

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

IARLA PRISCILA CASTRO TAVARES

POLIMORFISMOS GENÉTICOS ENVOLVIDOS NO ESTRESSE OXIDATIVO NA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA POR *LEISHMANIA GUYANENSIS* NO ESTADO DO
AMAZONAS

MANAUS - AMAZONAS

2024

IARLA PRISCILA CASTRO TAVARES

POLIMORFISMOS GENÉTICOS ENVOLVIDOS NO ESTRESSE OXIDATIVO NA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA POR *LEISHMANIA GUYANENSIS* NO ESTADO DO
AMAZONAS

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Imunologia Básica e
Aplicada da Universidade Federal do
Amazonas como parte do pré-requisito
para obtenção do título de Mestre em
Imunologia na área de concentração
“Imunologia Básica e Aplicada”.

Orientador: Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto
Coorientador: Prof. Dr. Rajendranath Ramasawmy

MANAUS - AMAZONAS

2024

Ficha Catalográfica

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

T231p	Tavares, Iarla Priscila Castro Polimorfismos genéticos envolvidos no estresse oxidativo na leishmaniose cutânea por <i>Leishmania guyanensis</i> no estado do Amazonas / Iarla Priscila Castro Tavares . 2024 131 f.: il. color; 31 cm. Orientador: José Pereira de Moura Neto Coorientador: Rajendranath Ramasawmy Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas. 1. Leishmaniose cutânea. 2. Polimorfismos. 3. Estresse oxidativo. 4. Citocinas. 5. Amazonas. I. Moura Neto, José Pereira de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título
-------	---

IARLA PRISCILA CASTRO TAVARES

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS ENVOLVIDOS NO ESTRESSE OXIDATIVO
NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA POR *LEISHMANIA GUYANENSIS* NO
ESTADO DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia na área de concentração “Imunologia Básica e Aplicada”.

Aprovada em 07 de dezembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado eletronicamente por **Jose Pereira de Moura Neto, Usuário Externo**, em 11/12/2023, às 11:30, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto, Presidente
Universidade Federal do Amazonas – UFAM



Documento assinado eletronicamente por **Aya Sadahiro, Professor do Magistério Superior**, em 07/12/2023, às 09:46, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Profª Drª. Aya Sadahiro, Membro
Universidade Federal do Amazonas – UFAM



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Marconi de Souza Cardoso, Usuário Externo**, em 07/12/2023, às 11:31, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Prof. Dr. Thiago Marconi Souza Cardoso, Membro
Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a minha fonte de espiritualidade, por ter me concedido a oportunidade de passar por diversos desafios durante a trajetória deste trabalho, dando-me sabedoria, discernimento, perseverança e calma;

À minha mãe Antonia Vieira de Castro, que me ensinou que o estudo será sempre o melhor caminho para a construção pessoal, profissional e espiritual. Gratidão por toda base familiar, cuidado, amor, orações, companheirismo e torcida estendida continuamente a minha pessoa;

Ao meu irmão Igor Castro Tavares, que sempre me incentivou a trilhar um caminho sólido nos estudos. Por todo apoio, palavras de consolo, incentivo e parceria de vida;

À minha irmã Adriana Timóteo Tavares, que mesmo distante presencialmente, sempre esteve torcendo e vibrando pelas minhas conquistas;

Ao meu Orientador Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto, um ser humano incrível que Deus colocou em minha vida. Ensinou-me a dar os primeiros passos ao universo fascinante da pesquisa científica. Palavras jamais conseguirão alcançar tamanha gratidão por tudo o que fez e tem feito durante toda a minha trajetória. Obrigada por todo o suporte, ensinamentos, positividade, atenção e paciência;

Ao meu Coorientador, Dr. Rajendranath Ramasawmy, por disponibilizar-se sempre em prol da realização deste estudo;

À toda a equipe da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) que extensivamente colaboram para a realização de protejos em Doenças Endêmicas. Em especial, ao Dr. José do Espírito Santo, por toda atenção e ajuda para tornar possível a realização deste estudo;

A todos do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da UFAM, excepcionalmente a pessoa do Edson Brazão, por sempre estar disponível para os auxílios e demandas diárias;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM, que disponibilizou toda estrutura laboratorial para a execução deste trabalho;

A CAPES, pelo suporte financeiro através da concessão de bolsa de estudos;

E a todos que indiretamente me ajudaram a realizar este sonho, GRATIDÃO!

***“Peçam, e será dado;
busquem, e encontrarão;
batam, e a porta será aberta.”***

Mateus 7:7

RESUMO

Introdução. O parasita *Leishmania* tem capacidade de sobreviver e se replicar no macrófago. Estas características provavelmente evoluíram como uma estratégia de resistência da *Leishmania* contra células inflamatórias. Durante a infecção por *Leishmania*, macrófagos e neutrófilos fagocitam os parasitas, formando o fagossomo, onde são “bombardeados” por uma “cascata oxidante” contendo especialmente ROS. Este processo contém principalmente superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formando um complexo conhecido como “explosão oxidativa”. Para tanto, nosso objetivo foi investigar polimorfismos genéticos em genes envolvidos no estresse oxidativo em pacientes com leishmaniose cutânea (LC) infectados por *L. (Viannia) guyanensis* utilizando um modelo de estudo caso-controle. **Métodos.** Foi realizado o recrutamento de pacientes com LC atendidos na FMT-HVD e os indivíduos saudáveis, sem sinais ou histórico de leishmaniose, residentes no mesmo local dos Casos. A dosagem de quimiocinas e citocinas plasmáticas foi realizada pela técnica de Luminex e os polimorfismos pela técnica de PCR em tempo real (qPCR) utilizando-se o sistema TaqMan® e analisados na plataforma QuantStudio 6 (Applied Biosystems). **Resultados:** Um total de 768 pacientes e 744 voluntários saudáveis concordaram em participar do estudo. O genótipo homozigoto selvagem (WT) c.-262CC em Catalase (OD: 1,29 - $p=0,041$) e WT SOD2 c.47CC foram associados como fator de risco para CL, enquanto WT MPO c.-463GG (OD: 0,73 - $p=0,004$); WT NOX2 c.242CC (DO: 0,74 - $p=0,005$); WT NOS3 c.-786TT (OD: 0,75 - $p=0,008$); WT TGF- β 1 c.-509CC (OD: 0,63 - $p<0,001$) associado como fator protetor. O SNP NOS2 c.-954G>C não apresentou associações significativas. IL-13 e MCP-1 foram as principais citocinas associadas fortemente reduzidas em pacientes na presença de genótipos mutantes em comparação com WT. Vale a pena notar que as concentrações plasmáticas de INF- γ foram significativamente reduzidas em genótipos mutantes de quase todos os SNPs em pacientes com LC. **Conclusões:** Consideramos que os genótipos mutantes diminuíram as principais citocinas ativadoras de neutrófilos, sendo IL-2 (MPO c.-463AA, TGF- β 1 c.-509TT e SOD2 c.47TT); IL-8 (CAT c.-262TT, TGF- β 1 c.-509TT e SOD2 c.47TT) e IL-12 (CAT c.-262TT e NOS3 c.-786CC), sugerindo menor concentração de ROS, diminuição do estresse oxidativo e maior progressão da doença nesses genótipos mutantes. Os genótipos mutantes (CAT c.-262TT, NOX2 c.242TT, TGF- β 1 c.-509TT e SOD2 c.47TT) resultaram em diminuição do INF- γ , sugerindo menor produção de citocinas inflamatórias e progressão da doença nestes genótipos. Enquanto o genótipo CAT c.-262CC diminuiu os níveis de IL-10 e IL-17 podendo estar associado a eliminação do parasita *Leishmania*. As citocinas IL-6, IL-13, IL-1B, FGF-Basic são produzidas por macrófagos, células dendríticas e linfócitos. Estas citocinas desempenham um papel vital na suscetibilidade à leishmaniose. Os genótipos homozigotos mutantes de TGF- β 1 c.-509TT e SOD2 c.47TT foram associados a níveis diminuídos nessas citocinas nos pacientes. Desta forma, essas citocinas podem estar associadas tanto na progressão como na eliminação da doença. Os nossos achados demonstraram os genótipos (WT MPO c.-463GG, WT NOX2 c.242CC, WT NOS3 c.-786TT e WT TGF- β 1 c.-509CC) com maior produção de ROS e com isso mostraram-se como fatores protetores para LC. Enquanto que os genótipos WT CAT c.-262CC e SOD2 c.47CC, demonstraram a menor produção de ROS sugerindo-se como fator de risco para Leishmaniose Cutânea.

Palavras-chave: Leishmaniose, Polimorfismos, Citocinas.

ABSTRACT

Background: The *Leishmania* parasite has the ability to survive and replicate in the macrophage. These characteristics probably evolved as a *Leishmania* resistance strategy against inflammatory cells. During *Leishmania* infection, macrophages and neutrophils phagocytose the parasites, forming the phagosome, where they are “bombarded” by an “oxidizing cascade” containing especially ROS. This process contains mainly superoxide ($O_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) forming a complex known as “oxidative explosion”. To this end, our objective was to investigate genetic polymorphisms in genes involved in oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis (CL) infected by *L. (Viannia) guyanensis* using a case-control study model. **Methods:** Patients with CL treated at FMT-HVD and healthy individuals, with no signs or history of leishmaniasis, living in the same location as the Cases, were recruited. plasma chemokines and cytokines were measured using the Luminex technique and the polymorphisms measured using real-time PCR (qPCR) by TaqMan® system, analyzed on QuantStudio 6 platform (Applied Biosystems). **Results:** A total of 768 patients and 744 healthy volunteers agreed to participate in the study. The homozygous wild genotype (WT) c.-262CC in Catalase (OD: 1.29 - $p=0.041$) and WT SOD2 c.47CC were associated as a risk factor for CL, while WT MPO c.-463GG (OD: 0.73 - $p=0.004$); WT NOX2 c.242CC (OD: 0.74 - $p=0.005$); WT NOS3 c.-786TT (OD: 0.75 - $p=0.008$); WT TGF- β 1 c.-509CC (OD: 0.63 - $p<0.001$) associated as a protective factor. The NOS2 c.-954G>C SNP did not show significant associations. IL-13 and MCP-1 were the main associated cytokines strongly reduced in patients in the presence of mutant genotypes compared to WT. It is worth noting that plasma INF- γ concentrations were significantly reduced in mutant genotypes of almost all SNPs in CL patients. **Conclusions:** We consider that the mutant genotypes decreased the main neutrophil-activating cytokines, being IL-2 (MPO c.-463AA, TGF- β 1 c.-509TT and SOD2 c.47TT); IL-8 (CAT c.-262TT, TGF- β 1 c.-509TT and SOD2 c.47TT) and IL-12 (CAT c.-262TT and NOS3 c.-786CC), suggesting lower ROS concentration, decreased stress oxidative activity and greater disease progression in these mutant genotypes. The mutant genotypes (CAT c.-262TT, NOX2 c.242TT, TGF- β 1 c.-509TT and SOD2 c.47TT) resulted in a decrease in INF- γ , suggesting lower production of inflammatory cytokines and disease progression in these genotypes. While the CAT c.-262CC genotype decreased the levels of IL-10 and IL-17, which may be associated with the elimination of the *Leishmania* parasite. The cytokines IL-6, IL-13, IL-1B, FGF-Basic are produced by macrophages, dendritic cells and lymphocytes. These cytokines play a vital role in susceptibility to leishmaniasis. The homozygous mutant genotypes of TGF- β 1 c.-509TT and SOD2 c.47TT were associated with decreased levels of these cytokines in patients. Therefore, these cytokines may be associated with both the progression and elimination of the disease. Our findings demonstrated the genotypes (WT MPO c.-463GG, WT NOX2 c.242CC, WT NOS3 c.-786TT and WT TGF- β 1 c.-509CC) with greater ROS production and thus proved to be protective factors for LC. While the WT CAT c.-262CC and SOD2 c.47CC genotypes demonstrated the lowest production of ROS, suggesting themselves as a risk factor for Cutaneous Leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis, Polymorphisms, Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de Transmissão da Leishmaniose	17
Figura 2 - Número de casos de leishmaniose cutânea e mucosa na Região das Américas, América Central, Brasil e Zona Andina no eixo esquerdo; Cone Sul, Caribe não latino e México no eixo direito, 2001-2020	20
Figura 3 - Esquema demonstrando os principais fatores envolvidos no desenvolvimento da leishmaniose	22
Figura 4 - Catalase associada a mecanismos que atuam sobre os radicais livres, reduzindo o estresse oxidativo	23
Figura 5 - Representação esquemática da capacidade de produção de ROS pela célula hospedeira durante a entrada de qualquer partícula estranha ou <i>Leishmania</i> sp	27
Figura 6 - Mecanismo de ação e biossíntese de NO	28
Figura 7 - Esquema demonstrando o papel importante da SOD2 na homeostase redox na mitocôndria	32
Figura 8 - Representação do ambiente oxidante gerando ambiente que propicia à infecção	33
Figura 9 - Fluxograma das Atividades	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ARG-1	Arginase-1
CAT	Catalase
DAMPs	Moléculas de Padrão Molecular Associadas a Danos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético
Fe	Ferro
GSHPx	Glutathione peroxidase
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HOCl	Ácido Hipocloroso
L-Arg	L-arginina
LC	Leishmaniose Cutânea
LCM	Leishmaniose Cutânea Mucosa
LM	Leishmaniose Mucosa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
Mn	Manganes
MnSOD2	Superóxido Dismutase Dependente de Manganês
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida-Adenina Dinucleotídeo Fosfato
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NOS2	Óxido Nítrico Sintase Induzível
NOS3	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
NOX2	NADPH Oxidase 2
O₂	Oxigênio Molecular
O₂•-	Superóxido
ONOO-	Ânion Peroxinitrito
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas do Oxigênio
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SOD2	Superóxido Dismutase 2
TGF-β1	Fator De Crescimento Transformador Beta 1
TNF-α	Fator De Necrose Tumoral- α
VPs	Vacúolos Parasitóforos
Zn	Zinco

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
1.1. Aspectos Gerais da Leishmaniose	15
1.1.1. Histórico da doença.....	15
1.1.2. Ciclo de transmissão	16
1.1.3. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	19
1.1.4. Fatores Genéticos do Hospedeiro no Desenvolvimento da Leishmaniose.....	20
1.2.1. Estresse Oxidativo.....	21
1.2.2. Catalase (CAT)	23
1.2.3. Mieloperoxidase (MPO)	24
1.2.4. Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase 2 (NOX2).....	26
1.2.5. Óxido Nítrico Sintase Induzida (NOS2).....	27
1.2.6. Óxido Nítrico Sintase Endotelial (NOS3)	29
1.2.7. Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β 1).....	30
1.2.8. Superóxido Dismutase 2 (SOD2)	31
1.3. Citocinas Inflamatórias no Estresse Oxidativo.....	33
2. OBJETIVOS.....	37
2.1. Objetivo Geral.....	37
2.2. Objetivos Específicos	37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1. Tipo de Estudo.....	38
3.2. Aspectos Éticos	38
3.3. Áreas de Estudo.....	38
3.4. Amostragem	38
3.5. Critérios de Inclusão e Exclusão	39
3.6. Fluxograma de atividades	39
3.7. Coleta de Material Biológico.....	40
3.8. Dosagem de Citocinas Plasmáticas.....	40
3.9. Caracterizações do Agente Etiológico	40
3.10. Genotipagem molecular dos Genes Humanos.....	40
3.11. Limitações do estudo.....	41

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
6. ANEXOS.....	118

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma doença infecciosa zoonótica não contagiosa, ocasionando diferentes lesões. De modo geral, essa enfermidade se divide em Leishmaniose Cutânea (LC), também conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e visceral progressiva conhecida como Leishmaniose Visceral (LV), originadas de infecções por diversas espécies de protozoários parasitas do gênero *Leishmania* (TUON *et al.*, 2008). Esses parasitas possuem ciclo de vida heteroxênico, alternando entre hospedeiros mamíferos e invertebrados, transmitidos durante o repasto sanguíneo pelos vetores dípteros da família Psychodidae (BATES, 2007).

A Leishmaniose LTA apresenta heterogeneidade nas manifestações clínicas de pele e mucosas e geralmente está associada a elevada morbidade, constituindo-se como grande problema de saúde pública mundial, presente em quase metade dos países do mundo. Por este motivo, é classificada como doença endêmica de controle prioritário e inclusa no *Program of Tropical Diseases Research* (HOTEZ *et al.*, 2007; de MOURA *et al.*, 2008; ALVAR *et al.*, 2012). Atualmente se destaca com incidência anual mundial entre 2-3 casos por 100.000 habitantes, com aproximadamente 15 milhões de pessoas infectadas mundialmente, em uma área de risco que engloba mais de 350 milhões de pessoas (WHO, 2020).

Nas Américas, do total de 36 Países, a LTA está presente em 18, com registro de aproximadamente 12 casos por 100.000 habitantes. Do total de casos, aproximadamente 80% estão concentrados no Brasil, e por isso, é considerada uma doença negligenciada com base nos limitados recursos investidos no diagnóstico, tratamento e controle (OPS/OMS, 2021).

No Brasil, estima-se que entre os anos de 1990 e 2015 ocorreram cerca de 700 mil novos casos, com elevadas taxas registradas na Região Norte e Nordeste do país (SINAN, 2017), causados pelas espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e *Leishmania (Leishmania) amazonenses* (PEREIRA, 2010; de MESQUITA *et al.*, 2022). No estado do Amazonas predomina a forma cutânea, ocorrendo principalmente na região metropolitana de Manaus, com raros casos de acometimento mucoso (NEVES *et al.*, 2011; WHO, 2014).

A exposição de *Leishmania* aos macrófagos levam à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), que contribuem para a regulação da resposta inflamatória, sendo controlada pelo sistema de defesa antioxidante celular (PAIVA, 2013). Após o reconhecimento de *Leishmania* spp., ocorre a ativação de macrófagos os quais são ativados e tornam-se as descritas "células efectoras" que podem destruir ou fagocitar o hospedeiro indesejado (GUPTA *et al.*, 2022).

O parasita *Leishmania* é caracterizado por sua capacidade de sobreviver e replicar no macrófago após fagocitose dos promastigotas em fase estacionária, ocorrendo então a formação de um fagossomo em torno do parasita, com fusão gradual de lisossomos e endossomos, resultando na geração de Vacúolos Parasitóforos (VPs) que rapidamente adquirem composição e função semelhantes às dos fagolisossomos, com propriedades hidrolíticas e proteolíticas (BURCHMORE & BARRETT, 2001; BISTI *et al.*, 2006). Essas características provavelmente evoluíram como estratégia de resistência por *Leishmania* contra células inflamatórias durante sua ativação para destruir patógenos intracelulares e extracelulares (GASPAROTTO *et al.*, 2017).

Entre as respostas do hospedeiro contra a infecção por *Leishmania*, a ativação da NADPH oxidase (NOX2), óxido nítrico sintase induzível (NOS2), óxido nítrico sintase endotelial (NOS3) e mieloperoxidase (MPO) podem contribuir para o estresse oxidativo do tecido (BLOS *et al.*, 2003; ROCHA *et al.*, 2007). No entanto, a resposta inflamatória pode ser ainda mais intensificada dependendo da capacidade do parasita de lidar com o estresse oxidativo gerado pelo hospedeiro. O aumento da produção de oxidantes durante esta resposta pode contribuir para o desenvolvimento da doença, visto que contribuem ainda mais para a lesão tecidual (HALLIWELL & JOHN, 2015). Assim, considerando esta relação entre a ativação pró-inflamatórias e a produção de espécies reativas, é possível que o estresse oxidativo seja um fator contribuinte ao comprometimento da função do tecido causado pela leishmaniose (GASPAROTTO *et al.*, 2017).

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Aspectos Gerais da Leishmaniose

1.1.1. Histórico da doença

O gênero *Leishmania* provavelmente evoluiu na era do Mesozóico e a origem geográfica das diferentes espécies de *Leishmania* ainda é uma questão de intensos debates científicos (GRIMALDI & TESH, 1993; KERR *et al.*, 2000). O aumento da temperatura pode ter sido a razão pela qual os vetores dípteros da família Psychodidae começaram a habitar o dossel da floresta, ocasionando mamíferos arbóreos a se tornarem novos hospedeiros para os parasitas da *Leishmania*. Mudanças climáticas e a aceitação de novos hospedeiros pelo vetor podem explicar a maior diversidade de *Leishmania* no Novo Mundo em comparação com o Velho Mundo (ROQUE & JANSEN, 2014; STEVERDING, 2017).

Com a colonização espanhola das Américas no início do século XVI, surgiram relatos de conquistadores e missionários descrevendo faces desfiguradas em condições que lembram a LC (COSTA *et al.*, 2009). Um dos primeiros relatos foi descrito pelo cronista espanhol Pedro Pizarro (1515–1602) em trabalhadores das encostas orientais inferiores do Andes peruanos que sofriam com a destruição do nariz e lábios (LAINSON, 2010). No Novo Mundo, comorbidades clínicas de LC são demonstradas em cerâmicas pré-colombianas desde o século V. Somado a isso, quatro crânios de mulheres descobertos no cemitério arqueológico do deserto de San Pedro do Atacama, norte do Chile, provavelmente do século XI, forneceram interessantes evidências morfológicas e até moleculares da leishmaniose (COSTA, 2009).

A cronografia da leishmaniose apresenta evolução da doença intrinsecamente ligada à atividade humana, embora a doença não se referir a um fator de seleção e evolução dos humanos. No entanto, evidências demonstram que a leishmaniose foi espalhada por todo o mundo pelo homem durante o início da migração humana (STEVERDING, 2008).

Atualmente a leishmaniose constitui um conjunto complexo de doenças com características e peculiaridades diferentes decorrentes da multiplicidade de seus agentes

etiológicos, vetores, reservatórios, fatores ambientais e a resposta imune disposta pelo hospedeiro em resposta ao protozoário e são classificadas em três manifestações principais: visceral (Calazar), mucocutanêa e cutânea (Tegumentar) (AWASTHI *et al.*, 2004).

1.1.2. Ciclo de transmissão

Os parasitas do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) são protozoários digenéticos (heteroxenos), com ciclo biológico desenvolvido em dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado. Apresentam dois estágios evolutivos principais: promastigota (com flagelo livre) que se desenvolve no aparelho digestivo do vetor e amastigota (intracelular, com flagelo rudimentar) que parasita o Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado infectado, reproduzindo-se no interior de macrófagos (LAINSON, 2010).

No continente americano, o ciclo de transmissão de *Leishmania* ocorre em diversos mamíferos (roedores, marsupiais, edentados, equinos, primatas e canídeos) que atuam como reservatórios naturais do parasita, e em insetos hematófagos flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) pertencentes a várias espécies e diferentes gêneros, dependendo da localização geográfica (YOUNG, 1994).

As formas amastigotas imóveis são esféricas ou ovais e medem cerca de 2,5-5,0 µm de diâmetro, possuindo um cinetoplasto localizado próximo ao núcleo, multiplicando-se dentro das células do SFM do hospedeiro vertebrado. Assim, as fêmeas flebotomíneas são infectadas durante a alimentação de um hospedeiro vertebrado pela ingestão de sangue ou linfa intersticial contendo macrófagos parasitados pelas formas amastigotas (BATES *et al.*, 2004; DAMIANOU *et al.*, 2020).

No trato digestivo do inseto, os amastigotas se diferem em promastigotas alongados, flagelados, com cerca de 5-15 µm de comprimento e com cinetoplastos situados entre o núcleo e a extremidade anterior. Enquanto ainda no trato digestivo do vetor, as formas promastigotas passam por estágios até se tornarem promastigotas metacíclicas, que se deslocam para o aparelho bucal do inseto. Os hospedeiros vertebrados são infectados quando os flebotomíneos fêmeas inoculam as formas promastigotas metacíclicas junto com a saliva durante a hematofagia (BATES, 2007; SUNTER & GULL, 2017). Uma vez dentro do hospedeiro vertebrado, os promastigotas

são internalizados no vacúolo fagocítico dos macrófagos, e transformados em amastigotas, que se replicam intensamente até romper a célula parasitada. Os amastigotas liberados infectam outros macrófagos e o ciclo inicia novamente (de MENEZES *et al.*, 2016) (Figura 1).

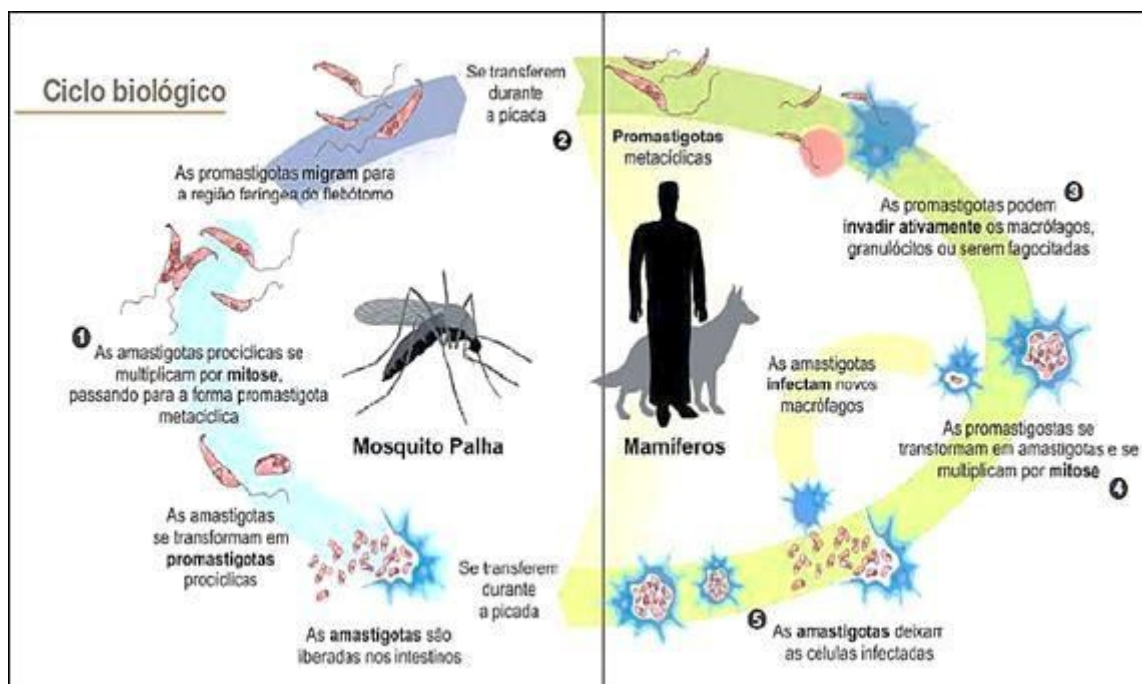


Figura 1 – Ciclo de Transmissão da Leishmaniose.

Fonte: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/36310/especializacao_marcia_miyuki_%20has_himoto.pdf;jsessionid=657261cdb0adc2998b27eddb4815830a?sequence=2.

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é causada por diferentes espécies de parasitas, sendo caracterizada principalmente pelo comprometimento do tecido cutâneo. Todavia, dependendo da espécie e fatores imunogenéticos do hospedeiro, pode ocorrer lesão do tecido mucoso nasofaríngeo, manifestando como Leishmaniose Cutânea (LC) ou Leishmaniose Cutânea Mucosa (LCM). Outros tipos de manifestações de importância clínica também podem ocorrer, como as formas disseminada e difusa (NEVES, 2004).

A Leishmaniose Cutânea apresenta-se com úlcera típica indolor com formato arredondado ou ovalado, com consistência firme, base eritematosa e medindo milímetros à centímetros. As bordas são bem delimitadas e elevadas com fundo avermelhado e granulações grosseiras (GONTIJO, 2003; SILVEIRA *et al.*, 2008). Nos dias de hoje, existem aproximadamente 30 espécies de *Leishmania* descritas e dentre

essas, 21 causam doença no homem. Nas Américas, 13 espécies são conhecidas, destas, sete foram descritas no Brasil (LAINSON, 2003).

Na Amazônia, a LTA pode ser ocasionada por sete espécies de *Leishmania*, seis do subgênero *Viannia*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e uma do subgênero *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis*. Dentre essas, até o momento, as de maior importância no estado do Amazonas são: *L. (V.) guyanensis* e a *L. (V.) naiffi*, seguidas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (ALVES *et al.*, 2011).

A *L. (L.) amazonensis* é a única espécie do subgênero *Leishmania* que causa a LC no Brasil. Possui distribuição geográfica relativamente ampla nas Américas com casos descritos como leishmaniose cutânea, cutânea mucosa, e por uma forma ainda sem tratamento conhecida como cutânea difusa anérgica (SILVEIRA *et al.*, 2008). Tem como principal vetor o *Lu. flaviscutellata*, um flebotômíneo de hábito noturno e pouco antropofílico (LAINSON, 2003).

A *L. (V.) braziliensis* causa lesões cutâneas e mucosas, ocorrendo de Norte a Sul do Brasil. O subgênero está relacionado com animais domésticos e a sua transmissão está associada ao vetor *Lu. wellcomei* em florestas no Pará e Sul da Bacia Amazônica (MARZOCHI, 1994).

No ano de 1954 foi descrita pela primeira vez a *L. guyanensis*, com os hospedeiros primários a preguiça de dois dedos (*Choloepus didactylus*) e o tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*). Estes, são considerados reservatórios secundários de *L. guyanensis*: *Didelphis marsupialis* (gambá comum), roedores do gênero *Proechimys*, *Marmosops incanus* (cuíca cinza) e *Dasypus novemcinctus* (LAINSON, 1988). A *Leishmania guyanensis* é uma espécie encontrada no Brasil, Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela. No Brasil, tem ampla distribuição, principalmente na região amazônica, incluindo os estados do Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Pará. As principais espécies de vetores que transmitem a *L. guyanensis* são *Lutzomyia umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani*, distribuídos em vários países da América do Sul (SCARPASSA, 2012).

O flebotômíneo *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* é o principal vetor que causa a *Leishmania (Viannia) guyanensis*, sendo um agente infeccioso da LTA no Norte da América do Sul. Além de sua distribuição na Bacia Amazônica, esta espécie também foi detectada em remanescentes da Mata Atlântica no Nordeste do Brasil (GASPAROTTO

et al., 2017). No Brasil, a *L. umbratilis* foi registrada em toda região amazônica e também em Pernambuco, estado da região Nordeste (GIUDICESSI, 2003; de MENEZES *et al.*, 2016).

Segundo Arias e Freitas (1977), a *Lu. umbratilis* é naturalmente infectada por *L. guyanensis* nas áreas do Leste e Norte do Rio Negro, sugerindo que este rio pode atuar como uma vicariante barreira à transmissão de *L. guyanensis*. Já compararam as primeiras gerações criadas em laboratório com populações de *Lu. umbratilis* obtidas nas áreas Sul e Norte do Rio Negro. Essas populações exibiram notáveis diferenças biológicas em seu ciclo de vida, fecundidade, fertilidade e longevidade adulta. A população do Norte era mais produtiva e vivia mais tempo em comparação com a população do Sul. Essas diferenças podem ser devido às feições biológicas intrínsecas decorrentes de seu isolamento geográfico junto ao Rio Negro (SOARES *et al.*, 2018).

1.1.3. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose cutânea é considerada mundialmente a forma mais comum de infecção por *Leishmania*, afetando mais de 1 milhão de seres humanos (WHO, 2014), com prevalência em metade do planeta (mais de 90 países) e comprovada transmissão endêmica em áreas tropicais e subtropicais do mundo, incluindo áreas rurais, florestas tropicais, áreas áridas, semiurbanas e áreas urbanas (ÁUREA *et al.*, 2019).

Entre os anos 2001 e 2020, foram notificados 1.067.759 casos de Leishmaniose Cutânea (LC) e Leishmaniose Mucosa (LM) à OPAS no mundo, com média de 53.387 casos por ano. Nesse período, notou-se uma queda no número de casos, atingindo 39.705. Ainda que esta diminuição represente menos de 5% do total da Região no período de 2019, poucos países registraram diminuições significativas que poderiam estar correlacionadas à paralisação total ou parcial das atividades de vigilância e assistência em decorrência da pandemia COVID-19 (Figura 2) (OPAS, 2021).

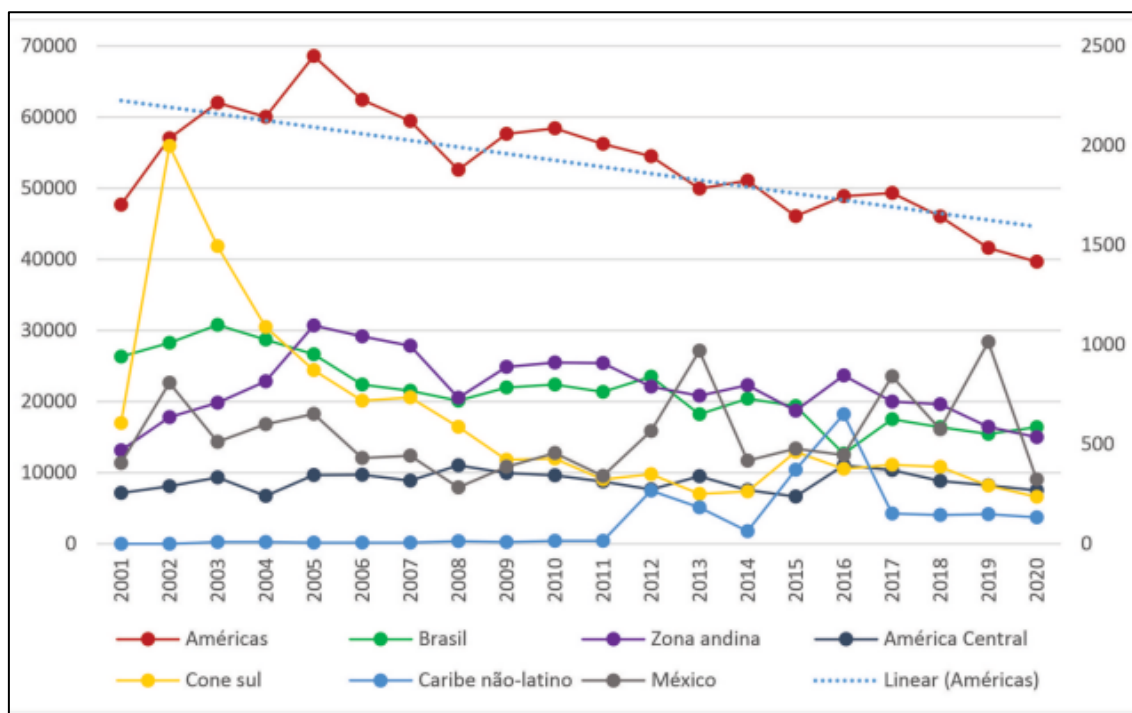


Figura 2 – Número de casos de leishmaniose cutânea e mucosa na Região das Américas, América Central, Brasil e Zona Andina no eixo esquerdo; Cone Sul, Caribe não latino e México no eixo direito, 2001-2020.

Fonte: Organização Pan-Americana da Saúde. Sistema de informação regional de leishmaniose (SisLeish) [Internet]. Washington, D.C.: OPAS; 2021 [acessado em 20 de outubro de 2023].

O Brasil, devido seu tamanho e população, encontra-se entre os cinco países com o maior número de casos nas Américas, representando um grave problema de saúde pública. No período de 2010 a 2015 foram registrados, em média, 20.798 casos, sendo distribuídos em todas as Unidades Federativas do Brasil, com destaque para as regiões norte e nordeste (ALVAR *et al.*, 2012; SINAN, 2017).

1.1.4. Fatores Genéticos do Hospedeiro no Desenvolvimento da Leishmaniose

As diferentes formas de leishmaniose apresentam-se desde assintomáticas, leves, graves e até fatais, com vários desfechos dependendo de muitos fatores relacionados ao hospedeiro, patógeno e ambiente. Dentre os fatores do hospedeiro, destacam-se o sistema imunológico com papel importante no estabelecimento de inúmeras infecções e sua gravidade (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

As variações genéticas nas populações humanas contribuem para a suscetibilidade ou resistência às diversas doenças infecciosas. Estas alterações genéticas do hospedeiro ocorrem de muitas formas, desde um polimorfismo de nucleotídeo único

(SNP), inserção/exclusão, repetições em tandem (minissatélite e microsatélite por exemplo) e até alterações numéricas estruturais, sendo os SNPs mais frequentemente relatados (SACHIDANANDAM *et al.*, 2001; ROSTAMI & KHAMESIPOUR, 2021).

Entendemos que o desenvolvimento da infecção por LC pode ser afetado por diversos fatores, normalmente incluindo o meio ambiente, o inseto vetor, o parasita e a base genética de ambos os hospedeiros, vertebrado e invertebrado. Em populações naturalmente expostas aos parasitas *Leishmania*, ainda não se sabe por que alguns indivíduos desenvolvem a LC e outros permanecem assintomáticos e ou saudáveis. Notadamente, o perfil genético do hospedeiro desempenha um papel vital na gravidade e resistência à LC (BLACKWELL *et al.*, 2020). Destacadamente, SNPs em genes de citocinas humanas têm sido associados à suscetibilidade de muitas doenças, incluindo as doenças infecciosas (KEEN, 2002; AKUFFO *et al.*, 2018).

1.2.1. Estresse Oxidativo

Durante os vários processos metabólicos que ocorrem no corpo humano, os radicais livres são formados como produtos naturais do metabolismo. Alguns destes atuam como moléculas sinalizadoras que controlam processos fisiológicos, porém, sua produção excessiva pode causar danos celulares e teciduais (DAVIES *et al.*, 2017; GIORGI *et al.*, 2018). Por esta razão, as células são forçadas a manter um equilíbrio na produção de ROS para manter a homeostase redox (HAJAM *et al.*, 2022). Para este fim, a família de compostos antioxidantes, que incluem uma série de complexos enzimáticos desempenha papel fundamental neste controle oxidativo. Vale salientar que o desequilíbrio entre o excesso de ROS e a capacidade biológica de detoxificar produtos reativos pode acompanhar muitas condições patológicas, mas também pode desempenhar um papel significativo na prevenção do envelhecimento celular (Figura 3) (RISTOW, 2014).

Atualmente é bem descrito os papeis do estresse e do dano oxidativo na contribuição e progressão de muitas doenças, principalmente na ativação de respostas pró-inflamatórias, especialmente observadas nas cardiovasculares, câncer, neurodegenerativas e doenças metabólicas como a diabetes. Todas, sem exceção,

apresentam componentes pró-inflamatórias nos mecanismos moleculares regulando sua progressão (HALLIWELL & JOHN, 2015; DHAMA *et al.*, 2019; BAI *et al.*, 2022).

