



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

**Avaliação da expressão do Liver X receptor (LXR)
na leishmaniose tegumentar**

Riam Rocha França

Salvador (Bahia)
Março, 2017

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

Rocha França, Riam

Avaliação da expressão do Liver X receptor (LXR) na leishmaniose tegumentar / Riam Rocha França. -- Salvador, 2017.

42 f.

Orientador: Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira.

Coorientador: Aldina Maria Prado Barral.

TCC (Graduação - Medicina) -- Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina da Bahia, 2017.

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Leishmaniose Mucosa. 3. Resposta imune inata. 4. Fator de transcrição LXR. 5. Macrófagos. I. Sampaio Boaventura de Oliveira, Viviane. II. Maria Prado Barral, Aldina. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Avaliação da expressão do Liver X receptor (LXR) na leishmaniose tegumentar

Riam Rocha França

Professora orientadora: **Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira**

Coorientadora: **Aldina Maria Prado Barral**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MEDB60/2016.2, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia)
Março, 2017

Monografia: *Avaliação da expressão do Liver X receptor (LXR) na leishmaniose tegumentar*, de **Riam Rocha França**

Professora orientadora: **Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira**

Coorientadora: **Aldina Maria Prado Barral**

COMISSÃO REVISORA

- **Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira** (Presidente, Professora orientadora)
Professora do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia.
- **Daniel Abensur Athanzio**, Professor do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia.
- **Deboraci Brito Prates**, Professora do Departamento de Biomorfologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.
- **Jaqueline França Costa**, Professora do Departamento de Biointegração do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO:

Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em ____ de _____ de 2016.

*“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez
tão importante...” (Antoine de Saint-Exupéry)*

*Aos meus pais,
por sempre sonharem os meus sonhos.*

EQUIPE

- Riam Rocha França, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA.
Email: riamfranca@hotmail
- Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira, Departamento de Patologia e medicina legal, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, Pesquisadora no Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ
- Aldina Maria Prado Barral, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, Pesquisadora no Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ
- Antônio Ricardo Khouri Cunha, Pesquisador no Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ
- Valéria Borges, Pesquisadora no Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

- Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM)
 - Laboratório de Imunoparasitologia

Universidade Federal da Bahia (UFBA)

- Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)

Rega Institute for Medical Research – KULeuven

- Department of Microbiology and Immunology
 - Laboratory of Clinical and Epidemiological Virology

FONTES DE FINANCIAMENTO

1. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
2. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e
3. Recursos próprios da equipe

AGRADECIMENTOS

- ◆ À minha Professora orientadora, Doutora **Viviane Boaventura**, por ter me conduzido à experiência mais enriquecedora da minha graduação, a iniciação científica. Por tantas vezes ter acreditado em mim mais do que eu mesma. Por ter me exposto ao novo, ao estranho, ao assustador, me fazendo crescer. Por estar ao meu lado em todas as etapas da construção desse trabalho, me ensinando a ler, pensar e fazer ciência. Minha gratidão mais sincera.
- ◆ À Doutora **Aldina Barral**, minha co-orientadora, grande fonte de inspiração como pesquisadora para todos que a cercam, por sempre estar disponível a ajudar em todas as vezes que precisei.
- ◆ Aos Pesquisadores Colaboradores, **Dr. Ricardo Khouri** e **Dra. Valéria Borges**, pelo constante auxílio na construção desse trabalho, obrigado por fazerem eu me sentir como uma orientanda de vocês também.
- ◆ Aos Professores **Daniel Abensur Athanzio**, **Deboraci Brito Prates** e **Jaqueline França Costa**, membros da comissão revisora dessa monografia, pela disponibilidade e auxílio.
- ◆ Aos colegas do Laboratório de Imunoparasitologia, do Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ, pelo suporte sempre presente, sem o quais tudo teria sido muito mais difícil.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE QUADROS, FIGURAS E TABELAS	10
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	11
I. RESUMO	12
II. OBJETIVOS	13
III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
III.1. Leishmaniose Tegumentar Americana	14
III.1.1. Aspectos Epidemiológicos e Clínicos	14
III.1.2. Imunopatogênese	15
III.1.3. Diagnóstico e Tratamento	16
III.2. Liver X Receptor	16
IV. METODOLOGIA	18
IV.1. Definição das amostras	18
IV.2. Nanostring (expressão de RNAm)	19
IV.3. Imuno-histoquímica	20
V. RESULTADOS	21
VI. DISCUSSÃO	25
VII. CONCLUSÃO	27
VIII. REFERÊNCIAS	29
IX. ANEXOS	33
ANEXO I - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisas – Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz - IGM - FIOCRUZ	34
ANEXO II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pacientes com Leishmaniose Mucosa e Leishmaniose Cutânea	38
ANEXO III– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Doadores de Pele e Mucosa Normal	40
ANEXO IV– Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos	42

ÍNDICE DE QUADROS, FIGURAS e TABELAS

QUADRO

QUADRO 1. População estudada por Nanostring	19
--	----

FIGURAS

FIGURA 1. Vias canônicas associadas à Leishmaniose Tegumentar Humana	21
FIGURA 2. Expressão de LXR em amostras de Leishmaniose Mucosa, Leishmaniose Cutânea e mucosa normal (aumento de 200X e 400X)	22
FIGURA 3. Expressão de LXR em amostras de Leishmaniose Mucosa, Leishmaniose Cutânea e mucosa normal (aumento de 1000x)	23
FIGURA 4. Quantificação das células marcadas para LXR por área de tecido na leishmaniose Cutânea, leishmaniose Mucosa e na Mucosa normal.	24

TABELA

TABELA 1. Análise da quantificação de células marcadas para LXR nas amostras de leishmaniose tegumentar e controle sadio.	24
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SIGLAS

BcL-xL	"B-cell lymphoma-extra large"
FXR	"Farnesoid X receptor"
LXR	"Liver X Receptor"
PPAR	"Peroxisome proliferator-activated receptor"
Th	"T helper"
DNA	Ácido dextroribonucleico
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
COX	Ciclo-oxigenase
DAB	Diaminobenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
TGF	Fator transformador de crescimento
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
IHQ	Imuno-histoquímica
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	leishmaniose cutânea localizada
LM	Leishmaniose mucosa
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
MMP	Metaloproteinase de matriz
MN	Mucosa normal
iNOS	Oxido nítrico sintetase
PBS	"Phosphate buffered saline"
PN	Pele normal
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
NAIP	Proteína inibitória de apoptose neural
MCP	Proteína quimiotática de monocitos
PCR	Reação de polimerase em cadeia
RXR	"Retinoid X receptors"

ABREVIATURAS

<i>L. braziliensis</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>
<i>L. chagasi/infantum</i>	<i>Leishmania chagasi/infantum</i>

I. RESUMO

Avaliação da expressão do Liver X receptor (LXR) na leishmaniose tegumentar.

Fundamentação teórica: A Leishmaniose Tegumentar é endêmica no Brasil, com cerca de 240 mil novos casos nos últimos dez anos. Causada principalmente pela *Leishmania braziliensis*, caracteriza-se por lesões cutânea ou mucosa, com intenso infiltrado inflamatório e poucos parasitas, sobretudo, na leishmaniose mucosa. O “Liver X receptor” (LXR), membro da superfamília dos receptores nucleares, parece exercer função de destaque na regulação dos macrófagos em processos infecciosos. Genes inibidos pelo LXR expressam proteínas com efeitos pró-inflamatórios, sugerindo que esses receptores poderiam influenciar na resposta imune. Objetivo: avaliar a transcrição e a expressão proteica *in situ* de LXR em diferentes formas da leishmaniose tegumentar.

Metodologia: Amostras das lesões de pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucosa, amostras de pele normal (PN) e mucosa normal (MN) de doadores saudáveis (controles) foram submetidos à extração de RNAm (LCL=43, LM=04, PN= 20, MN=05). Em seguida, os transcritos foram analisados por *nanostring* para a expressão de centenas de moléculas envolvidas na resposta imune. As vias diferentemente expressas foram identificadas utilizando o software Ingenuity Pathway Analysis (IPA). A expressão proteica de LXR foi avaliada por imuno-histoquímica (LCL = 06, LM = 03, MN = 02) utilizando o anticorpo primário anti-LXR α . e a área marcada foi quantificada utilizando o software ImagePro. Resultados: (1) a expressão de RNAm para LXR estava diminuída tanto na LCL como na LM em relação aos controles; (2) houve tendência a menor expressão de LXR nas amostras de LCL e LM, quando comparadas às sadias; entretanto, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos Conclusão: Há redução na transcrição e tradução do LXR *in situ* na leishmaniose tegumentar, que pode estar relacionada a resposta inflamatória exacerbada nessa doença.

Palavras-chave: 1. Leishmaniose Cutânea, 2. Leishmaniose Mucosa; 3. Resposta imune inata; 4. Fator de transcrição LXR; 5. Macrófagos; 6. Imuno-histoquímica

II. OBJETIVOS

PRIMÁRIO

Avaliar a transcrição e a expressão *in situ* de LXR na LM e LCL

ESPECÍFICOS

1. Caracterizar a transcrição e a expressão proteica de LXR em lesões de pacientes com leishmaniose cutânea localizada e leishmaniose mucosa.
2. Comparar a transcrição e a expressão de LXR na lesão de pacientes com leishmaniose tegumentar e no tecido normal

III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

III.1. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

III.1.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, presente em 88 países e endêmica no Brasil. Estima-se a ocorrência de 1 a 1,5 milhões novos casos por ano no mundo (1). Nas últimas décadas, observou-se uma expansão geográfica da doença no território brasileiro. Enquanto em 1980 apenas 19 unidades da federação haviam registrado casos da doença, em 2003 todos os estados brasileiros já possuíam registros de casos autóctones (2). Cerca de 240 mil novos pacientes foram diagnosticados no Brasil nos últimos 10 anos. No ano de 2015, 19.404 novos casos foram registrados no país, com um coeficiente de detecção de 9,5 em 100.000 habitantes, sendo que 2.175 (11,21%) desses casos ocorreram no estado da Bahia (3,4). O agente etiológico responsável pela doença é o protozoário do gênero *Leishmania*. Sete espécies diferentes já foram identificadas no Brasil, sendo as três principais a *Leishmania (Leishmania) amazonenses*, *Leishmania (Viannia) guyanensi*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* (2,5). Na Bahia, a LTA é causada principalmente pela *L. braziliensis*. O contágio dá-se pela inoculação do parasita pela fêmea do inseto vetor, o flebotomíneo do gênero *Lutzomyia*, conhecido popularmente como mosquito-palha (2,5).

A LTA apresenta ampla diversidade de aspectos clinico-morfológicos, com comprometimento cutâneo e mucoso. A reação inflamatória desencadeada pela presença do patógeno, apesar de ser um mecanismo de defesa do organismo, pode causar lesão tecidual que se reflete nas diferenças clínicas dos subtipos da LTA (2). No pólo anérgico da resposta imune está a leishmaniose cutânea difusa (LCD), com lesões nodulares, com grande número de parasita, pouco infiltrado celular e sem formação de granulomas na histopatologia. A reação de hipersensibilidade tardia – reação intradérmica de Montenegro (IDRM)- ao antígeno de leishmania costuma ser negativa na LCD (2,6). No pólo hiperérgico está a leishmaniose Mucosa (LM), caracterizada por lesões destrutivas de mucosa nasal, faringe e laringe, com escassez de parasitas associado a uma intensa resposta imune celular e formação de granulomas. A IDRM costuma ser positiva na LM. (2,6,7). Nesse cenário, a leishmaniose cutânea localizada (LCL), a forma clínica mais prevalente no Brasil, exhibe um perfil inflamatório intermediário, com úlceras de

bordas elevadas e bem delimitadas, poucos parasitárias, formação de granuloma, e área restrita de destruição tecidual (2,8,9). Enquanto a LCL caracteriza-se por úlceras cutâneas com tendência à cura espontânea, a LCD e LM são formas mais graves da doença, com baixa resposta ao tratamento e falência terapêutica freqüente (2,5,8).

III.1.2.IMUNOPATOGENESE

Ao picar um hospedeiro infectado, a fêmea do flebotomíneo adquire a forma amastigota do protozoário, que no intestino do vetor evolui na forma promastigota. Durante o repasto sanguíneo do vetor, as formas promastigotas são injetadas no hospedeiro, interagirem com o sistema fagocítico mononuclear e se multiplicam no interior das células, novamente como amastigotas (2). Da interação entre o patógeno e a resposta imune do hospedeiro resulta a expressão clínica da leishmaniose (10). Inicialmente no local da inoculação ocorre uma resposta inflamatória aguda inespecífica, na qual participam células natural killer, polimorfonucleares (eosinófilos, neutrófilos), macrófagos e o sistema complemento, destruindo a maioria das amastigotas do ambiente extracelular. Na medida em que o parasita é fagocitado uma série de processos oxidativos são deflagrados, numa tentativa de eliminar os agentes invasores (7,10). Com a ativação da resposta imunológica do hospedeiro, há uma expansão de vários tipos celulares, sobretudo linfócitos TCD4⁺, expressando citocinas do tipo Th1 e Th17 (7). A expressão de IL-17, bem como das citocinas indutoras da sua síntese (IL-1 β , IL-23, IL-6 e TGF- β), foram detectadas na lesão de pacientes de LM. A resposta Th17 parece induzir dano tecidual pelo recrutamento de neutrófilos e liberação de proteinases. A hiperresponsividade ao parasita, com exacerbação da resposta Th1 e Th17, e desregulação dessa resposta parecem favorecer a persistência da lesão na LM (7,11). Pacientes com doença mucosa apresentam maior capacidade de produção de interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) pelas células mononucleares do sangue periférico, além da diminuição da secreção de IL-10, em comparação com a pacientes com LCL (7,10,12). Esses achados indicam que uma resposta das células T pouco regulada em pacientes com LM parece ser induzida pela produção de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α , bem como uma diminuição na capacidade de IL-10 e TGF- β de modular essa resposta. Tais alterações podem ser a base para os achados patológicos observadas nesta doença (7,11,13).

III.1.3. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Para o diagnóstico da LTA são consideradas as características clínicas e epidemiológicas, além do diagnóstico laboratorial. Diversas são as possibilidades diagnósticas no âmbito da pesquisa clínica (2)Dentre os exames parasitológicos estão a pesquisa de amastigota em esfregaço de lesão, cultura do parasita em meios artificiais, ou isolamento por inoculação em animais. O parasita pode ser identificado por histopatologia com imunohistoquímica (IHQ) ou por reação de polimerase em cadeia (PCR) da amostra. Esse último constitui o padrão ouro para o diagnóstico, apresentando maior sensibilidade que a avaliação histopatológica, já que pode haver pequena quantidade de parasita na LCL e LM (5). Outros métodos diagnósticos são os exames que avaliam a resposta imune ao parasita: a IDR (o significado em inglês) (resposta celular) e a sorologia por imunofluorescência indireta ou Elisa (resposta humoral) (2,9).

No Brasil, o tratamento padronizado e disponibilizado gratuitamente pelo Ministério da Saúde é o antimoníaco de N-metil-glucamina (Glucantime®), sob o esquema terapêutico preconizado pela Organização Mundial de Saúde: LCL: 10-20 mg/Sb⁺⁵/kg/dia durante 20 dias; LCD: 20 mg/Sb⁺⁵/kg/dia durante 20 dias; LM: 20 mg/Sb⁺⁵/kg/dia durante 30 dias (2). Nos pacientes em que o Glucantime não é tolerado, devido aos seus efeitos adversos (toxicidade cardíaca, hepática, pancreática e renal) e em gestante, é preconizado o uso da anfotericina B (2,9).

III.2. LIVER X RECEPTOR

O “Liver X receptor” (LXR) é um fator de transcrição ativado por ligantes, membro da superfamília dos receptores nucleares, assim como o Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), o Farnesoid X receptor (FXR) e o Retinoid X receptors (RXR), receptores relacionados ao metabolismo lipídico (14–16). Os LXRs formam heterodímeros obrigatórios com os receptores de retinóide X (RXRs) (16). Duas isoformas, codificadas por genes distintos, já foram identificadas, LXR α e LXR β (16). O LXR α tem sua expressão restrita ao fígado, rim, intestino, tecido adiposo, pulmão, baço e macrófagos, enquanto a isoforma β é expressa em quase todos os tecidos do corpo (17). O heterodímero LXR/RXR é ativado tanto por agonistas do LXR (oxiesteróis), quanto por agonistas do RXR (cis-ácido retinóico). Como os metabólitos do colesterol funcionam como ligantes naturais do LXR/RXR, esse heterodímero funciona como um “sensor” dos

níveis de colesterol celular, desempenhando um papel importante na homeostase lipídica: regulando o transporte de colesterol, induzindo a transcrição de insulina, promovendo a expressão de genes envolvidos no efluxo/absorção de colesterol, na sua conversão em ácidos biliares e na lipogênese (15,18,19). O LXR também exerce um importante papel da resposta imune, ao inibir a via do NF-kB (18–20). Muitos dos genes regulados negativamente pelo LXR trazem sequências de proteínas com efeitos pró-inflamatórios, como óxido nítrico sintase (iNOS), ciclo-oxigenase-2 (COX-2), as interleucinas IL-6 e IL-1b, a metaloproteinase de matriz (MMP)-9 e proteína quimiotática de monócitos (MCP) -1 e -3, proteína de macrófagos inflamatórios -1b (MIP-1b) e interferon (18). Além disso, a ativação do LXR está relacionada à maior sobrevivência de macrófagos, na medida em que sua ação inibe eventos apoptóticos por ativar genes como: Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large), Birc1a/NAIP (proteína inibitória de apoptose neural), e AIM (inibidor de fator apoptótico secretado por macrófagos) (18). Esta dupla capacidade para promover o efluxo de colesterol e inibir a inflamação repercute em uma função protetora para os LXR contra doenças como a aterosclerose.

O tratamento com agonistas de LXR reduz a incidência de aterosclerose em modelos animais. Por outro lado, animais deficientes em LXR desenvolvem fígados aumentados, colesterol elevado no sangue e são altamente propensos a aterosclerose (20). Sabendo-se que macrófagos naturalmente expressam LXR e que desempenham um papel fundamental na resolução de inflamações e infecções, além de serem as células hospedeiras da infecção por leishmania, procuramos avaliar o papel do receptor nuclear LXR na patogênese da LCL e LM.

IV. METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido sob os critérios da Regulamentação da Bioética no Brasil, Resolução 466/96 e resoluções complementares do Conselho Nacional de Saúde, que determinam as diretrizes a serem adotadas nas pesquisas que envolvem seres humanos, atendendo desta forma às exigências éticas e científica fundamentais. Trata-se de um estudo experimental para análise da transcrição e expressão *in situ* do LXR na leishmaniose tegumentar. O estudo foi submetido a provação pelo comitê de ética da Fiocruz (parecer número 1.437.205) e o consentimento informado foi obtido de todos os pacientes ou responsáveis legais.

IV.1. DEFINIÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de lesões foram obtidas em uma área endêmica para LTA, no município de Mutuípe (Bahia, Brasil). Nesse local são atendidos cerca de 10 casos novos de LCL por mês e 5 casos novos de LM por ano.

Para o diagnóstico da LCL e da LM foram considerados critérios clínico-epidemiológico, IDRM e a positividade em pelo menos um dos seguintes testes: sorologia anti-leishmania, PCR, histopatologia com IHQ. Como critério clínico para LCL foi considerada a presença de lesões ulceradas, única ou múltiplas, com bordos bem delimitados e fundo granuloso. A suspeita de LM foi estabelecida a partir da avaliação por médico otorrinolaringologista, que considerou a presença de edema, erosão, perfuração do septo e/ou aspecto granulomatoso, identificados em rinoscopia anterior e/ou fibronasolaringofaringoscopia.

Mucosa normal (MN) e pele normal (PN) foram obtidas de doadores saudáveis recrutados, respectivamente, no ambulatório de otorrinolaringologia do Hospital Santa Izabel e de cirurgias plásticas. Foram convidados a participar apenas indivíduos maiores de 18 anos, com indicação de cirurgia nasal ou mamoplastia. Não houve nenhuma modificação no procedimento cirúrgico proposto e a amostra foi obtida a partir do material retirado rotineiramente no procedimento de rinosseptoplastia/mamoplastia.

IV.2. NANOSTRING (EXPRESSÃO DE RNAm)

Para a análise da expressão de RNAm foram utilizadas 60 amostras (LCL=33, PN=18, MN=5, LM=4). As amostras foram analisadas em 03 grupos diferentes: LCL1, LCL2, LM (quadro I). No grupo LCL1 os pacientes foram divididos pelo tempo da lesão (lesão precoce e lesão tardia). No grupo LCL 2 não houve separação por tempo de lesão.

A metodologia nCounter (Nanostring) utiliza sondas específicas com “código de barra” fluorescente para quantificar RNAs em multiplex (100-500 genes selecionados pelo pesquisador) por hibridização, sem reação enzimática intermediária, resultando numa sensibilidade maior que microarranjos e equivalente ao PCR em tempo real. Foram analisados, simultaneamente, os RNAm para 500 moléculas diferentes. Em seguida foi utilizado um software de análise de dados, o Ingenuity Pathway Analysis (IPA), para analisar as vias e genes diferentemente expressos nas lesões em comparação com o tecido normal.

Quadro 1. População estudada por Nanostring. Foram realizados dois ensaios para leishmaniose cutânea e um para leishmaniose mucosa. No LCL 1 os pacientes foram separados pelo tempo de lesão (lesão precoce e lesão tardia). No LCL 2 e no LM não houve separação pelo tempo de lesão.

Grupo	Número (n) total de casos	População estudada/n	
LCL 1	35	PN = 10	
		LCL = 25	Lesão precoce = 8
			Lesão tardia = 17
LCL 2	16	PN = 8	
		LCL = 8	
LM	9	MN = 5	
		LM = 4	

IV.3. IMUNO-HISTOQUÍMICA

A IHQ foi utilizada para validação das proteínas identificadas na etapa anterior. Foram utilizadas amostras de 06 pacientes LCL, 03 LM e 02 MN. Secções em parafina foram fixadas em lâminas ImunoSlide. Os cortes foram desparafinizados em xilol e acetona e posteriormente hidratados gradualmente em álcool (100%, 70%, 50%, 30%) e água destilada. A recuperação antigênica foi realizada durante 35 minutos em incubadora à 95°C (calor úmido) com Tampão Dako Target Retrieval, diluído 10 vezes (pH 9). A peroxidase endógena foi bloqueada nos tecidos com 20 minutos de H₂O₂, seguida de bloqueio com leite desnatado a 3%. O anticorpo primário (Anti-LXR alpha antibody - ab41902 - 20 µg/ml), diluído em PBS-tween foi colocado sobre os tecidos a serem testados, que permaneceram incubados overnight à 4°C. Os tecidos controle foram incubados com isotipo (IgG - Anti-coelho - 20 µg/ml). Após lavagem em PBS-tween (pH 7,4) os fragmentos de tecidos foram expostos a DAKO Advanced HRP LINK (K 4068), por 40 minutos. Após nova lavagem, foi adicionado Advance HRP enzyme- DAKO (K 4068) por 40 minutos seguido de mais uma lavagem e revelação da marcação com DAB no escuro. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina. As imagens digitais foram obtidas utilizando o microscópio Nikon E600, câmara digital Q-Color 1 Olympus e o software Image-Pro Plus (Media Cybernetics). Para a quantificação, foram obtidas imagens de 06 campos contínuos fotografados em cada lâmina, utilizando-se um aumento de 400X. A análise dos dados obtidos foi feita no programa GraphPad Prism 6. Para comparação dos grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

VII. RESULTADOS

Através do Nanostring, foram avaliadas diversas vias canônicas associadas à leishmaniose tegumentar. Dezenas de vias se mostraram ativadas nas amostras de leishmaniose (LCL e LM), tanto na lesão precoce como na lesão tardia. As vias do LXR/RXR e do PPAR estavam inibidas nas amostras estudadas, em comparação com os controles sadios (figura 1).

Canonical Pathway	GSE63931 LCL	GSE43880 LCL	GSE55664 LCLearly	GSE55664 LCLlate	LCL	LM
TREM1 Signaling	2.68	2.74	4.08	4.12	2.68	4.01
Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	2.21	4.07	2.08	2.08	2.74	4.15
Colorectal Cancer Metastasis Signaling	2.05	4.12	4.12	2.05	2.45	2.22
Leukocyte Extravasation Signaling	2.08	4.05	4.05	2.05	2.05	2.05
LXR/RXR Activation	-0.12	-0.39	-2.29	-0.39	-0.48	-0.31
Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses	2.12	2.81	4.12	2.81	2.48	2.21
Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	2.23	2.77	4.02	2.80	2.48	2.71
IL-8 Signaling	2.23	2.87	2.87	2.88	2.48	2.18
iCOS-iCOSL Signaling in T Helper Cells	2.03	2.85	2.88	2.85	2.85	2.81
Tec Kinase Signaling	2.23	2.87	2.88	2.11	2.24	2.89
NF-κB Signaling	1.98	2.21	2.30	1.88	2.28	4.02
Phospholipase C Signaling	2.12	2.48	2.83	2.12	2.12	2.16
HMGB1 Signaling	1.88	2.88	2.88	2.71	1.12	2.74
PKCθ Signaling in T Lymphocytes	1.15	2.15	2.88	2.22	1.84	2.87
Fcγ Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes	1.83	2.74	2.83	2.85		2.85
Calcium-induced T Lymphocyte Apoptosis		2.85	2.15	2.88	2.24	2.85
IL-6 Signaling	0.88	2.83	2.11	1.88	2.88	2.89
Chemokine Signaling	1.34	2.48	2.83	2.84	1.83	2.83
p38 MAPK Signaling	0.28	2.23	2.12	2.12	1.34	2.22
Acute Phase Response Signaling	1.12	2.11	2.88	2.88	2.88	1.88
LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	1.88	2.83	2.88	2.88		2.83
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	2.88	2.88	2.34	1.34		2.88
PI3K Signaling in B Lymphocytes		2.88	2.83	2.45		2.12
Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors	1.88	2.23	2.23	2.23		2.88
Fc Epsilon RI Signaling	1.83	2.71	1.88	1.88		1.83
IL-2 Signaling	0.28	2.24	1.34	1.88	2.88	1.88
fMLP Signaling in Neutrophils	1.88	2.83	2.88	2.45		
IL-9 Signaling	1.88	2.88	2.88		2.88	2.24
iNOS Signaling		2.24	2.24	2.24		2.48
Interferon Signaling		2.18	2.23	2.23		1.88
VDR/RXR Activation	1.34	1.83	1.12	2.12		2.45
Renin-Angiotensin Signaling	0.88	1.88	2.23	1.83	1.88	1.83
PPAR Signaling		-0.12	-1.83	-0.39		-0.23
Retinoic acid Mediated Apoptosis Signaling		2.88	2.88	2.88		

Figura 1. Vias canônicas associadas à Leishmaniose Tegumentar Humana. Avaliação da ativação de vias relacionadas à resposta imune na leishmaniose tegumentar humana (LC e LM) em comparação com tecidos sadios, através de Nanostring. Vias ativadas estão representados em vermelho. Em azul estão representadas as vias cuja expressão foi diminuída em relação ao tecido sadio. A amplitude dessa ativação/inativação é mostrada através da variação na escala de cores, com tom intenso representando maior variação e tons mais claros representando menor variação.

Para avaliar a expressão de LXR nas lesões LXR, foi feita a análise por microscopia óptica das amostras dos tecidos marcados por IHQ. (Figura 2 e 3).

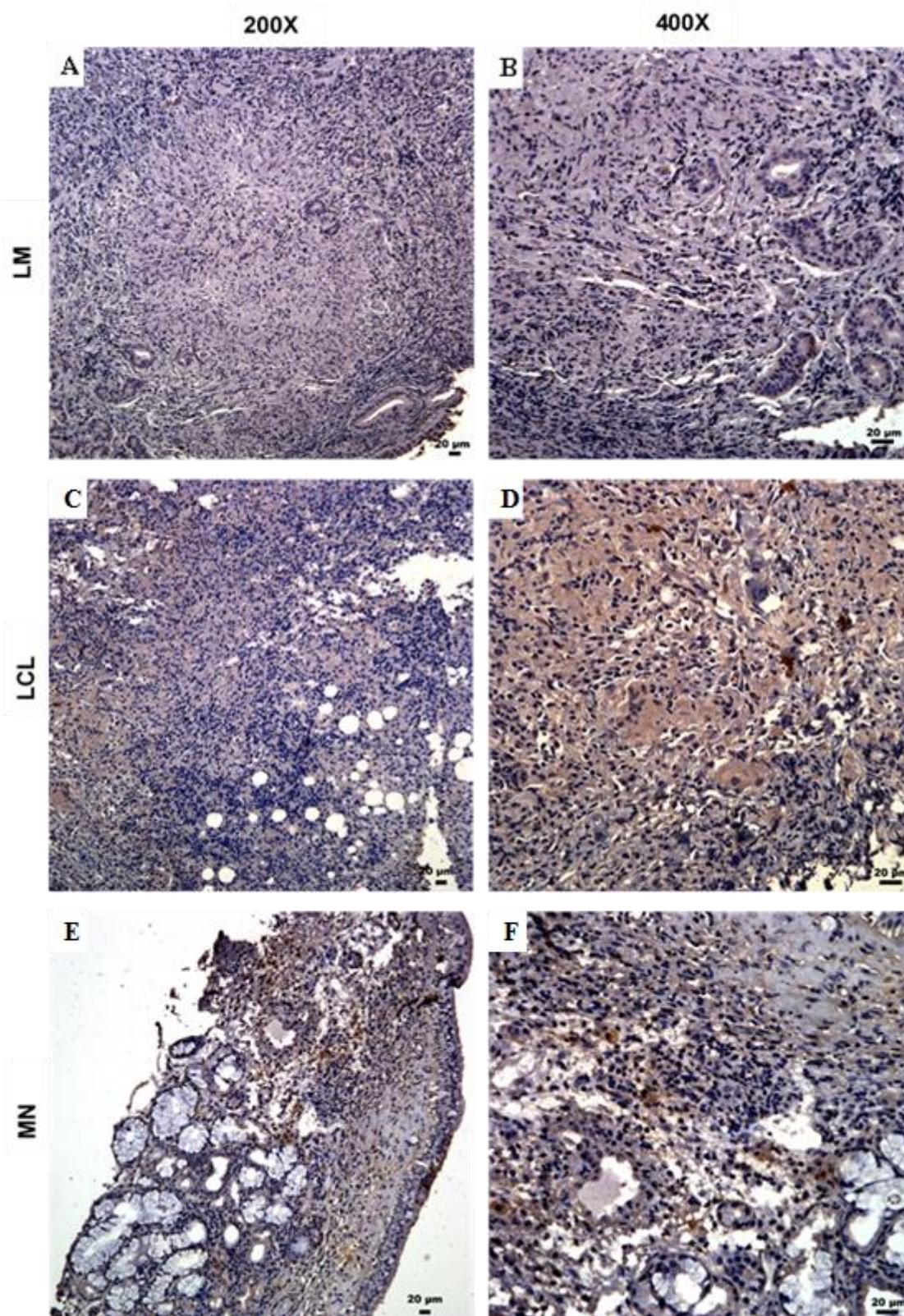


Figura 2. Expressão de LXR em amostras de Leishmaniose Mucosa, Leishmaniose Cutânea e mucosa normal (aumento 200X e 400X). Imuno-histoquímica para LXR em amostras de pele humana. A-B: Leishmaniose Mucosa, sem marcação positiva. C-D: Leishmaniose cutânea, poucas células marcadas. E-F: mucosa normal, maior número de células marcadas. A, C e E estão aumentadas 200X. B, D e F estão aumentadas 400X

Houve uma maior quantidade de células marcadas para LXR, por área, em indivíduos saudáveis (Figuras 2E, 2F, 3E e 3F). As amostras de LM apresentaram redução ou ausência de células positivas para LXR (Figuras 2A, 2B, 3A e 3B).

As expressão do LXR em amostras de LCL apresentou um padrão intermediário (Figuras 2C, 2D, 3C e 3D).

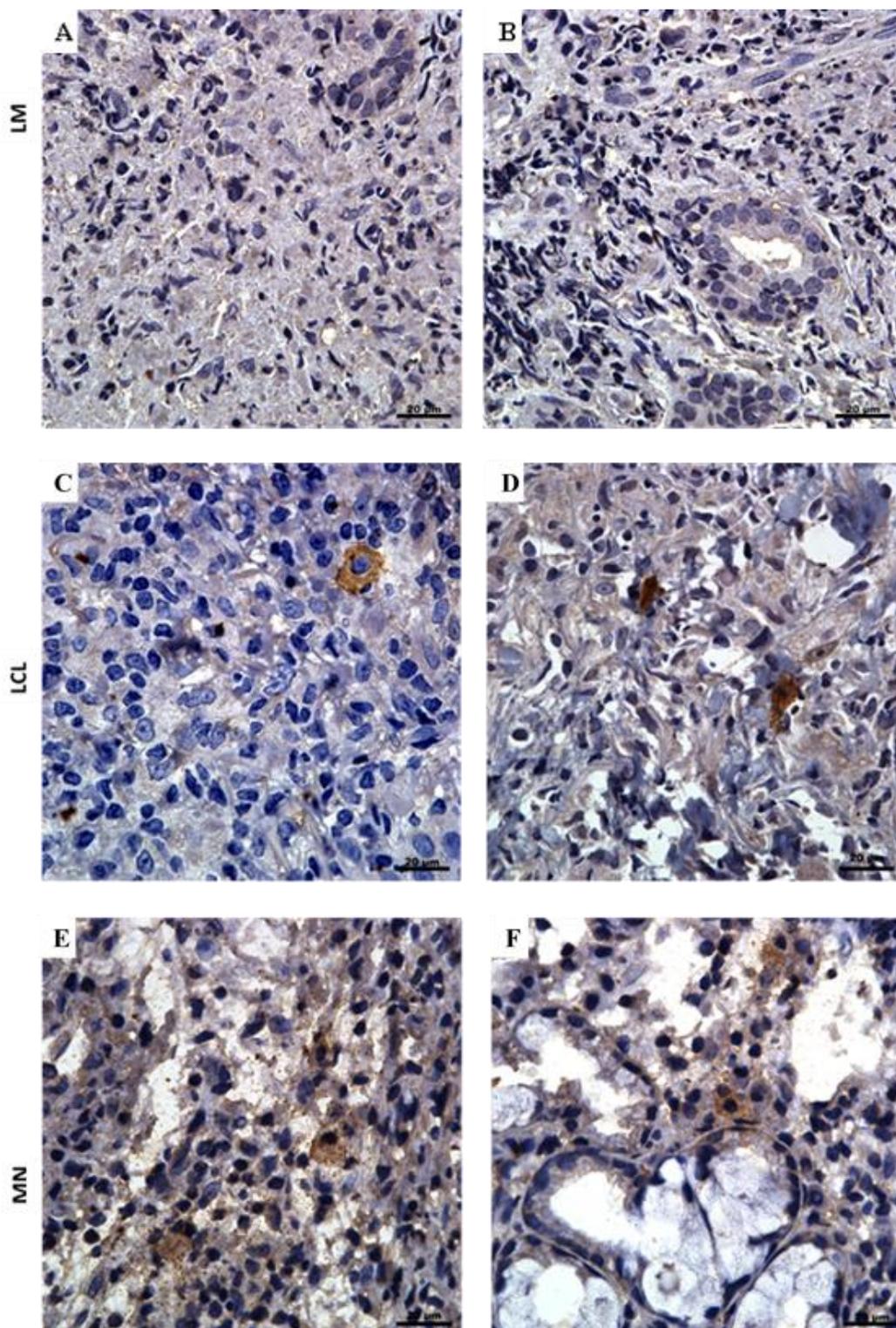


Figura 3. Expressão de LXR em amostras de Leishmaniose Mucosa, Leishmaniose Cutânea e mucosa normal (aumento 1000X). Macrófagos marcados para LXR. A-B: Leishmaniose Mucosa (LM). C-D: Leishmaniose cutânea localizada (LCL). E-F: Mucosa Normal (MN). Imagens aumentadas 1000x.

Houve uma tendência a menor expressão de LXR nas amostras de LCL e LM, quando comparadas às sadias; entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre a quantificação de células marcadas nos diferentes grupos ($P= 0,067$) (Tabela 2, Figura 4).

Tabela 1. Quantificação de células marcadas para LXR nas amostras de leishmaniose tegumentar e controle sadio.

Tecido	QUANTIFICAÇÃO		
	Células marcadas	Área em mm ²	cel/área em mm ²
LCL			
LCL 1	4	0,5766	6,93721817551162
LCL 2	0	0,684	0
LCL 3	0	0,2796	0
LCL 4	0	0,140970	0
LCL 5	4	0,5792	6,906077348066297
LCL 6	0	0,6498175	0
LM			
LM 1	0	0,76488	0
LM 2	1	0,696085	1,436606161603827
LM 3	0	0,730978	0
MN			
MN 1	11	0,39569957	27,798867711683386
MN 2	12	0,5481828	21,89050805680149

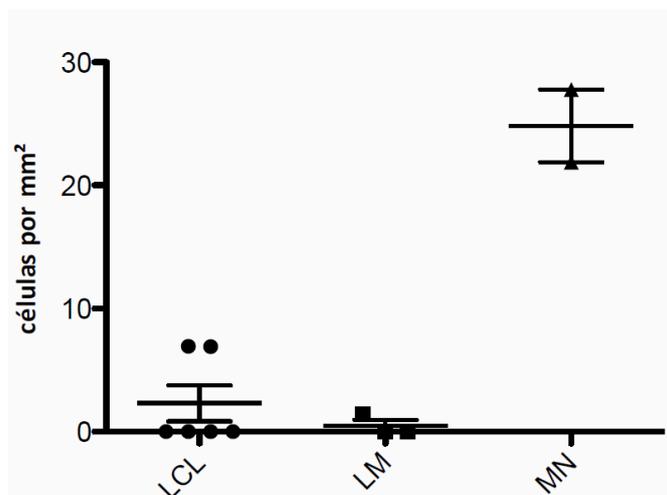


Figura 4. Análise da quantificação das células marcadas para LXR por área de tecido na leishmaniose Cutânea, leishmaniose Mucosa e na Mucosa normal. Análise estatística foi feita com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallistest ($P=0,067$).

V. DISCUSSÃO

Os dados encontrados nesse trabalho demonstram uma redução da transcrição e sugerem sub-expressão de LXR nos pacientes com LCL e LM, em comparação com os doadores saudáveis. Já é sabido que o LXR tem um importante papel na resposta imune inata, sobretudo, no que se refere às respostas inflamatórias, inibindo a via do NF- κ B (18–20). Apesar dos mecanismos específicos ainda serem pouco conhecidos, a ativação do LXR é capaz de inibir a síntese de diversos genes pró-inflamatórios como óxido nítrico sintase (iNOS), ciclo-oxigenase-2 (COX-2), interleucinas IL-6 e IL-1 β , metaloproteinase de matriz (MMP)-9, proteína quimiotática de monócitos (MCP) e proteína de macrófagos inflamatórios-1 β (MIP-1 β) (18). Trabalhos anteriores já haviam demonstrado que agonistas do LXR são capazes de inibir uma série de eventos transcricionais inflamatórios relacionados à infecção bacteriana em macrófagos (21,22). Outros estudos demonstraram a capacidade que agonistas do LXR tem de reduzir *in vivo* a inflamação em modelos animais de dermatite de contato e de aterosclerose (23,24). A sub-expressão do LXR identificada nesse trabalho pode estar relacionada a uma desregulação na modulação da resposta Th1 e Th17, com consequente exacerbação da resposta inflamatória nas lesões e destruição tecidual encontrada nessas lesões (7).

A regulação da atividade e sobrevivência dos macrófagos é outro fator importante na duração, magnitude e características das respostas imunes. A morte programada das células limita a amplitude da inflamação e facilita sua resolução (18,25). A ativação do LXR está relacionada com uma maior sobrevivência dos macrófagos e sua inibição está relacionada com mais eventos apoptóticos, considerando que a via ativa genes com efeitos inibidores da apoptose como: Bcl-xL, Bcl-2/NAIP (proteína inibitória de apoptose neural), e AIM (inibidor de fator apoptótico secretado por macrófagos) (18). A inibição apoptótica através da ativação do LXR já foi demonstrada nas infecções pelos seguintes patógenos: *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* (26,27). Considerando que na LM, ocorrem mais eventos apoptóticos, pela supressão do LXR, em relação aos outros grupos, é possível que esses eventos estejam relacionados à maior amplitude da inflamação e maior dificuldade na resolução da lesão.

Diferentemente do que foi encontrado na infecção por *L. brasilienses*, nesse trabalho e do que já foi demonstrado para infecções bacterianas, em que a deficiência do LXR é um fator complicador das infecções, Bruhn e colaboradores ao analisarem a relação entre o

LXR e a infecção por *Leishmania chagasi/infantum*, na leishmaniose visceral, encontraram resultados opostos. Camundongos deficientes em LXR apresentavam melhor resposta frente à infecção por *L. chagasi/infantum* do que os camundongos selvagens, já que os macrófagos LXR-deficientes eliminaram parasitas mais eficientemente do que os do tipo selvagem, além de produzirem mais NO e Interleucina-1B (IL-1B) (28). Cabe ressaltar que as leishmanioses tegumentar e visceral têm mecanismos completamente diferentes, o que pode explicar essa discordância de resultados frente à presença do LXR. Enquanto na leishmaniose visceral é possível encontrar muitos parasitas no hospedeiro, nas leishmanioses tegumentar a resposta imune tem maior destaque no desenvolvimento das lesões, que possuem pouquíssimos parasitas, portanto uma exacerbação na resposta inflamatória é benéfica na eliminação de parasitas na leishmaniose visceral e prejudicial na resolução da lesão na leishmaniose tegumentar.

Apesar dos resultados encontrados nesse trabalho serem congruentes com diversos outros estudos anteriormente publicados, é preciso ressaltar que o número de casos estudados, sobretudo na etapa das imuno-histoquímicas, foi pequeno. Além disso, não foram analisadas amostras de pele normal por imuno-histoquímica, o que impediu uma comparação pareada dos grupos estudados.

Nas próximas etapas desse trabalho, novas análises por imuno-histoquímica serão feitas, uniformizando os grupos estudados. Ensaios pilotos *in vitro* também já foram iniciados, onde macrófagos humanos infectados por *leishmania* foram expostos à agonistas do LXR para que seja observado a evolução da infecção e a variação no perfil de citocinas, com e sem estímulo à via do LXR.

VI. CONCLUSÃO

1. Houve menor transcrição de RNAm para LXR nos pacientes portadores de LCL e LM, em relação às amostras sadias.
2. Houve tendência a menor expressão de LXR na LCL e na LM, em relação aos tecidos sadios na imuno-histoquímica, entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

VII. SUMMARY

Evaluation of liver X receptor (LXR) expression in cutaneous leishmaniasis.

Background: cutaneous Leishmaniasis is endemic in Brazil, with about 240,000 new cases in the last ten years. Mostly caused by *Leishmania braziliensis*, it is characterized by cutaneous or mucous lesions, with intense inflammatory infiltrate and few parasites, especially in mucous leishmaniasis. The "liver X receptor" (LXR), a member of the nuclear receptor superfamily, seems to have a prominent role in the regulation of macrophages in infectious processes. Genes inhibited by LXR express proteins with proinflammatory effects, suggesting that these receptors influence the immune response.

Objective: evaluate a transcription and an in situ protein expression of LXR in different forms of cutaneous leishmaniasis. Methodology: Samples of lesions from patients with localized cutaneous leishmaniasis (LCL), mucous leishmaniasis (LM), normal skin samples (PN) and normal mucosa (MN) of healthy donors (control) were submitted to a RNA extraction (LCL = 43, LM = 04, PN = 20, MN = 05). Then the transcripts were analyzed by nanostring for an expression of the hundreds of molecules involved in the immune response. The differently pathways expressed were identified by Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software. Protein expression of LXR was evaluated by immunohistochemistry (LCL = 06, LM = 03, MN = 02) using anti-LXR α primary antibody and the marked area was quantified using ImagePro software. Results: (1) the expression of mRNA for LXR was decreased in both LCL and LM compared to controls; (2) there was a trend to lower LXR expression in LCL and LM samples when compared to healthy ones; however, there was no significant statistical difference between the groups. Conclusion: There is a reduction in transcription and translation of LXR in situ in cutaneous leishmaniasis, which may be related to an exacerbated inflammatory response in this disease.

Key words: 1. Cutaneous Leishmaniasis, 2. Mucous Leishmaniasis; 3. Innate immune response; 4. LXR transcription factor; 5. Macrophages; 6. Immunohistochemistry

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Desjeux P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004;27(5):305–18.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana Diagnóstico Clínico e Diferencial [Internet]. 1ª. 2006. Available from: <https://www.nescon.medicina.ufmg.br/biblioteca/imagem/3323.pdf>
3. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coeficiente de detecção de casos de Leishmaniose Tegumentar por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015 [Internet]. Sinan/SVS/MS. 2015. p. 2015. Available from: http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/07/LT-Coef_Deteco.pdf
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015 [Internet]. Sinan/SVS/MS. 2015. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/07/LT-Casos.pdf>
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância em