0.3731	0.11381	0.6439	1443
T/C	71	0.2167	0.11790			121	-0.8117	0.11347			192	-0.4314	0.09095		
T/T	23	0.4031	0.26417			34	-0.6429	0.21500			57	-0.2208	0.17892		
<b>Dominante</b>															
C/C	71	0.2152	0.12251	0.7857	491.8	96	-0.8082	0.16281	0.8357	885.6	167	-0.3731	0.11381	0.9200	1442

<b>T/C-T/T</b>	94	0.2623	0.10959			155	-0.7747	0.10018			249	-0.3832	0.08123		
<b>Recessivo</b>															
<b>C/C-T/C</b>	142	0.2160	0.08471	0.4247	491.2	217	-0.8102	0.09564	0.5156	885.2	359	-0.4043	0.07181	0.3955	1441
<b>T/T</b>	23	0.4031	0.26417			34	-0.6429	0.21500			57	-0.2208	0.17892		
<b>Subdominante</b>															
<b>C/C-T/T</b>	94	0.2612	0.11244	0.7738	491.8	130	-0.7650	0.13247	0.8074	885.6	224	-0.3344	0.09620	0.4932	1441
<b>T/C</b>	71	0.2167	0.11790			121	-0.8117	0.11347			192	-0.4314	0.09095		

Fonte: José Júnior (2023). Nota: me: média de log (picograma por mililitros); se: erro padrão da média; p-valor: ajustado por sexo e idade; AIC: Akaike Information Criterion para cada modelo. p-valor < 0.05 são considerados significantes.