Durante a infecção, os neutrófilos e macrófagos são capazes de fagocitar os patógenos formando o fagossomo, local onde são “bombardeados” por uma “cascata oxidante” contendo especialmente ROS e RNS. Esse processo contendo principalmente superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), é dependente da enzima NADPH-oxidase (NOX2), formando o complexo NOX2 e mieloperoxidase (MPO) conhecido como “explosão oxidativa”, (WINTERBOURN *et al.*, 2016). Este complexo parece ser dependente do pH e menos efetiva em pH mais elevado (ATOSUO, 2019).

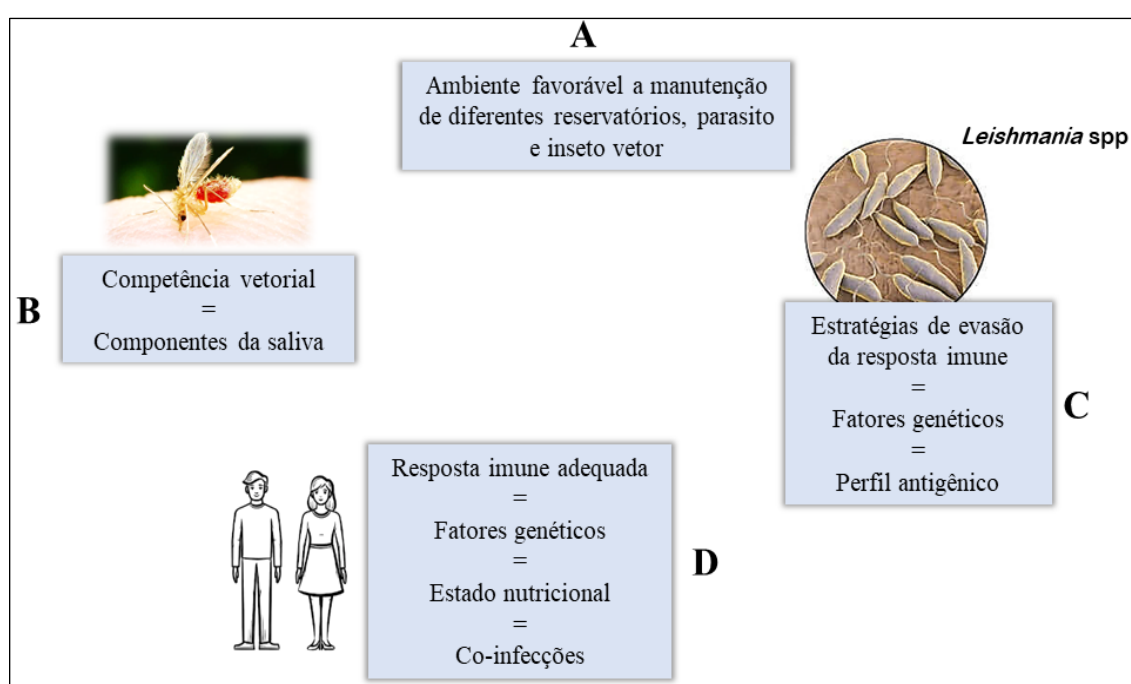


Figura 3 – Esquema demonstrando os principais fatores envolvidos no desenvolvimento da leishmaniose. **A)** Ambiente com diferentes reservatórios do parasito e vetores, condições de abrigo, alimentação e reprodução; **B)** Condições que favoreçam o vetor, multiplicação das *Leishmania* e sua transformação em formas infectivas. Além disso, possuir componentes na saliva que permita sucesso no repasto sanguíneo e inoculação no hospedeiro vertebrado as formas promastigotas metacíclicas infectantes; **C)** Espécies de *Leishmania* que dispõem de mecanismos de evasão das respostas imunes do hospedeiro vertebrado e capacidade de multiplicação e manutenção da espécie; **D)** O homem, como hospedeiro acidental com condições de desenvolver a leishmaniose.

Fonte: Adaptada de COVAS, 2010.

Em humanos, existem importantes sistemas enzimáticos antioxidantes para manutenção da homeostase redox, os quais, neutralizam compostos potencialmente danosos e agem na desintoxicação de radicais livres produzidos durante a metabolização oxidativa. Entre estas enzimas, se destacam a Catalase (CAT), Mieloperoxidase (MPO), NADPH Oxidase 2 (NOX2), Óxido Nítrico Sintase Endotelial (NOS3), Fator de

transformação do crescimento beta (TGF- β), superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD2/SOD2) e Óxido Nítrico Sintase Induzida (NOS2) (KARLSSON *et al.*, 1988; MATÉS *et al.*, 1999; KRISHNAMURTHY & WADHWANI, 2012).

1.2.2. Catalase (CAT)

A Catalase é uma enzima antioxidante presente em quase todos os organismos aeróbicos. A Catalase humana é codificada pelo gene *CAT* localizado no cromossomo 11. Possui ação primordial na inflamação, mutagênese e supressão da apoptose, condições estas normalmente associadas ao aumento do estresse oxidativo. A Catalase humana é monofuncional típica, contendo heme um grupo prostético de protoporfirina férrica IX que reage com H_2O_2 (NANDI *et al.*, 2019).

Com um papel essencial na regulação do nível celular de H_2O_2 , a Catalase protege as células do “ataque” oxidativo, como por exemplo, protegendo as células β pancreáticas da lesão pelo H_2O_2 (TIEDGE *et al.*, 1998).

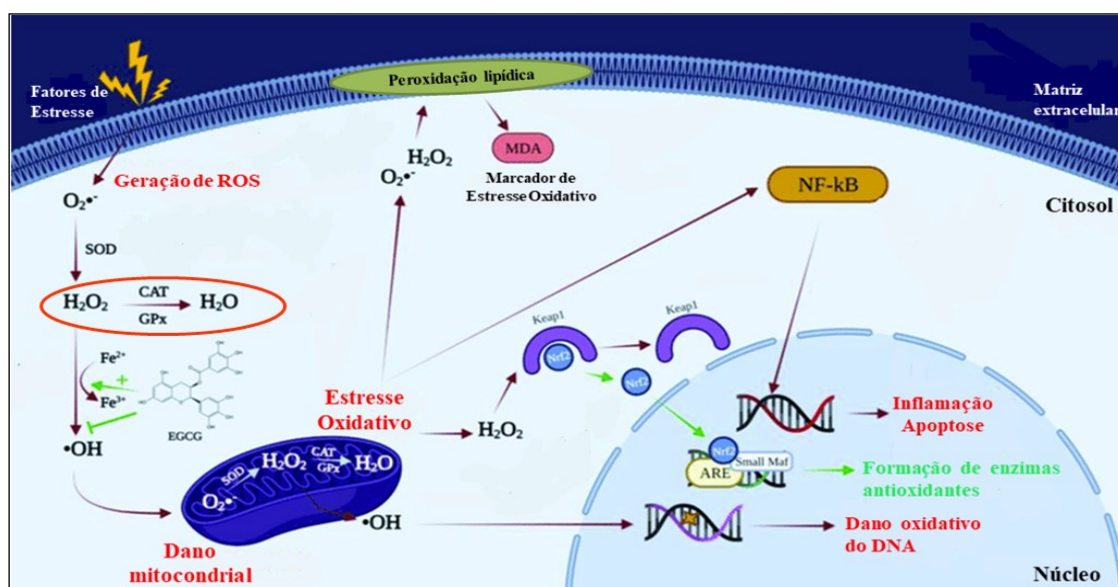


Figura 4 – Catalase associada a mecanismos que atuam sobre os radicais livres, reduzindo o estresse oxidativo. Os compostos que podem induzir enzimas antioxidantes (GPx, SOD e CAT) decompõem (hidroperóxidos, peróxido de hidrogênio e ânion superóxido). Em contraste, eles também podem inibir a expressão das enzimas.

Fonte: Adaptada de ENARU *et al.*, (2021).

A figura 4 demonstra um dos mecanismos de dano celular oxidativo. Os radicais livres são reduzidos a água com a cooperação de três principais enzimas antioxidantes: SOD, Catalase e Glutathione peroxidase (GSHPx). A geração de radicais hidroxila a partir do hidroperóxido pode levar ao desenvolvimento de lesão celular oxidativa, sendo o dano ao DNA, carboxilação de proteínas e peroxidação lipídica (incluindo lipídios das membranas mitocondriais) os principais. Então, uma das funções da Catalase é evitar o dano oxidativo que leve à morte celular (GARCÍA-FERNÁNDEZ *et al.*, 2008).

Alterações genéticas localizadas na região promotora do *CAT*, tem demonstrado diminuição da atividade da enzima Catalase, favorecendo a patogênese de várias doenças (PARK *et al.*, 2006; NANDI *et al.*, 2019). Dois polimorfismos são bem descritos na literatura influenciando a diminuição da transcrição do *CAT* (c.-262C>T e c.-844G>A) e consequentemente decréscimo de sua atividade antioxidante (KODYDKOVÁ *et al.*, 2014). Interessantemente, estudos vem demonstrando que parasitas que expressam Catalase estão gravemente comprometidos em sua capacidade de se desenvolver em insetos e de sua transmissão em camundongos e testes “*In Vitro*”. Em resumo, trabalhos suportam a hipótese de que a presença da Catalase não é compatível com o ciclo de vida dixeno da *Leishmania*, resultando na perda desse gene do genoma durante a evolução desses parasitos (KHAN *et al.*, 2018; BIANCHI *et al.*, 2019; HORÁKOVÁ *et al.*, 2020). Existem muitos outros polimorfismos envolvidos no desenvolvimento de inúmeras doenças que variam entre as populações, porém, até o presente momento, não houve estudos demonstrando a correlação da Catalase Humana com Leishmaniose.

1.2.3. Mieloperoxidase (MPO)

A enzima mieloperoxidase (MPO) pertence ao subgrupo peroxidase-ciclooxygenase da família de enzimas heme peroxidase, sendo uma das principais constituintes de neutrófilos e monócitos, desempenhando papel importante na imunidade inata (ZAMOCKY *et al.*, 2008; ARNHOLD, 2020). Em sua função na fagocitose microbica, participa catalisando a formação de ácido hipocloroso (HOCl), uma das moléculas oxidantes mais fortes produzidas no corpo humano (ARATANI, 2018). Em seus fagossomas recém-formados, a MPO está envolvida na criação e

manutenção de um meio alcalino, ideal para combater os agentes infecciosos (PARKER *et al.*, 2021). Outrossim, a MPO também é uma componente chave nas armadilhas extracelulares de neutrófilos (ARNHOLD, 2020).

Apesar da aparente importância da MPO como antimicrobiana, sabe-se que cerca de 50% dos indivíduos com deficiência de MPO permanecem assintomáticos e sem presença de comorbidades graves (PATIROĞLU *et al.*, 2013). A deficiência de MPO pode se tornar mais crítica se o indivíduo sofrer de outras doenças ou alterações genéticas que comprometam o sistema imune. Por outro lado, a deficiência secundária de MPO pode resultar de vários estados de doença ou exposição a xenobióticos (MILLIGAN *et al.*, 2016; SIRAKI, 2021).

Muitos estudos vêm correlacionando o SNP c.-463G>A como fator de risco de amplo espectro de doenças humanas, incluindo câncer, fibrose cística, hipertensão, doenças malignas, vasculites inflamatórias e doenças neurodegenerativas (BOUALI *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2017; CUEVAS *et al.*, 2019). Dado que muitos dos distúrbios de interesse são de origem poligênica, a falha em identificar associações claras com um SNP em um único gene, como o *MPO*, tem sido um desafio (NAUSEEF, 2018).

Além de função antipatogênica ou bactericida da MPO em condições normais, sob algumas circunstâncias patológicas, a elevação de sua concentração pode levar ao dano oxidativo de proteínas e até do ácido desoxirribonucleico (DNA), envolvendo diversos tipos de lesões teciduais, incluindo patogênese direta de diversas doenças crônicas (MIRONSKA, 2015; KARGAPOLOVA *et al.*, 2021).

Níveis elevados de MPO é considerado um bom marcador de estresse inflamatório e oxidativo nessas doenças (KHAN *et al.*, 2018), porém até o presente momento, não há estudos demonstrando ligação direta entre MPO e Leishmaniose. Grande parte dos trabalhos demonstrando a função dos neutrófilos na leishmaniose foi realizada em modelo experimental e com diferentes espécies do parasito (GUIMARÃES-COSTA *et al.*, 2009; NOVAIS *et al.*, 2009). Todavia, Boaventura e col. (2010) demonstraram elevação de neutrófilos nas lesões da leishmaniose mucosa e que estes expressavam concentrações elevadas da elastase neutrofílica, MPO e metaloproteínase de matriz-9, enzimas que normalmente estão relacionadas com a potencialização de mecanismos microbicidas e com a progressão da lesão, sugerindo que talvez estejam ligados na patogênese da leishmaniose.

1.2.4. Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase 2 (NOX2)

A Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) oxidase 2 (NOX2) é um complexo multimérico-proteico que consiste em várias subunidades protéicas facilitando exclusivamente a “explosão oxidativa”, descrita pela produção inicialmente lenta de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), e elevando-se com o tempo. Geralmente, o radical $O_2^{\bullet-}$ possui funções tanto na sinalização celular quanto na defesa imunológica. A explosão oxidativa de NOX2 é considerada crucial para a defesa imunológica, especialmente pela liberação e produção de $O_2^{\bullet-}$ em resposta a infecções (HOANG *et al.*, 2021).

Os fagócitos são estimulados para gerar NOX2 derivados de ROS ao se deparar com micróbios em um processo referido como uma "explosão respiratória". Quando os componentes de NOX2 se juntam na membrana do fagolisossomo, geram-se ROS intracelular, enquanto a montagem na membrana plasmática gera-se ROS extracelulares (KOTSIAS *et al.*, 2023). A explosão respiratória fagocítica é crítica para morte de microrganismos, uma vez que quando ausente, ocorre suscetibilidade para infecções bacterianas e fúngicas (ARNOLD, 2017).

Inativar a montagem de NOX2 é uma estratégia desenvolvida por vários patógenos para subverter a exposição aos oxidantes. Nas infecções por *Leishmania*, a inibição da maturação do fagolisossomo é caracterizada por uma montagem prejudicada de NOX2 (ARANGO *et al.*, 2019). Além disso, a resposta anti-*Leishmania* em macrófagos também consiste na produção de ROS pela Óxido Nítrico Sintetase induzível (NOS2). Evidentemente, os parasitas *Leishmania* poderiam se beneficiar da diminuição da explosão oxidativa devido à indução da resposta antioxidante do hospedeiro, favorecendo assim sua sobrevivência (REVERTE *et al.*, 2021).

Os neutrófilos fagocitam e matam 80-90% dos parasitas *Leishmania* invasores. Os macrófagos também participam da remoção de parasitas, porém, com papel duplo, pois conseguem matar alguns dos parasitas fagocitados, mas também constituem um nicho replicativo (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2012; SCOTT & NOVAIS, 2016; ROSSI & FASEL, 2018). Pelo menos uma subespécie, *Leishmania major*, prejudica ativamente o recrutamento de NOX2 para fagossomas, o que leva à redução da produção extracelular de ROS (MATTE *et al.*, 2016). É notável que todas as subespécies de *Leishmania* são capazes de reduzir a produção direta de ROS antiparasitárias por meio

da inibição do recrutamento de NOX2. A infecção por *Leishmania amazonensis* induziu um aumento nos níveis de proteína NOX2 e nos níveis celulares totais de ROS (ALONSO *et al.*, 2019).

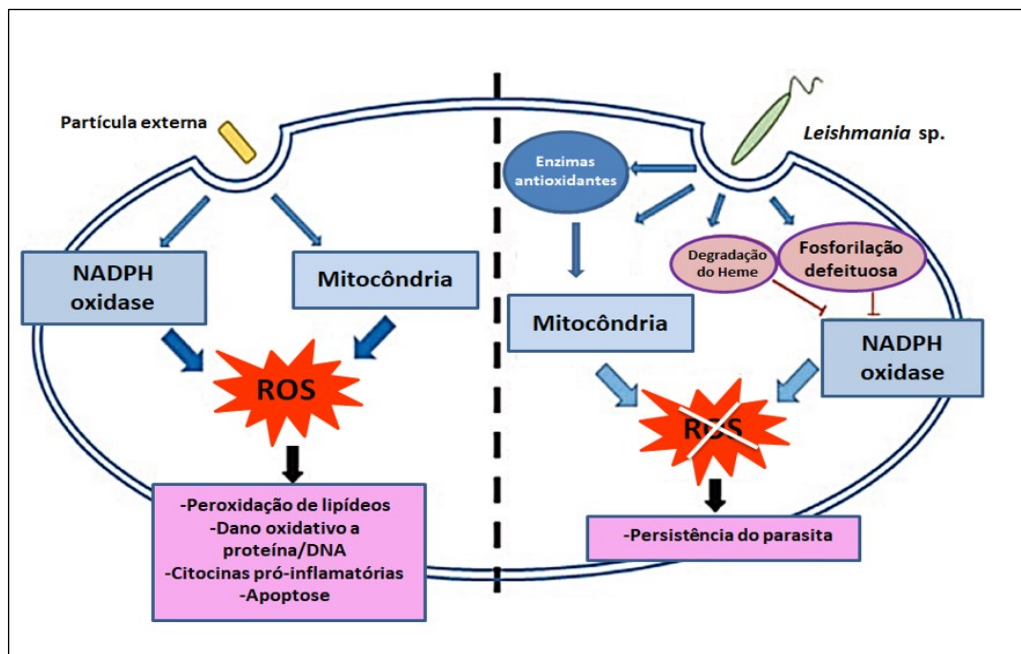


Figura 5 – Representação esquemática da capacidade de produção de ROS pela célula hospedeira durante a entrada de qualquer partícula estranha ou *Leishmania* sp. O reconhecimento da partícula estranha ativa as enzimas geradoras de NADPH oxidase e mitocondriais, levando à geração de ROS e sua apoptose. Na entrada da *Leishmania* sp., a geração de ROS pela célula hospedeira é inibida por várias vias, pela degradação do heme celular e não fosforilação da NADPH oxidase.

Fonte: Adaptada de MOUMITA & PIJUSH (2019).

A figura 5 demonstra a infecção por *Leishmania* levando a uma regulação negativa da proteína mitocondrial na geração de ROS. Assim, o nível reduzido de ROS na célula infectada por *Leishmania* permite a persistência do parasita dentro da célula e na progressão da doença.

1.2.5. Óxido Nítrico Sintase Induzida (NOS2)

O óxido nítrico (NO) é uma importante molécula sinalizadora celular com participação em diversas funções fisiológicas, incluindo vasodilatação, relaxamento da musculatura lisa, neurotransmissor e na resposta imune. O óxido nítrico como um radical livre, é produzido por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS) pela oxidação da L-arginina (L-Arg) em L-citrulina. Duas isoformas, a neuronal

(nNOS ou NOS1) e a endotelial (eNOS ou NOS3) são expressas constitutivamente, enquanto uma é induzível (iNOS ou NOS2) (CINELLI *et al.*, 2020).

As enzimas NOS2 tem muitas funções e foi descrita principalmente, devido seus efeitos reguladores na angiogênese, metástase tumoral e adesão celular. Sua função na produção de NO desempenha papel crucial na proteção imunológica contra patógenos intracelulares, pois está diretamente relacionada a sua eliminação. Assim, a NOS2 é um dos principais agentes mediadores da resposta imune a muitas infecções, geralmente às microbianas (BATH *et al.*, 2021; KOPELYANSKIY *et al.*, 2022). Embora a NOS2 seja necessária para a fisiologia normal, quantidades elevadas de NO como resultado da superexpressão ou desregulação da NOS2 estão implicadas em algumas doenças humanas, como sepse, choque séptico, câncer e cardiopatia (ANNANE *et al.*, 2000; KIELBIK *et al.*, 2019; WILMES *et al.*, 2020).

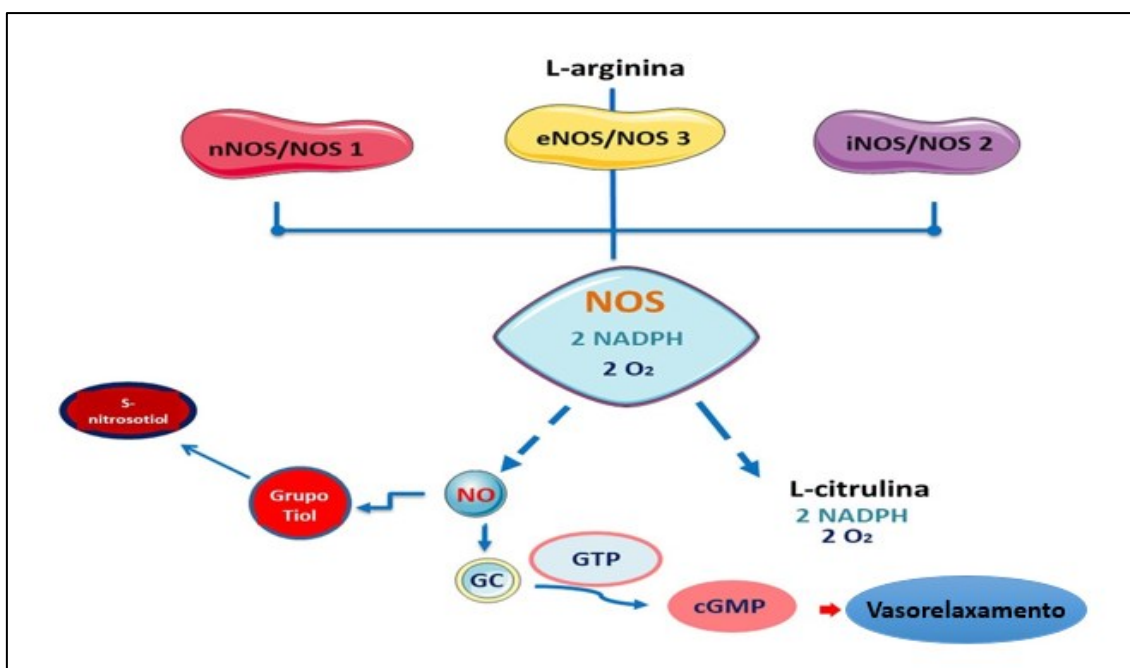


Figura 6 – Mecanismo de ação e biossíntese de NO. O NO é produzido pelas três isoformas NOS1, NOS2 e NOS3 que catalisam a oxidação de L-arginina a L-citrulina. O NO ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (GC) com a produção do segundo mensageiro cGMP que inicia a sinalização celular. O NO também modifica proteínas por meio da s-nitrosilação, (reação entre o NO e o grupo tiol de um resíduo específico de cisteína de proteínas intracelulares), desencadeando a sinalização celular.

Fonte: Servier Medical Art. (<https://smart.servier.com>). Adaptado de (MONTEIRO *et al.*, 2019).

A enzima NOS2 é encontrada principalmente no sistema nervoso e musculatura esquelética e possui múltiplas funções, sendo as principais na plasticidade sináptica no sistema nervoso central (SNC), relaxamento muscular e vasodilatação dos nervos

nitrérgicos periféricos (FORSTERMANN & SESSA, 2012). A NOS2, por outro lado, não está constantemente presente nas células e só é expressa quando a célula é induzida ou estimulada, normalmente por citocinas pró-inflamatórias. Após a indução, NOS2 gera quantidades significativas de NO (faixa micromolar), que dura até que a enzima seja degradada (SHARMA *et al.*, 2007) (Figura 6).

A *Leishmania* desenvolve múltiplas estratégias para evadir ou se beneficiar da resposta imune do hospedeiro e garantir sua sobrevivência dentro do hospedeiro. Dentre essas estratégias, a regulação do catabolismo da L-arginina via NOS2 e Arginase-1 (ARG-1) surgiu como uma via crítica envolvida no estabelecimento e progressão da leishmaniose. Nesse contexto, os macrófagos podem matar ou hospedar parasitas intracelulares de *Leishmania*, dependendo de sua capacidade de metabolizar a L-arginina por meio de NOS2 ou ARG-1, cuja expressão é induzida e regulada diferencialmente nesses fagócitos, de acordo com seu estado de ativação (WILKINS *et al.*, 2020).

A ativação da NOS2 é dependente da transcrição do NF- κ B e parasitas do gênero *Leishmania* podem clivar a subunidade NF- κ B p65, impedindo a transcrição de vários mediadores pró-inflamatórios e consequentemente afetando a expressão de NOS2 e a produção de NO (GREGORY *et al.*, 2008). Sabe-se que o NO é uma das moléculas cruciais no controle da carga parasitária durante o desenvolvimento da LTA (KHOURI *et al.*, 2009). Para driblar a imunidade do hospedeiro, os parasitas do gênero *Leishmania* modulam a resposta nos macrófagos diminuindo a atividade da NOS2 e a produção de NO pela depleção do substrato enzimático, além de aumentar a produção de poliaminas essenciais que são necessárias para o crescimento e diferenciação dos parasitas (MARCUSO *et al.*, 2016).

1.2.6. Óxido Nítrico Sintase Endotelial (NOS3)

A Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS, também descrita como NOS3) é a isoforma prototípica encontrada nas células endoteliais (KONE *et al.*, 2003; ATOCHIN & HUANG, 2010). Possui ação na síntese do óxido nítrico de curta duração, com função vasodilatadora e inibidora fisiológica da agregação e adesão plaquetária, prevenindo adesão de leucócitos ao endotélio e inibindo a proliferação de células

musculares lisas vasculares (KATUSIC & AUSTIN, 2014; NAVARATHNA *et al.*, 2019).

Normalmente, a NOS3 é expressa constitutivamente em células em estado inativo (ALDERTON *et al.*, 2001; ZOU *et al.*, 2021), com alguns mecanismos hipotetizados na correlação da diminuição da produção endotelial de NO durante a inflamação prolongada induzida por endotoxinas (LUIKING *et al.*, 2009). Acredita-se que a produção prejudicada de NO na microcirculação seja mediada pela disfunção da NOS3, que é mediada, parcialmente, pela deficiência de arginina (WIJNANDS *et al.*, 2012).

A NOS3 está associada a doenças cardiovasculares como hipertensão, aterosclerose e diabetes mellitus (XIA *et al.*, 2010). Nos últimos anos, descreveram a NOS3 desempenhando vários papéis em tumores malignos, inibidora da apoptose, além de promover angiogênese, proliferação, invasividade e imunossupressão (TRAN *et al.*, 2022). No entanto, o padrão de expressão de NOS3 e o seu potencial diagnóstico e prognóstico não foram investigados na Leishmaniose.

1.2.7. Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β 1)

O Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β 1) é uma citocina capaz de regular múltiplos processos celulares, incluindo proliferação celular, cicatrização de feridas e resposta imune com características imunossupressoras e anti-inflamatórias (HANSEN *et al.*, 2000). O Fator de Crescimento Transformador Beta é identificado em diversas células do sistema imunológico e sua atividade modifica em diferentes tipos de células (WANG *et al.*, 2023). É produzido por células T CD4⁺ (Tregs), monócitos, neutrófilos e células dendríticas (WAN & Flavell, 2007).

Curiosamente, o TGF- β 1 foi identificado inicialmente como fator de crescimento peptídico individual que conferia fenótipo “transformador” em células não malignas. Esses peptídeos foram batizados como fator de crescimento transformador alfa (TGF- α) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β 1) (ROBERTS *et al.*, 1981; CHILDS *et al.*, 1982; SPORN, 1999).

O TGF- β 1 e as células T reguladoras (Tregs) são essenciais para o controle das respostas imunes contra patógenos estranhos, manutenção da homeostase e a promoção da tolerância imunológica, suprimindo a resposta imune adaptativa e inata, acarretando

a inibição da função das células inflamatórias e promovendo a função das células Tregs (LAOUAR *et al.*, 2005).

Estudos vem demonstrando que na infecção por *Leishmania* ocorre a modulação da resposta imune do hospedeiro na secreção de citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β 1, o que favorece a sobrevivência do parasito ao desativar os fagócitos do hospedeiro (FALEIRO *et al.*, 2014). O efeito inibitório das citocinas imunossupressoras sobre a função efetora das células T helper 1 (Th1) é relatado em diferentes formas de leishmaniose (SABUR *et al.*, 2014). Na infecção por *Leishmania*, ocorre elevação das concentrações séricas de TGF- β 1, ocorrendo a inibição das respostas Th1 contra o parasito, devido principalmente pela regulação negativa de IFN- γ , inativação de macrófagos e inibição da estimulação de IL-2R (BARRAL *et al.*, 1995). Relatos também correlacionam elevação da suscetibilidade à infecção por *Leishmania* devido a supressão da produção de NO, TNF- α e IFN- γ pela elevação do TGF- β 1 (GORELIK *et al.*, 2002; KEDZIERSKI & EVANS, 2014).

1.2.8. Superóxido Dismutase 2 (SOD2)

Superóxido dismutase 2 (SOD2) é uma metaloenzimas com papel importante contra o estresse oxidativo no organismo, exercendo defesa crucial antioxidante em organismos aeróbicos, removendo o excesso de radicais $O_2^{\bullet-}$ e convertendo-os em H_2O_2 e oxigênio molecular (O_2). A SOD2, também descrita como Mn-SOD está localizada dentro da mitocôndria com função de eliminar o $O_2^{\bullet-}$ gerado a partir do O_2 na cadeia respiratória, realizando desta forma, papel antioxidante mitocondrial (WEISIGER & FRIDOVICH, 1973; GIULIVI *et al.*, 1995).

A superexpressão de SOD2 protege a função respiratória mitocondrial, bloqueia a indução de apoptose e atenua a geração mitocondrial dos ROS, peroxidação lipídica intracelular e morte celular (MOTOORI *et al.*, 2001). Interessantemente, seu papel antioxidante é fortemente dependente de seu nível de expressão, podendo afetar significativamente os níveis de ROS (KOWALD & KLIPP, 2004). Desta forma, a auto regulação cuidadosa da expressão de SOD2 é crítica para que células e tecidos se beneficiem de seu efeito antioxidante (Figura 7).

A atividade da SOD2 pode ter uma função dupla e oposta: Possuir função antioxidante quando sua atividade é complexada com as enzimas CAT, GPx ou Prx/Trx, que evitam o acúmulo de H_2O_2 neutralizando-o em H_2O ; e atuar como um pró-oxidante, pois o H_2O_2 pode acumular levando à superprodução de ROS e à toxicidade celular (SINGH *et al.*, 2017).

Muitas enzimas superóxido dismutase foram identificadas com base no íon metálico como cofator (KIRKINEZOS & MORAES, 2001). A SOD2 humana difere dos patógenos intracelulares por ter Cobre (Cu), Zinco (Zn) e Manganês (Mn) como cofatores metálicos. No entanto, SOD2 de patógenos intracelulares como *Leishmania*, *Plasmodium* e *Mycobacterium*, por exemplo, possui ferro (Fe) como cofatores metálicos, dando a esta enzima função de neutralizar o radical livre de oxigênio (O_2) e impedindo a formação de ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), ajudando os patógenos a escapar da morte citotóxica baseada em redox (ASSCHE *et al.*, 2020; MAURYA & NAMDEO, 2021).

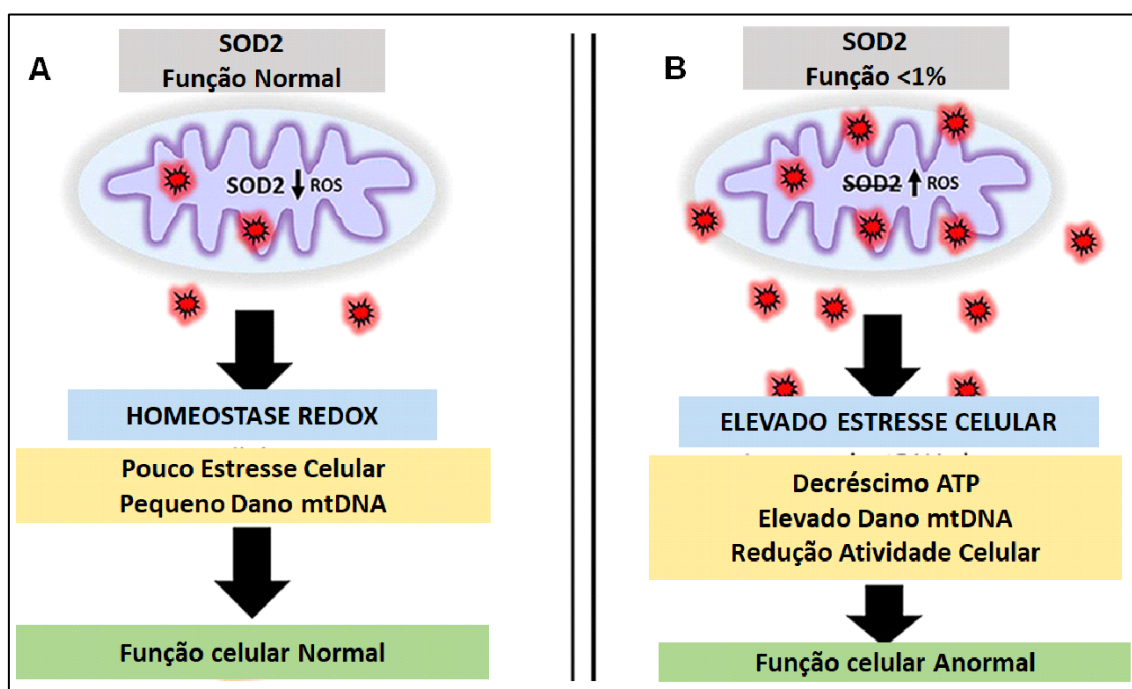


Figura 7 – Esquema demonstrando o papel importante da SOD2 na homeostase redox na mitocôndria.

A) Célula de camundongo normal para a atividade da SOD2 (Atividade antioxidante Normal).

B) Camundongos knockout para SOD2 apresentaram elevação do estresse oxidativo, alterações na morfologia celular e na estrutura e função das mitocôndrias.

Fonte: Adaptado de BROWN *et al.*, 2019.

Em resumo, SOD2 é uma enzima crucial necessária para manter o potencial redox das células, com papel vital na proteção contra ROS produzidas durante muitas infecções por patógenos intracelulares (BABIOR, 2000; STAFFORD *et al.*, 2002).

1.3. Citocinas Inflamatórias no Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição deletéria que pode causar dano celular e subsequente morte celular, devido à oxidação de componentes celulares, como lipídios, proteínas e DNA (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2001). O ambiente oxidante pode facilitar a ligação de patógenos ou antígenos às células efectoras, levando a um sistema imune inato hiperresponsivo. Este ambiente oxidante leva ao aumento da liberação de ROS incluindo superóxido e óxido nítrico e aumento da produção de citocinas, principalmente o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina IL-1 β , IL-6 e IL-12, com a criação de um ambiente acentuadamente reduzido pela adição de antioxidantes mesmo com respostas primárias do sistema imunológico inato (CRAPO, 2003) (Figura 8).

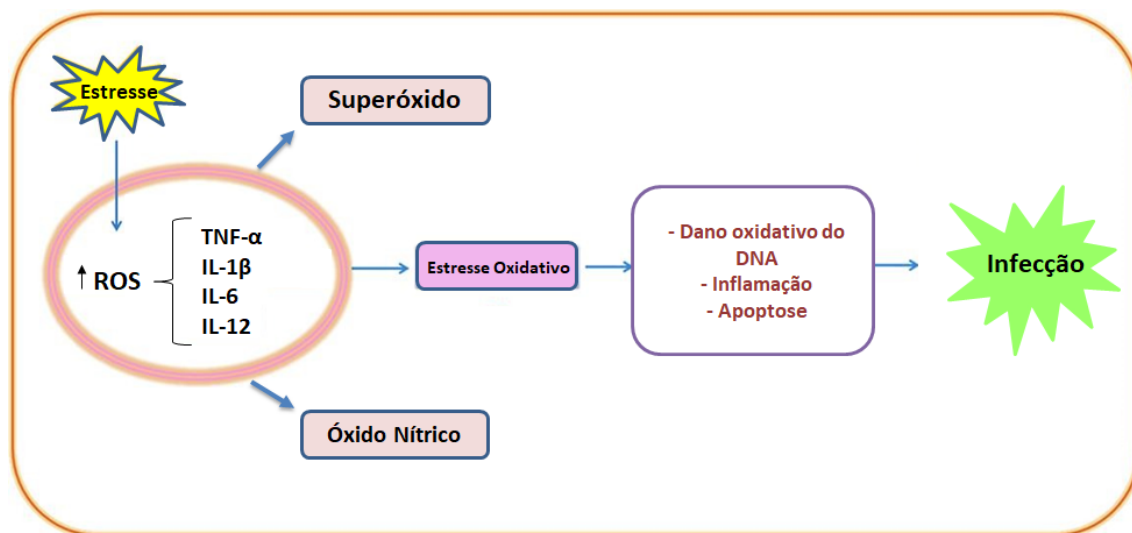


Figura 8 – Representação do ambiente oxidante gerando ambiente que propicia à infecção.
Fonte: Adaptada de PENG *et al.*, 2019.

Normalmente, uma resposta inflamatória é iniciada após reconhecimento de moléculas de padrão molecular associadas a patógenos (PAMPs) e moléculas de padrão molecular associadas a danos (DAMPs), o que leva a ativação de receptores de

reconhecimento de padrão, como os receptores Toll-like (TLRs) e os receptores NOD-like (NLRs), que são expressos na superfície de neutrófilos e macrófagos, ocasionando alterações nas vias de sinalização celular inflamatória (BEDARD & KRAUSE, 2007).

Estas cascatas intracelulares induzem rapidamente a expressão de genes pró-inflamatórios e a síntese de citocinas associadas à inflamação, como as IL-6, TNF- α e IL-1 β , que normalmente alteram a permeabilidade vascular e a função endotelial pela elevação de moléculas de adesão como L-selectina e E-selectina, causando rolamento das células efetoras ao longo do endotélio vascular, com consequente ativação de integrinas. Essas moléculas se ligam a moléculas de adesão endotelial vascular (ICAM-1 e VCAM-1), facilitando a transmigração de leucócitos através do endotélio ativado até o local da lesão (BENNETT *et al.*, 2018).

A função das quimiocinas reside principalmente no recrutamento de células e proteínas imunes adicionais, como NOS2 para geração de NO e elevados níveis de ROS (TSCHOPP, 2011; MAGNANI *et al.*, 2020). Somado a isso, alguns trabalhos vêm demonstrando forte interação entre TNF- α e IL-6 como fundamental na disfunção endotelial mediada pelo aumento do estresse oxidativo e redução da fosforilação da NOS3 (LI *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2017).

A interleucina 6 (IL-6), produzida de forma imediata e transitoriamente em resposta à infecções e lesões teciduais, contribui para a defesa do hospedeiro por meio da estimulação de respostas de fase aguda, hematopoese e reações imunes. Embora sua expressão seja estritamente controlada por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, a síntese contínua e desregulada de IL-6 desempenha um efeito patológico na inflamação crônica e na autoimunidade (TANAKA *et al.*, 2014). Uma expressão imediata ou transitória de IL-6 ocorre em resposta a fatores de estresse ambiental, como infecções e lesões teciduais, ativando mecanismos de defesa do hospedeiro contra o estresse, o que se atenua quando a fonte do estresse é eliminada (NAKA *et al.*, 1997). No entanto, a produção desregulada e persistente de IL-6, de etiologia ainda desconhecida, está associada com o desenvolvimento das várias doenças, principalmente as inflamatórias (HIRANO *et al.*, 1987; NISHIMOTO *et al.*, 1989, 2005).

O TNF- α desempenha papel crítico no estabelecimento da resistência do hospedeiro à diversos patógenos e também está implicado na maior expressão e produção de ROS (MALVEZI *et al.*, 2004). Se as mitocôndrias são a principal fonte de

ROS, é bastante concebível supor que o TNF- α prejudica diretamente a atividade de transporte de elétrons mitocondriais e eleva a concentração de ROS no interior das células ativas na produção de energias, como os da musculatura esquelética (GOOSSENS *et al.*, 1995; CORDA *et al.*, 2001). De fato, em células tumorais, hepatócitos e células endoteliais vasculares, as mitocôndrias foram identificadas como uma importante fonte de produção de ROS induzida por TNF- α . Além disso, a produção de ROS pode causar danos ao mtDNA, diminuir a atividade e, assim, contribuir para o aumento do estresse oxidativo (MILLS, 2015).

Diversas respostas imunológicas podem ocorrer dependendo principalmente da ativação dos macrófagos e espécie de *Leishmania* (MOSSER *et al.*, 1987; NOVAIS *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2019). Somado à sua capacidade de controlar a replicação do parasito, os macrófagos são capacitados para elevar a produção das citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1, e citocinas reguladoras como TGF- β e IL-10 (HSIAO *et al.*, 2011; FU & HARRISON, 2021). Alterações genéticas do hospedeiro geralmente determinam mudanças na resposta contra a *leishmania*, caracterizando ou não o desenvolvimento da doença (RIBEIRO *et al.*, 2020; CARNEIRO *et al.*, 2021).

Diversos estudos vêm demonstrando o papel dos linfócitos T CD4⁺ na secreção de citocinas produzidas pelas células Th1, sempre relacionadas nas respostas imunes contra a *leishmania* eficiente (MURRAY *et al.*, 1997; GHOSH *et al.*, 2013; MESQUITA *et al.*, 2018; SAMANT *et al.*, 2021). A progressão da leishmaniose tem sido correlacionada ao aumento da concentração de células T CD8⁺ expressando principalmente granzimas (UENO & WILSON, 2012), tendo desta forma, papel fundamental na patologia da doença Leishmaniose, principalmente na lesão (GOLLOB *et al.*, 2014). Vale salientar que as células Th1 secretam citocinas associadas à defesa contra patógenos intracelulares ativando os macrófagos, principalmente na produção de IFN- γ e TNF α . Já a resposta T helper 2 (Th2) estão associadas à secreção de citocinas que “ajudam” a sobrevivência da *Leishmania* no hospedeiro, como as IL-4, IL-5 e IL-13 (MASPI *et al.*, 2016).

Devido ao exposto, entendemos que a identificação dos genótipos e dos parasitas, correlacionados com o resultado clínico dos pacientes estão estabelecendo abordagens mais significativas aos regimes de tratamento. Acreditamos que a leishmaniose pode afetar o metabolismo oxidativo, ativação e a própria apoptose das principais células efectoras na resposta a *Leishmania*. Desta forma, propusemos

investigar alterações genéticas em genes importantes envolvidos na produção e inativação do estresse oxidativo que ocorre a nível do metabolismo celular oxidativo.

Portanto, evidenciamos que este projeto é de importância especial na região Norte do Brasil, mais especificamente na região metropolitana de Manaus, onde há elevada incidência de leishmaniose. Esperamos que nossos resultados possam descrever possíveis interferentes e ou moduladores genéticos e ou laboratoriais em indivíduos portadores de leishmaniose, de forma a demonstrar diferenças no padrão de resposta nestes pacientes frente aos parasitas.

Outrossim, consideramos que o conhecimento destes prováveis mecanismos, ajudará na antecipação do curso clínico mais grave nestes pacientes, de forma a criar melhor assistência aos mesmos, especialmente no caso das infecções recorrentes. Além do mais, julgamos que o presente estudo poderá contribuir para estratégias de combate ao surto de *Leishmania*, no contexto particular pela *L. guyanensis*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar polimorfismos genéticos em genes envolvidos no estresse oxidativo de pacientes com leishmaniose cutânea infectados por *L. (Viannia) guyanensis* utilizando um modelo de estudo caso-controle.

2.2. Objetivos Específicos

- Descrever o perfil demográfico e clínico da população recrutada na Fundação de Medicina Tropical;
- Determinar e comparar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos nos genes *CAT* - rs1001179 (c.-262C>T), *MPO* - rs2333227 (c.-463G>A), *NOX2* - rs4673 (c.242C>T), *NOS3* - rs2070744 (c.-786T>C), *TGF-β* - rs1800469 (c.-509C>T), *SOD2* - rs4880 (c.47C>T) e *NOS2* -rs1800482 (c.-954G>C) em cada população;
- Quantificar as concentrações das moléculas imunológicas solúveis em cada população;
- Correlacionar as concentrações das moléculas imunológicas solúveis com os polimorfismos em cada população;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Tipo de Estudo

O modelo de estudo baseia-se em um estudo caso-controle utilizando ferramentas e técnicas da biologia molecular para análise de frequências alélicas e genotípicas com possível associação a susceptibilidade ou resistência em indivíduos com Leishmaniose Cutânea causada pela *L. guyanensis*.

3.2. Aspectos Éticos

Este estudo é parte integrante de um projeto maior intitulado “Polimorfismos genéticos dos genes envolvidos na resposta imune e na cicatrização das lesões em pacientes com leishmaniose cutânea”, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMT-HVD, sob o número do CAAE: 09995212.0.0000.0005. Todos os participantes incluídos no estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), devidamente aprovado pelo Comitê de Ética (CEP) pertinente.

3.3. Áreas de Estudo

A população do estudo reside em regiões endêmicas para leishmaniose, localizadas nas proximidades do município de Manaus, especificamente na rodovia AM-010. Estas regiões são consideradas endêmicas por serem áreas de floresta tropical que, ao longo dos anos sofreram desmatamento, dando lugar a assentamentos populacionais nos arredores das áreas de mata. A atividade agropecuária e seu tipo de moradia, localizadas próximo às áreas de floresta, tornam essa população exposta à infecção por *Leishmania*.

3.4. Amostragem

O recrutamento dos participantes do nosso Grupo Caso é composto por pacientes atendidos no ambulatório de Leishmaniose da FMT-HVD, com diagnóstico confirmado

de LC causada por *L. guyanensis*. Já o Grupo Controle é composto por indivíduos sem sinal ou histórico de leishmaniose residentes no mesmo local dos Casos.

3.5. Critérios de Inclusão e Exclusão

Para ambos os grupos, a participação no estudo exigiu idade entre 12 e 65 anos e ser natural do Estado do Amazonas. Para o grupo caso, foram selecionados aleatoriamente pacientes de ambos os gêneros e que apresentassem alguma lesão cutânea característica de Leishmaniose. A confirmação diagnóstica de LC foi realizada por meio do exame direto e confirmação da espécie por metodologia molecular. Para o Grupo Controle o participante obrigatoriamente teria que ser morador da área endêmica por no mínimo 10 anos, e não apresentar sinais ou histórico da doença. Os critérios de não inclusão e ou exclusão no estudo ocorreram para ambos casos e controles, com exclusão dos participantes que apresentaram sorologia positiva para infecções (HIV e hepatites), gestante em qualquer idade gestacional e militar.

3.6. Fluxograma de atividades

A Figura 9 resume as atividades desde o início, com entrevistas aos participantes do grupo Caso e do grupo Controle, até o processamento dos dados com a análise estatística.

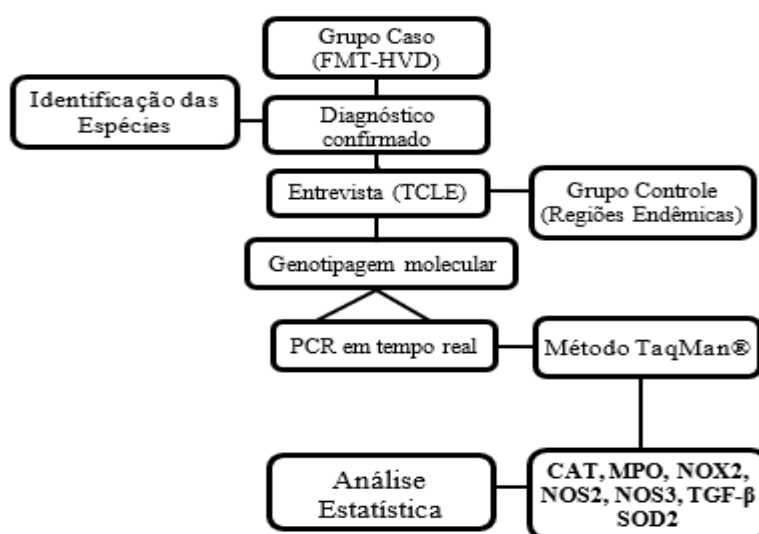


Figura 9 – Fluxograma das Atividades.

3.7. Coleta de Material Biológico

Todos os participantes da pesquisa foram submetidos a uma punção venosa para coleta de 5mL de sangue periférico em tubo contendo anticoagulante EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético). Após coletadas, as amostras foram armazenadas em gelo para preservação das citocinas no Laboratório de Pesquisa da FMT-HVD.

3.8. Dosagem de Citocinas Plasmáticas

A dosagem das quimiocinas e citocinas plasmáticas em ambos os grupos Casos e Controles, foi realizada pela técnica de LUMINEX, determinadas utilizando os kits comerciais multiplex Bio-PlexPro-Human Cytokine GrpI Panel 27-Plex (Bio-Rad) de acordo com as instruções do fabricante no Bio-Plex 200 Protein Array System (Luminex Corporation). O cálculo final das concentrações para cada citocinas foi realizado no software FCAP-Array™ (v3.1).

3.9. Caracterizações do Agente Etiológico

A caracterização da espécie foi realizada por meio da PCR-RFLP com a digestão enzimática utilizando-se a enzima HaeIII (MBI Fermentas, St Leon-Rot, Germany) utilizando-se os primers L hsp70 Reverso (5' CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3') e Direto (5' GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3'), com termociclagem seguindo a ciclagem a seguir: 94°C: 2 minuto, seguido de 20 ciclos de: 96°C: 12 segundos, 55°C: 20 segundos, 60°C: 1:30 minutos, seguido de mais 15 ciclos de: 96°C: 10 segundos, 55°C: 15 segundos, 60°C: 2:30 minutos. Após amplificação, os produtos foram cortados enzimaticamente com HaeIII para confirmação da espécie.

3.10. Genotipagem molecular dos Genes Humanos

Após a extração do DNA genômico a partir de 200µL de sangue de cada participante do estudo pelo método direto QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), conforme protocolo do fabricante, o DNA foi armazenado a -20°C até o momento das análises atendendo a Resolução 441/2011-CNS durante o período necessário para a análise molecular.

Para genotipagem de todos os polimorfismos foi utilizado a técnica de PCR em tempo real (qPCR) pelo sistema TaqMan®, analisados através da plataforma QuantStudio 6 (Applied Biosystems). As sondas utilizadas para cada gene foram: *CAT* - rs1001179 (c.-262C>T), *MPO* - rs2333227 (c.-463G>A), *NOX2* - rs4673 (c.242C>T), *NOS3* - rs2070744 (c.-786T>C), *TGF-β* - rs1800469 (c.-509C>T), *SOD2* - rs4880 (c.47C>T) e *NOS2* -rs1800482 (c.-954G>C).

3.11. Limitações do estudo

As principais limitações do estudo basearam-se nas desistências de Casos e Controles durante a participação no projeto, abandono do tratamento e perdas por óbito ocorridas antes da fase final de indução. Somado a isso, a quantificação das citocinas apresentaram muitos resultados com concentrações zero (0,0 pg/mL), o que deixou não uniforme a quantificação de todas citocinas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

(Apresentado como Artigo Científico)

Manuscript Title:

**GENETIC POLYMORPHISMS IN OXIDATIVE STRESS RELATED GENES
AS RISK FACTOR FOR CUTANEOUS LEISHMANIA**

ABSTRACT

Background: The *Leishmania* parasite has the ability to survive and replicate in the macrophage. These characteristics probably evolved as a *Leishmania* resistance strategy against inflammatory cells. During *Leishmania* infection, macrophages and neutrophils phagocytose the parasites, forming the phagosome, where they are “bombarded” by an “oxidizing cascade” containing especially ROS. This process contains mainly superoxide ($O_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) forming a complex known as “oxidative explosion”. To this end, our objective was to investigate genetic polymorphisms in genes involved in oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis (CL) infected by *L. (Viannia) guyanensis* using a case-control study model. **Methods:** Patients with CL treated at FMT-HVD and healthy individuals, with no signs or history of leishmaniasis, living in the same location as the Cases, were recruited. Plasma chemokines and cytokines were measured using the LUMINEX technique and polymorphisms were measured using real-time PCR (qPCR) using the TaqMan® system, analyzed on the QuantStudio 6 platform (Applied Biosystems). **Results:** A total of 768 patients and 744 healthy volunteers agreed to participate in the study. The homozygous wild genotype (WT) c.-262CC in Catalase (OD: 1.29 - $p=0.041$) and WT SOD2 c.47CC were associated as a risk factor for CL, while WT MPO c.-463GG (OD: 0.73 - $p=0.004$); WT NOX2 c.242CC (OD: 0.74 - $p=0.005$); WT NOS3 c.-786TT (OD: 0.75 - $p=0.008$); WT TGF- β 1 c.-509CC (OD: 0.63 - $p<0.001$) associated as a protective factor. The NOS2 c.-954G>C SNP did not show significant associations. IL-13 and MCP-1 were the main associated cytokines strongly reduced in patients in the presence of mutant genotypes compared to WT. It is worth noting that plasma INF- γ concentrations were significantly reduced in mutant genotypes of almost all SNPs in CL patients. **Conclusions:** We consider that the mutant genotypes decreased the main neutrophil-activating cytokines, being IL-2 (MPO c.-463AA, TGF- β 1 c.-509TT and SOD2 c.47TT); IL-8 (CAT c.-262TT, TGF- β 1 c.-509TT and SOD2 c.47TT) and IL-12 (CAT c.-262TT and NOS3 c.-786CC), suggesting lower ROS concentration, decreased stress oxidative activity and greater disease progression in these mutant genotypes. The mutant genotypes (CAT c.-262TT, NOX2 c.242TT, TGF- β 1 c.-509TT and SOD2 c.47TT) resulted in a decrease in INF- γ , suggesting lower production of inflammatory cytokines and disease progression in these genotypes. While the CAT c.-262CC genotype decreased the levels of IL-10 and IL-17, which may be associated with the elimination of the *Leishmania* parasite. The cytokines IL-6, IL-13, IL-1B, FGF-Basic are produced by macrophages, dendritic cells and lymphocytes. These cytokines play a vital role in susceptibility to leishmaniasis. The homozygous mutant genotypes of TGF- β 1 c.-509TT and SOD2 c.47TT were associated with decreased levels of these cytokines in patients. Therefore, these cytokines may be associated with both the progression and elimination of the disease. Our findings demonstrated the genotypes (WT MPO c.-463GG, WT NOX2 c.242CC, WT NOS3 c.-786TT and WT TGF- β 1 c.-509CC) with greater ROS production and thus proved to be protective factors for LC. While the WT CAT c.-262CC and SOD2 c.47CC genotypes demonstrated the lowest production of ROS, suggesting themselves as a risk factor for Cutaneous Leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis, Polymorphisms, Cytokines.

INTRODUCTION

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) Leishmaniasis presents heterogeneity in the clinical manifestations of the skin and mucous membranes and is generally associated with high morbidity, constituting a major global public health problem, present in almost half of the countries in the world. For this reason, it is classified as an endemic disease for priority control and included in the Program of Tropical Diseases Research (HOTEZ et al., 2007; ALVAR et al., 2012). It currently stands out with an annual worldwide incidence of between 2-3 cases per 100,000 inhabitants, with approximately 15 million people infected worldwide, in a risk area that encompasses more than 350 million people (WHO, 2020).

In the Americas, of the total of 36 countries, ATL is present in 18, with a record of approximately 12 cases per 100,000 inhabitants. Of the total cases, approximately 80% are concentrated in Brazil, and therefore, it is considered a neglected disease based on the limited resources invested in diagnosis, treatment and control (OPAS/WHO, 2021). In Brazil, it is estimated that between 1990 and 2015 there were around 700 thousand new cases, with high rates recorded in the North and Northeast of the country (SINAN, 2017), caused by the species *Leishmania (Viannia) braziliensis*, L. (V.) *guyanensis*, L. (V.) *lainsoni*, L. (V.) *naiffi*, L. (V.) *shawii*, L. (V.) *lindenbergi* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (de MESQUITA et al., 2022). In the state of Amazonas, the cutaneous form predominates, occurring mainly in the metropolitan region of Manaus, with rare cases of mucosal involvement (WHO, 2014).

Leishmania exposure to macrophages leads to the generation of reactive oxygen species (ROS), which contribute to the regulation of the inflammatory response, being controlled by the cellular antioxidant defense system (PAIVA, 2013). After recognition of *Leishmania* spp., macrophages are activated and become the described "effector cells" that can destroy or phagocytose the unwanted host (GUPTA et al., 2022).

The *Leishmania* parasite have ability to survive and replicate in the macrophage inside phagosome around the parasite, resulting in the generation of Parasitophorous Vacuoles. that quickly acquire a composition and function similar to those of phagolysosome, with hydrolytic and proteolytic properties (BISTI et al., 2006). These characteristics probably evolved as a resistance strategy by *Leishmania* against inflammatory cells. The increased production of oxidants during this response may

contribute to the development of the disease, as they further contribute to tissue damage (HALLIWELL & JOHN, 2015). Thus, considering this relationship between pro-inflammatory activation and the production of reactive species, it is possible that oxidative stress is a contributing factor to the impairment of tissue function caused by leishmaniasis (GASPAROTYO et al., 2017).

During infection, neutrophils and macrophages are capable of phagocytosing parasites, where they are “bombarded” by an “oxidizing cascade” containing especially ROS. This process, containing mainly superoxide (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2), forming complex known as “oxidative burst” (WINTERBOURN et al., 2016). In humans, there are important antioxidant enzymatic systems for maintaining redox homeostasis, which neutralize potentially harmful compounds and act to detoxify free radicals produced during oxidative metabolism. Among these enzymes, the most significant are Catalase (CAT), Myeloperoxidase (MPO), NADPH Oxidase 2 (NOX2), Endothelial Nitric Oxide Synthase (NOS3), Transforming growth factor beta (TGF- β), manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD2/SOD2) and Induced Nitric Oxide Synthase (NOS2) (KARLSSON et al., 1988; MATÉS et al., 1999; KRISHNAMURTHY & WADHWANI, 2012).

The oxidizing environment can facilitate the binding of pathogens or antigens to effector cells, leading to a hyperresponsive innate immune system. This oxidizing environment leads to increased release of ROS including superoxide and nitric oxide and increased production of cytokines, mainly tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin IL-1 β , IL-6 and IL-12, with the creation of a markedly reduced environment by the addition of antioxidants even with primary responses from the innate immune system (CRAPO, 2003).

Several immunological responses can occur depending mainly on the activation of macrophages and *Leishmania* species (KUMAR et al., 2019). In addition to their ability to control parasite replication, macrophages are able to increase the production of inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1, and regulatory cytokines such as TGF- β and IL-10 [FU & HARRISON, 2021]. Genetic alterations in the host generally determine changes in the response against *Leishmania*, characterizing or not the development of the disease (CARNEIRO et al., 2021). The function of chemokines lies mainly in the recruitment of additional immune cells and proteins, such as NOS2 to generate nitric oxide (NO) and high levels of ROS (MAGNANI et al., 2020). In

addition, some studies have demonstrated a strong interaction between TNF- α and IL-6 as fundamental in endothelial dysfunction mediated by increased oxidative stress and reduced phosphorylation of eNOS (LI et al., 2007; LEE et al., 2017).

Several studies have demonstrated the role of CD4⁺ T lymphocytes in the secretion of Th1 cytokines, always involved in efficient immune responses against leishmania (MURRAY et al., 1997; GHOSH et al., 2013; MESQUITA et al., 2018). The progression of leishmaniasis has been correlated with an increase in the concentration of CD8⁺ T cells expressing mainly granzymes (UENO & WILSON, 2012), thus playing a fundamental role in the pathology of Leishmaniasis disease, mainly in the lesion (GOLLOB et al., 2014). It is worth noting that Th1 cells secrete cytokines associated with defense against intracellular pathogens, activating macrophages, mainly in the production of IFN- γ and TNF α . The Th2 response is associated with the secretion of cytokines that “help” the survival of Leishmania in the host, such as IL-4, IL-5 and IL-13 (MASPI et al., 2016).

Due to the above, we understand that the identification of genotypes and parasites, correlated with the clinical outcome of patients, is establishing more meaningful approaches to treatment regimens. We believe that leishmaniasis can affect the oxidative metabolism, activation and apoptosis of the main effector cells in the response to Leishmania. In this way, we proposed to investigate genetic changes in important genes involved in the production and inactivation of oxidative stress that occurs at the level of cellular oxidative metabolism.

To this end, we aimed to investigate genetic polymorphisms in genes involved in oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *L. (Viannia) guyanensis* using a case-control study model.

MATERIALS AND METHODS

The study occurred from 2020 to 2022 at Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, Amazonas-Brazil and Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas-Brazil. The study model was based on a case-control study using molecular biology tools and techniques to analyze allele and genotypic frequencies with possible association with susceptibility or resistance in individuals with Cutaneous Leishmaniasis caused by *L. guyanensis*.

ETHICAL CONSIDERATIONS

This study is an integral part of a larger project entitled “Genetic polymorphisms of genes involved in the immune response and wound healing in patients with cutaneous leishmaniasis”, approved by the Research Ethics Committee (CEP) of the FMT-HVD, under number from CAAE: 09995212.0.0000.0005. Also, Declaration of Helsinki regarding was considered by obtaining verbal and written consent from each participant and the guardians of patients under 18 years old before enrolling to the current study.

SAMPLE COLLECTION AND DESCRIPTION

The recruitment of participants to Case Group consisted of patients treated at the Leishmaniasis outpatient clinic at FMT-HVD, with a confirmed diagnosis of CL caused by *L. guyanensis*. The Control Group consisted of healthy individuals with no sign or history of leishmaniasis living in the same location as the Cases.

INCLUSION AND EXCLUSION CRITERIA

The participation in the study required being between 12 and 65 years old and being from the State of Amazonas. For the case group, patients of both genders and who presented a skin lesion characteristic of Leishmaniasis were randomly selected. Diagnostic confirmation of CL was carried out through direct examination and confirmation of the species by molecular methodology. For the Control Group, the participant would have to be a resident of the endemic area for at least 10 years, and not

show signs or history of the disease. The criteria for non-inclusion and/or exclusion in the study occurred for both cases and controls, with the exclusion of participants who presented positive serology for infections (HIV and hepatitis), pregnant women of any gestational age and military personnel.

BIOLOGICAL MATERIAL

All research participants underwent a venipuncture to collect 5mL of peripheral blood in a tube containing EDTA anticoagulant (Ethylene Diamine Tetra-Acetic Acid). The measurement of plasma chemokines and cytokines in both patient and control groups was determined using the multiplex cytokine commercial kit Bio-PlexPro-Human Cytokine GrpI Panel 27-Plex (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions in the Bio-Plex 200 Protein Array System (Luminex Corporation).

CHARACTERIZATIONS OF THE ETIOLOGICAL AGENT

Characterization of the species was carried out using PCR-RFLP method using the primers L hsp70 Reverse (5' CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3') and Direct (5' GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3'). After amplification, the products were enzymatically cut using HaeIII enzyme (MBI Fermentas, St Leon-Rot, Germany) to confirm the species.

MOLECULAR GENOTYPING OF HUMAN GENES

After extraction of genomic DNA from 200µL of blood from each study participant using the direct method QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol, the DNA was stored at -20oC until the moment of analysis in compliance with Resolution 441/ 2011-CNS during the period necessary for molecular analysis. For genotyping of polymorphisms, the real-time PCR (qPCR) technique was performed using specific probes by TaqMan® system, analyzed using the QuantStudio 6 platform (Applied Biosystems). The probes used for each gene were: CAT - rs1001179 (c.-262C>T), MPO - rs2333227 (c.-463G>A), NOX2 - rs4673 (c.242C>T),

NOS3 - rs2070744 (c.- 786T>C), TGF- β - rs1800469 (c.-509C>T), SOD2 - rs4880 (c.47C>T) and NOS2 -rs1800482 (c.-954G>C).

STATISTICAL ANALYSIS

The distribution of variables analysis was performed using the Kolmogorov-Smirnov test, with ANOVA parametric test used to analyze the distribution of means of quantitative variables with normal distribution within categories and non-parametric Kruskal-Wallis test for the off-normal distributions. Spearman's rank correlation coefficient was used to assess the relationship plasma concentrations cytokines and SNPs genotypes. All analyzes were performed in the Statistical software's IBM SPSS Statistics, 19.0 and GraphPad Prism 9.

STUDY LIMITATIONS

The main limitations of the study were based on the withdrawal of patients and controls during participation in the project, abandonment of treatment and losses due to death that occurred before the final induction phase. In addition, the quantification of cytokines presented many results with zero concentrations (0.0 pg/mL), which made the quantification of all cytokines non-uniform.

RESULTS

A total of 768 patients, 584 (76%) male and 184 (24%) female participated in the study, all diagnosed and confirmed positively for Cutaneous Leishmaniasis (CL) caused by *L. guyanensis*. For the control group (healthy volunteers), a total of 744 agreed to participate in the study, 495 (66.5%) male and 249 (33.5%) female. All healthy volunteers had no sign or history of leishmaniasis, and all lived in the same location as the patients.

The mean age of the patients was 32.74 ± 13.46 years old in male and 36.47 ± 14.09 in female, while in the healthy group it was 43.84 ± 16.48 in male and 41.94 ± 14.35 in female

Associations of genotypes of polymorphisms between groups of patients and Healthy Controls

The genotypic and allelic frequencies of SNPs among patients and healthy controls and their odds ratio (OD) estimates for *Leishmania (Viannia) guyanensis* were presented in tables 1 to 7, subdivided by gender for each group.

The different genotypes of the *CAT* c.-262C>T SNP (rs1001179) did not demonstrate significant associations between patients and total healthy controls. However, when analyzing each group by gender, the wild-type homozygous genotype c.-262^{CC} was significantly more prevalent in male patients than in male controls, presenting itself as a possible risk factor for CL (*CC*vs.*CT* - OD: 1.29 - $p=0.041$) - (*CC*vs.*CT+TT* - OD: 1.28 $p=0.047$). Though, in female sex, the same genotype was more prevalent in healthy controls, however, no significant results were observed, $p=0.087$ and $p=0.104$, respectively (Table 1).

The analysis for the *MPO* c.-463G>A SNP (rs2333227), we identified the normal homozygous genotype c.-463^{GG} as significantly more prevalent in the total healthy control group, presenting itself as a possible protective factor for CL (*GG*vs.*GA* - OD: 0.73 - $p=0.004$) - (*GG*vs.*GA+AA* - OD: 0.76 $p=0.011$). Interestingly, when analyzing each group by gender, among patients and controls, the normal homozygous genotype c.-463^{GG} was shown to be a protective factor for CL (*GG*vs.*GA* - OD: 0.69 - $p=0.005$) - (*GG*vs.*GA+AA* - OD: 0.69 - $p=0.005$), while the same genotype among

patients and healthy female controls was a risk factor for CL (*GG* vs. *AA* - OD: 3.38 - $p=0.041$) (Table 2).

Analysis of the *NOX2* c.242C>T SNP (rs4673) demonstrated that normal homozygous genotype c.242^{CC} was significantly more prevalent in healthy controls, presenting itself as a possible protective factor for CL (*CC* vs. *CT* - OD: 0.74 - $p=0.005$) - (*CC* vs. *CT+TT* - OD: 0.77 - $p=0.012$). However, these results were significant only in males (*CC* vs. *CT* - OD: 0.59 - $p<0.001$) - (*CC* vs. *CT+TT* - OD: 0.60 - $p<0.001$) (Table 3).

Analysis of the *NOS3* c.-786T>C SNP (rs2070744) revealed the normal homozygous genotype c.-786^{TT} as a protective factor for LC (*CC* vs. *CT* - OD: 0.75 - $p=0.008$) - (*CC* vs. *CT+TT* - OD: 0.80 - $p=0.032$). However, the same genotype was protective only in male (*CC* vs. *CT* - OD: 0.75 - $p=0.026$) - (*CC* vs. *CT+TT* - OD: 0.76 - $p=0.031$), while in female showed as a risk factor for CL (*CC* vs. *TT* - OD: 4.4 - $p=0.010$) (Table 4).

The analysis for the *TGF-β1* c.-509C>T SNP (rs1800469), we found the normal homozygous genotype c.-509^{CC} to be significantly more prevalent in healthy controls, strongly associated as protective factor for CL (*CC* vs. *CT* - OD: 0.63 - $p<0.001$) - (*CC* vs. *TT* - OD: 0.60 - $p=0.001$) - (*CC* vs. *CT+TT* - OD: 0.62 - $p<0.001$) for both genders (Table 5).

The analysis of the genotypes of the *SOD2* SNP c.47C>T (rs4880) of demonstrated the c.47^{CC} genotype significantly associated with a risk factor for CL in both genders (*CC* vs. *CT* - OD: 1.7 - $p>0.001$) - (*CC* vs. *CT+TT* - OD: 1.62 - $p<0.001$), highlighting to more strongly associations in females (*CC* vs. *CT* - OD: 2.7 - $p=0.003$) - (*CC* vs. *CT+TT* - OD: 1.98 - $p=0.003$) (Table 6).

The *NOS2* c.-954G>C SNP (rs1800482) did not show significant associations between genotypes and groups of patients and healthy controls (Table 7).

Table 8 show all significant associations between for elevated and/or decreased plasma concentrations cytokines and homozygous mutant genotypes of the SNPs. The IL-13 cytokine presented many significant associations, mainly correlated with patients with strongly decreased levels of cytokines for most mutant genotypes, with the exception of elevated levels in patients and healthy controls correlated with *NOS3*. Interestingly, homozygous mutant genotypes in *MPO* and *NOS3* SNPs demonstrated significantly elevated MCP-1 plasma concentrations in patients, while significantly decreased in healthy controls. In addition, to *NOX2* homozygous mutant SNP, MCP-1

plasma concentrations were significantly reduced in patients, while significantly elevated in healthy controls. It is worth noting that plasma concentrations of INF- γ were significantly reduced in mutant genotypes of almost all SNPs, occurring mainly in CL patients. Just two cytokines were significantly associated with only one mutant SNP, *MPO* with elevated levels of G-CSF and *CAT* with decreased levels of VEGF in CL patients.

Associations Between Single Nucleotide Polymorphisms and Cytokines Plasma Concentrations in CL Patients and Healthy Controls.

After analysis of normality of distribution using the Kolmogorov-Smirnov test of the levels of measured cytokines, all correlations between SNPs and cytokine plasma concentrations followed in a non-parametric way with statistical significance values presented using the Kruskal-Wallis test. Also due to cytokine levels did not follow a normal distribution all correlation matrices were performed using Spearman correlation coefficient test, accepting only those with strong correlations ($r > 7.0$ – $P < 0.0001$). In these tests, two matrices were performed for each group (Patients/Controls), one containing only analyzes of homozygous normal genotypes and the other containing both heterozygous/homozygous mutant genotypes.

For these correlation matrices, only nine (9) cytokines were correlated by the Spearman Test. These were chosen because they are the most prevalent and discussed in the literature and are correlated with various infectious diseases, including leishmaniasis. They were correlated the T helper 1 (Th1) inflammatory cytokines (INF- γ , TNF- α , IL-1Ra and IL-12), generally involved in protection against CL; T helper 2 (Th2) cytokines (IL-4, IL-5 and IL-13) associated with facilitating parasite persistence due to self-regulation; and the immunoregulatory cytokines IL-10 and IL-17 associated with susceptibility to CL and the persistence of the parasite at the site of infection (LIEW et al., 1997; RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998; VIGNALI & KUCHROO, 2012; OLIVEIRA et al., 2014; ESPIR et al., 2014; MASPI et al., 2016).

Several significant correlations were found between the genotypes with elevated and decreased levels of cytokines in the two groups studied. All results for both patient groups and healthy controls are shown in the figures 1 to 6.

For the CAT c.-262C>T SNP (rs1001179), the heterozygous c.-262^{CT} and homozygous c.-262^{TT} mutant genotypes were significantly associated for most cytokines, with particular emphasis on decreased levels for IL-8 and IL-13 in patients and IL-12 in healthy controls, while elevated levels for the chemokine RANTES in patients and IL-6 and MCP1 in healthy controls (Figures 1A: 1B).

To the *MPO* c.-463G>A SNP (rs2333227), the c.-463^{GA/AA} mutant genotypes were significantly associated with decreased levels for most cytokines, with special emphasis on IL-1Ra, IL-2 and IL-13 in patients and IL-7, IL-13 and MCP-1 in healthy controls, while at elevated levels in the cytokines IL-4, IL-5, GCS-F, MCP-1 and RANTES in patients (Figures 2A: 2B).

Analysis of the NOX2 c.242C>T SNP (rs4673), the c.242^{CT/TT} mutant genotypes showed a significant association with decreased levels of the cytokines INF- γ , TNF- α , IL-15 and IL-10 in patients and IL-7, IL-13 and IL-17 in healthy controls, while significant for elevated levels in the cytokines MCP-1 and IL-5 in healthy controls (Figures 3A).

Analysis to the NOS3 c.-786T>C SNP (rs2070744), the c.-786^{TC/CC} mutant genotypes were significantly associated with decreased levels of the cytokines IL-17 in patients and IL-13 and MCP-1 in healthy controls, while significant to decreased levels for IL-12 and elevated levels for the cytokines IL-13 and MCP-1 in healthy controls (Figures 4A).

The TGF- β 1 c.-509C>T SNP (rs1800469), the c.-509^{CT/TT} mutant genotypes were significantly associated with decreased levels of the cytokines IL-6, IL-1Ra, IL-1 β and FGF in patients and INF- γ in healthy controls. There were no significant associations with elevated levels of cytokines in any of the groups studied (Figures 5A: 5B).

Analyzing the *SOD2* c.47C>T SNP (rs4880), we found the normal genotype c.47^{CC} significantly associated with decreased levels for most cytokines, especially IL-2, IL-6, IL-8, IL-13, IL-1 β , FGF, INF- γ in patients and PDGF in healthy controls, while significant levels elevated of the chemokine MIP-1 α in healthy controls (Figures 6A: 6B).

The correlation analyzes by Spearman test between the different plasma concentrations of cytokines and the genotypes of the SNPs demonstrated very different results in the groups of patients and controls. When analyzing only the group of

patients, in those carrying only the normal genotypes for all SNPs, several strong and significant correlations were found, totally different from the same group of patients carrying only the heterozygous/homozygous mutant genotypes. These results were especially different for the *SOD2*, *TGFB1* and *NOX2* genes. Interestingly, the same associations when analyzed in the group of healthy controls, few strong significant correlations were found, with little or no differences when analyzed in the normal and mutant genotypes (Figures 1C: 2C: 3C: 4B: 5C and 6C).

DISCUSSION

In recent decades, several studies have demonstrated the importance of molecular studies in the diagnosis, treatment and monitoring of patients with leishmaniasis (DESJEUX, 2004; EVANS & KEDZIERSKI, 2012). Despite being quite broad and sometimes not very evident and understandable, the identification of molecular laboratory markers is improving the understanding of the clinical outcomes of leishmaniasis disease, even though even today, the genetic principles in the different comorbidities of the disease are unknown (BLACKWELL *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2023).

Although only a small part of the population in regions where the disease is endemic is infected, unfortunately, leishmaniasis still is classified as a major global public health problem, showed a broad and heterogeneous clinical and epidemiological spectrum (JOGAS, 2022; SANTOS *et al.*, 2023). Furthermore, there are still cases of individuals infected with *Leishmania* completely asymptomatic and do not show any signs of infection (CUSTODIAO *et al.*, 2012). Studies have discussed the variables that affect the severity and asymptomatic cases of the disease (MELBY *et al.*, 1995; GAAFAR *et al.*, 1995). Most researchers support that the severity of the disease is strongly linked to a host immunological and genetic profile. Some studies reinforce that the human immunogenetic profile acts directly associated with T cells and the infecting *Leishmania* species (de FREITAS & von STEBUT, 2021; MANN *et al.*, 2021).

The male gender was more prevalent in both study groups, 76% in patients and 66.5% in healthy controls, corroborating similar results with other national studies and also with studies carried out in the same region of Brazil (SPIR *et al.*, 2014; LEWNARD *et al.*, 2014). We believe that the higher prevalence of males and an average age of 34 years found in our study was due to the fact that the population is from rural areas and consequently more present and subjected to daily and recurrent exposure to the tropical forest, not only due to their fixed residence close to the Amazon rainforest, as well as their extractive activities and natural exploitation of the forest, thus resulting in greater exposure to *Leishmania* vectors (de MESQUITA *et al.*, 2022).

The frequencies of the *CAT* c.-262C>T SNP (rs1001179) genotypes in the study population corroborated other national studies. SOUSA *et al.* (2016) demonstrated 64.2% and 71.2% of the genotype c.-262^{CC} wild-type in Cystic Fibrosis and Cancer patients, respectively, from Pernambuco-Brazil. DOMINGOS *et al.* (2020), in a study

involving sickle cell anemia patients, demonstrated the c.-262CC genotype in 74.7%. Some studies have associated the c.-262C allele as risk factor for many diseases, including diabetic neuropathy (CHISTIAKOV *et al.*, 2006), male infertility (GARCÍA *et al.*, 2019), while the c.-262T allele in asthma and breast cancer (ISLAM *et al.*, 2008).

The significantly higher prevalence of the c.-262CC genotype in male patients compared to male controls ($p=0.041$), meaning a possible risk factor (OD: 1.29), was not demonstrated in females, who presented a higher prevalence of the genotype wild-type in female controls compared to female patients. This fact may be explained due to male have lower Catalase catalytic activity compared to women, suggesting that males may be more susceptible to developing diseases, included more infections (SUN *et al.*, 2019). Despite, the mechanisms that lead to lower activity are still unknown. In addition, studies have shown that parasites of the *Leishmania* genus that express high Catalase activity compromise their own ability to develop in insect vectors, reducing their transmissibility, suggesting the hypothesis that the presence of Catalase is not compatible with the digenetic life-cycle of the *Leishmania* (KHAN *et al.*, 2018).

The results of our study demonstrating the wild-type homozygous genotype c.-463^{GG} significantly more prevalent in the healthy control group ($p=0.004$), suggests a lower probability of developing CL when compared to individuals with the c.-463^{GA/AA} mutant genotypes (OD: 0.76). We believe that mutant genotypes are significantly associated with increased risk of infection due to downregulation of MPO expression in patients. Myeloperoxidase is an oxidative lysosomal enzyme associated mainly with neutrophils and polymorphonuclear monocytes, with a function in the generation of hypochlorous acid (HClO) in the presence of H₂O₂, mainly to destroy pathogens during infections (ARATANI, 2018; RIZO-TÉLLEZ *et al.*, 2022).

The G allele of the *MPO* c.-463G>A SNP (rs2333227) creates a stronger binding site at the promoter site, causing a higher expression of MPO in relation to the A allele (PIEDRAFITA *et al.*, 1996). Masuoka e Col. (2021) described c.-463^{GA/AA} mutant genotypes associated with low MPO activity in Alzheimer's disease and Arslan e col. (2017) in heart diseases. Others have demonstrated the wild-type homozygous genotype c.-463^{GG} associated with greater MPO activity, risk factor for type 2 diabetes mellitus (TIBAUT & PETROVIČ, 2016; JIANG *et al.*, 2023) and lung cancer (MENG *et al.*, 2018), all correlating MPO with an important role in inflammation, decreasing the bioavailability of nitric oxide and low-density lipoprotein oxidation (HOY *et al.*, 2002).

The *NOX2* c.242T>C SNP (rs4673) has been widely investigated in several diseases. In the study, the prevalence of the wild-type genotype c.242^{TT} was significantly higher in the healthy control group ($p < 0.001$), presenting itself as a protective factor for CL mainly in males (OD: 0.74 – $p = 0.005$). Our results corroborate other studies reporting the c.242^{CT/TT} mutant genotypes associated with lower NOX2 activity in hypertensive patients compared to the c.242^{CC} (GUZIK *et al.*, 2000; SHIMONAKANISHI *et al.*, 2004). In a recent study, Carneiro *et al.* (2018) demonstrated in C57BL/6 mice infected by *Leishmania amazonensis*, the c.242CT/TT mutant alleles correlated with significantly more severe pathology in the later stages of infection, revealing a deficiency in microbicidal apoptosis.

NADPH oxidase (NOX2) is directly involved in phagocyte formation, establishing an enzymatic complex with a critical function in innate immunity, catalyzing the reduction of molecular oxygen “O₂” to “O₂-“, increasing reactive oxygen species (ROS), fundamental components for phagocytic microbicidal activity (HEYWORTH *et al.*, 2003). Phagocyte NADPH oxidase has two polypeptide subunits, gp91-phox and p22-phox (encoded by CYBB and CYBA, respectively) (NAUSEEF, 2019). When NOX2 components come together on the phagolysosome membrane, intracellular ROS are generated, while when assembled on the plasma membrane, extracellular ROS are generated (KOTSIAS *et al.*, 2023). The phagocytic respiratory burst is critical for the death of microorganisms, and when absent, there is susceptibility to infections, mainly bacterial and fungal (ARNOLD, 2017). Inactivating NOX2 assembly is a strategy developed by several pathogens to subvert exposure to oxidants. In *Leishmania* infections, inhibition of phagolysosome maturation is characterized by an impaired assembly of NOX2 (ARANGO *et al.*, 2019).

Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is mainly responsible for the continuous basal production of NO, protecting the endothelium and maintaining wild-type blood flow, attenuating possible inflammatory processes (FÖRSTERMANN & MÜNZEL, 2006). Nitric oxide plays an important role in the pathogenesis of antimicrobial sepsis and in inducing the permeability of vascular tone. The mutant genotypes c.-786^{TC/CC} (rs2070744) reduce NOS3 mRNA and serum nitrite/nitrate levels compared to those with the c.-786^{TT} wild-type genotype (MIYAMOTO *et al.*, 2000). In addition, studies have demonstrated that the c.-786^{TC/CC} genotypes can reduce the promoter activity of the NOS3 gene resulting in reduced NO production (AZUMA *et*

al., 2020). The result of our study demonstrating the c.-786^{TT} wild-type genotype as a protective factor for CL in males (OD: 0.75 – p=0.026), but not in females (OD: 4.4 – p=0.010) may be correlated to the indirect effect of NO bioavailability and increased ROS in patients, which are correlated with potential protection against pathogens.

Transforming Growth Factor Beta has several functions, mainly related to the immunosuppression of T and B lymphocytes, chemotaxis of macrophages and stimulation of cell proliferation. Many SNPs potentially functional in the *TGF-β1* are associated with modulating TGF-β1 plasma concentrations and are correlated with numerous diseases (VILLAR *et al.*, 2023). The TGF-β1 signaling pathway plays a key role in regulating several cellular processes, such as cell proliferation and differentiation, cell adhesion and apoptosis (MORIKAWA *et al.*, 2016). Mutations in the TGF-β1 signaling pathway have been shown to result in many human diseases, such as hypertension, atherosclerosis, and renal fibrosis (HU *et al.*, 2018). Some studies demonstrated twice as high plasma levels of TGF-β1 associated with the allele c.-509T when compared to the wild-type c.-509C allele (GRAINGER *et al.*, 1999; HUANG & CHEN, 2012; SCHON & WEISKIRCHEN, 2014).

The results of this study associating homozygous wild-type genotype c.-509^{CC} SNP (rs1800469) as a protective factor for CL in both genders (*CC*vs.*CT* – OD: 0.63 – p<0.001 – *CC*vs.*TT* – OD 0.60 – p<0.001 – *CC*vs.*CT+TT* – OD: 0.62 – p<0.001), corroborates other studies correlated with other diseases, although none correlate with CL. The wild-type c.-509^{CC} genotype has been described as protective for other diseases such as Hepatitis C Virus Infection (JING *et al.*, 2020), Chagas disease (FERREIRA *et al.*, 2022) and for Asthma (PANEK *et al.*, 2016) and a better response to antiviral therapy. We believe that heterozygous and homozygous mutants genotypes c.-509CT/TT mutants lead to high risk of developing CL, since these genotypes are associated with changes in the expression of TGFB-1 with direct actions favorable to the Leishmania parasite.

Mitochondrial Superoxide Dismutase 2 is an important enzyme in the detoxification of intracellular superoxide. Its activity may have a dual function, acting as an antioxidant complexed with the enzymes Catalase, Glutathione Peroxidase and Peroxirredoxina, neutralizing H₂O₂ into H₂O; it can also act as a pro-oxidant in the accumulation of H₂O₂, increasing the overproduction of ROS and cellular toxicity (SINGH *et al.*, 2017).

The finding of the homozygous wild-type genotype of *SOD2* c.47C>T (rs4880) associated with a risk factor for CL, especially in females (*CC* vs. *CT* – *OD*: 2.07 – *p*=0.003; *CC* vs. *CT+TT* – *OD*: 1.98 – *p*=0.003) corroborates with studies that demonstrate that serum concentrations of SOD2 are important regulators of the response against various parasites, including *Leishmania*. Khouri et al. (2009, 2010) demonstrated that the initial infection by *L. amazonensis* after treatment with interferon- γ is partially dependent on the enzyme superoxide dismutase (SOD) in the reducing the concentration of ROS to favor the development of *Leishmania*.

Inducible nitric oxide synthase (NOS2) is fundamental in the production of NO with a crucial role in immunological protection in the elimination of intracellular pathogens, thus being one of the main mediating agents of the immune response to many infections (KOPELYANSKIY *et al.*, 2022). Although, the analysis to genotype frequencies of *NOS2* c.-954G>C SNP (rs1800482) in the study not showed significant association between the groups of patients and healthy controls, even though the frequency of allele mutant c.-954C was found almost 2 times more in healthy controls (4.2%) than in patients (2.6%). Perhaps due to the low prevalence of the mutant allele, there was no statistical difference.

Although NOS2 function is necessary for normal physiological regulation, elevated concentrations of NO as a result of NOS2 overexpression or dysregulation are implicated in sepsis, septic shock, cancer, and heart disease (WILMES *et al.*, 2020). *Leishmania* parasites could benefit from the reduction in the oxidative burst due to the induction of the host's antioxidant response, thus favoring their survival (REVERTE *et al.*, 2021).

The results of elevated and decreased plasma concentrations cytokines associated with homozygous mutant genotypes of the SNPs performed in our study corroborate with numerous studies described in the literature, especially when related to elevated levels of cytokines in infections. Cytokines have a fundamental role in the immune response, participating in several processes from the regulation of local inflammation, cell proliferation and metabolism (IVASHKIV, 1995; GULATI *et al.*, 2016). Although its main function is to regulate inflammation and physiological and disease immune response, its activities are well defined in pro-inflammatory and anti-inflammatory roles (TAKEUCHI *et al.*, 2022). For each cytokine there is its respective specific receptor linked to the cell surface, with positive or negative regulation of many

genes and their respective transcriptional factors (AKDIS *et al.*, 2011). Generally, this regulation may involve the elevation and production of other cytokines, at the same time that their surface receptors for other molecules are also elevated, or it may also lead to the suppression of cytokine function (DONG, 2021).

The balance of pro- and anti-inflammatory cytokines is essential to prevent immunopathological disorders. In leishmaniasis, protective immunity depends on a Th1 response and the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-12, IFN- γ . It is worth noting that most cytokines are short-lived and their functions occur locally (COHEN & SHACHAR, 2012). However, there are those that are present in the bloodstream that are capable of acting remotely, such as transforming growth factor beta (TGF- β) and monocyte colony-stimulating factor (M-CSF), for example. In short, there must be a pro-inflammatory and regulatory balance of cytokines, defining the design of the immunological response, which will determine the outcome of the physiological result (LI & FLAVELL, 2008; TRAVIS & SHEPPARD, 2016; BATLLE & MASSAGUÉ, 2019).

Significant increase and decrease in plasma concentrations mainly of the cytokines IL-13, MCP-1, IL-2 and INF- γ associated with the homozygous mutant SNPs analyzed in our study. Interestingly, the main significant correlations occurred in the patients' decreased plasma concentrations of the cytokines IL-13 and IL-2, which could mean possible negative modulation of homozygous mutant genotypes in the Th2 and Th1 cells expression, since they are especially activated in protection of the host against *Leishmania* infection (MATTHEWS *et al.*, 2000; HURDAYAL & BROMBACHER, 2014).

Study recent have demonstrated an important role for MCP-1 in the initial immunity against cutaneous leishmaniasis by recruiting macrophages, monocytes, NK cells and other leukocytes (SCOTT & NOVAIS, 2016). Interestingly, our results showed where plasma IL-13 concentrations were significantly decreased, MCP-1 levels were significantly elevated in the presence of the same mutant genotypes. Generally, *Leishmania* infection generates a constitutive expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), which increases the activation of macrophages in an alternative way to control the infection (DAYAKAR *et al.*, 2019).

An interesting result found in our study was the association of most cytokines (IL-13, IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-8, IL1- β and FGF-Basic) being significantly reduced in the

presence of the mutant genotypes of the TGF-1B c.-509^{TT} SNP (rs1800469) and SOD2 c.47^{TT} (rs4880) in patients. This result may mean that the T allele mutant in both SNPs may negatively modulate the expression of these cytokines by inhibiting Th1 and Th2 responses, concomitantly. We know that the imbalance between Th1 and Th2 responses, concomitantly with regulatory systems, is the key point for infections, especially leishmaniasis. Studies have demonstrated different Th1 responses in resistance to infection, while Th2 persistence of the *Leishmania* parasite. A stable Th1 response must occur in order to avoid exacerbation causing severe tissue damage and increased production of pro-inflammatory cytokines, such as IFN γ and TNF α (COSTA-DA-SILVA *et al.*, 2022).

Our results demonstrated the homozygous mutant genotypes for the SNPs *CAT* rs1001179 (c.-262^{TT}), *NOX2* rs4673 (c.242^{TT}), *TGFB-1* rs1800469 (c.-509^{TT}) and SOD2 rs4880 (c.47^{TT}) significantly associated with plasma concentrations decreased levels of INF- γ in patients and not in controls, with the exception of c.-509TT also decreased in healthy controls. This demonstrates how these genotypes in these enzymes can be associated with risk factors for Leishmaniasis, since they reduce one of the main cytokines in the initial protection of infection by the Th1 response (LIEW *et al.*, 1990; CHARMOY *et al.*, 2007; SEYED & RAFATI, 2021). Studies have described elevated levels of IL-10 and IL-17 in patients with CL and MCL, which revealed a possible role for Th17 cells and regulatory T cells (Tregs) in the severity and perhaps pathogenesis of leishmaniasis (ANDERSON *et al.*, 2009; BANERJEE *et al.*, 2016). Our study found the homozygous mutant genotype of the *CAT* SNP rs1001179 (c.-262TT) significantly associated with decreased plasma concentrations of IL-10 and IL-17, which may demonstrate an important role of Catalase with a role in regulating the pathogenesis of *Leishmania*.

Currently, many studies try verify associations of host genetic markers with the clinical severity of the disease, especially in those individuals positive for *Leishmania*, however, completely asymptomatic. The possible identification of genetic alterations implicated in the susceptibility or severity of *Leishmania* infection is the best future we can achieve, in terms of improvements in treatments and the most reasonable conception of research for the progress, perhaps even of prognostic vaccines against the disease.

CONCLUSIONS

The wide-type genotypes of *CAT* c.-262CC (rs1001179) and *SOD2* c.47CC (rs4880) were shown to be a risk factor for Cutaneous Leishmaniasis;

The wide-type genotypes of *MPO* c.-463GG (rs2333227), *NOX2* c.242CC (rs4673), *NOS3* c.-786TT (rs2070744), *TGFB-1* c.-509CC (rs1800469) were shown protective factors for Cutaneous Leishmaniasis;

Plasma concentrations of INF- γ were significantly decreased in the homozygous mutant genotypes of *CAT* c.-262TT, *NOX2* c.242TT, *TGFB-1* c.-509TT and *SOD2* c.47TT, indicating possible greater susceptibility to *Leishmania* infection in these genotypes;

The finding of decreased plasma concentrations of the cytokines IL-2, IL-8 and IL-12 in the mutant genotypes of *CAT* c.-262TT, *MPO* c.-563AA, *NOS3* c.786TT, *TGFB-1* c.-509TT and *SOD2* c.47TT, may indicate survival and progression of Leishmaniasis disease in these genotypes;

The homozygous mutant genotypes of *TGFB-1* c.-509TT and *SOD2* c.47TT were significantly associated with decreased plasma IL-1- β , IL-6, IL-13 and FGF-Basic in patients. Therefore, these genotypes may have modulated expression of these cytokines from inhibiting Th1 and Th2 responses, concomitantly, which may be associated with both the progression and elimination of the parasites;

Significant plasma concentrations of the cytokines IL-10 and IL-17 were associated with the c.-262TT Catalase mutant genotype, providing an important negative regulation in the expression of these cytokines in this genotype, which may be associated with protection against Cutaneous Leishmaniasis.

FUNDING STATEMENT

Financial support was provided by grants from:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) - Pró-Estado Program #002/2008, #007/2018, and #005/2019; POSGRAD Program #005/2022,
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
- The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

DISCLOSURE

The authors of this study clarifies that the funding and sponsors of this study, who played no role in collection of samples, the practical and laboratorial parts or interpreting the data presented herein, are public organizations whose main is to support science in general.

CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURE

The author(s) declare(s) that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper and also 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.

ACKNOWLEDGMENTS

The research team acknowledges funding and support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) – Financial Code #002/2008, #007/2018, #005/2019 and POSGRAD Program #005/2022). The study was also supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

- Akdis M, Burgler S, Cramer R et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases [published correction appears in *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Oct;128(4):739. Quaked, Nadia [corrected to Ouaked, Nadia]. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):701-21.e270. doi:10.1016/j.jaci.2010.11.050.
- Alvar J, Vélez Id, Bern C et al. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671. Epub 2012 May 31.
- Anderson CF, Stumhofer JS, Hunter CA et al. IL-27 regulates IL-10 and IL-17 from CD4⁺ cells in nonhealing *Leishmania major* infection. *J Immunol*. 2009;183(7):4619-4627. doi:10.4049/jimmunol.0804024.
- Arango Duque G, Jardim A, Gagnon É et al. The host cell secretory pathway mediates the export of *Leishmania* virulence factors out of the parasitophorous vacuole. *PLoS Pathog*. 2019 Jul 29;15(7):e1007982. doi: 10.1371/journal.ppat.1007982.
- Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys*. 2018;640:47-52. doi:10.1016/j.abb.2018.01.004.
- Arnold De, Heimall JR. A Review of Chronic Granulomatous Disease. *Adv Ther*. 2017 Dec;34(12):2543-2557. doi: 10.1007/s12325-017-0636-2.
- Arslan S, Berkan Ö, Bayyurt B et al. Effects of *MPO-463G/A* and *-129G/A* polymorphisms on coronary artery disease risk and patient survival in a Turkish population. *Biomed Rep*. 2017 Dec;7(6):547-552. doi: 10.3892/br.2017.995.
- Azuma S, Uojima H, Chuma M et al. Influence of NOS3 rs2070744 genotypes on hepatocellular carcinoma patients treated with lenvatinib. *Sci Rep*. 2020 Oct 13;10(1):17054. doi: 10.1038/s41598-020-73930-3.
- Banerjee A, Bhattacharya P, Joshi AB et al. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in *Leishmania* pathogenesis and in protective immunity by *Leishmania* vaccines. *Cell Immunol*. 2016;309:37-41. doi:10.1016/j.cellimm.2016.07.004.
- Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity*. 2019 Apr 16;50(4):924-940. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.024.
- Bisti S, Konidou G, Boelaert J et al. The prevention of the growth of *Leishmania major* progeny in BALB/c iron-loaded mice: a process coupled to increased oxidative burst, the amplitude and duration of which depend on initial parasite developmental stage and dose. *Microbes Infect*. 2006 May;8(6):1464-72. doi: 10.1016/j.micinf.2006.01.014.
- Blackwell JM, Fakiola M, Ibrahim ME et al. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. *Parasite Immunol*. 2009 May;31(5):254-66. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01102.x.

Carneiro MB, Peters NC. The Paradox of a Phagosomal Lifestyle: How Innate Host Cell-Leishmania amazonensis Interactions Lead to a Progressive Chronic Disease. *Front Immunol.* 2021;12:728848. Published 2021 Sep 7. doi:10.3389/fimmu.2021.728848.

Chistiakov DA, Zotova EV, Savost'anov KV et al. The 262T>C promoter polymorphism of the catalase gene is associated with diabetic neuropathy in type 1 diabetic Russian patients. *Diabetes Metab.* (2006) 32:63–8. 10.1016/s1262-3636(07)70248-3.

Cohen S, Shachar I. Cytokines as regulators of proliferation and survival of healthy and malignant peripheral B cells. *Cytokine.* 2012;60(1):13-22. doi:10.1016/j.cyto.2012.06.019.

Costa-da-Silva AC, Nascimento DO, Ferreira JRM et al. Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. *Trop Med Infect Dis.* 2022 Mar 31;7(4):54. doi:10.3390/tropicalmed7040054.

Crapo JD. Oxidative stress as an initiator of cytokine release and cell damage. *Eur Respir J Suppl.* 2003 Sep;44:4s-6s. doi: 10.1183/09031936.03.00000203a.

Dayakar A, Chandrasekaran S, Kuchipudi SV et al. Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. *Front Immunol.* 2019 Apr 5;10:670. doi:10.3389/fimmu.2019.00670.

de Freitas e Silva R, von Stebut E. Unraveling the Role of Immune Checkpoints in Leishmaniasis. *Front Immunol.* 2021 Mar 11;12:620144. doi:10.3389/fimmu.2021.620144.

de Mesquita TGR, Junior JDES, da Silva LDO et al. Distinct plasma chemokines and cytokines signatures in Leishmania guyanensis-infected patients with cutaneous leishmaniasis. *Front Immunol.* 2022 Aug 25;13:974051. doi:10.3389/fimmu.2022.974051.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004;27(5):305-318. doi:10.1016/j.cimid.2004.03.004.

Domingos IF, Pereira-Martins DA, Borges-Medeiros RL et al. Evaluation of oxidative stress-related genetic variants for predicting stroke in patients with sickle cell anemia. *J Neurol Sci.* 2020;414:116839. doi:10.1016/j.jns.2020.116839.

Dong C. Cytokine Regulation and Function in T Cells. *Annu Rev Immunol.* 2021;39:51-76. doi:10.1146/annurev-immunol-061020-053702.

Espir TT, Figueira Lde P, Naiff Mde F et al. The role of inflammatory, anti-inflammatory, and regulatory cytokines in patients infected with cutaneous leishmaniasis in Amazonas State, Brazil. *J Immunol Res.* 2014;2014:481750. doi:10.1155/2014/481750.

Evans KJ, Kedzierski L. Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. *J Trop Med*. 2012;2012:892817. doi: 10.1155/2012/892817. Epub 2011 Sep 5.

Ferreira RR, Waghabi MC, Bailly S et al. The Search for Biomarkers and Treatments in Chagas Disease: Insights From TGF-Beta Studies and Immunogenetics. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Feb 2;11:767576. doi: 10.3389/fcimb.2021.767576.

Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006;113(13):1708-1714. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532.

FU YL, HARRISON RE. Microbial Phagocytic Receptors and Their Potential Involvement in Cytokine Induction in Macrophages. *Front Immunol*. 2021 Apr 29;12:662063. doi: 10.3389/fimmu.2021.662063.

Gaafar A, Kharazmi A, Ismail A et al. Dichotomy of the T cell response to Leishmania antigens in patients suffering from cutaneous leishmaniasis; absence or scarcity of Th1 activity is associated with severe infections. *Clin Exp Immunol*. 1995 May;100(2):239-45. doi: 10.1111/j.1365-2249.1995.tb03660.x.

García Rodríguez A, de la Casa M, Johnston S. Association of polymorphisms in genes coding for antioxidant enzymes and human male infertility. *Ann Hum Genet*. 2019 Jan;83(1):63-72. doi: 10.1111/ahg.12286.

Gasparotto J, Kunzler A, Senger MR et al. N-acetyl-cysteine inhibits liver oxidative stress markers in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017 Feb;112(2):146-154. doi: 10.1590/0074-02760160403.

Ghosh K, Sharma G, Saha A et al. Successful therapy of visceral leishmaniasis with curdlan involves T-helper 17 cytokines. *J Infect Dis*. 2013;207(6):1016-1025. doi:10.1093/infdis/jis771.

Gollob KJ, Viana AG, Dutra WO et al. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite Immunol*. 2014;36(8):367-376. doi:10.1111/pim.12100.

Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet*. 1999;8(1):93-97. doi:10.1093/hmg/8.1.93.

Gulati K, Guhathakurta S, Joshi J et al. Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. 2016. *MOJ Immunol* 4(2):00121. DOI: 10.15406/moji.2016.04.00121.

Gupta AK, Das S, Kamran M et al. The pathogenicity and virulence of *Leishmania* - interplay of virulence factors with host defenses. *Virulence*. 2022 Dec;13(1):903-935. doi: 10.1080/21505594.2022.2074130.

Guzik TJ, West NE, Black E et al. Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation*. 2000 Oct 10;102(15):1744-7. doi: 10.1161/01.cir.102.15.1744.

Halliwell B & John Mc. Free Radicals in Biology and Medicine, 5th edn (Oxford, 2015; online edn, Oxford Academic, 22 Oct. 2015), <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>.

Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT et al. Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(5):578-584. doi:10.1016/s0952-7915(03)00109-2.

Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A et al. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med*. 2007 Sep 6;357(10):1018-27. doi: 10.1056/NEJMra064142.

Hoy A, Leininger-Muller B, Kutter D et al. Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2002 Jan;40(1):2-8. doi: 10.1515/CCLM.2002.002.

Huang F, Chen YG. Regulation of TGF- β receptor activity. *Cell Biosci*. 2012 Mar 15;2:9. doi: 10.1186/2045-3701-2-9. PMID: 22420375; PMCID: PMC3333473.

Hurdal R, Brombacher F. The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous Leishmaniasis. *Immunol Lett*. 2014;161(2):179-183. doi:10.1016/j.imlet.2013.12.022.

Islam T, McConnell R, Gauderman WJ et al. Ozone, oxidant defense genes, and risk of asthma during adolescence. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Feb 15;177(4):388-95. doi: 10.1164/rccm.200706-863OC.

Ivashkiv LB. Cytokines and STATs: how can signals achieve specificity?. *Immunity*. 1995;3(1):1-4. doi:10.1016/1074-7613(95)90152-3.

Jiang C, Zhou M, Bai H et al. Myeloperoxidase G-463A and CYBA C242T genetic variants in gestational diabetes mellitus. *Endocr Connect*. 2023 Feb 8;12(3):e220369. doi: 10.1530/EC-22-0369

Jing JS, Wang ZQ, Jiang YK et al. Association of cytokine gene polymorphisms with chronic hepatitis C virus genotype 1b infection in Chinese Han population: An observational study. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Sep 18;99(38):e22362. doi: 10.1097/MD.00000000000022362.

Jogas DG Jr. The South American medical communities in the genesis of the tropical medicine: construction and circulation of knowledge on American leishmaniasis in the beginning of the twentieth century. *Med Hist*. 2022 Jan;66(1):64–84. doi: 10.1017/mdh.2021.42.

Karlsson K, Lindahl U, Marklund SL et al. Binding of human extracellular superoxide dismutase C to sulphated glycosaminoglycans. *Biochem J*. 1988 Nov 15;256(1):29-33. doi: 10.1042/bj2560029.

Khouri R, Bafica A, Silva Mda P et al. IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. *J Immunol*. 2009;182(4):2525-2531. doi:10.4049/jimmunol.0802860.

Khouri R, Novais F, Santana G et al. DETC induces Leishmania parasite killing in human in vitro and murine in vivo models: a promising therapeutic alternative in Leishmaniasis. *PLoS One*. 2010;5(12):e14394. Published 2010 Dec 21. doi:10.1371/journal.pone.0014394.

Kopelyanskiy D, Desponds C, Prevel F et al. Leishmania guyanensis suppressed inducible nitric oxide synthase provoked by its viral endosymbiont. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Aug 12;12:944819. doi: 10.3389/fcimb.2022.944819.

Kotsias F, Hoffmann E, Amigorena S et al. Reactive oxygen species production in the phagosome: impact on antigen presentation in dendritic cells. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Feb 20;18(6):714-29. doi: 10.1089/ars.2012.4557.

Krishnamurthy P, Wadhwani A. Antioxidant Enzymes and Human Health. In: El-Missiry, M.A., editor. Antioxidant Enzyme [Internet]. London: IntechOpen; 2012 [cited 2022 Nov 21]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/39554> doi: 10.5772/48109.

Kumar GA, Karmakar J, Mandal C et al. Leishmania donovani Internalizes into Host Cells via Caveolin-mediated Endocytosis. *Sci Rep*. 2019;9(1):12636.

Lee KM, Choi JY, Lee JE et al. Genetic polymorphisms of NOS3 are associated with the risk of invasive breast cancer with lymph node involvement. *Breast Cancer Res Treat*. 2007 Dec;106(3):433-8. doi: 10.1007/s10549-007-9506-y.

Lewnard JA, Jirmanus L, Júnior NN et al. Forecasting temporal dynamics of cutaneous leishmaniasis in Northeast Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Oct 30;8(10):e3283. doi: 10.1371/journal.pntd.0003283.

Li G, Barrett EJ, Barrett MO et al. Tumor necrosis factor-alpha induces insulin resistance in endothelial cells via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Endocrinology*. 2007 Jul;148(7):3356-63. doi: 10.1210/en.2006-1441.

Li MO, Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell*. 2008 Aug 8;134(3):392-404. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.025.

Liew FY, Li Y, Millott S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology*. 1990;71(4):556-559.

Magnani ND, Marchini T, Calabró V et al. Role of Mitochondria in the Redox Signaling Network and Its Outcomes in High Impact Inflammatory Syndromes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Sep 23;11:568305. doi: 10.3389/fendo.2020.568305.

- Mann S, Frasca K, Scherrer S et al. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. *Curr Trop Med Rep*. 2021;8(2):121-132. doi: 10.1007/s40475-021-00232-7.
- Maspi N, Abdoli A, Ghaffarifar F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathog Glob Health*. 2016 Sep;110(6):247-260. doi: 10.1080/20477724.2016.1232042.
- Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I et al. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*. 1999 Nov;32(8):595-603. doi: 10.1016/s0009-9120(99)00075-2.
- Matthews DJ, Emson CL, McKenzie GJ et al. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania* major infection. *J Immunol*. 2000;164(3):1458-1462. doi:10.4049/jimmunol.164.3.1458.
- Melby PC, Yang YZ, Cheng J et al. Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun*. 1998 Jan;66(1):18-27. doi: 10.1128/IAI.66.1.18-27.1998.
- Meng Q, Wu S, Wang Y et al. *MPO* Promoter Polymorphism rs2333227 Enhances Malignant Phenotypes of Colorectal Cancer by Altering the Binding Affinity of AP-2 α . *Cancer Res*. 2018 May 15;78(10):2760-2769. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2538. Epub 2018 Mar 14.
- Mesquita I, Ferreira C, Barbosa AM et al. The impact of IL-10 dynamic modulation on host immune response against visceral leishmaniasis. *Cytokine*. 2018;112:16-20. doi:10.1016/j.cyto.2018.07.001.
- Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M et al. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786 T→C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet*. 2000; 9: 2629-2637.
- Moreira POL, Nogueira PM, Monte-Neto RL et al. Next-Generation Leishmanization: Revisiting Molecular Targets for Selecting Genetically Engineered Live-Attenuated *Leishmania*. *Microorganisms*. 2023 Apr 16;11(4):1043. doi: 10.3390/microorganisms11041043.
- Morikawa M, Derynck R, Miyazono K et al. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016 May 2;8(5):a021873. doi: 10.1101/cshperspect.a021873.
- Murray HW, Hariprashad J, Coffman RL et al. Behavior of visceral *Leishmania donovani* in an experimentally induced T helper cell 2 (Th2)-associated response model. *J Exp Med*. 1997;185(5):867-874. doi:10.1084/jem.185.5.867.
- Nauseef WM. The phagocyte NOX2 NADPH oxidase in microbial killing and cell signaling. *Curr Opin Immunol*. 2019 Oct;60:130-140. doi: 10.1016/j.coi.2019.05.006.
- OPAS, OMS. Situação epidemiológica Leishmaniose cutânea e mucosa. p. 10, 2021. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/55386>>.

Paiva CN, Bozza MT. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? *Antioxid Redox Signal*. 2014 Feb 20;20(6):1000-37. doi: 10.1089/ars.2013.5447.

Panek M, Pietras T, Fabijan A et al. Identification and association of the single nucleotide polymorphisms, C-509T, C+466T and T+869C, of the TGF- β 1 gene in patients with asthma and their influence on the mRNA expression level of TGF- β 1. *Int J Mol Med*. 2014;34(4):975-986. doi:10.3892/ijmm.2014.1894.

Piedrafita FJ, Molander RB, Vansant G et al. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *J Biol Chem*. 1996;271(24):14412-14420. doi:10.1074/jbc.271.24.14412.

Reverte M, Eren RO, Jha B et al. The antioxidant response favors Leishmania parasites survival, limits inflammation and reprograms the host cell metabolism. *PLoS Pathog*. 2021 Mar 25;17(3):e1009422. doi: 10.1371/journal.ppat.1009422.

Rizo-Téllez SA, Sekheri M, Filep JG et al. Myeloperoxidase: Regulation of Neutrophil Function and Target for Therapy. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Nov 21;11(11):2302. doi: 10.3390/antiox11112302.

Santos ALS, Rodrigues IA, d'Avila-Levy CM et al. Therapeutic Strategies against *Leishmania* and *Trypanosoma*. *Pathogens*. 2023 Oct 19;12(10):1263. doi: 10.3390/pathogens12101263.

Schon HT, Weiskirchen R. Immunomodulatory effects of transforming growth factor- β in the liver. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2014 Dec;3(6):386-406. doi: 10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.06.

Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(9):581-592. doi:10.1038/nri.2016.72.

Seyed N, Rafati S. Th1 concomitant immune response mediated by IFN- γ protects against sand fly delivered Leishmania infection: Implications for vaccine design. *Cytokine*. 2021;147:155247. doi:10.1016/j.cyto.2020.155247.

Shimo-Nakanishi Y, Hasebe T, Suzuki A et al. Functional effects of NAD(P)H oxidase p22(phox) C242T mutation in human leukocytes and association with thrombotic cerebral infarction. *Atherosclerosis*. 2004 Jul;175(1):109-15. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.

SINAN, Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Casos de Leishmaniose Tegumentar, 2017.

Singh N, Gupta VK, Kumar A et al. Synergistic Effects of Heavy Metals and Pesticides in Living Systems. *Front Chem*. 2017 Oct 11;5:70. doi: 10.3389/fchem.2017.00070.

Sousa VC, Carmo RF, Vasconcelos LR et al. Association of Catalase and Glutathione Peroxidase 1 Polymorphisms with Chronic Hepatitis C Outcome. *Ann Hum Genet*. 2016;80(3):145-153. doi:10.1111/ahg.12152.

Takeuchi, T. Cytokines and cytokine receptors as targets of immune-mediated inflammatory diseases—RA as a role model. *Inflamm Regener* 42, 35 (2022). <https://doi.org/10.1186/s41232-022-00221-x>.

Tibaut M, Petrovič D. Oxidative Stress Genes, Antioxidants and Coronary Artery Disease in Type 2 Diabetes Mellitus. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2016;14(1):23-38. doi: 10.2174/1871525714666160407143416.

Travis MA, Sheppard D. TGF- β activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:51-82. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120257.

Ueno N, Wilson ME. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends Parasitol*. 2012 Aug;28(8):335-44. doi: 10.1016/j.pt.2012.05.002.

Villar VH, Subotički T, Đikić D et al. Transforming Growth Factor- β 1 in Cancer Immunology: Opportunities for Immunotherapy. *Adv Exp Med Biol*. 2023;1408:309-328. doi:10.1007/978-3-031-26163-3_17.

WHO, World Health Organization. Leishmaniasis - Epidemiological Report of the Americas - No2. p. 2–5, 2014a. Disponível em: <<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/Report-Leishmaniasis-PAHO-June2014.pdf>>.

WHO, World Health Organization. Manual for case management of cutaneous leishmaniasis in the WHO Eastern Mediterranean Region. 2020. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/120002>>. Acesso em: 26 Outubro 2023.

Wilmes V, Lux C, Niess C et al. Changes in gene expression patterns in postmortem human myocardial infarction. *Int J Legal Med*. 2020 Sep;134(5):1753-1763. doi: 10.1007/s00414-020-02311-2.

Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB et al. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu Rev Biochem*. 2016 Jun 2;85:765-92. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014442. Epub 2016 Apr 6.

Table 1. Genotypic and allelic frequencies of Catalase rs1004179 (c.-262 C>T) in patients and controls groups and odds ratio (OD) estimates for in cutaneous Leishmania (Viannia) guyanensis by gender.

Catalase - rs1001179 (c.-262 C>T)									
GROUPS	MALE		OD (IC 95%) p-value	FEMALE		OD (IC 95%) p-value	TOTAL		OD (IC 95%) p-value
	Patients	Controls		Patients	Controls		Patients	Controls	
Genotypes	N=584 (%)	N=495 (%)		N=184 (%)	N=249 (%)		N=768 (%)	N=744 (%)	
CC	364 (62.3)	279 (56.4)	<u>CC vs. CT</u> 1.29 (1.01 - 1.62) 0.041	114 (62.0)	174 (69.9)	<u>CC vs. CT</u> 0.68 (0.45 - 1.04) 0.087	478 (62.2)	453 (60.9)	<u>CC vs. CT</u> 1.06 (0.86 - 1.31) 0.631
CT	212 (36.3)	210 (42.4)	<u>CC vs. TT</u> 0.98 (0.33 - 2.82) 0.968	63 (34.2)	66 (26.5)	<u>CC vs. TT</u> 0.84 (0.30 - 2.32) 0.740	275 (35.8)	276 (37.1)	<u>CC vs. TT</u> 1.06 (0.51 - 2.18) 0.885
TT	8 (1.4)	6 (1.2)	<u>CC vs. CT+TT</u> 1.28 (1.04 - 1.63) 0.047	7 (3.8)	9 (3.6)	<u>CC vs. CT+TT</u> 0.71 (0.47 - 1.05) 0.104	15 (2.0)	15 (2.0)	<u>CC vs. CT+TT</u> 1.1 (0.86 - 1.30) 0.626
Allele Frequencies									
C	0.728	0.776		0.791	0.831		0.801	0.794	
T	0.172	0.224		0.209	0.169		0.199	0.206	

Table 2. Genotypic and allelic frequencies of Myeloperoxidase - rs2333227 (c.-463 G>A) in patients and controls groups and odds ratio (OD) estimates for in cutaneous Leishmania (Viannia) guyanensis by gender.

Myeloperoxidase - rs2333227 (c.-463 G>A)									
GROUPS	MALE		OD (IC 95%) p-value	FEMALE		OD (IC 95%) p-value	TOTAL		OD (IC 95%) p-value
	Patients	Controls		Patients	Controls		Patients	Controls	
Genotypes	N=584 (%)	N=495 (%)		N=184 (%)	N=249 (%)		N=768 (%)	N=744 (%)	
GG	315 (54.1)	310 (62.6)	<u>GG vs. GA</u> 0.69 (0.53 - 0.96) 0.005	101 (54.9)	142 (57.1)	<u>GG vs. GA</u> 0.79 (0.53 - 1.18) 0.294	416 (54.2)	452 (60.8)	<u>GG vs. GA</u> 0.73 (0.59 - 0.90) 0.004
GA	242 (41.4)	165 (33.3)	<u>GG vs. AA</u> 0.75 (0.41 - 1.37) 0.435	79 (42.9)	88 (35.3)	<u>GG vs. AA</u> 3.38 (1.1 - 10.2) 0.041	321 (41.8)	253 (34.0)	<u>GG vs. AA</u> 1.16 (0.71 - 1.90) 0.644
AA	27 (4.6)	20 (4.1)	<u>GG vs. GA+AA</u> 0.69 (0.54 - 0.89) 0.005	4 (2.2)	19 (7.6)	<u>GG vs. GA+AA</u> 0.91 (0.62 - 1.34) 0.73	31 (4.0)	39 (5.2)	<u>GG vs. GA+AA</u> 0.76 (0.62 - 0.94) 0.011
Allele Frequencies									
G	0.746	0.763		0.764	0.747		0.751	0.778	
A	0.254	0.237		0.236	0.253		0.249	0.222	

Table 3. Genotypic and allelic frequencies of NADPH oxidase – rs4673 (c.242 C>T) in patients and controls groups and odds ratio (OD) estimates for in cutaneous Leishmania (Viannia) guyanensis by gender.

NADPH oxidase – rs4673 (c.242 C>T)									
GROUPS	MALE		OD (IC 95%) p-value	FEMALE		OD (IC 95%) p-value	TOTAL		OD (IC 95%) p-value
	Patients	Controls		Patients	Controls		Patients	Controls	
Genotypes	N=584 (%)	N=495 (%)		N=184 (%)	N=249 (%)		N=768 (%)	N=744 (%)	
CC	300 (51.4)	315 (63.6)	<u>CC vs. CT</u> 0.59 (0.46 - 0.76) <0.001	86 (46.7)	108 (43.4)	<u>CC vs. CT</u> 1.1 (0.73 - 1.59) 0.779	386 (50.3)	423 (56.9)	<u>CC vs. CT</u> 0.74 (0.6 - 0.91) 0.005
CT	259 (44.3)	161 (32.6)	<u>CC vs. TT</u> 0.72 (0.39 - 1.35) 0.382	90 (48.9)	122 (49.0)	<u>CC vs. TT</u> 1.89 (0.79 - 4.53) 0.215	349 (45.4)	283 (38.0)	<u>CC vs. TT</u> 1.05 (0.65 - 1.71) 0.94
TT	25 (4.3)	19 (3.8)	<u>CC vs. CT+TT</u> 0.60 (0.47 - 0.77) <0.001	8 (4.4)	19 (7.6)	<u>CC vs. CT+TT</u> 1.2 (0.78 - 1.68) 0.550	33 (4.3)	38 (5.1)	<u>CC vs. CT+TT</u> 0.77 (0.63 - 0.94) 0.012
Allele Frequencies									
C	0.736	0.799		0.712	0.679		0.730	0.759	
T	0.264	0.201		0.288	0.321		0.270	0.241	

Table 4. Genotypic and allelic frequencies of Endothelial Nitric Oxide Synthase - rs2070744 (c.-786 C>T) in patients and controls groups and odds ratio (OD) estimates for in cutaneous Leishmania (Viannia) guyanensis by gender.

Endothelial Nitric Oxide Synthase - rs2070744 (c.-786 T>C)									
GROUPS	MALE		OD (IC 95%) p-value	FEMALE		OD (IC 95%) p-value	TOTAL		OD (IC 95%) p-value
	Patients	Controls		Patients	Controls		Patients	Controls	
Genotypes	N=584 (%)	N=495 (%)		N=184 (%)	N=249 (%)		N=768 (%)	N=744 (%)	
TT	223 (38.2)	222 (44.9)	<u>TT vs. TC</u> 0.75 (0.58 - 0.96) 0.026	82 (44.5)	115 (46.2)	<u>TT vs. TC</u> <i>0.80 (0.54 - 1.19)</i> <i>0.312</i>	305 (39.7)	337 (45.3)	<u>TT vs. TC</u> 0.75 (0.61 - 0.93) 0.008
TC	333 (57)	248 (50.0)	<u>TT vs. CC</u> <i>0.89 (0.51 - 1.59)</i> <i>0.818</i>	98 (53.3)	110 (44.2)	<u>TT vs. CC</u> 4.4 (1.43 - 12.79) 0.010	431 (56.1)	358 (48.1)	<u>TT vs. CC</u> <i>1.34 (0.87 - 2.22)</i> <i>0.214</i>
CC	28 (4.8)	25 (5.1)	<u>TT vs. TC+CC</u> 0.76 (0.60 - 0.97) 0.031	4 (2.2)	24 (9.6)	<u>TT vs. TC+CC</u> <i>0.94 (0.64 - 1.37)</i> <i>0.813</i>	32 (4.2)	49 (6.6)	<u>TT vs. TC+CC</u> 0.80 (0.65 - 0.98) 0.032
Allele Frequencies									
T	0.667	0.699		0.712	0.683		0.677	0.694	
C	0.333	0.301		0.288	0.317		0.323	0.306	

Table 5. Genotypic and allelic frequencies of Transforming Growth Factor Beta - rs1800469 (c.-509 C>T) in patients and controls groups and odds ratio (OD) estimates for in cutaneous Leishmania (Viannia) guyanensis by gender.

Transforming Growth Factor Beta - rs1800469 (c.-509 C>T)									
GROUPS	MALE		OD (IC 95%) p-value	FEMALE		OD (IC 95%) p-value	TOTAL		OD (IC 95%) p-value
	Patients	Controls		Patients	Controls		Patients	Controls	
Genotypes	N=584 (%)	N=495 (%)		N=184 (%)	N=249 (%)		N=768 (%)	N=744 (%)	
CC	157 (26.9)	180 (36.4)	<u>CC vs. CT</u> 0.61 (0.46 - 0.80) <0.001	37 (20.1)	83 (33.3)	<u>CC vs. CT</u> 0.61 (0.38 - 0.98) 0.04	194 (25.3)	263 (35.3)	<u>CC vs. CT</u> 0.63 (0.5 - 0.79) <0.001
CT	322 (55.1)	224 (45.2)	<u>CC vs. TT</u> 0.76 (0.53 - 1,08) 0.143	94 (51.1)	129 (51.8)	<u>CC vs. TT</u> 0.31 (0.18 - 0.55) <0.001	416 (54.1)	353 (47.5)	<u>CC vs. TT</u> 0.60 (0.44 - 0.81) 0.001
TT	105 (18.0)	91 (18.4)	<u>CC vs. CT+TT</u> 0.84 (0.65 - 1.09) 0.220	53 (28.8)	37 (14.9)	<u>CC vs. CT+TT</u> 0.51 (0.32 - 0.79) 0.002	158 (20.5)	128 (17.2)	<u>CC vs. CT+TT</u> 0.62 (0.5 - 0.77) <0.001
Allele Frequencies									
T	0.545	0.589		0.456	0.592		0.523	0.591	
C	0.455	0.411		0.544	0.408		0.477	0.409	

Table 6. Genotypic and allelic frequencies of Mitochondrial Superoxide Dismutase 2- rs4880 (c.47 C>T) in patients and controls groups and odds ratio (OD) estimates for in cutaneous Leishmania (Viannia) guyanensis by gender.

Mitochondrial Superoxide Dismutase 2- rs4880 (c.47 C>T)									
GROUPS	MALE		OD (IC 95%) p-value	FEMALE		OD (IC 95%) p-value	TOTAL		OD (IC 95%) p-value
	Patients	Controls		Patients	Controls		Patients	Controls	
Genotypes	N=584 (%)	N=495 (%)		N=184 (%)	N=249 (%)		N=768 (%)	N=744 (%)	
CC	173 (29.7)	109 (22.1)	<u>CC vs. CT</u> 1.57 (1.18 - 2.09) 0.002	58 (31.5)	47 (18.9)	<u>CC vs. CT</u> 2.07 (1.31 - 3.28) 0.003	231 (30.1)	156 (21.0)	<u>CC vs. CT</u> 1.7 (1.34 - 2.17) <0.001
CT	322 (55.1)	318 (64.2)	<u>CC vs. TT</u> 1.21 (0.82 - 1.83) 0.394	97 (52.7)	163 (65.4)	<u>CC vs. TT</u> 1.66 (0.90 - 3.07) 0.144	419 (54.5)	481 (64.6)	<u>CC vs. TT</u> 1.34 (0.96 - 1.87) 0.097
TT	89 (15.2)	68 (13.7)	<u>CC vs. CT+TT</u> 1.49 (1.13 - 1.97) 0.006	29 (15.8)	39 (15.7)	<u>CC vs. CT+TT</u> 1.98 (1.27 - 3.09) 0.003	118 (15.4)	107 (14.4)	<u>CC vs. CT+TT</u> 1.62 (1.28 - 2.05) <0.001
Allele Frequencies									
T	0.572	0.541		0.579	0.516		0.574	0.533	
C	0.428	0.459		0.421	0.484		0.426	0.467	

Table 7. Genotypic and allelic frequencies of Inducible Nitric Oxide Synthase - rs1800482 (c.-954 G>C) in patients and controls groups and odds ratio (OD) estimates for in cutaneous Leishmania (Viannia) guyanensis by gender.

Inducible Nitric Oxide Synthase - rs1800482 (c.-954 G>C)									
GROUPS	MALE		OD (IC 95%) p-value	FEMALE		OD (IC 95%) p-value	TOTAL		OD (IC 95%) p-value
	Patients	Controls		Patients	Controls		Patients	Controls	
Genotypes	N=584 (%)	N=495 (%)		N=184 (%)	N=249 (%)		N=768 (%)	N=744 (%)	
GG	567 (97.1)	468 (94.5)		180 (97.8)	244 (98.0)		747 (97.3)	712 (95.7)	
GC	16 (2.7)	26 (5.3)	4 (2.2)	5 (2.0)	20 (2.6)	31 (4.2)			
CC	1 (0.2)	1 (0.2)	0	0	1 (0.1)	1 (0.1)			
Allele Frequencies									
G	0.984	0.972		0.989	0.990		0.986	0.978	
C	0.016	0.028		0.011	0.010		0.014	0.022	

Table 8. Significant associations found between elevated and/or decreased concentrations of cytokines and the mutant homozygous genotypes of the polymorphisms studied.

Cytokines	GENE											
	Ref SNP identifier											
	Nucleotide Variation (Alternative)											
	CAT rs1001179 c.-262TT		MPO rs2333227 c.-463AA		NOX2 rs4673 c.242TT		NOS3 rs2070744 c.-786CC		TGF-1B rs1800469 c.-509TT		SOD2 rs4880 c.47TT	
	Patient	Control	Patient	Control	Patient	Control	Patient	Control	Patient	Control	Patient	Control
IL-13	↓		↓	↓			↑	↑	↓		↓	↑
MCP-1		↑	↑	↓	↓	↑	↑	↓				
IL-2			↓	↓			↑		↓	↑	↓	
IFN- γ	↓				↓				↓	↓	↓	
PDGF-BB	↓	↓										↓
IL-6		↑							↓		↓	
IL-8	↓								↓		↓	
IL1- β									↓		↓	↑
IL-9		↓					↑	↓	↓			
IL-1Ra	↑		↓						↓			
FGF-Basic									↓	↓	↓	
IL-7			↑	↓			↑					
IL-10	↓				↓	↑						
IL-12	↓	↓						↓				
MIP-1A							↓				↓	↑
IL-5			↑			↑						
EOTAXIN		↑			↓							
IL-4			↑	↑								
IL-15				↓	↓							
IL-17	↓				↑							
RANTES			↑					↓				
IP-10		↑	↑									
TNF- α	↑				↓			↓				
G-CSF			↑									
VEGF	↓											

RefSNP accession ID (rs number): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>

Empty: Not Significant Found

□: Serum Concentrations Significantly Elevated

©: Serum Concentrations Significantly Decreased

CAT: Catalase

MPO: Myeloperoxidase

NOX2: NAD(P)H Oxidase

NOS3: Endothelial Nitric Oxide Synthase

TGFB1: Transforming Growth Factor Beta 1

SOD2: Mitochondrial Superoxide Dismutase

Figure 1A. Significant differences observed between Catalase - rs1001179 (c.-262 C>T) genotypes and plasma concentrations cytokines in the CL patients and healthy controls.

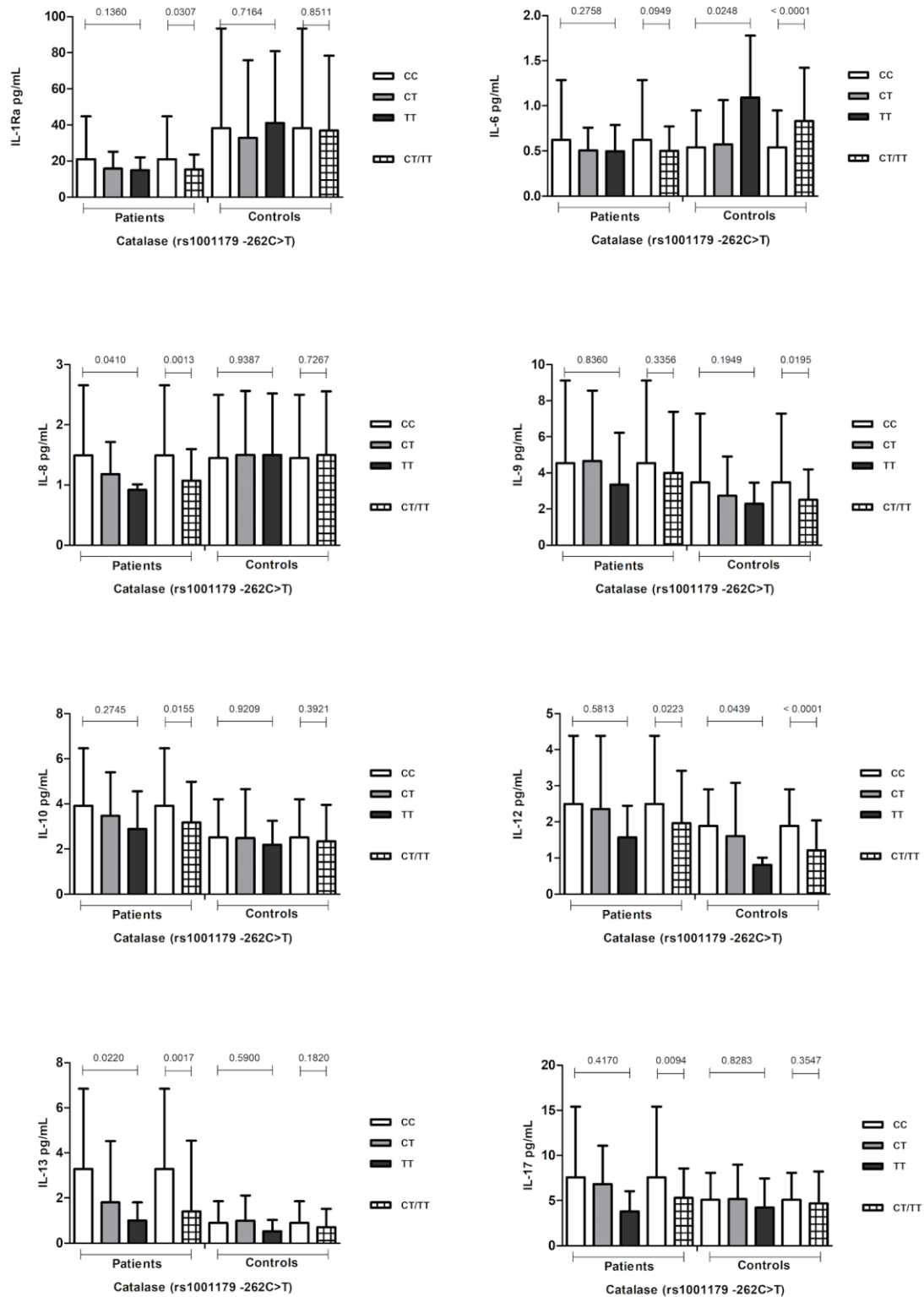


Figure 1B. Significant differences observed between Catalase - rs1001179 (c.-262 C>T) genotypes and plasma concentrations cytokines in the CL patients and healthy controls.

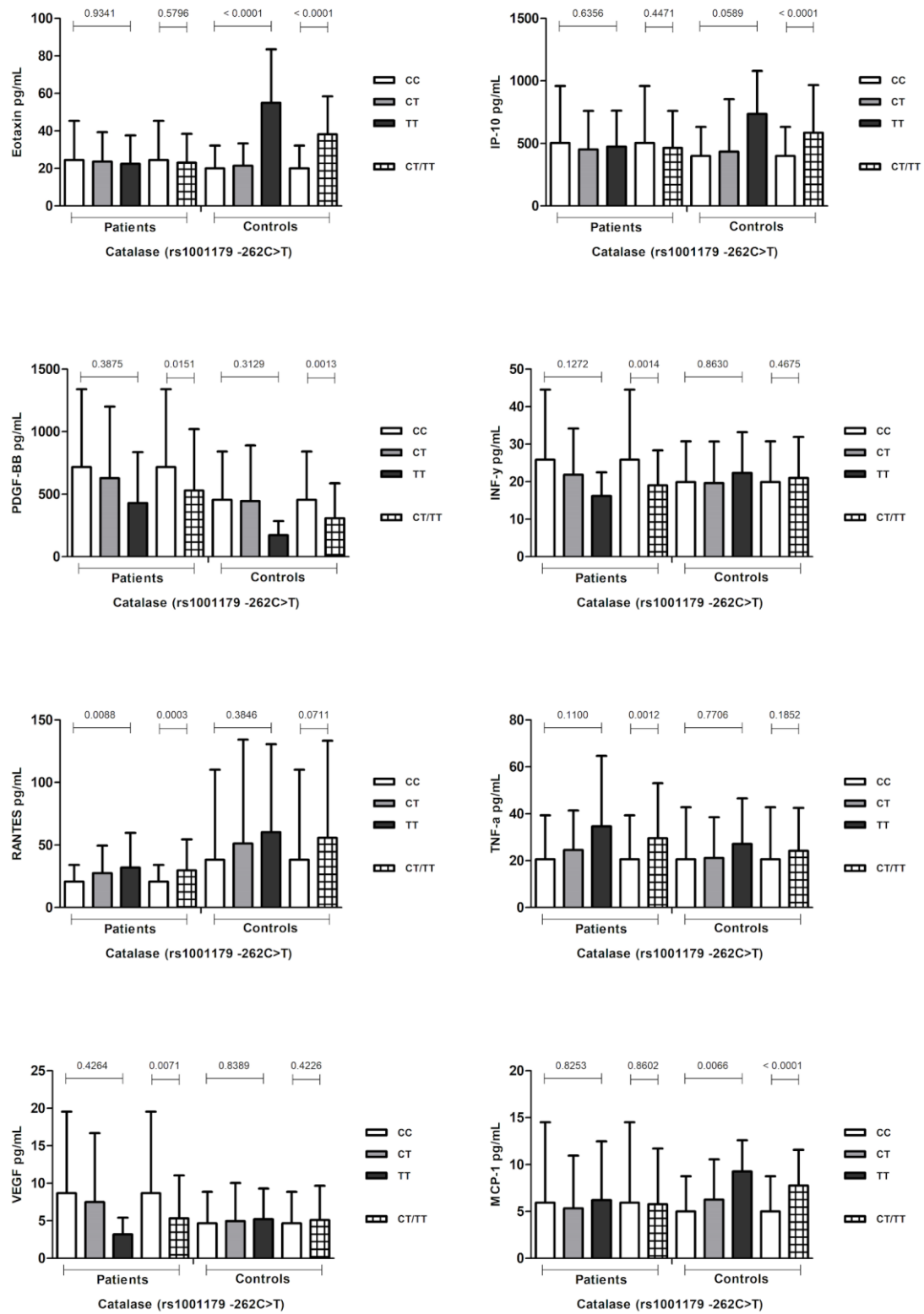


Figure 2A. Significant differences observed between Myeloperoxidase - rs2333227 (c.-463 G>A) genotypes and plasma concentrations cytokines in the CL patients and healthy controls.

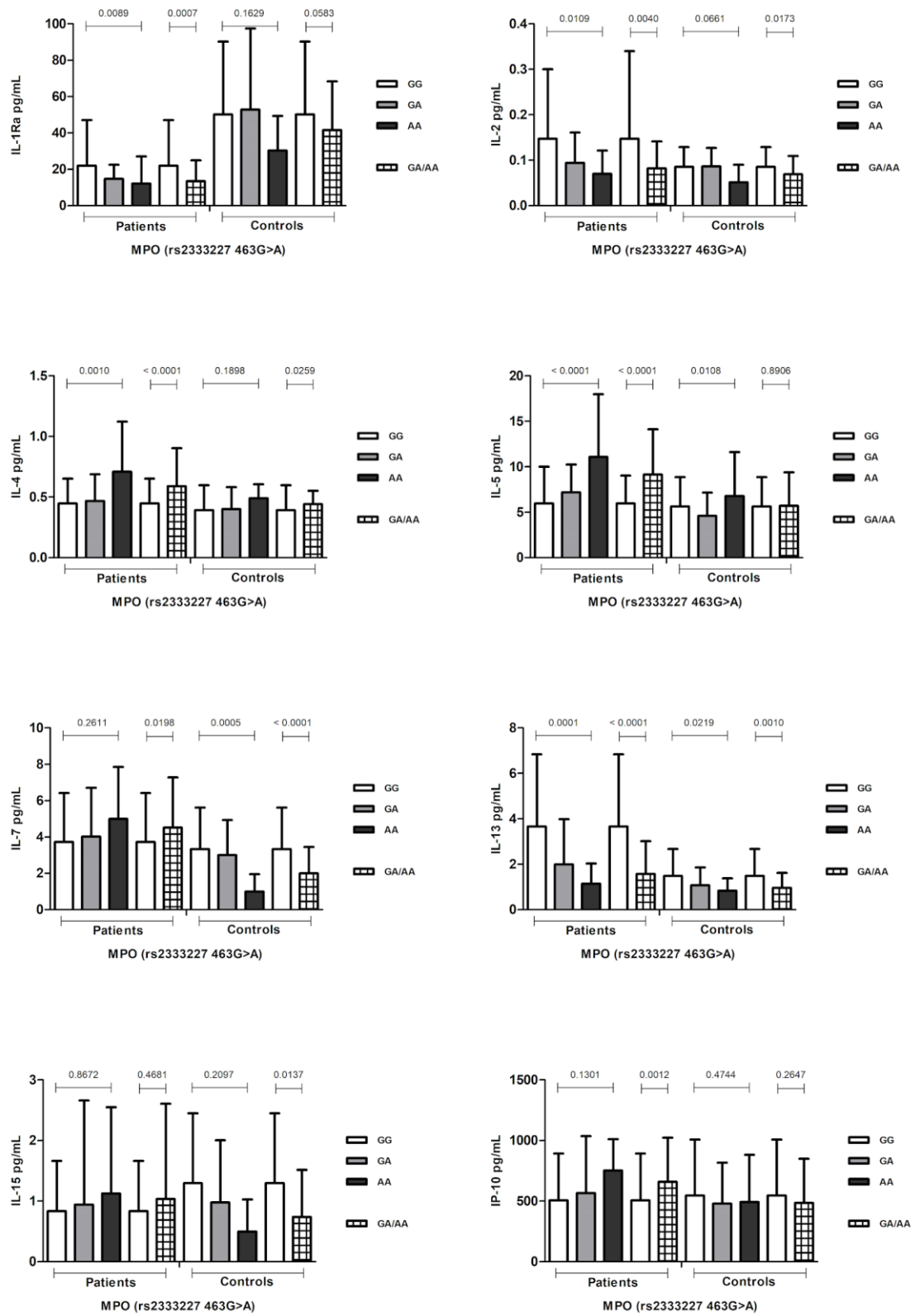


Figure 2B. Significant differences observed between Myeloperoxidase - rs2333227 (c.-463 G>A) genotypes and plasma concentrations cytokines in the CL patients and healthy controls.

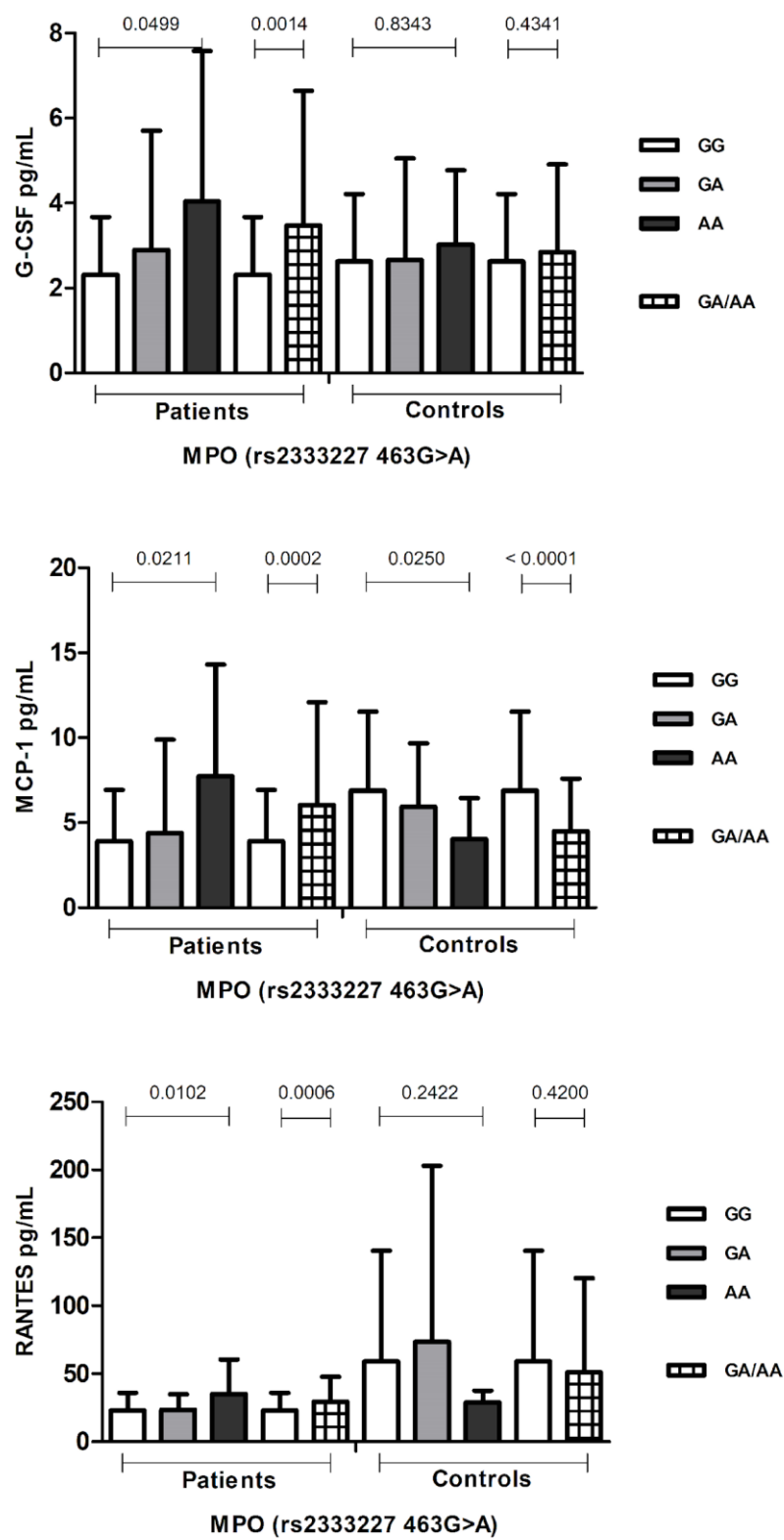


Figure 3A. Significant differences observed between NADPH oxidase – rs4673 (c.242 C>T) genotypes and plasma concentrations cytokines in the CL patients and healthy controls.

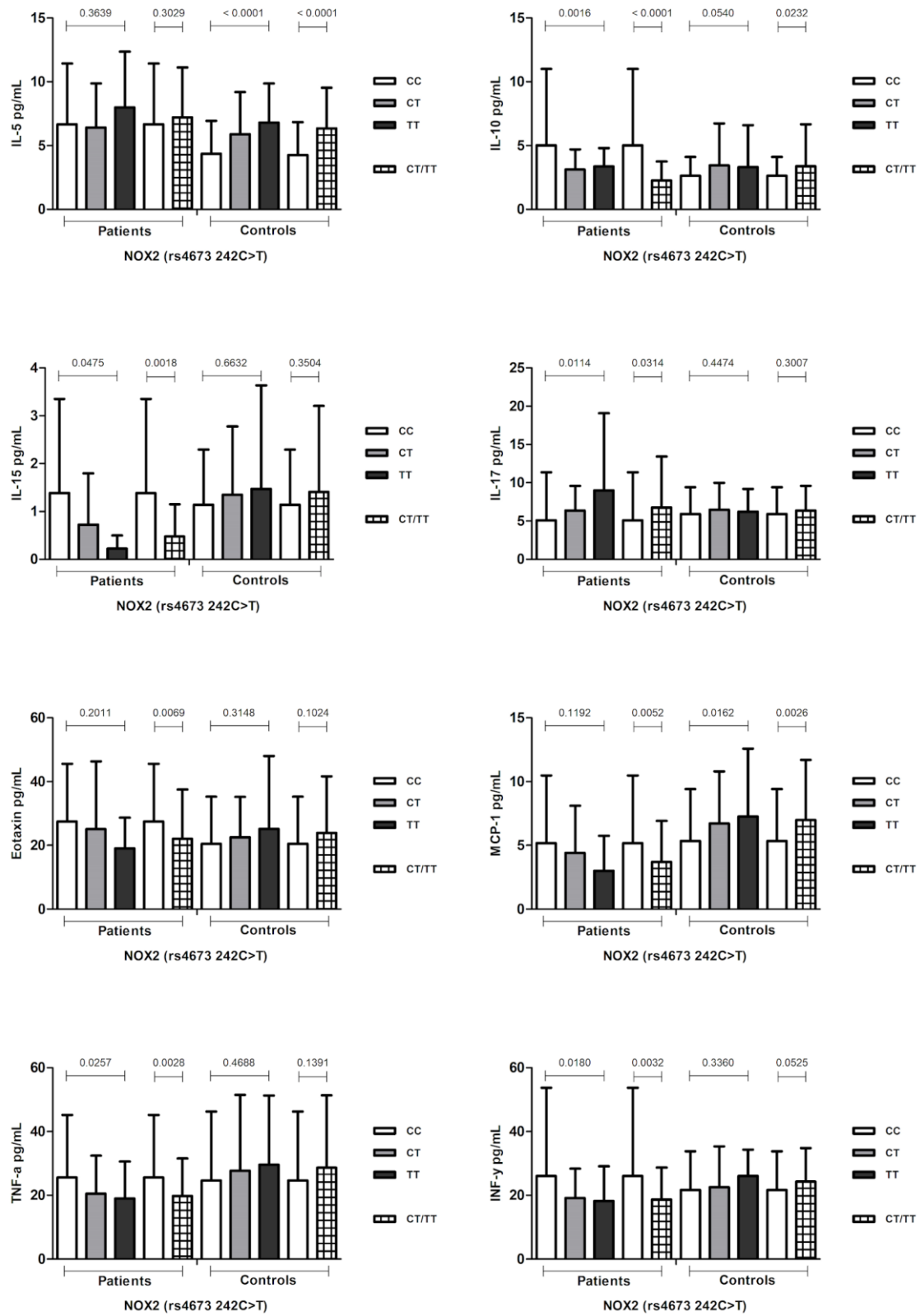


Figure 4A. Significant differences observed between Endothelial Nitric Oxide Synthase - rs2070744 (c.-786 T>C) genotypes and plasma concentrations cytokines in the CL patients and healthy controls.

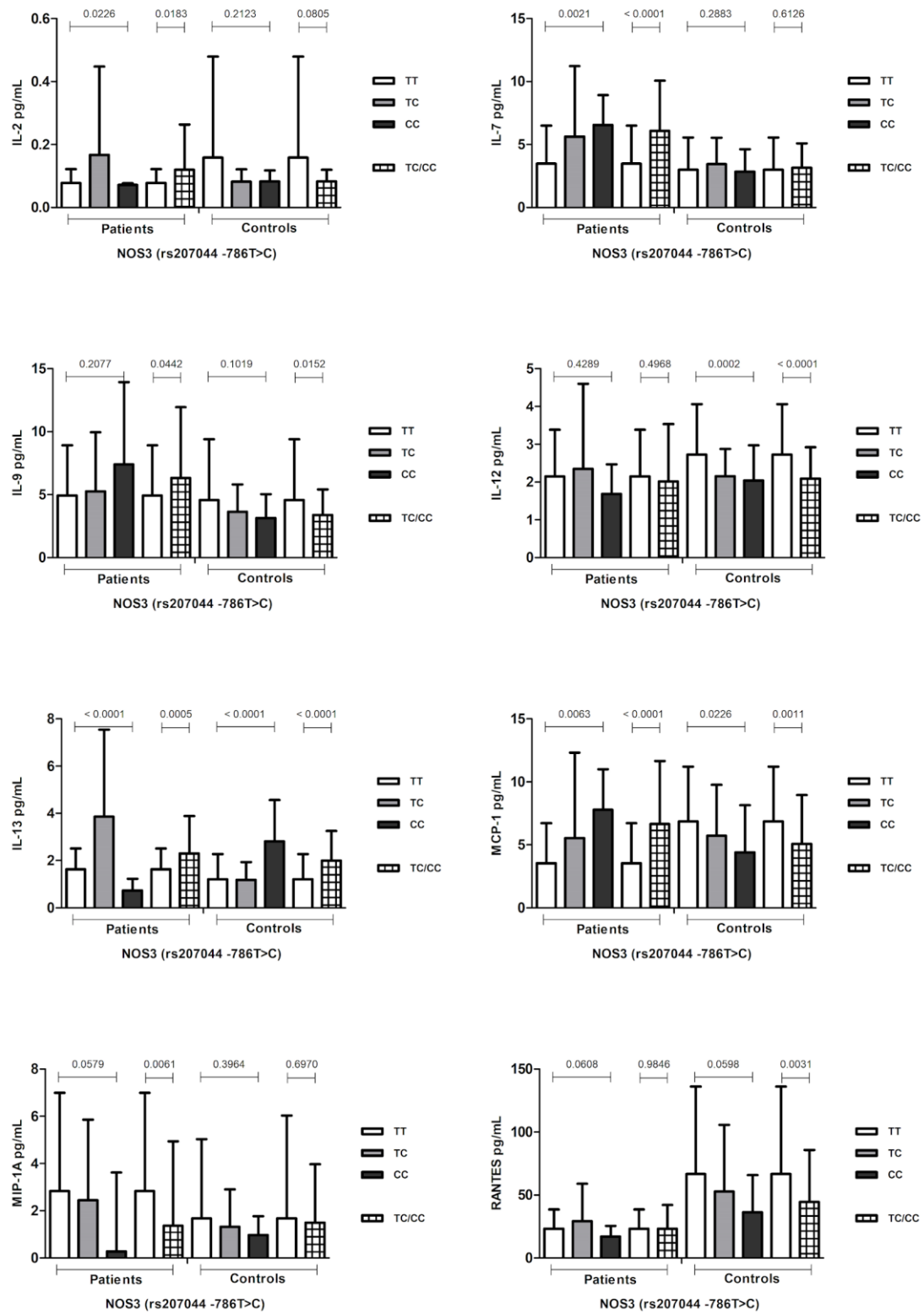


Figure 5A. Significant differences observed between Transforming Growth Factor Beta - rs1800469 (c.-509 C>T) genotypes and plasma concentrations cytokines in the CL patients and healthy controls.

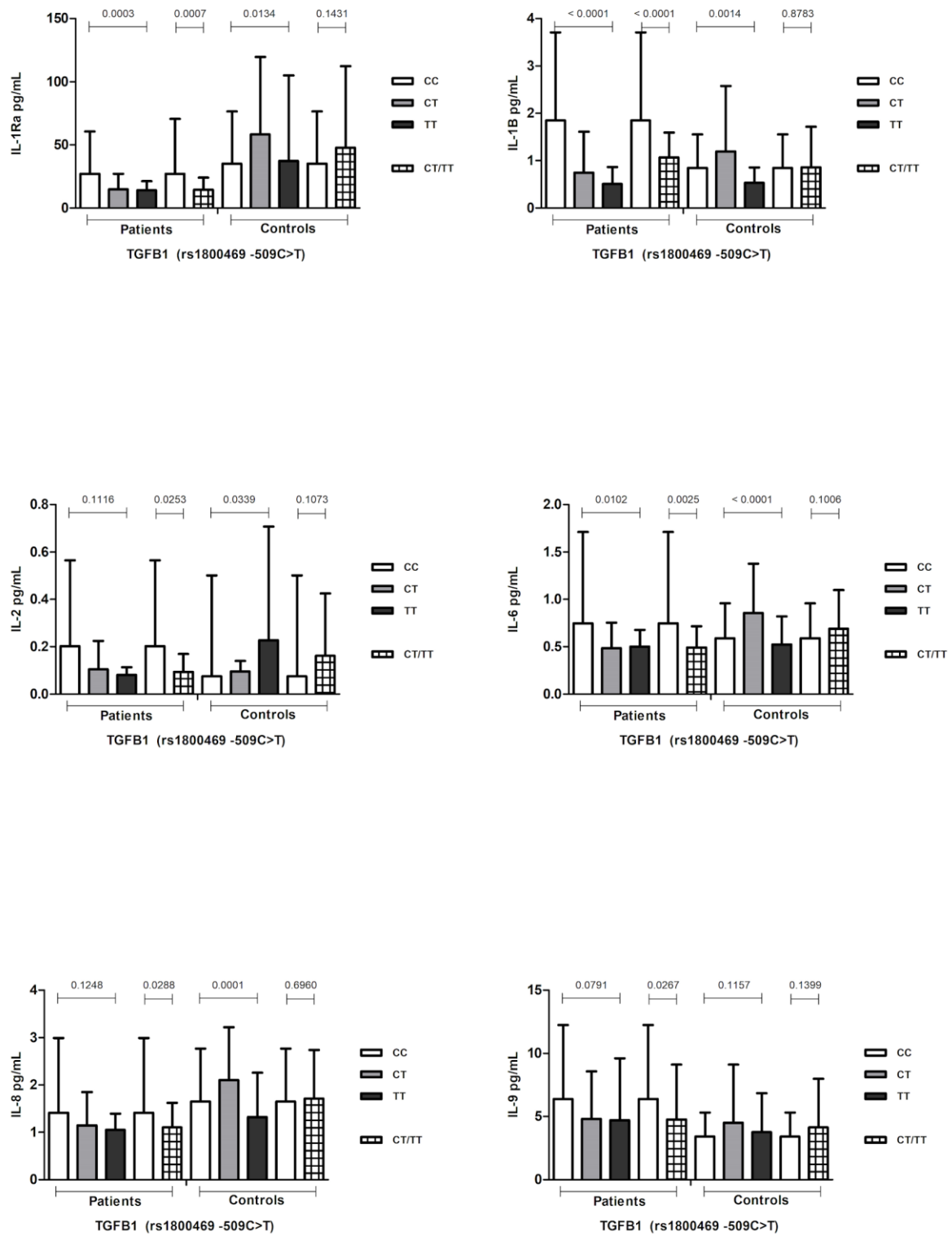


Figure 5B. Significant differences observed between Transforming Growth Factor Beta - rs1800469 (c.-509 C>T) genotypes and plasma concentrations cytokines in the CL patients and healthy controls.

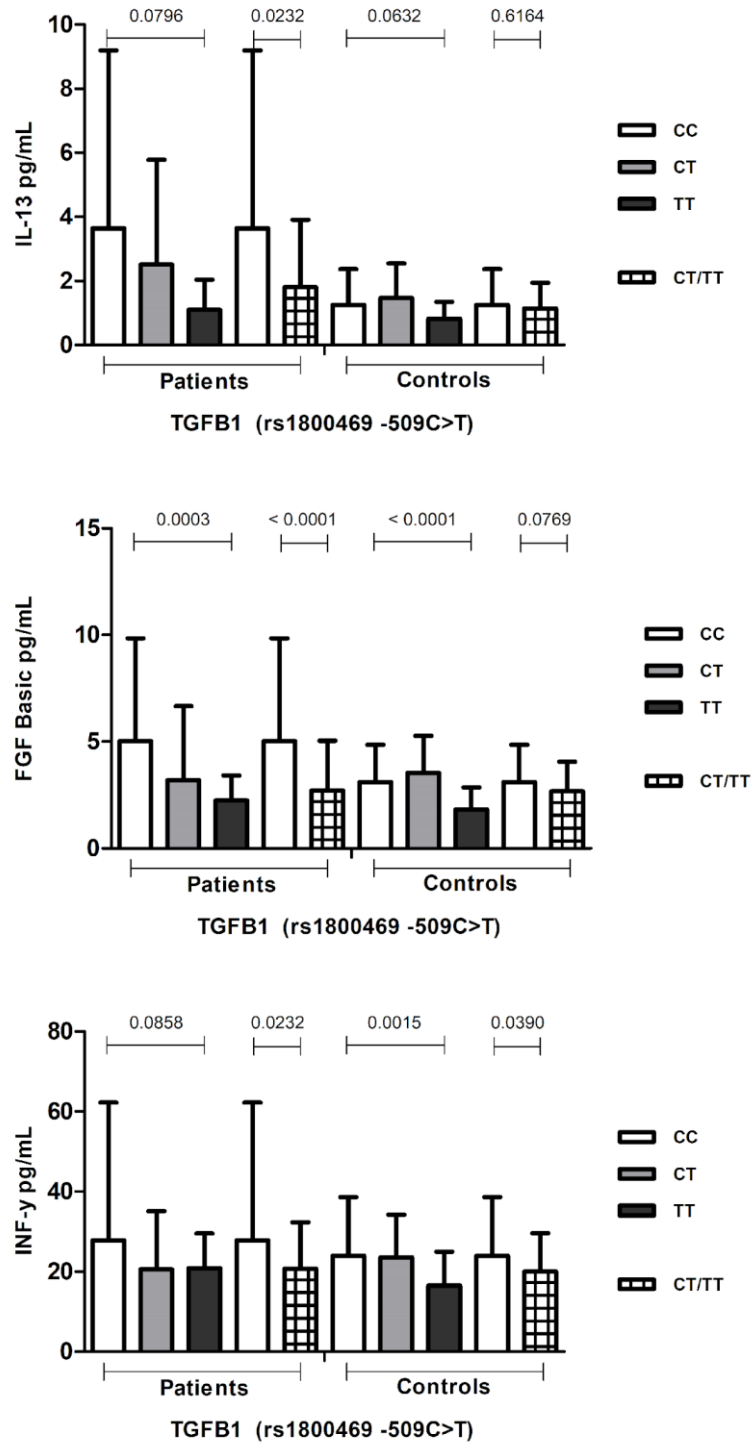


Figure 6A. Significant differences observed between Mitochondrial Superoxide Dismutase 2- rs4880 (c.47 C>T) genotypes and plasma concentrations cytokines in the CL patients and healthy controls.

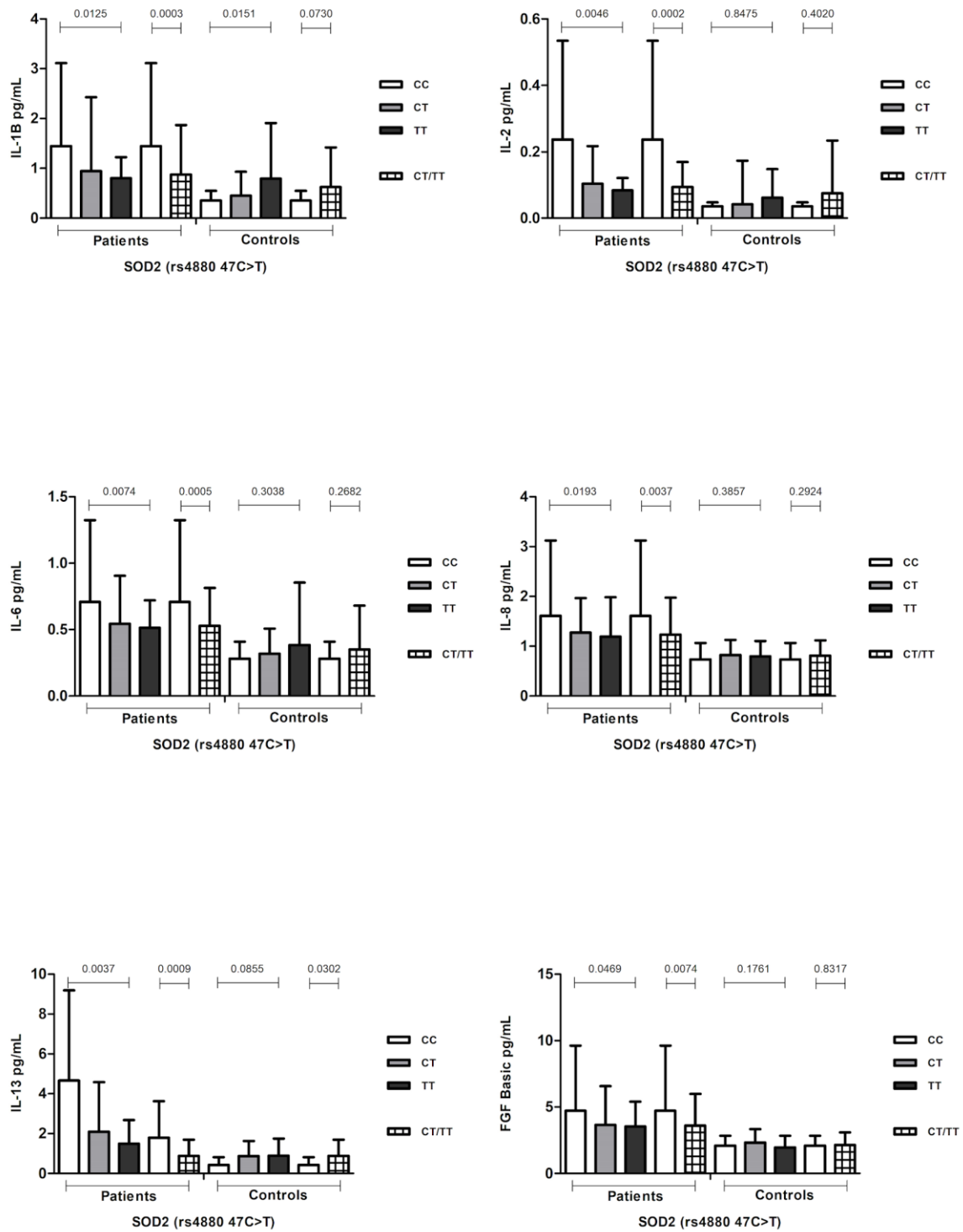


Figure 6B. Significant differences observed between Mitochondrial Superoxide Dismutase 2- rs4880 (c.47 C>T) genotypes and plasma concentrations cytokines in the CL patients and healthy controls.

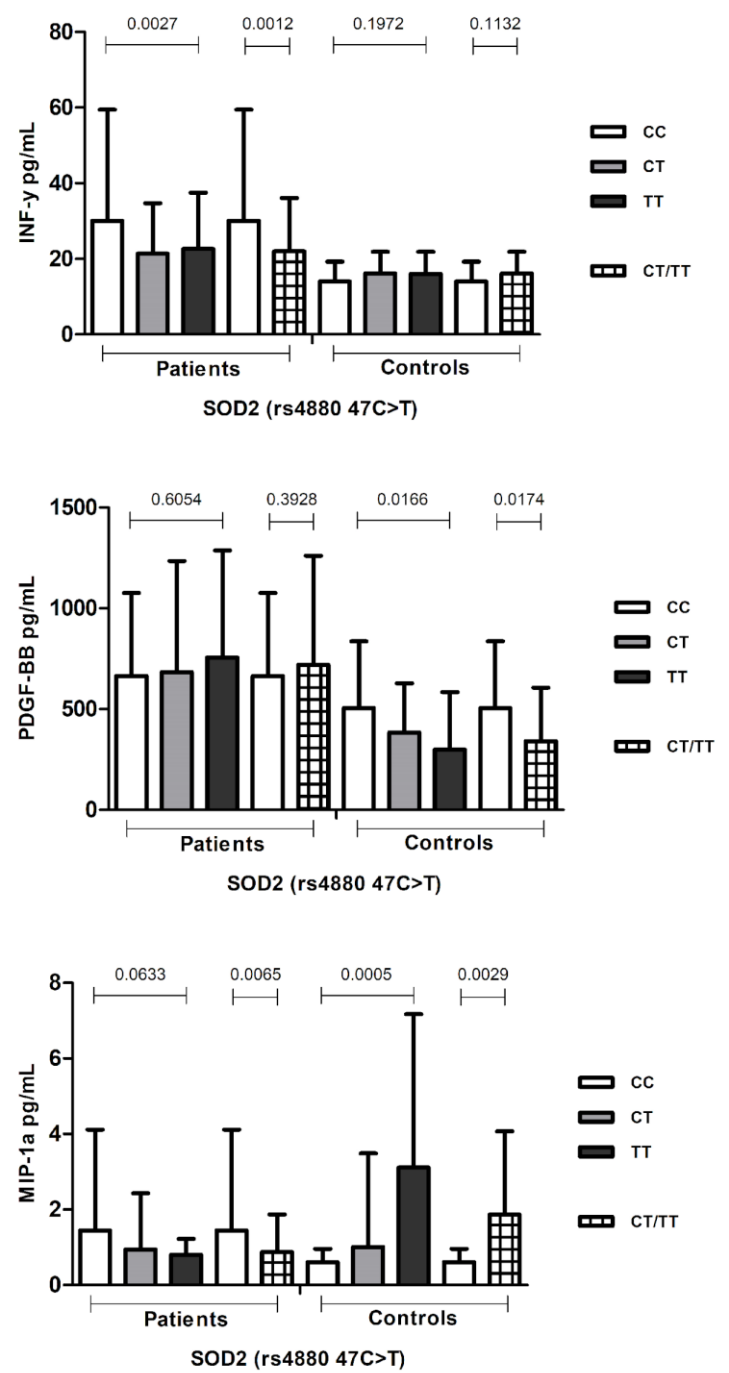


Figure 1C. Spearman rank correlation showing how plasma cytokine concentrations vary between wild-type and mutant genotypes in the Catalase - rs1001179 (c.-262 C>T) in CL patients and healthy controls. The intense blue color demonstrates strong correlations ($r > 0.70 - p < 0.0001$).

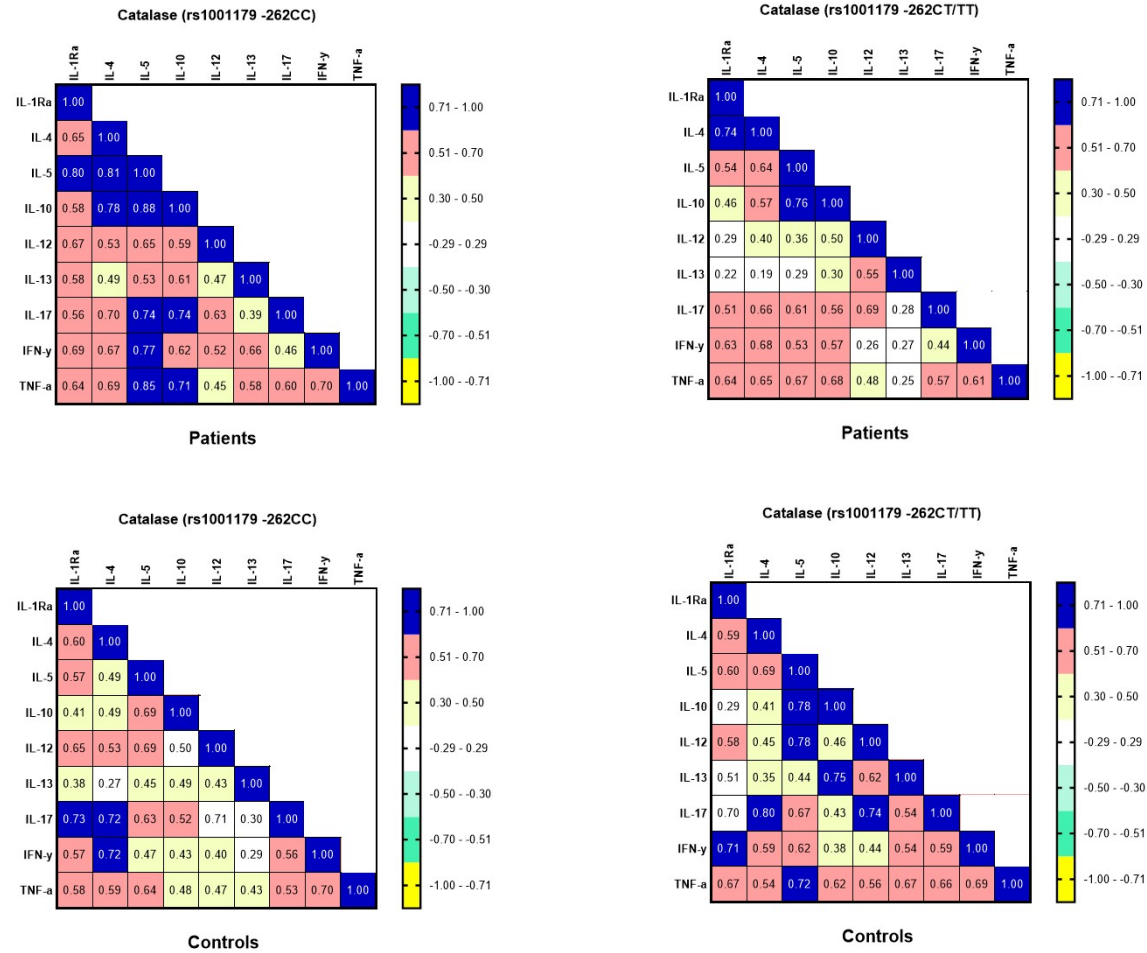


Figure 2C. Spearman rank correlation showing how plasma cytokine concentrations vary between wild-type and mutant genotypes in the Myeloperoxidase -rs2333227 (c.-463 G>A) in CL patients and healthy controls. The intense blue color demonstrates strong correlations ($r > 0.70 - p < 0.0001$).

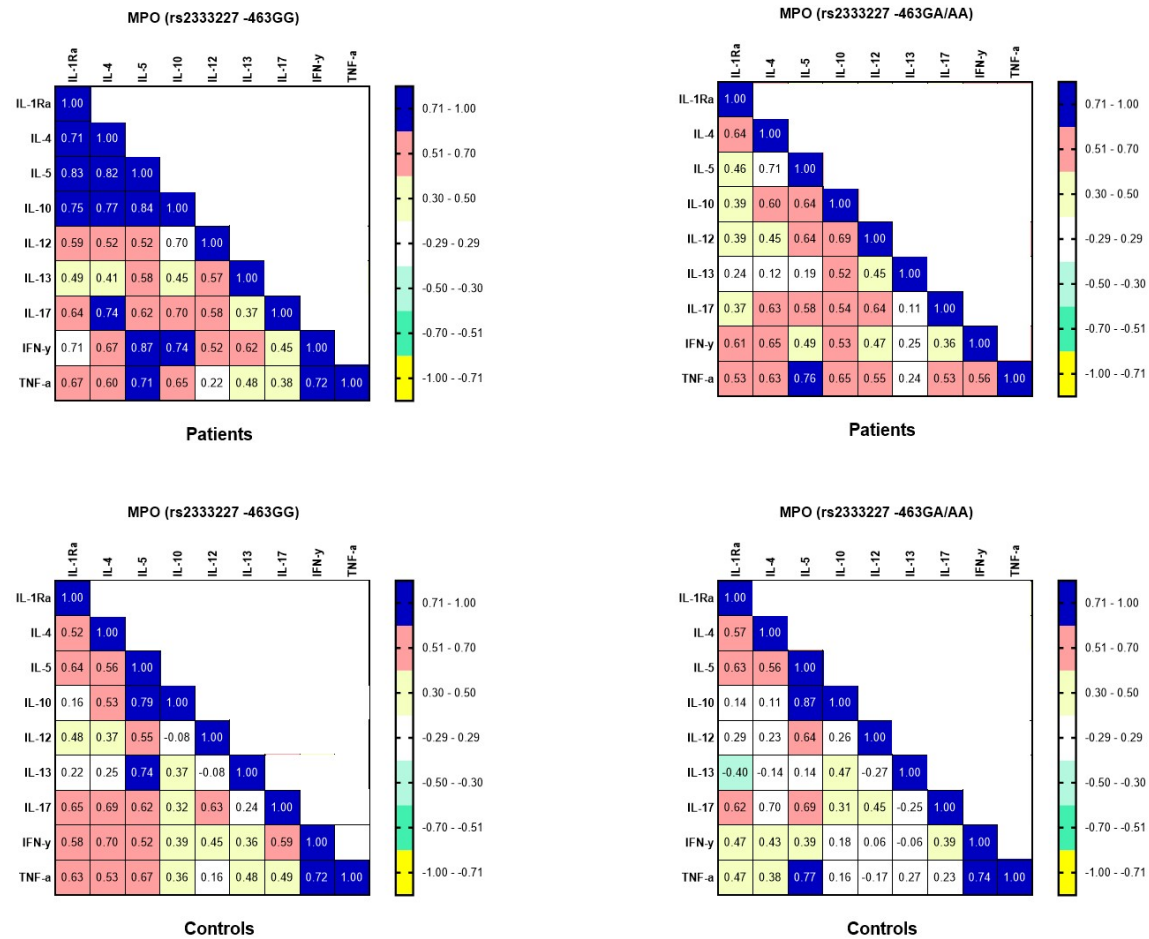


Figure 3B. Spearman rank correlation showing how plasma cytokine concentrations vary between wild-type and mutant genotypes in the NADPH oxidase – rs4673 (c.242 C>T) in CL patients and healthy controls. The intense blue color demonstrates strong correlations ($r > 0.70 - p < 0.0001$).

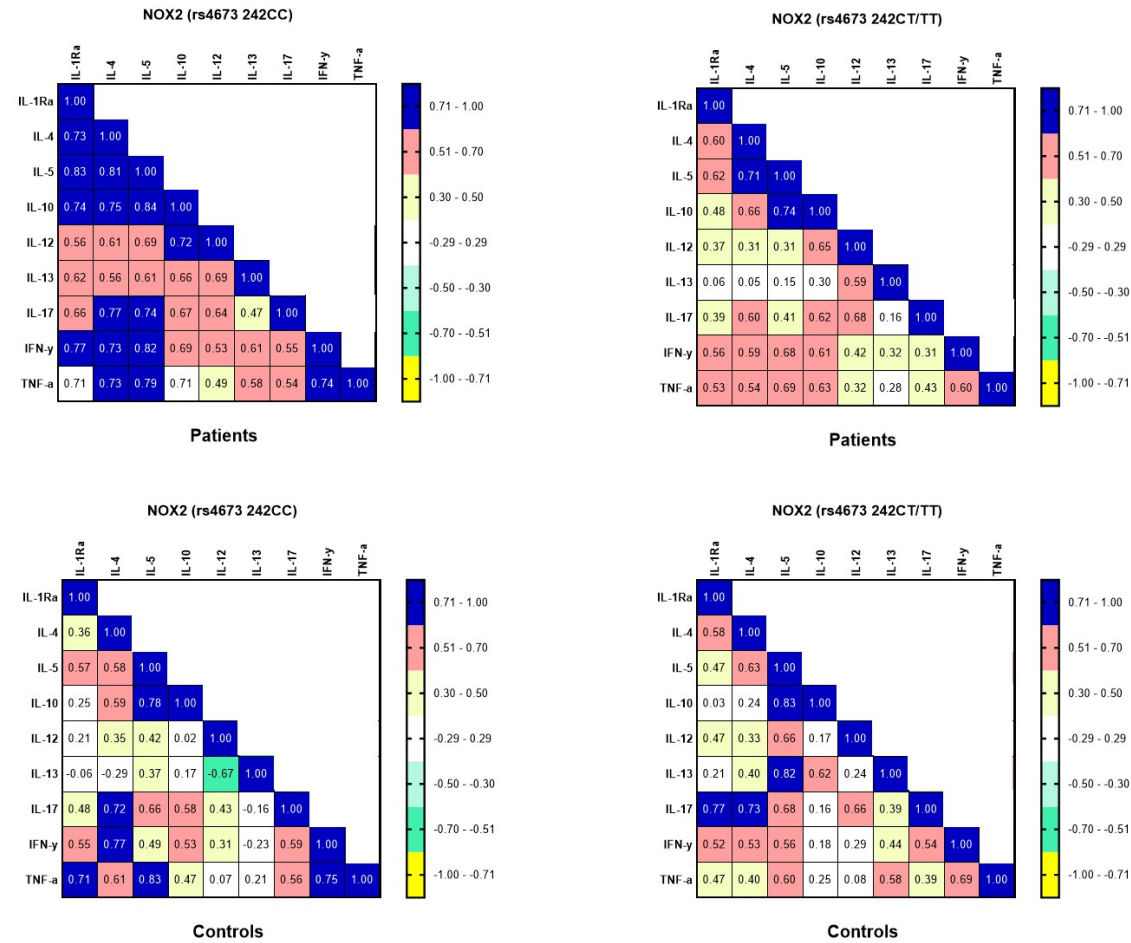


Figure 4B. Spearman rank correlation showing how plasma cytokine concentrations vary between wild-type and mutant genotypes in the Endothelial Nitric Oxide Synthase - rs2070744 (c.-786 T>C) in CL patients and healthy controls. The intense blue color demonstrates strong correlations ($r > 0.7$ – $p < 0.0001$).

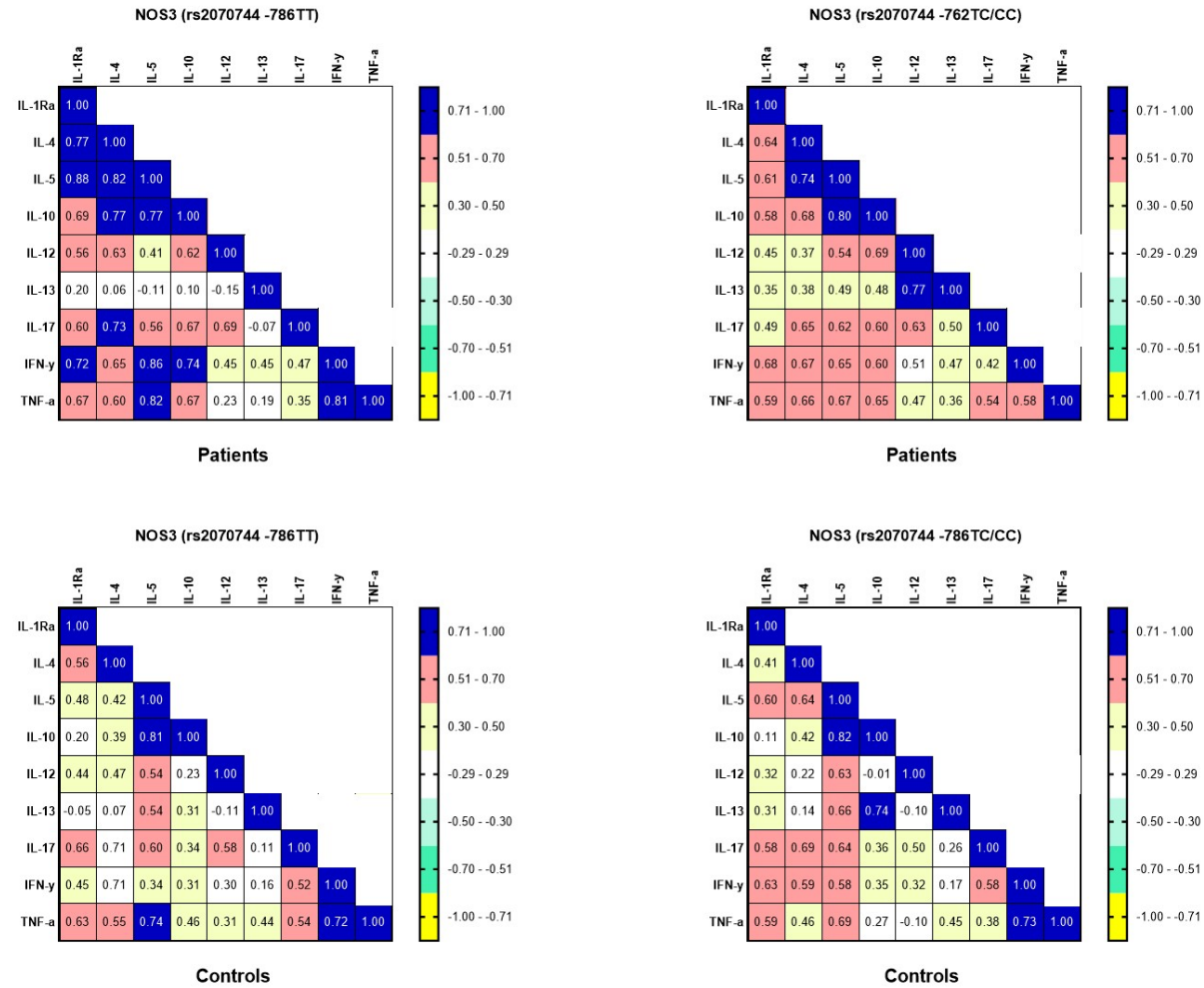


Figure 5C. Spearman rank correlation showing how plasma cytokine concentrations vary between wild-type and mutant genotypes in the Transforming Growth Factor Beta - rs1800469 (c.-509 C>T) in CL patients and healthy controls. The intense blue color demonstrates strong correlations ($r > 0.70 - p < 0.0001$).

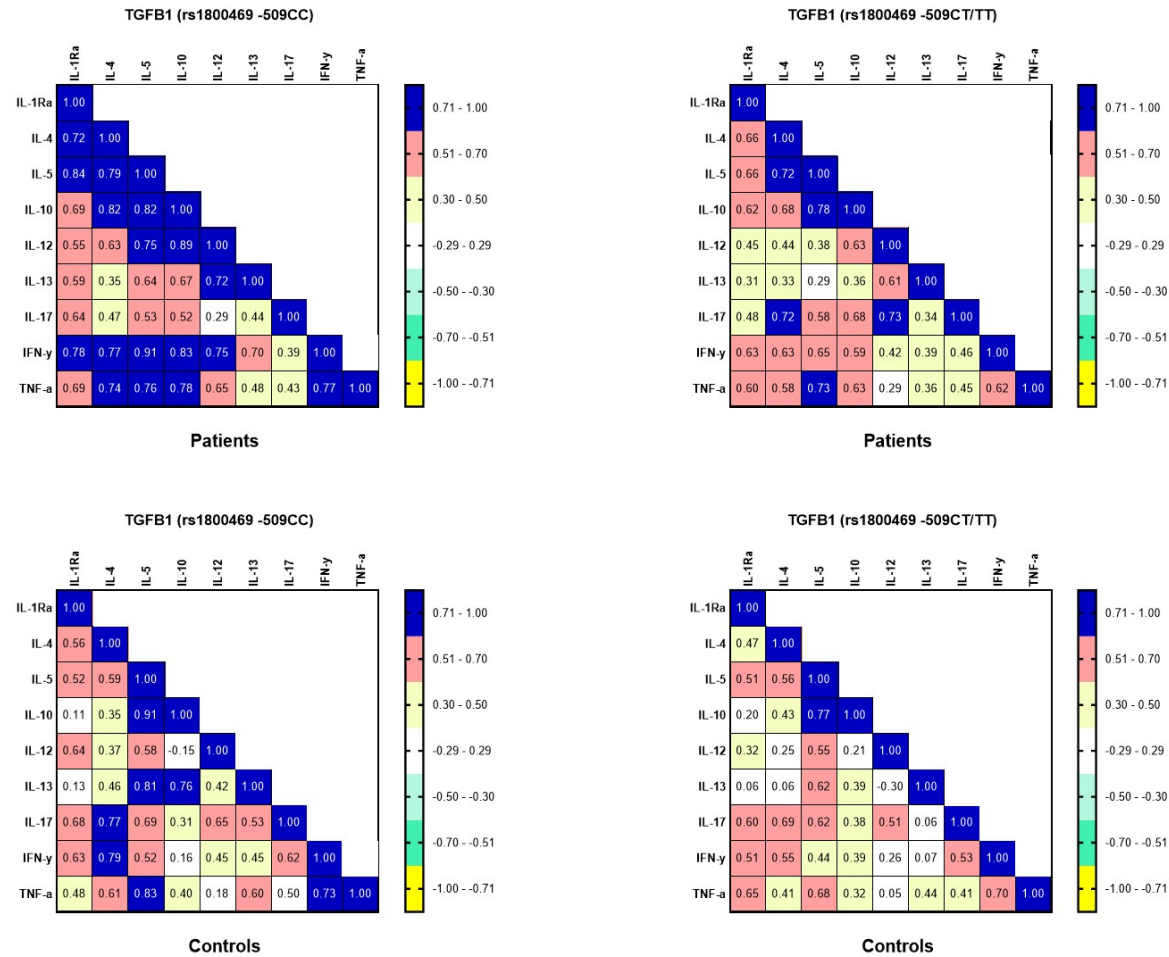


Figure 6C. Spearman rank correlation showing how plasma cytokine concentrations vary between wild-type and mutant genotypes in the Mitochondrial Superoxide Dismutase 2- rs4880 (c.47 C>T) in CL patients and healthy controls. The intense blue color demonstrates strong correlations ($r > 0.70 - p < 0.0001$).

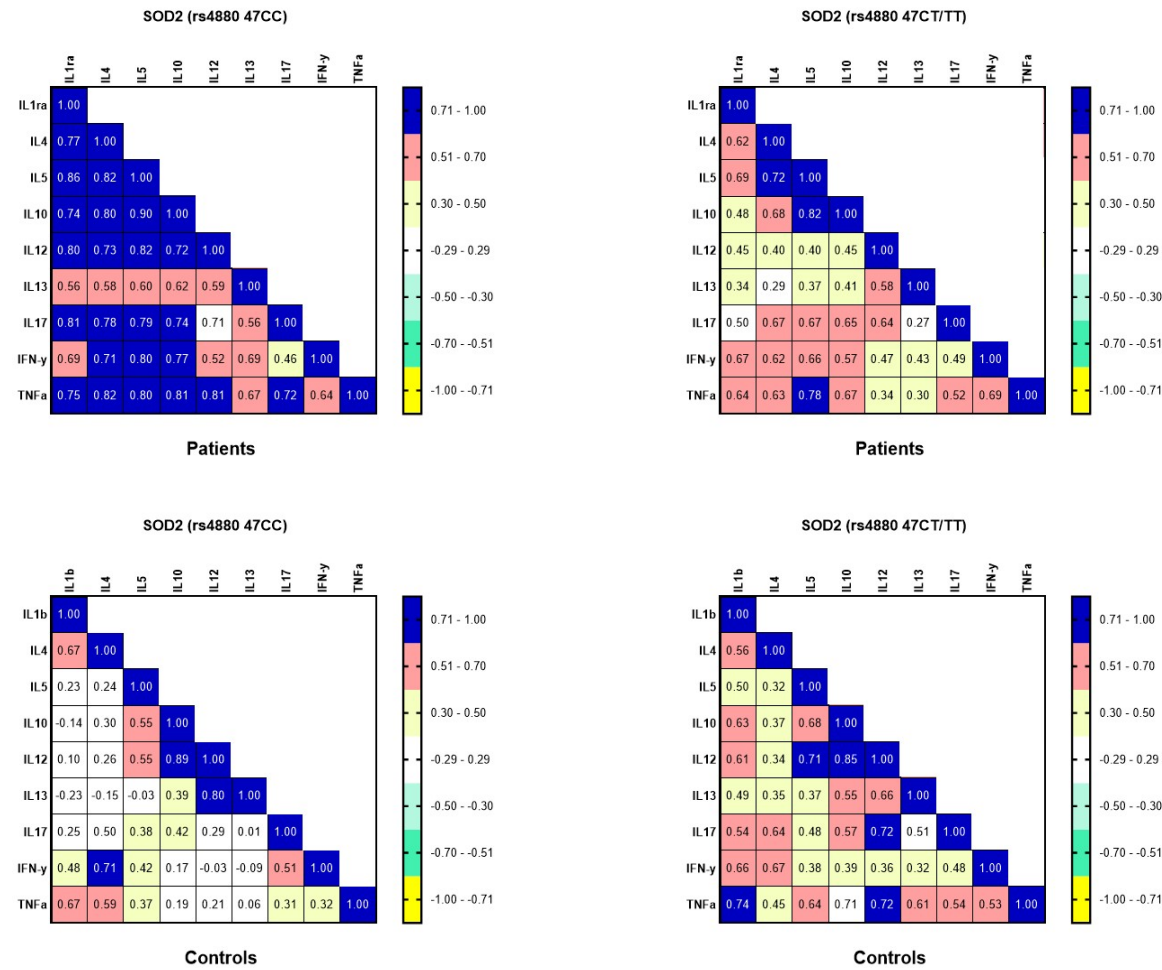
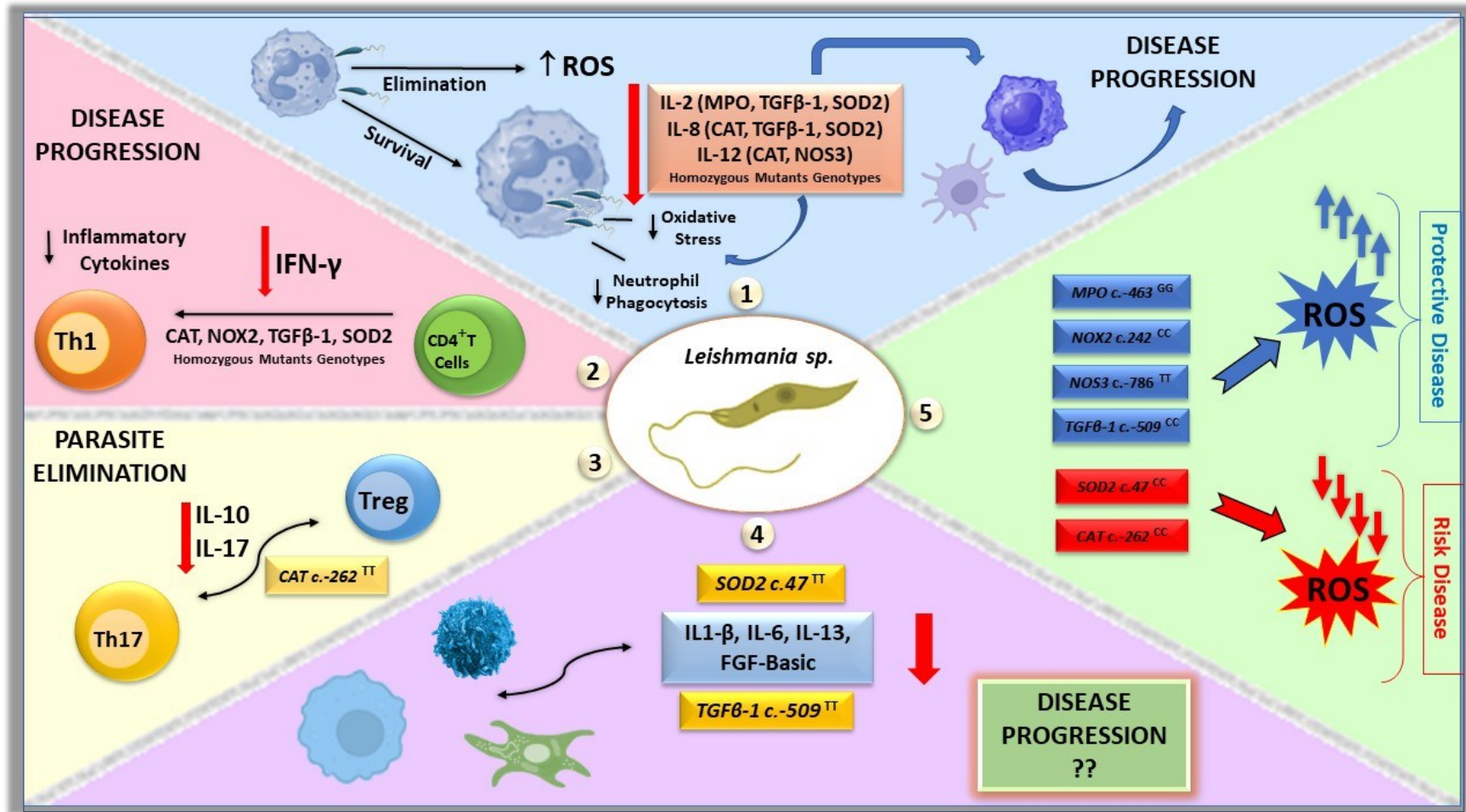


Figure 7. Impact of Catalase genotypes - rs1001179 (c.-262 C>T), Myeloperoxidase - rs2333227 (c.-463 G>A), NADPH oxidase – rs4673 (c.242 C>T), Endothelial Nitric Oxide Synthase - rs2070744 (c.-786 T>C), Transforming Growth Factor Beta - rs1800469 (c.-509 C>T) and Mitochondrial Superoxide Dismutase 2- rs4880 (c.47 C>T) in plasma cytokine concentrations in CL patients.



1 - Neutrophils, macrophages and dendritic cells can eliminate or promote the survival of the parasite. The finding of decreased plasma concentrations of the cytokines IL-2, IL-8 and IL-12 in the mutant genotypes of CAT c.-262TT, MPO c.-563AA, NOS3 c.786TT, TGFB-1 c.-509TT and SOD2 c.47TT, may indicate parasite survival and progression of Leishmaniasis disease in these genotypes;

2 - IFN- γ is an important pro-inflammatory cytokine involved in immunoprotection and immunopathology. IFN- γ is mainly secreted by Th1 subset of CD4⁺ T cells. Plasma concentrations of INF- γ were significantly decreased in the homozygous mutant genotypes of CAT c.-262TT, NOX2 c.242TT, TGFB-1 c.-509TT and SOD2 c.47TT, indicating possible susceptibility to Leishmania infection in these genotypes;

3 - The production of IL-10 by regulatory T cells suppresses the activation of macrophages and the maturation of dendritic cells. IL-17 is an inflammatory cytokine produced by Th17 cells. Significant plasma concentrations of the cytokines IL-10 and IL-17 were associated with the c.-262TT Catalase mutant genotype, indicating an important negative regulation in the expression of these cytokines in this genotype, which may be associated with protection against Cutaneous Leishmaniasis.

4 - The cytokines IL-6, IL-13, IL-1B, FGF-Basic, play a vital role in susceptibility to leishmaniasis. The homozygous mutant genotypes of TGFB-1 c.-509TT and SOD2 c.47TT were significantly associated with decreased plasma IL-13, IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-8, IL1- β and FGF- Basic in patients. Therefore, these genotypes can negatively modulate the expression of these cytokines by inhibiting the Th1 and Th2 responses, concomitantly, which may be associated with both the progression and elimination of the disease;

5 - All SNPs indicated in the figure are associated with a decrease in the enzymatic activity of their respective enzymes. The normal genotypes Catalase c.-262CC (rs1001179) and Mitochondrial Superoxide Dismutase 2 c.47CC (rs4880) were shown to be a risk factor for Leishmaniasis Cutanea; The normal genotypes of Myeloperoxidase c.-463GG (rs2333227), NADPH oxidase c.242CC (rs4673), Endothelial Nitric Oxide Synthase c.-786TT (rs2070744), Transforming Growth Factor Beta c.-509CC (rs1800469) were shown to be protective factors Cutaneous Leishmaniasis.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKUFFO H, COSTA C, VAN GRIENSVEN J et al. New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 May 10;12(5):0006375. doi: 10.1371/journal.pntd.0006375.

ALDERTON WK, COOPER CE, KNOWLES RG et al. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001 Aug 1;357(Pt 3):593-615. doi: 10.1042/0264-6021:3570593.

ALONSO D, SERRANO E, BERMEJO FJ et al. HIF-1 α -regulated MIF activation and Nox2-dependent ROS generation promote *Leishmania amazonensis* killing by macrophages under hypoxia. *Cell Immunol*. 2019 Jan;335:15-21. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.10.007. Epub 2018 Oct 22.

ALVAR J, VÉLEZ ID, BERN C et al. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671. Epub 2012 May 31.

ALVES MOTA, LA; MIRANDA, RR. Dermatologic and otorhinolaryngologic manifestations in leishmaniasis. *International Archives of Otorhinolaryngology*, v. 15, n. 3, p. 376–381, 2011.

ANNANE D, SANQUER S, SÉBILLE V et al. Compartmentalised inducible nitric-oxide synthase activity in septic shock. *Lancet*. 2000 Apr 1;355(9210):1143-8. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02063-8.

ARANGO DUQUE G, JARDIM A, GAGNON É et al. The host cell secretory pathway mediates the export of *Leishmania* virulence factors out of the parasitophorous vacuole. *PLoS Pathog*. 2019 Jul 29;15(7):e1007982. doi: 10.1371/journal.ppat.1007982.

ARATANI Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys*. 2018;640:47–52. doi: 10.1016/j.abb.2018.01.004.

ARIAS, JR, FREITAS RA. On The Vectors Of Cutaneous Leishmaniasis In The Central Amazon Of Brazil. 1977. Doi: 10.1590/1809-43921982123609.

ARNHOLD J. The Dual Role of Myeloperoxidase in Immune Response. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 29;21(21):8057. doi: 10.3390/ijms21218057.

ARNOLD DE, HEIMALL JR. A Review of Chronic Granulomatous Disease. *Adv Ther*. 2017 Dec;34(12):2543-2557. doi: 10.1007/s12325-017-0636-2. Epub 2017 Nov 22. PMID: 29168144.

ATOCHIN DN, HUANG PL. Endothelial nitric oxide synthase transgenic models of endothelial dysfunction. *Pflugers Arch*. 2010;460(6):965-974. doi:10.1007/s00424-010-0867-4.

ATOSUO J, SUOMINEN E. A real-time-based in vitro assessment of the oxidative antimicrobial mechanisms of the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system. *Mol Immunol*. 2019 Dec;116:38-44. doi: 10.1016/j.molimm.2019.09.017. Epub 2019 Oct 5.

ÁUREA GABRIEL, VALÉRIO-BOLAS A, PALMA-MARQUES J et al. Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. *J Immunol Res*. 2019 Dec 1;2019:2603730. doi: 10.1155/2019/2603730.

AWASTHI A, MATHUR RK, SAHA B et al. Immune response to Leishmania infection. *Indian J Med Res*. 2004 Jun;119(6):238-58. PMID: 15243162.

AZUMA S, UOJIMA H, CHUMA M et al. Influence of NOS3 rs2070744 genotypes on hepatocellular carcinoma patients treated with lenvatinib. *Sci Rep*. 2020 Oct 13;10(1):17054. doi: 10.1038/s41598-020-73930-3.

BABIOR BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med*. 2000 Jul;109(1):33-44. doi: 10.1016/s0002-9343(00)00481-2.

BAI J, TAN R, AN Z et al. Quantitative estimation of intracellular oxidative stress in human tissues. *Brief Bioinform*. 2022 Jul 18;23(4):bbac206. doi: 10.1093/bib/bbac206.

BARRAL A, TEIXEIRA M, REIS P et al. Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol*. 1995 Oct;147(4):947-54. PMID: 7573370.

BATES PA, ROGERS ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. *Curr Mol Med*. 2004 Sep;4(6):601-9. doi: 10.2174/1566524043360285.

BATES PA. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. 2007 Aug;37(10):1097-106. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.04.003. Epub 2007 Apr 18.

BATH PM, COLEMAN CM, GORDON AL et al. Nitric oxide for the prevention and treatment of viral, bacterial, protozoal and fungal infections. *F1000Res*. 2021 Jul 5;10:536. doi: 10.12688/f1000research.51270.2.

BEDARD K, KRAUSE KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):245-313. doi: 10.1152/physrev.00044.2005.

BENNETT JM, REEVES G, BILLMAN GE et al. Inflammation-Nature's Way to Efficiently Respond to All Types of Challenges: Implications for Understanding and Managing "the Epidemic" of Chronic Diseases. *Front Med (Lausanne)*. 2018 Nov 27;5:316. doi: 10.3389/fmed.2018.00316.

BIANCHI C, KOSTYGOV AY, KRAEVA N et al. An enigmatic catalase of Blastocrithidia. *Mol Biochem Parasitol*. 2019 Sep;232:111199. doi: 10.1016/j.molbiopara.2019.111199. Epub 2019 Jul 2.

BISTI S, KONIDOU G, BOELAERT J et al. The prevention of the growth of *Leishmania* major progeny in BALB/c iron-loaded mice: a process coupled to increased oxidative burst, the amplitude and duration of which depend on initial parasite developmental stage and dose. *Microbes Infect.* 2006 May;8(6):1464-72. doi: 10.1016/j.micinf.2006.01.014.

BLACKWELL JM, FAKIOLA M, CASTELLUCCI LC et al. Human genetics of leishmania infections. *Hum Genet.* 2020 Jun;139(6-7):813-819. doi: 10.1007/s00439-020-02130-w.

BLOS M, SCHLEICHER U, SOARES ROCHA FJ et al. Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania* major infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. *Eur J Immunol.* 2003 May;33(5):1224-34. doi: 10.1002/eji.200323825.

BOAVENTURA VS, SANTOS CS, CARDOSO CR et al. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol.* 2010 Oct;40(10):2830-6. doi: 10.1002/eji.200940115.

BOUALI H, NIETERT P, NOWLING TM et al. Association of the G-463A myeloperoxidase gene polymorphism with renal disease in African Americans with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2007 Oct;34(10):2028-34. Epub 2007 Sep 15.

BRASCH-ANDERSEN C, CHRISTIANSEN L, TAN Q et al. Possible gene dosage effect of glutathione-S-transferases on atopic asthma: using real-time PCR for quantification of GSTM1 and GSTT1 gene copy numbers. *Hum Mutat.* 2004 Sep;24(3):208-14. doi: 10.1002/humu.20074.

BROWN EE, DEWEERD AJ, ILDEFONSO CJ, et al. Mitochondrial oxidative stress in the retinal pigment epithelium (RPE) led to metabolic dysfunction in both the RPE and retinal photoreceptors. *Redox Biol.* 2019 Jun;24:101201. doi: 10.1016/j.redox.2019.101201.

BURCHMORE RJ, BARRETT MP. Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *Int J Parasitol.* 2001 Oct;31(12):1311-20. doi: 10.1016/s0020-7519(01)00259-4.

BUTLER MW, HACKETT NR, SALIT J et al. Glutathione S-transferase copy number variation alters lung gene expression. *Eur Respir J.* 2011 Jul;38(1):15-28. doi: 10.1183/09031936.00029210.

CARNEIRO MB, PETERS NC. The Paradox of a Phagosomal Lifestyle: How Innate Host Cell-*Leishmania* amazonensis Interactions Lead to a Progressive Chronic Disease. *Front Immunol.* 2021;12:728848. Published 2021 Sep 7. doi:10.3389/fimmu.2021.728848.

CHAPPUIS F, SUNDAR S, HAILU A et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol.* 2007 Nov;5(11):873-82. doi: 10.1038/nrmicro1748.

CHILDS CB, PROPER JA, TUCKER RF et al. Serum contains a platelet-derived transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(17):5312-5316. doi:10.1073/pnas.79.17.5312.

CHISTIYAKOV DA, ZOTOVA EV, SAVOST'ANOV KV et al. The 262T>C promoter polymorphism of the catalase gene is associated with diabetic neuropathy in type 1 diabetic Russian patients. *Diabetes Metab.* (2006) 32:63–8. doi: 10.1016/s1262-3636(07)70248-3.

CINELLI MA, DO HT, MILEY GP et al. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev.* 2020 Jan;40(1):158-189. doi: 10.1002/med.21599.

CORDA S, LAPLACE C, VICAUT E et al. Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor- α is mediated by ceramide. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001 Jun;24(6):762-8. doi: 10.1165/ajrcmb.24.6.4228.

COSTA MA, MATHESON C, IACHETTA L et al. Ancient Leishmaniasis in a highland desert of Northern Chile. *PLoS One.* 2009 Sep 10;4(9):e6983. doi: 10.1371/journal.pone.0006983.

COVAS, CJF. Estudo da influência de polimorfismos nos genes IL-10, IL-12, MIF e TNF na imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar Americana. Rio de Janeiro, 2010.

CRAPO JD. Oxidative stress as an initiator of cytokine release and cell damage. *Eur Respir J Suppl.* 2003 Sep;44:4s-6s. doi: 10.1183/09031936.03.00000203a.

CUEVAS S, VILLAR VAM, JOSE PA et al. Genetic polymorphisms associated with reactive oxygen species and blood pressure regulation. *Pharmacogenomics J.* 2019 Aug;19(4):315-336. doi: 10.1038/s41397-019-0082-4.

CUNNINGHAM, AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 72, n. 2, p. 132–141, 2002.

DAMIANOU A, BURGE RJ, CATTAPRETA CMC et al. Essential roles for deubiquitination in *Leishmania* life cycle progression. *PLoS Pathog.* 2020 Jun 16;16(6):e1008455. doi: 10.1371/journal.ppat.1008455.

DAVIES JMS, CILLARD J, FRIGUET B, et al. The Oxygen Paradox, the French Paradox, and age-related diseases. *Geroscience.* 2017 Dec;39(5-6):499-550. doi: 10.1007/s11357-017-0002-y.

DAYAKAR A, CHANDRASEKARAN S, KUCHIPUDI SV et al. Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. *Front Immunol.* 2019 Apr 5;10:670. doi: 10.3389/fimmu.2019.00670.

DE MENEZES JP, SARAIVA EM, DA ROCHA-AZEVEDO B et al. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasit Vectors.* 2016 May 4;9:264. doi: 10.1186/s13071-016-1540-3.

DE MESQUITA TGR, JUNIOR JDES, DA SILVA LDO et al. Distinct plasma chemokines and cytokines signatures in *Leishmania guyanensis*-infected patients with cutaneous leishmaniasis. *Front Immunol.* 2022 Aug 25;13:974051. doi: 10.3389/fimmu.2022.974051.

DE MOURA FJ, LEAL PP, DE SOUZA FURTADO R et al. Pentoxifylline prevents the meglumine antimonate-induced renal toxicity in rats, but not that induced by the inorganic antimony pentachloride. *Toxicology*. 2008 Jan 14;243(1-2):66-74. doi: 10.1016/j.tox.2007.09.032.

DHAMA K, LATHEEF SK, DADAR M et al. Biomarkers in Stress Related Diseases/Disorders: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Values. *Front Mol Biosci*. 2019 Oct 18;6:91. doi: 10.3389/fmolb.2019.00091.

EL-JAICK KB, RIBEIRO-ALVES M, SOARES MVG et al. Homozygotes NAT2*5B slow acetylators are highly associated with hepatotoxicity induced by anti-tuberculosis drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2022 Apr 27;117:e210328. doi: 10.1590/0074-02760210328.

ENARU B, SOCACI S, FARCAS A et al. Novel Delivery Systems of Polyphenols and Their Potential Health Benefits. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Sep 22;14(10):946. doi: 10.3390/ph14100946.

FALEIRO RJ, KUMAR R, HAFNER LM et al. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jul 10;8(7):e2914. doi: 10.1371/journal.pntd.0002914.

FORSTERMANN U, SESSA WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012 Apr;33(7):829-37, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.

FU YL, HARRISON RE. Microbial Phagocytic Receptors and Their Potential Involvement in Cytokine Induction in Macrophages. *Front Immunol*. 2021 Apr 29;12:662063. doi: 10.3389/fimmu.2021.662063.

GARCÍA RODRÍGUEZ A, DE LA CASA M, JOHNSTON S et al. Association of polymorphisms in genes coding for antioxidant enzymes and human male infertility. *Ann Hum Genet*. 2019 Jan;83(1):63-72. doi: 10.1111/ahg.12286.

GARCÍA-FERNÁNDEZ M, DELGADO G, PUCHE JE et al. Low doses of insulin-like growth factor I improve insulin resistance, lipid metabolism, and oxidative damage in aging rats. *Endocrinology*. 2008 May;149(5):2433-42. doi: 10.1210/en.2007-1190. Epub 2008 Jan 10.

GASPAROTTO J, KUNZLER A, SENGER MR et al. N-acetyl-cysteine inhibits liver oxidative stress markers in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017 Feb;112(2):146-154. doi: 10.1590/0074-02760160403.

GHILARDI G, BIONDI ML, CECCHINI F et al. Vascular invasion in human breast cancer is correlated to T-->786C polymorphism of NOS3 gene. *Nitric Oxide*. 2003. ep;9(2):118-22. doi: 10.1016/j.niox.2003.09.002.

GHOSH K, SHARMA G, SAHA A et al. Successful therapy of visceral leishmaniasis with curdlan involves T-helper 17 cytokines. *J Infect Dis.* 2013;207(6):1016-1025. doi:10.1093/infdis/jis771.

GILGUN-SHERKI Y, MELAMED E, OFFEN D et al. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology.* 2001 Jun;40(8):959-75. doi: 10.1016/s0028-3908(01)00019-3.

GIORGI C, MARCHI S, SIMOES ICM et al. Mitochondria and Reactive Oxygen Species in Aging and Age-Related Diseases. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2018;340:209-344. doi: 10.1016/bs.ircmb.2018.05.006.

GIUDICESSI JR, ACKERMAN MJ. Determinants of incomplete penetrance and variable expressivity in heritable cardiac arrhythmia syndromes. *Transl Res.* 2013 Jan;161(1):1-14. doi: 10.1016/j.trsl.2012.08.005.

GIULIVI C, BOVERIS A, CADENAS E et al. Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys.* 1995 Feb 1;316(2):909-16. doi: 10.1006/abbi.1995.1122.

GOLLOB KJ, VIANA AG, DUTRA WO. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite Immunol.* 2014;36(8):367-376. doi:10.1111/pim.12100.

GONTIJO B, DE CARVALHO MDE L. Leishmaniose tegumentar americana [American cutaneous leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003 Jan-Feb;36(1):71-80. Portuguese. doi: 10.1590/s0037-86822003000100011.

GONZÁLEZ-CASTRO TB, GENIS-MENDOZA AD, TOVILLA-ZÁRATE C et al. Association between polymorphisms of NOS1, NOS2 and NOS3 genes and suicide behavior: a systematic review and meta-analysis. *Metab Brain Dis.* 2019 Aug;34(4):967-977. doi: 10.1007/s11011-019-00406-3.

GOOSSENS V, GROOTEN J, DE VOS K et al. Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Aug 29;92(18):8115-9. doi: 10.1073/pnas.92.18.8115.

GORELIK L, CONSTANT S, FLAVELL RA et al. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med.* 2002 Jun 3;195(11):1499-505. doi: 10.1084/jem.20012076.

GREGORY DJ, GODBOUT M, CONTRERAS I et al. A novel form of NF-kappaB is induced by Leishmania infection: involvement in macrophage gene expression. *Eur J Immunol.* 2008 Apr;38(4):1071-81. doi: 10.1002/eji.200737586.

GRIMALDI G JR, TESH RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev.* 1993 Jul;6(3):230-50. doi: 10.1128/CMR.6.3.230.

GUIMARÃES-COSTA AB, NASCIMENTO MT, FROMENT GS et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Apr 21;106(16):6748-53. doi: 10.1073/pnas.0900226106. Epub 2009 Apr 3.

GUPTA AK, DAS S, KAMRAN M et al. The pathogenicity and virulence of *Leishmania* - interplay of virulence factors with host defenses. *Virulence.* 2022 Dec;13(1):903-935. doi: 10.1080/21505594.2022.2074130.

GUZIK TJ, WEST NE, BLACK E et al. Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation.* 2000 Oct 10;102(15):1744-7. doi: 10.1161/01.cir.102.15.1744.

HAJAM YA, RANI R, GANIE SY et al. Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. *Cells.* 2022 Feb 5;11(3):552. doi: 10.3390/cells11030552.

HALLIWELL B, JOHN MC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5th edn (Oxford, 2015; online edn, Oxford Academic, 22 Oct. 2015), <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>.

HANSEN G, MCINTIRE JJ, YEUNG VP et al. CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Clin Invest.* 2000 Jan;105(1):61-70. doi: 10.1172/JCI7589.

HASHEMI M, ESKANDARI-NASAB E, FAZAELI A et al. Association between polymorphisms of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and breast cancer risk in a sample Iranian population. *Biomark Med.* 2012 Dec;6(6):797-803. doi: 10.2217/bmm.12.61.

HAYES JD, FLANAGAN JU, JOWSEY IR et al. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:51-88. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857.

HE HR, ZHANG XX, SUN JY et al. Glutathione S-transferase gene polymorphisms and susceptibility to chronic myeloid leukemia. *Tumour Biol.* 2014 Jun;35(6):6119-25. doi: 10.1007/s13277-014-1810-7.

HEIN DW, DOLL MA, FRET LAND AJ et al. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000 Jan;9(1):29-42.

HEIN DW, FRET LAND AJ, DOLL MA et al. Effects of single nucleotide polymorphisms in human N-acetyltransferase 2 on metabolic activation (O-acetylation) of heterocyclic amine carcinogens. *Int J Cancer.* 2006 Sep 1;119(5):1208-11. doi: 10.1002/ijc.21957.

HIRANO T, TAGA T, YASUKAWA K et al. Human B-cell differentiation factor defined by an anti-peptide antibody and its possible role in autoantibody production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Jan;84(1):228-31. doi: 10.1073/pnas.84.1.228.

HOANG HM, JOHNSON HE, HEO J. Rac-dependent feedforward autoactivation of NOX2 leads to oxidative burst. *J Biol Chem*. 2021 Aug;297(2):100982. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100982.

HORÁKOVÁ E, FAKTOROVÁ D, KRAEVA N et al. Catalase compromises the development of the insect and mammalian stages of *Trypanosoma brucei*. *FEBS J*. 2020 Mar;287(5):964-977. doi: 10.1111/febs.15083.

HOTEZ PJ, MOLYNEUX DH, FENWICK A et al. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med*. 2007 Sep 6;357(10):1018-27. doi: 10.1056/NEJMra064142.

HOY A, LEININGER-MULLER B, KUTTER D et al. Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2002 Jan;40(1):2-8. doi: 10.1515/CCLM.2002.002.

HSIAO CH, UENO N, SHAO JQ et al. The effects of macrophage source on the mechanism of phagocytosis and intracellular survival of *Leishmania*. *Microbes Infect*. 2011;13(12-13):1033-1044. doi:10.1016/j.micinf.2011.05.014.

HU HH, CHEN DQ, WANG YN et al. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis. *Chem Biol Interact*. 2018 Aug 25;292:76-83. doi: 10.1016/j.cbi.2018.07.008.

HU JL, XU JB, ZHOU X et al. [Correlation between MPO 129 A/G polymorphism and severity of coronary artery disease]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2011 Aug;27(3):306-10. Chinese. PMID: 22097722.

HUSAIN A, ZHANG X, DOLL MA et al. Functional analysis of the human N-acetyltransferase 1 major promoter: quantitation of tissue expression and identification of critical sequence elements. *Drug Metab Dispos*. 2007 Sep;35(9):1649-56. doi: 10.1124/dmd.107.016485.

ISLAM T, MCCONNELL R, GAUDERMAN WJ et al. Ozone, oxidant defense genes, and risk of asthma during adolescence. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Feb 15;177(4):388-95. doi: 10.1164/rccm.200706-863OC.

JABLONSKA E, GROMADZINSKA J, PEPLONSKA B et al. Lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity relationship in breast cancer depends on functional polymorphism of GPX1. *BMC Cancer*. 2015 Oct 7;15:657. doi: 10.1186/s12885-015-1680-4.

JASTROCH M, DIVAKARUNI AS, MOOKERJEE S et al. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem*. 2010;47:53-67. doi: 10.1042/bse0470053.

JOSEPH T, CHACKO P, WESLEY R et al. Germline genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian cervical cancer: associations with tumor progression, age and human papillomavirus infection. *Gynecol Oncol.* 2006 Jun;101(3):411-7. doi: 10.1016/j.ygyno.2005.10.033.

KAKKOURA MG, DEMETRIOU CA, LOIZIDOU MA et al. MnSOD and CAT polymorphisms modulate the effect of the Mediterranean diet on breast cancer risk among Greek-Cypriot women. *Eur J Nutr.* 2016 Jun;55(4):1535-44. doi: 10.1007/s00394-015-0971-5.

KARGAPOLOVA Y, GEIßEN S, ZHENG R et al. The Enzymatic and Non-Enzymatic Function of Myeloperoxidase (MPO) in Inflammatory Communication. *Antioxidants (Basel).* 2021 Apr 5;10(4):562. doi: 10.3390/antiox10040562.

KARLSSON K, LINDAHL U, MARKLUND SL et al. Binding of human extracellular superoxide dismutase C to sulphated glycosaminoglycans. *Biochem J.* 1988 Nov 15;256(1):29-33. doi: 10.1042/bj2560029.

KATUSIC ZS, AUSTIN SA. Endothelial nitric oxide: protector of a healthy mind. *Eur Heart J.* 2014;35(14):888-894. doi:10.1093/eurheartj/eh544.

KEDZIERSKI L, EVANS KJ. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2014 Jul 30;1-19. doi: 10.1017/S003118201400095X.

KEEN LJ. The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. *Transpl Immunol.* 2002 Aug;10(2-3):143-6. doi: 10.1016/s0966-3274(02)00061-8.

KERR SF, MERKELZ R, MACKINNON C et al. Further support for a Palaearctic origin of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000 Jul-Aug;95(4):579-81. doi: 10.1590/s0074-02762000000400022.

KHAN YA, ANDREWS NW, MITTRA B et al. ROS regulate differentiation of visceralizing *Leishmania* species into the virulent amastigote form. *Parasitol Open.* 2018;4:e19. doi: 10.1017/pao.2018.15. Epub 2018 Nov 6.

KHOURI R, BAFICA A, SILVA MDA P et al. IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. *J Immunol.* 2009 Feb 15;182(4):2525-31. doi: 10.4049/jimmunol.0802860.

KIELBIK M, SZULC-KIELBIK I, KLINK M et al. The Potential Role of iNOS in Ovarian Cancer Progression and Chemoresistance. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 9;20(7):1751. doi: 10.3390/ijms20071751.

KIRKINEZOS IG, MORAES CT. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2001 Dec;12(6):449-57. doi: 10.1006/scdb.2001.0282.

KLAUS A, ZORMAN S, BERTHIER A et al. Glutathione S-transferases interact with AMP-activated protein kinase: evidence for S-glutathionylation and activation in vitro. *PLoS One.* 2013 May 31;8(5):e62497. doi: 10.1371/journal.pone.0062497.

KODYDKOVÁ J, VÁVROVÁ L, KOCÍK M et al. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol (Praha)*. 2014;60(4):153-67.

KONE BC, KUNCEWICZ T, ZHANG W et al. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Aug;285(2):F178-90. doi: 10.1152/ajprenal.00048.2003.

KOPELYANSKIY D, DESPONDS C, PREVEL F et al. *Leishmania guyanensis* suppressed inducible nitric oxide synthase provoked by its viral endosymbiont. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Aug 12;12:944819. doi: 10.3389/fcimb.2022.944819.

KOTSIAS F, HOFFMANN E, AMIGORENA S et al. Reactive oxygen species production in the phagosome: impact on antigen presentation in dendritic cells. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Feb 20;18(6):714-29. doi: 10.1089/ars.2012.4557.

KOWALD A, KLIPP E. Alternative pathways might mediate toxicity of high concentrations of superoxide dismutase. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Jun;1019:370-4. doi: 10.1196/annals.1297.065.

KRISHNAMURTHY, P, WADHWANI, A. Antioxidant Enzymes and Human Health. In: El-Missiry, M.A., editor. *Antioxidant Enzyme* [Internet]. London: IntechOpen; 2012 [cited 2022 Nov 21]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/39554> doi: 10.5772/48109.

KULEAPE JA, TAGOE EA, PUPLAMPU P et al. Homozygous deletion of both GSTM1 and GSTT1 genes is associated with higher CD4+ T cell counts in Ghanaian HIV patients. *PLoS One*. 2018 May 24;13(5):e0195954. doi: 10.1371/journal.pone.0195954.

KUMAR GA, KARMAKAR J, MANDAL C et al. *Leishmania donovani* Internalizes into Host Cells via Caveolin-mediated Endocytosis. *Sci Rep*. 2019 Sep 2;9(1):12636. doi: 10.1038/s41598-019-49007-1.

LAINSON R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1988 Oct 31;321(1207):389-404. doi: 10.1098/rstb.1988.0099.

LAINSON, R. Flebotomíneos do Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 20, n. 1978, p. 1436–1437, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2004000500043&lng=pt&tlng=pt>.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Avances en Biomedicina*, v. 3, n. 1, 2010. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/pdf/rpas/v1n2/es_v1n2a06.pdf>.

LAOUAR Y, SUTTERWALA FS, GORELIK L et al. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol*. 2005 Jun;6(6):600-7. doi: 10.1038/ni1197.

LEE J, LEE S, ZHANG H et al. Interaction of IL-6 and TNF- α contributes to endothelial dysfunction in type 2 diabetic mouse hearts. *PLoS One*. 2017 Nov 2;12(11):e0187189. doi: 10.1371/journal.pone.0187189.

LEE KM, CHOI JY, LEE JE et al. Genetic polymorphisms of NOS3 are associated with the risk of invasive breast cancer with lymph node involvement. *Breast Cancer Res Treat*. 2007 Dec;106(3):433-8. doi: 10.1007/s10549-007-9506-y.

LEE SA, KIM JW, ROH JW et al. Genetic polymorphisms of GSTM1, p21, p53 and HPV infection with cervical cancer in Korean women. *Gynecol Oncol*. 2004 Apr;93(1):14-8. doi: 10.1016/j.ygyno.2003.11.045.

LI G, BARRETT EJ, BARRETT MO et al. Tumor necrosis factor- α induces insulin resistance in endothelial cells via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Endocrinology*. 2007 Jul;148(7):3356-63. doi: 10.1210/en.2006-1441.

LIEW FY, WEI XQ, PROUDFOOT L et al. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1997;352(1359):1311-1315. doi:10.1098/rstb.1997.0115.

LTAMIRANO-ENCISO AJ, MARZOCHI MC, MOREIRA JS et al. On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post- colombian historical source. *História, ciências, saúde--Manguinhos*, v. 10, n. 3, p. 852–882, 2003.

LUIKING YC, POEZE M, RAMSAY G et al. Reduced citrulline production in sepsis is related to diminished de novo arginine and nitric oxide production. *Am J Clin Nutr*. 2009 Jan;89(1):142-52. doi: 10.3945/ajcn.2007.25765.

MA N, LIU W, ZHANG X et al. Oxidative Stress-Related Gene Polymorphisms Are Associated With Hepatitis B Virus-Induced Liver Disease in the Northern Chinese Han Population. *Front Genet*. 2020 Jan 8;10:1290. doi: 10.3389/fgene.2019.01290.

MAGALON H, PATIN E, AUSTERLITZ F et al. Population genetic diversity of the NAT2 gene supports a role of acetylation in human adaptation to farming in Central Asia. *Eur J Hum Genet*. 2008 Feb;16(2):243-51. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201963.

MAGNANI ND, MARCHINI T, CALABRÓ V et al. Role of Mitochondria in the Redox Signaling Network and Its Outcomes in High Impact Inflammatory Syndromes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Sep 23;11:568305. doi: 10.3389/fendo.2020.568305.

MALIK SS, KAZMI Z, FATIMA I et al. Genetic Polymorphism of GSTM1 and GSTT1 and Risk of Prostatic Carcinoma - a Meta-analysis of 7,281 Prostate Cancer Cases and 9,082 Healthy Controls. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(5):2629-35.

MALVEZI AD, CECCHINI R, DE SOUZA F et al. Involvement of nitric oxide (NO) and TNF- α in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2004 May 1;41(1):69-77. doi: 10.1016/j.femsim.2004.01.005.

MARCUSSO ORSINI T, KAWAKAMI NY, PANIS C et al. Antileishmanial Activity and Inducible Nitric Oxide Synthase Activation by RuNO Complex. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:2631625. doi: 10.1155/2016/2631625.

MARZOCHI MCA, MARZOCHI KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 10, n. suppl 2, p. S359–S375. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X1994000800014>. 1994.

MASPI N, ABDOLI A, GHAFARIFAR F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathog Glob Health.* 2016 Sep;110(6):247-260. doi: 10.1080/20477724.2016.1232042.

MATÉS JM, PÉREZ-GÓMEZ C, NÚÑEZ DE CASTRO I et al. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999 Nov;32(8):595-603. doi: 10.1016/s0009-9120(99)00075-2.

MATTE C, CASGRAIN PA, SÉGUIN O et al. *Leishmania major* Promastigotes Evade LC3-Associated Phagocytosis through the Action of GP63. *PLoS Pathog.* 2016 Jun 9;12(6):e1005690. doi: 10.1371/journal.ppat.1005690.

MATTSON MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 2004 Aug 5;430(7000):631-9. doi: 10.1038/nature02621.

MAURYA R, NAMDEO M. Superoxide Dismutase: A Key Enzyme for the Survival of Intracellular Pathogens in Host. In: Ahmad. R. editor. *Reactive Oxygen Species*. 2021. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/78800> doi: 10.5772/intechopen.100322.

MAZAHERI M, KARIMIAN M, BEHJATI M et al. Association analysis of rs1049255 and rs4673 transitions in p22phox gene with coronary artery disease: A case-control study and a computational analysis. *Ir J Med Sci.* 2017 Nov;186(4):921-928. doi: 10.1007/s11845-017-1601-4.

MEGÍAS-VERICAT JE, MONTESINOS P, HERRERO MJ et al. Impact of NADPH oxidase functional polymorphisms in acute myeloid leukemia induction chemotherapy. *Pharmacogenomics J.* 2018 Apr;18(2):301-307. doi: 10.1038/tpj.2017.19.

MESQUITA I, FERREIRA C, BARBOSA AM et al. The impact of IL-10 dynamic modulation on host immune response against visceral leishmaniasis. *Cytokine.* 2018;112:16-20. doi:10.1016/j.cyto.2018.07.001.

MIAO L, ST CLAIR DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med.* 2009 Aug 15;47(4):344-56. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018.

MILLIGAN KL, MANN D, RUMP A et al. Complete Myeloperoxidase Deficiency: Beware the "False-Positive" Dihydrorhodamine Oxidation. *J Pediatr.* 2016;176:204-206. doi:10.1016/j.jpeds.2016.05.047.

MILLS CD. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Front Immunol.* 2015 May 5;6:212. doi: 10.3389/fimmu.2015.00212.

MIRONSKA K. Neutrophil functional disorder in childhood. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki).* 2015;36(1):183-190.

MITCHELL KR, WARSHAWSKY D. Xenobiotic inducible regions of the human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2 genes. *Toxicol Lett.* 2003 Mar 20;139(1):11-23. doi: 10.1016/s0378-4274(02)00437-x.

MONTEIRO HP, RODRIGUES EG, AMORIM REIS AKC et al. Nitric oxide and interactions with reactive oxygen species in the development of melanoma, breast, and colon cancer: A redox signaling perspective. *Nitric Oxide.* 2019 Aug 1;89:1-13. doi: 10.1016/j.niox.2019.04.009.

MORIKAWA M, DERYNCK R, MIYAZONO K et al. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016 May 2;8(5):a021873. doi: 10.1101/cshperspect.a021873.

MOSSER DM, VLASSARA H, EDELSON PJ et al. Leishmania promastigotes are recognized by the macrophage receptor for advanced glycosylation endproducts. *J Exp Med.* 1987;165(1):140-145. doi:10.1084/jem.165.1.140.

MOTOORI S, MAJIMA HJ, EBARA M et al. Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase protects against radiation-induced cell death in the human hepatocellular carcinoma cell line HLE. *Cancer Res.* 2001 Jul 15;61(14):5382-8.

MOUMITA B & PIJUSH K. Role of Reactive Oxygen Species in Infection by the Intracellular Leishmania Parasites. 2019. doi: 10.1007/978-981-13-8763-0_16.

MURRAY HW, HARIPRASHAD J, COFFMAN RL et al. Behavior of visceral Leishmania donovani in an experimentally induced T helper cell 2 (Th2)-associated response model. *J Exp Med.* 1997;185(5):867-874. doi:10.1084/jem.185.5.867.

NAKA T, NARAZAKI M, HIRATA M et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature.* 1997 Jun 26;387(6636):924-9. doi: 10.1038/43219.

NANDI A, YAN LJ, JANA CK et al. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Nov 11;2019:9613090. doi: 10.1155/2019/9613090.

NAUSEEF WM. Biosynthesis of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys.* 2018 Mar 15;642:1-9. doi: 10.1016/j.abb.2018.02.001.

NAVARATHNA DH, LIONAKIS MS, ROBERTS DD et al. Endothelial nitric oxide synthase limits host immunity to control disseminated Candida albicans infections in mice. *PLoS One.* 2019 Oct 31;14(10):e0223919. doi: 10.1371/journal.pone.0223919.

NEVES LO, TALHARI AC, GADELHA EPN et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoníato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 6, p. 1092–1101, dez. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22281895>>.

NEVES DP. *Parasitologia Humana - Leishmaniose Visceral Americana*. p. 41–84, 2004.

NISHIMOTO N, KANAKURA Y, AOZASA K et al. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2627-32. doi: 10.1182/blood-2004-12-4602.

NISHIMOTO N, YOSHIZAKI K, TAGOH H et al. Elevation of serum interleukin 6 prior to acute phase proteins on the inflammation by surgical operation. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989 Mar;50(3):399-401. doi: 10.1016/0090-1229(89)90147-5.

NOVAIS FO, SANTIAGO RC, BÁFICA A et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J Immunol*. 2009;183(12):8088-8098. doi:10.4049/jimmunol.0803720.

NUNOBIKI O, UEDA M, TOJI E et al. Genetic Polymorphism of Cancer Susceptibility Genes and HPV Infection in Cervical Carcinogenesis. *Patholog Res Int*. 2011;2011:364069. doi: 10.4061/2011/364069.

OLIVEIRA WN, RIBEIRO LE, SCHRIEFFER A et al. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine*. 2014;66(2):127-132. doi:10.1016/j.cyto.2013.12.016.

OPAS, OMS. Situação epidemiológica Leishmaniose cutânea e mucosa. p. 10, 2021. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/55386>>.

OPS/OMS, ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD -. Sub-region Number cases %. p. 3–7, 2021. Disponível em: <<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/2015-cha-leish-epi-report-americas.pdf>>.

PACHOLAK LM, KERN R, DE OLIVEIRA ST et al. Effects of GSTT1 and GSTM1 polymorphisms in glutathione levels and breast cancer development in Brazilian patients. *Mol Biol Rep*. 2021 Jan;48(1):33-40. doi: 10.1007/s11033-020-06107-w. Epub 2021 Jan 16.

PAIVA CN, BOZZA MT. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? *Antioxid Redox Signal*. 2014 Feb 20;20(6):1000-37. doi: 10.1089/ars.2013.5447.

PARK HH, HA E, UHM YK et al. Association study between catalase gene polymorphisms and the susceptibility to vitiligo in Korean population. *Exp Dermatol*. 2006 May;15(5):377-80. doi: 10.1111/j.0906-6705.2006.00423.x.

PARKER HA, FORRESTER L, KALDOR CD et al. Antimicrobial Activity of Neutrophils Against Mycobacteria. *Front Immunol*. 2021 Dec 23;12:782495. doi: 10.3389/fimmu.2021.782495.

PARSONS M, CAMPA A, LAI S et al. Effect of GSTM1-Polymorphism on Disease Progression and Oxidative Stress in HIV Infection: Modulation by HIV/HCV Co-Infection and Alcohol Consumption. *J AIDS Clin Res.* 2013 Aug 31;4(9):10002337. doi: 10.4172/2155-6113.1000237.

PATIROĞLU T, EKE GÜNGÖR H, BELOHRADSKY JS et al. Myeloperoxidase deficiency: the secret under the flag of unstained cell. *Turk J Haematol.* 2013 Jun;30(2):232-3. doi: 10.4274/Tjh.2012.0012.

PENG W, YA BF, LIYAN W et al. Interleukin-6: Its role and mechanisms in rescuing depression-like behaviors in rat models of depression. 2019. doi.org/10.1016/j.bbi.2019.08.002.

PEREIRA, DP. Avaliação De Infecção Natural De Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) Por *Leishmania* Spp. Empregando Ensaio De Pcr Multiplex E Pcr Em Tempo Real. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/13044>. 2010.

REVERTE M, EREN RO, JHA B et al. The antioxidant response favors *Leishmania* parasites survival, limits inflammation and reprograms the host cell metabolism. *PLoS Pathog.* 2021 Mar 25;17(3):e1009422. doi: 10.1371/journal.ppat.1009422.

RIBEIRO CV, ROCHA BFB, OLIVEIRA E et al. *Leishmania infantum* induces high phagocytic capacity and intracellular nitric oxide production by human proinflammatory monocyte. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2020;115:e190408. Published 2020 Apr 17. doi:10.1590/0074-02760190408.

RIBEIRO-DE-JESUS A, ALMEIDA RP, LESSA H ET AL. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31(1):143-148. doi:10.1590/s0100-879x1998000100020.

RIBEIRO-GOMES FL, PETERS NC, DEBRABANT A et al. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathog.* 2012 Feb;8(2):e1002536. doi: 10.1371/journal.ppat.1002536. Epub 2012 Feb 16.

RISTOW M. Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits. *Nat Med.* 2014 Jul;20(7):709-11. doi: 10.1038/nm.3624.

ROBERTS AB, ANZANO MA, LAMB LC et al. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(9):5339-5343. doi:10.1073/pnas.78.9.5339.

ROCHA FJ, SCHLEICHER U, MATTNER J et al. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. *Infect Immun.* 2007 Aug;75(8):3823-32. doi: 10.1128/IAI.01335-06.

ROQUE AL, JANSEN AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2014 Aug 29;3(3):251-62. doi: 10.1016/j.ijppaw.2014.08.004.

ROSA AC, CORSI D, CAVI N et al. Superoxide Dismutase Administration: A Review of Proposed Human Uses. *Molecules*. 2021 Mar 25;26(7):1844. doi: 10.3390/molecules26071844.

ROSSI M, FASEL N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! *Int Immunol*. 2018 Mar 10;30(3):103-111. doi: 10.1093/intimm/dxx075.

ROSTAMI MN, KHAMESIPOUR A. Potential biomarkers of immune protection in human leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol*. 2021 Jun;210(2-3):81-100. doi: 10.1007/s00430-021-00703-8.

SABUR A, BHOWMICK S, CHHAJER R et al. Liposomal Elongation Factor-1 α Triggers Effector CD4 and CD8 T Cells for Induction of Long-Lasting Protective Immunity against Visceral Leishmaniasis. *Front Immunol*. 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.00018.

SACHIDANANDAM R, WEISSMAN D, SCHMIDT SC et al. International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):928-33. doi: 10.1038/35057149.

SALARI S, BAMOROVAT M, SHARIFI I et al. Global distribution of treatment resistance gene markers for leishmaniasis. *J Clin Lab Anal*. 2022 Aug;36(8):e24599. doi: 10.1002/jcla.24599.

SAMANT M, SAHU U, PANDEY SC et al. Role of Cytokines in Experimental and Human Visceral Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Feb 18;11:624009. doi: 10.3389/fcimb.2021.624009.

SCARPASSA VM, ALENCAR RB. *Lutzomyia umbratilis*, the main vector of *Leishmania guyanensis*, represents a novel species complex? *PLoS One*. 2012;7(5):e37341. doi: 10.1371/journal.pone.0037341.

SCOTT P, NOVAIS FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2016 Sep;16(9):581-92. doi: 10.1038/nri.2016.72.

SHARMA JN, AL-OMRAN A, PARVATHY SS et al. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*. 2007 Dec;15(6):252-9. doi: 10.1007/s10787-007-0013-x.

SHIMO-NAKANISHI Y, HASEBE T, SUZUKI A et al. Functional effects of NAD(P)H oxidase p22(phox) C242T mutation in human leukocytes and association with thrombotic cerebral infarction. *Atherosclerosis*. 2004 Jul;175(1):109-15. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.

SILVEIRA F. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. Revista Paraense de Medicina, v. 22, n. 1, p. 9–20, 2008.

SINAN, Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Casos de Leishmaniose Tegumentar, 2017.

SINGH N, GUPTA VK, KUMAR A et al. Synergistic Effects of Heavy Metals and Pesticides in Living Systems. Front Chem. 2017 Oct 11;5:70. doi: 10.3389/fchem.2017.00070.

SIRAKI AG. The many roles of myeloperoxidase: From inflammation and immunity to biomarkers, drug metabolism and drug discovery. Redox Biol. 2021 Oct;46:102109. doi: 10.1016/j.redox.2021.102109.

SNAHNICANOVA Z, MENDELOVA A, GRENDAR M et al. Association of Polymorphisms in CYBA, SOD1, and CAT Genes with Type 1 Diabetes and Diabetic Peripheral Neuropathy in Children and Adolescents. Genet Test Mol Biomarkers. 2018 Jul;22(7):413–419. doi: 10.1089/gtmb.2018.0018.

SOARES RP, NOGUEIRA PM, SECUNDINO NF et al. *Lutzomyia umbratilis* from an area south of the negro river is refractory to in vitro interaction with *leishmania guyanensis*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 113, n. 3, p. 202–205, 2018.

SPORN MB. TGF-beta: 20 years and counting. Microbes Infect. 1999;1(15):1251–1253. doi:10.1016/s1286-4579(99)00260-9.

STAFFORD JL, NEUMANN NF, BELOSEVIC M et al. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. Crit Rev Microbiol 2002; 28: 187–248. DOI:10.1080/1040-840291046731.

STEVERDING D. The history of leishmaniasis. Parasit Vectors. 2017 Feb 15;10(1):82. doi: 10.1186/s13071-017-2028-5.

STOSIC I, GRUJICIC D, ARSENIJEVIC S et al. Glutathione S-transferase T1 and M1 polymorphisms and risk of uterine cervical lesions in women from central Serbia. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(7):3201–5. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.7.3201.

SUAREZ-KURTZ G, VARGENS DD, SORTICA VA et al. Accuracy of NAT2 SNP genotyping panels to infer acetylator phenotypes in African, Asian, Amerindian and admixed populations. Pharmacogenomics. 2012 Jun;13(8):851–4; author reply 855. doi: 10.2217/pgs.12.48.

SUDENGA SL, SHRESTHA S, MACALUSO M et al. Functional variants in CYP1A1 and GSTM1 are associated with clearance of cervical HPV infection. Gynecol Oncol. 2014 Dec;135(3):560–4. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.09.015.

SUN Y, LI S, LIU H et al. Association of *GPx1 P198L* and *CAT C-262T* Genetic Variations With Polycystic Ovary Syndrome in Chinese Women. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Nov 8;10:771. doi: 10.3389/fendo.2019.00771.

SUNTER J, GULL K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol*. 2017 Sep;7(9):170165. doi: 10.1098/rsob.170165. Erratum in: *Open Biol*. 2018.

TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T et al. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Sep 4;6(10):a016295. doi: 10.1101/cshperspect.a016295.

TEW KD, MANEVICH Y, GREK C et al. The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer. *Free Radic Biol Med*. 2011 Jul 15;51(2):299-313. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.013.

TIEDGE M, LORTZ S, MUNDAY R et al. Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species. *Diabetes*. 1998 Oct;47(10):1578-85. doi: 10.2337/diabetes.47.10.1578.

TRAN N, GARCIA T, ANIQA M et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) and the Cardiovascular System: in Physiology and in Disease States. *Am J Biomed Sci Res*. 2022;15(2):153-177. Epub 2022 Jan 4.

TSCHOPP J. Mitochondria: Sovereign of inflammation? *Eur J Immunol*. 2011 May;41(5):1196-202. doi: 10.1002/eji.201141436.

TUON FF, AMATO VS, GRAF ME et al. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis--a systematic review with a meta-analysis. *Int J Dermatol*. 2008 Feb;47(2):109-24. doi: 10.1111/j.1365-4632.2008.03417.x.

UENO N, WILSON ME. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends Parasitol*. 2012 Aug;28(8):335-44. doi: 10.1016/j.pt.2012.05.002.

VAN ASSCHE T, DESCHACHT M, DA LUZ RA et al. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med*. 2011 Jul 15;51(2):337-51. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.011.

VAN ZANDBERGEN G, HERMANN N, LAUFS H et al. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infect Immun*. 2002 Aug;70(8):4177-84. doi: 10.1128/IAI.70.8.4177-4184.2002.

VIGNALI DA, KUCHROO VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol*. 2012;13(8):722-728. Published 2012 Jul 19. doi:10.1038/ni.2366.

WAN YY, FLAVELL RA. 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol Rev.* 2007 Dec;220:199-213. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00565.x.

WANG J, WANG H, HAO P et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase 2 by oxidative stress is associated with cardiac dysfunction in diabetic rats. *Mol Med.* 2011 Mar-Apr;17(3-4):172-9. doi: 10.2119/molmed.2010.00114.

WANG Y, CHEN XY, WANG K et al. Myeloperoxidase polymorphism and coronary artery disease risk: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2017 Jul;96(27):e7280. doi: 10.1097/MD.0000000000007280.

WANG Z, HAN Y, PENG Y et al. Senescent epithelial cells remodel the microenvironment for the progression of oral submucous fibrosis through secreting TGF- β 1. *PeerJ.* 2023 Apr 19;11:e15158. doi: 10.7717/peerj.15158.

WASTHI A, MATHUR RK, SAHA B et al. Immune response to Leishmania infection. *Indian J Med Res.* 2004 Jun;119(6):238-58.

WEISIGER RA, FRIDOVICH I. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem.* 1973 Jul 10;248(13):4793-6.

WETERING C VAN, ELKO E, BERG M et al. Glutathione S-transferases and their implications in the lung diseases asthma and chronic obstructive pulmonary disease: Early life susceptibility? *Redox Biol.* 2021 Jul;43:101995. doi: 10.1016/j.redox.2021.101995.

WHO, World Health Organization. Leishmaniasis - Epidemiological Report of the Americas - No2. p. 2-5, 2014. Disponível em: <<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/Report-Leishmaniasis-PAHO-June2014.pdf>>.

WHO, World Health Organization. Leishmaniose cutânea e mucosa. Disponível em: <https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417:2012-leishmaniasis-cutanea-mucosa&Itemid=39345&lang=en>. Acesso em: 28 Julho 2023.

WHO, World Health Organization. Manual for case management of cutaneous leishmaniasis in the WHO Eastern Mediterranean Region. 2020. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/120002>>. Acesso em: 26 maio 2023.

WIJNANDS KAP, MEESTERS DM, VANDENDRIESSCHE B et al. Microcirculatory Function during Endotoxemia-A Functional Citrulline-Arginine-NO Pathway and NOS3 Complex Is Essential to Maintain the Microcirculation. 2021 Nov 3;22(21):11940. doi: 10.3390/ijms222111940.

WILKINS R, ARTURO 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.

WILMES V, LUX C, NIESS C et al. Changes in gene expression patterns in postmortem human myocardial infarction. *Int J Legal Med.* 2020 Sep;134(5):1753-1763. doi: 10.1007/s00414-020-02311-2.

WINTERBOURN CC, KETTLE AJ, HAMPTON MB et al. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu Rev Biochem.* 2016 Jun 2;85:765-92. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014442.

WU B, DONG D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2012 Dec;33(12):656-68. doi: 10.1016/j.tips.2012.09.007.

XIA N, DAIBER A, HABERMEIER A et al. Resveratrol reverses endothelial nitric-oxide synthase uncoupling in apolipoprotein E knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Oct;335(1):149-54. doi: 10.1124/jpet.110.168724.

YANG WJ, WANG MY, PAN FZ et al. Association between MPO-463G > A polymorphism and cancer risk: evidence from 60 case-control studies. *World J Surg Oncol.* 2017 Aug 2;15(1):144. doi: 10.1186/s12957-017-1183-7.

YOUNG DMA. Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). 1994.

ZAMOCKY M, JAKOPITSCH C, FURTMÜLLER PG et al. The peroxidase-cyclooxygenase superfamily: Reconstructed evolution of critical enzymes of the innate immune system. *Proteins.* 2008;72:589–605. doi: 10.1002/prot.21950.

ZOU D, LI Z, LV F et al. Pan-Cancer Analysis of NOS3 Identifies Its Expression and Clinical Relevance in Gastric Cancer. *Front Oncol.* 2021 Mar 4;11:592761. doi: 10.3389/fonc.2021.592761.

6. ANEXOS

ANEXO A

Número do Prontuário _____ Número da Ficha _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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.

Introdução: Você está sendo convidado para participar do projeto de pesquisa citado acima. Este estudo será coordenado pelo Dr. Rajendranath Ramasawmy, pesquisador visitante sênior e professor permanente do programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e Infecciosas da UEA/FMT-HVD. Antes de tomar qualquer decisão, é importante que você leia e compreenda as seguintes explicações sobre o procedimento proposto. Esta declaração descreve o objetivo, procedimento, benefícios e riscos do estudo, e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Estas informações estão sendo dadas para esclarecer quaisquer dúvidas sobre a pesquisa proposta, antes de obter o seu consentimento.

Justificativa: Leishmaniose tegumentar ou ferida braba é uma doença causada por um pequeno parasita que fica na pele, mas existem diferentes espécies de parasito que podem causar a mesma doença, assim sendo, é importante saber qual o tipo de parasito que pode estar causando sua doença, ou se você não teve essa doença queremos saber se você tem mais possibilidade de contrai-la de que outra pessoa. Dessa forma, queremos que você participe deste estudo permitindo que seja retirada uma pequena amostra de sangue da sua veia para fazermos testes que vão nos dizer se você tem mais chance de ter leishmaniose causada pelo parasita *Leishmania guyanensis* do que outra pessoa. Caso você tenha essa doença queremos saber se você tem no seu organismo (na parte genética) capacidade de boa cicatrização, após ter sido tratado com um medicamento específico para essa doença.

Métodos: Caso você concordar em participar desse estudo, você será submetido a um exame médico, e uma coleta de 5 mL de sangue do seu antebraço, com uma agulha nova descartável, após a assepsia local (limpeza). Se o médico suspeitar que você tenha leishmaniose, você poderá ser submetido ainda a uma coleta para biópsia de pele realizada por um dos médicos (Dr. Jorge Guerra ou Dra. Anette Talhari) integrantes da equipe. Os indivíduos não afetados por leishmaniose e sem histórico de leishmaniose, que procurem o ambulatório de dermatologia da FMT-HVD, serão selecionados para e, caso aceitem participar, comporão o grupo controle. Os indivíduos que, depois de examinados pelo dermatologista, forem caracterizados como não afetados por leishmaniose, e que não apresentarem história de infecções crônicas, inflamação e doenças auto-imunes, serão considerados candidatos. A biópsia será utilizada para identificação do parasita que está causando sua doença. A biópsia é um procedimento no qual se colhe uma pequena quantidade de pele, isto é, uma amostra, de tecido ou células, para posterior estudo em laboratório. A grande maioria dos pequenos procedimentos de biópsia é muito segura, tendo apenas um pequeno risco de sangramento ou infecção no local da biópsia. Ela é feita após anestesia local na borda local da ferida e depois de isso retirar um pequeno pedaço de pele com auxílio de instrumento cortante esterilizado chamado de punch. A amostra de sangue servirá para saber o que queremos através de testes realizados no laboratório, além disso, com sua autorização, informações de prontuários clínicos também poderão ser lidas pelos participantes do estudo para comparar o resultado dos testes feitos em seu sangue e a resposta de seu tratamento.

1) Local do estudo

Os procedimentos descritos acima serão realizados no ambulatório de Dermatologia (avaliação clínica e biópsia) sob a responsabilidade do Dr. Jorge Guerra ou Dra. Anette Talhari, médicos integrantes da equipe de pesquisa e nos laboratórios da FMT-HVD sob a responsabilidade do Dr. Rajendranath Ramasawmy.

Rubrica do pesquisador

Rubrica do participante

Número do Prontuário _____

Número da Ficha _____

2) Permissão para estocagem

Está sendo solicitada a sua permissão para estocagem (guarda ou armazenamento) de sua amostra de biópsia, soro e de DNA na FMT-HVD sob a responsabilidade do Dr. Rajendranath Ramasawmy de acordo com a resolução CNS Nº441 de 12 de maio de 2011 e da portaria Nº00212/2012-GDP/FMT-HVD. Se assinar esse termo de consentimento, você estará autorizando estocagem de longo prazo das amostras para estudos futuros. Isso evitará procedimentos como nova coleta de sangue bem como a diminuição de recursos financeiros para novos procedimentos.

A sua amostra de DNA será mantida indefinidamente. Isto significa que a sua amostra não será destruída após um determinado período de tempo, mas sim será estocada pelo tempo que ela durar. Amostras estocadas serão usadas exclusivamente para fins de pesquisas e poderão ser utilizadas para outros estudos a respeito da susceptibilidade à leishmaniose. O uso de sua amostra estocada terá como condição uma nova avaliação e aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética pertinente. Sua permissão será solicitada. Se você concorda, você será pedir de assinar um novo TCLE com as justificativas e especificidades.

3) Risco físico para saúde/desconfortos

Os riscos físicos para a saúde na participação deste estudo são limitados ao procedimento de biópsia e coleta de sangue, ambos de rotina nos laboratórios clínicos. Em ambos os casos, você poderá sentir um desconforto temporário devido à introdução da agulha. A grande maioria dos procedimentos de biópsia é muito segura, tendo apenas um risco de sangramento ou infecção no local da biópsia. Ela é feita após anestesia local na borda local da ferida e depois de isso retirar um pequeno pedaço de pele com auxílio de instrumento cortante esterilizado chamado de punch. Durante a realização de biópsia, pode ocorrer pequeno sangramento que acostuma regredir em seguida. Pode também acontecer infecção se não houver cuidado de limpeza durante e depois desse procedimento. De qualquer maneira, você receberá uma pomada de antibiótico para evitar infecção. Entretanto, caso você tenha febre ou dor, "inchaço" (edema), rubor ou sangramento no local de biópsia deve procurar a equipe da pesquisa (Dr. Jorge Guerra ou Dra Anette Talhari). Existe também a possibilidade de risco de perda da confidencialidade tal como outras pessoas poderiam ter acesso aos seus dados e identificá-lo. Entretanto, serão tomados cuidados especiais para que isso não aconteça, pois, sua identificação será feita por meio códigos. O seu nome não estará visível nos frascos contendo as amostras biológicas, elas serão codificadas para evitar o risco de perda da confidencialidade.

4) Indenização e compensação por danos

Se você desenvolver uma infecção localizada devido ao procedimento de coleta de sangue ou biópsia, você será assistido pelo Dr. Jorge Guerra ou a Dra Anette Talhari, médicos integrantes da equipe de pesquisa no FMT-HVD. O custo desse tratamento será totalmente coberto pelo projeto. Qualquer dano decorrente de sua participação somente neste estudo referente a qualquer procedimento relacionado, você será assistido na FMT-HDV e terá direito a indenizações ou ressarcimentos em casos de danos decorrentes de sua participação no estudo.

5) Desligamento

A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios os quais você tenha direito. Se você estiver afetado pela leishmaniose, acesso a procedimentos médicos para diagnósticos e tratamento da doença será providenciado mesmo que não queira participar deste estudo. Se você não estiver afetado pela leishmaniose, você está sendo convidado a participar do estudo como parte do grupo controle ou como familiar do afetado. Neste caso, sua decisão de participar ou não, ou de cessar sua participação a qualquer momento, não irá interferir de nenhuma forma nos procedimentos médicos para diagnóstico ou tratamento da leishmaniose que você possa necessitar no futuro. Da mesma forma, sua decisão não irá refletir no acesso a procedimentos médicos necessários a algum familiar ou contato afetado pela leishmaniose.

Rubrica do pesquisador_____
Rubrica do participante

Número do prontuário: _____

Número da Ficha: _____

6) Custo para os participantes

No caso de você decidir participar do estudo, você não terá nenhum custo. Custos com testes laboratoriais e análises de suas amostras na pesquisa serão cobertos pelo estudo.

7) Benefícios

Em longo prazo, os procedimentos médicos e laboratoriais aos quais você será submetido poderão facilitar a detecção de resistência à leishmaniose e seu tratamento, tornando possível evitar tratamentos inadequados. Além disso, espera-se que conhecimentos científicos adicionais sejam alcançados, com consequente melhoria do tratamento de pessoas afetadas pela leishmaniose.

8) Reembolso

Já que não haverá gastos adicionais de transporte e alimentação devido a sua participação no estudo, você não será reembolsado por participar deste estudo.

9) Exclusividade de uso de material genético e biológico

Amostras de DNA serão utilizadas apenas para pesquisa de susceptibilidade à leishmaniose. Todos os resultados obtidos no estudo, após análise do conjunto completo dos dados, serão publicados em artigos científicos. É importante reafirmar que o alvo de nossos estudos é a identificação do fator de risco genético à leishmaniose e contribuição no entendimento do mecanismo da doença.

10) Confidencialidade dos dados

Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidencialmente até onde é permitido por lei e todas as informações estarão restritas à equipe responsável pelo projeto. Nenhuma informação genética individual será tornada pública. As informações serão codificadas e mantidas em local protegidas o tempo todo. Somente os pesquisadores envolvidos neste estudo terão acesso às informações. Após o término deste estudo, as informações serão transcritas dos questionários para os arquivos de computador, mantidos em local restrito com acesso permitido apenas aos mesmos pesquisadores. Os dados deste estudo poderão ser discutidos com pesquisadores de outras instituições, mas nenhuma identificação será fornecida. Você tenha direito de conhecer os resultados dos testes laboratoriais que serão realizados. Os resultados da pesquisa em nenhum momento irão interferir no tratamento já preconizado.

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.

Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento para mantê-lo consigo. Se você tiver qualquer dúvida no futuro sobre sua participação neste estudo, você pode e deve utilizar os seguintes meios de contato com os pesquisadores responsáveis:

Dra Anette TALHARI	(92) 21273429	anette@dermatologiatalhari.com.br
Dr Jorge GUERRA	(92) 2127 3429	jguerra291@gmail.com
Dr Rajendranath RAMASAWMY	(92) 21273447	mailto:ramasawm@gmail.com

Para quaisquer informações, fica disponibilizado o endereço do CEP/FMT-HVD, sito à Av. Pedro Teixeira nº25 Dom Pedro I, Cep 69040-000, Manaus-AM, que funciona de 2ª a 6ª feira, das 08:00 às 14:00 horas, telefone (92)2127-3572, e-mail: CEP@fmt.am.gov.br

CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações precedentes. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando o meu consentimento em participar do estudo, até que eu decida o contrário.

Assinatura ou impressão digital do voluntário

Nome completo e nº do prontuário

Assinatura do entrevistador	Nome do entrevistador
Assinatura testemunha 1	Assinatura testemunha 2
Data: ____ / ____ / ____	
Eu, Rajendranath Ramasawmy, coordenador do projeto intitulado: <i>“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”</i>, manifesto perante a CEP da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas Doutor Heitor Vieira Dourado, o meu compromisso que o projeto terá início após a aprovação pelo CEP e terá duração de 36 meses.	
Assinatura Nome: RajendranathRamasawmy CPF: 230660558-09	
TERMO DE COMPROMISSO	
Eu, RajendranathRamasawmy, coordenador do projeto intitulado: <i>“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.”</i>, manifesto perante a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas Doutor Heitor Vieira Dourado, o meu compromisso de uso e metodologia de identificação que assegure o sigilo e garanta respeito e confidencialidade dos indivíduos envolvidos na pesquisa supracitados, bem como assegurar que o sistema de identificação, utilizado garanta a recuperação de informações dos indivíduos pesquisados, visando possível necessidade de fornecimento de informações de interesse ou para obtenção de consentimento específico para uso em novo projeto de pesquisa. Autorizo a instituição a avaliar com prioridade absoluta os meus atos a partir do momento em que haja dúvida sobre as amostras biológicas a serem armazenadas. Concordo expressamente com as propostas deste termo, pelo que subscrevo-me.	
Assinatura Nome: RajendranathRamasawmy CPF: 230660558-09	
Local: Manaus Data: ____ de ____ de ____	

ANEXO B

Projeto Imunogenética da Leishmaniose

Identificação do voluntário:

1. Nome:

2. Gênero: Masc() Fem ()

3. D/N ___/___/___

4. Idade: _____

5. Etnia: Branco: (); Misto (); Índio: ()

Outro(qual): _____

6. Tipo e local de trabalho: _____

Dados para contato:

1. Telefone: _____

2. Endereço: _____

3. Referência: _____

4. Tempo de Residência: _____

5. Histórico de Residência (onde já morou e por quanto tempo): _____

Dados Clínicos:

1. Já teve leishmaniose ? Sim () Não ()

a) Se Sim (grupo caso):

i) Caso ativo ou histórico? Ativo () Histórico ()

ii) Teve mais de uma vez (se sim, responder iii a viii para cada episódio): Sim () Não ()

iii) Data de diagnóstico: ___/___/___

iv) Forma clínica: cutânea () Mucosa ()

v) Local de provável infecção: _____

vi) Tratamento: _____

vii) Reposta ao tratamento: Sim () Não ()

viii) Se caso histórico: Sim () Não ()

b) Se não (grupo controle) - confirmado por ausência de cicatriz

2. Já teve malária? Sim () Não ()

a) Se Sim quantas: _____

3. Já teve outras doenças ? _____

4. Prontuário da FMT-HVD: _____

ANEXO C

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO



Infectologia Celular e Molecular Código POP	POP_ICM_LB_001_v01
Título	Procedimento para separação de plasma, Buffy Coat e hemácias.
Elaborado por: Felipe Jules de Araujo Suzana Kanawati Pinheiro Luan Diego Oliveira da Silva	Aprovado por: Dr. Rajendranath Ramasawmy

1. OBJETIVOS

Descrever o procedimento para separação de plasma, Buffy Coat e hemácias.

2. DEFINIÇÕES

Não se aplica.

3. RESPONSABILIDADES

Pessoal encarregado da coleta das amostras da pesquisa.

Equipe do laboratório de biologia molecular.

4. POPS RELACIONADOS

Procedimento para realização de extração de DNA e para realização de Metodologias Moleculares.

1. PROCEDIMENTOS**a) Recursos necessários**

1. Sangue total de caso e controle a ser testado, armazenado em tubo.

b) Materiais

1. Pipetas automáticas de 1000 µL.
2. Ponteiras com filtro para pipetas automáticas.
3. Tubos para 1,5 ou 2,0 mL.

c) Equipamentos

1. Centrífuga

d) Reagentes

1. H₂O Mili Q ou H₂O de injeção.

e) Obtenção de sangue total

1. Por punção endovenosa

- a. Obter 5 mL de sangue venoso em tubo de EDTA identificado.
- b. Limpar bancada e centrífuga com álcool a 70%, antes e após o procedimento.
- c. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min (visualizar as 3 fases – plasma, Buffy Coat e eritrócitos).
- d. Retirar o plasma e colocar em tubo de 1,5 ou 2,0 mL.
- e. Retirar a camada leucocitária (Buffy Coat) – tomar cuidado para não retirar as hemácias - e colocar em tubo de 1,5 ou 2,0 mL. No tubo de buffy coat, completar com H₂O Mili Q ou H₂O de injeção (**gelada**), fechar o tubo e homogeneizar abruptamente (na primeira vez, e nas demais homogeneizar suavemente). Centrifugar a 13000 rpm por 5min. Obs.: Repetir 3 vezes, até limpar.
- f. Retirar os eritrócitos e colocar em tubo de 1,5 e 2,0 mL.

f) Biossegurança

Todo procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança (EPI's).

g) Armazenamento das amostras

Guardar no freezer a -80oC conforme as caixas indicadas (plasma, Buffy Coat e hemácias).

ANEXO D



PROCEDIMENTO PARA EXAME DIRETO POR MEIO DA ESCARIFICAÇÃO DA LESÃO

1. Utilizar lanceta esteril (do lado oposto ao pontiagudo) ou bisturi esteril.
2. Coletar da borda da lesão.
3. Realizar o esfregaco na lamina (duas laminas, totalizando quarto campos para cada paciente).

Coloração da lâmina com kit Panótico

1. Fixador por 1”.
2. Revelador por 1”.
3. Corante por 2”.
4. Tirar o excesso com agua.
5. Deixar secar e enxugar sem esfregar.

Microscopia

1. Colocar oleo de imersao para realizar a leitura.
2. Utilizar a objetiva de

ANEXO E

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: 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

Pesquisador: RAJENDRANATH RAMASAWMY

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 3

CAAE: 09995212.0.0000.0005

Instituição Proponente: Diretoria de Ensino e Pesquisa - DENPE

Patrocinador Principal: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((CNPq))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 289.683

Data da Relatoria: 24/05/2013

Apresentação do Projeto:

Este é um estudo genético/epidemiológico quantitativo, transversal, de ciência básica, que utilizará ferramentas de análise genética para avançar na dissecção do componente genético de controle da susceptibilidade do hospedeiro à LTA causada pela espécie *Leishmania guyanensis*. Brevemente, análise de associação caso-controle será aplicada, a fim de se detectar distribuição distinta das frequências alélicas e genotípicas entre grupos de casos e controles não afetados pela doença, recrutados de forma prospectiva, o que indicaria envolvimento do gene investigado no controle da susceptibilidade à doença.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avançar no entendimento da complexa natureza do controle molecular da susceptibilidade e a cura da lesão do ser humano à LTA. Para isso, nós aplicaremos técnicas de análise genética de associação baseada em populações, na investigação de locus candidato ao controle da susceptibilidade à doença em uma população brasileira.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fimt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 289.683

Objetivo Secundário:

- Descrever, clinicamente e epidemiologicamente, uma amostra populacional de indivíduos afetados por LTA, recrutados na FMT-HVD, Manaus, adequada para estudos de análise genética da susceptibilidade do hospedeiro a fenótipos da leishmaniose;
- Descrever uma população sem sinal ou histórico de leishmaniose, recrutada na mesma região geográfica que o grupo de casos e pareada para idade, gênero e etnia, para compor o grupo controle;
- Genotipar marcadores dos genes citados acima nos indivíduos de ambos os grupos de casos e controles, a fim de se estabelecer as frequências alélicas e genotípicas em cada grupo;
- Dosar as citocinas em amostras de sangue dos pacientes com LC antes e após o tratamento com miltefosina;
- Aplicar análise de associação baseada em populações a fim de buscar evidências da participação de variantes dos genes envolvidos no controle da suscetibilidade do hospedeiro à doença;
- Comparar os genótipos dos genes estudados e a concentração das citocinas com o tempo de cura.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

- Os riscos de participação dos voluntários de pesquisa neste estudo são aceitáveis levando-se em consideração os eventos adversos (EAs) já descritos em inúmeros ensaios clínicos que utilizaram a Miltefosina no tratamento da Leishmaniose Visceral e da Leishmaniose Tegumentar. Os riscos físicos para a saúde de participação neste estudo são muito pequenos e limitados ao procedimento de biópsia e coleta de sangue, ambos de rotina nos laboratórios clínicos. Em ambos os casos, você poderá sentir um desconforto temporário devido a introdução da agulha. Tanto a biópsia quanto a coleta de sangue poderá resultar em uma pequena lesão que quase sempre cura-se sozinha. Em raros casos, pode ocorrer infecção localizada.

Benefícios:

- Possivelmente os resultados deste estudo, contribuirão para a incorporação da miltefosina como medicamento a ser recomendado pelo MS no tratamento da leishmaniose cutânea. A longo prazo, os procedimentos médicos e laboratoriais aos quais você será submetido poderão facilitar a detecção de resistência à leishmaniose e seu tratamento, tomando possível evitar tratamentos inadequados. Além disso, espera-se que conhecimentos científicos adicionais sejam alcançados,

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 289.683

com consequente melhoria do tratamento de pessoas afetadas pela leishmaniose.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é de grande relevância pois pretende elucidar A susceptibilidade do ser humano a fenótipos da leishmaniose. Pretende verificar o papel de genes envolvidos no sistema imune e na cura de lesão sobre o controle da suscetibilidade do hospedeiro a doenças infecciosas causadas por pelo diferentes parasitas intracelulares. O Pesquisador crê que variantes dos genes possam estar envolvidos no controle da suscetibilidade do ser humano e a cura da lesão a leishmaniose cutânea causada pela *L. guyanensis* em uma população recrutada no município de Manaus.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo contém os itens fundamentais para ser avaliado pelo CEP descritas na Resolução 196/96, item VI - Protocolo de Pesquisa.

Recomendações:

Adequar o projeto e TCLE conforme as pendências relatadas a seguir.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Folha de rosto:

1- Falta preenchimentos dos itens: 10 (Outro Telefone), 12 (cargo), 16 (telefone), 17 (outro telefone). Todos os itens da folha de rosto devem ser preenchidos, se houver dificuldade em preencher devido inconsistências do sistema, sugerimos imprimir, preencher a mão, escanear e posteriormente anexar à Plataforma Brasil para análise por este CEP.

Resposta do pesquisador: Os campos foram preenchidos e a nova Folha de Rosto foi anexada.

Conclusão do relator: Pendência atendida.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

Após análise do TCLE observa-se houve adequação de algumas pendências, porém outras ainda carecem de maior esclarecimento, segundo o relato abaixo:

a) Observa-se discrepância nos métodos descritos no modelo de projeto da plataforma Brasil e o TCLE, pois no projeto esta descrito a retirada de 5 ml de sangue e no TCLE esse volume é de 10ml.

Resposta do pesquisador: Os itens foram corrigidos.

Parecer do relator: Identificado no TCLE a referencia de coleta de 5ml de sangue. Pendência atendida

b) Descrever o procedimento, riscos e desconfortos da biópsia de pele esclarecendo como será

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

**FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))**



Continuação do Parecer: 289,683

feito o exame.

Resposta do pesquisador: Os itens foram corrigidos.

Parecer do relator: O TCLE informa o desconforto, sangramento e infecção, além de quebra da confidencialidade, informando como será realizado os exames, bem as medidas para minimizar os riscos. Pendência atendida.

c) No tópico local do estudo, não está clara a procedência do grupo controle e o TCLE nem menciona o recrutamento do grupo controle.

Resposta do pesquisador: Foi corrigido no TCLE - métodos.

Parecer do relator: Pendência atendida.

d) No tópico permissão para estocagem, adicionar após a palavra estocagem os termos guarda ou armazenamento, a fim de facilitar a compreensão do sujeito da pesquisa.

Resposta do pesquisador: Foi realizado a mudança conforme solicitado pelo relator. Anexado a permissão de estocagem.

Parecer do relator: Pendência atendida.

e) No tópico riscos para a saúde/desconforto esclarecer quais seriam os desconfortos que o paciente pode sentir (dor, sangramento, roxo, inchaço no local e até infecção no local). Relatando ainda que existe o risco de perda da confidencialidade e que mecanismos o projeto pretende adotar para minimiza-los. Este tópico foi abordado no item 10 confidencialidade dos dados, mas merece a menção pois essa perda de confidencialidade também representa risco ao indivíduo.

Resposta do pesquisador: Foi corrigido no TCLE.

Parecer do relator: O TCLE informa o desconforto, sangramento e infecção, além de quebra da confidencialidade, informando como será realizado os exames, bem as medidas para minimizar os riscos. Pendência atendida.

f) Dentro das atribuições previstas no item VIII.4.c.8 da resolução 196/96, cabe a CONEP, após aprovação do CEP institucional, apreciar as pesquisas enquadradas nessa área temática.

Resposta do pesquisador: De acordo com a revisão da Resolução 446/2011, este protocolo não se inclui mais em área temática especial e, portanto, não deve ser encaminhado a CONEP: Seção VII das competências da comissão - IV - Analisar e emitir parecer, no prazo de 60 dias, e acompanhar os protocolos de pesquisa em áreas temáticas especiais em genética humana sempre que o

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 289.683

projeto envolver: 1) envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético; 2) armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniente com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais; 3) alterações da estrutura genética de células humanas para utilização in vivo; 4) pesquisas na área de genética da reprodução humana (reprogenética); 5) pesquisa em genética do comportamento e 6) pesquisas em que esteja prevista a dissociação irreversível dos dados dos sujeitos da pesquisa. Parecer do relator: A resolução citada trata da reestruturação da comissão da CONEP, contudo a descrição se refere a resolução 340/04. VI.3. O projeto não preenche nenhum desses critérios. Pendência atendida.

Detalhar na metodologia e no TCLE:

a) No tópico critério de inclusão, não há referência sobre o grupo controle.

Resposta do pesquisador: Foi detalhado tanto na metodologia (projeto de pesquisa quanto no TCLE.

Parecer do relator: Pendência atendida.

b) No tópico critério de exclusão está mencionando "crianças que não conseguem ingerir as cápsulas". Isso deixa dúvidas com relação a faixa etária de 4 a 65 anos, pois crianças de 4 anos não ingerem cápsulas. Sugiro rever a faixa etária com base nesse critério de exclusão.

Resposta do pesquisador: Como sugerido pelo relator, foi corrigido no projeto - critério de inclusão "10 a 65 anos".

Parecer do relator: Pendência atendida.

c) No tópico riscos, volto a reforçar a necessidade de descrever os riscos, que não podem ser considerados pequenos, pois além dos riscos resultantes dos procedimentos, há o risco de perda da confidencialidade.

Resposta do pesquisador: Foi corrigido tanto no projeto como no TCLE.

Parecer do relator: Pendência atendida.

d) Ajustar cronograma para início do projeto após aprovação em comitê de ética, pois segundo o cronograma existente o recrutamento de pacientes iniciou em 03/12/12.

Resposta do pesquisador: O cronograma foi corrigido tanto no projeto anexo pelo pesquisador

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 289,683

quanto na Plataforma Brasil.

Parecer do relator: Pendência atendida.

e) Solicitar a permissão para estocagem do material biológico: CNS Resolução 441/2011.

Resposta do pesquisador: Foi anexado ao protocolo o formulário padrão de armazenamento de material biológico, assinado pelo diretor da DEMPE.

Parecer do relator: Pendência atendida.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Considerando o feriado de 30/05/13 e o decreto de ponto facultativo em 31/05/13 que implicou em suspensão da reunião ordinária deste CEP, o coordenador-1 acata ad referendum o parecer da relatora, considerando que o interessado atendeu a todas as pendências apontadas.

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 196/96 de 10 de outubro de 1996, item IX.2, "c", utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

MANAUS, 31 de Maio de 2013

Assinador por:
Maria Paula Gomes Mourão
(Coordenador)

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br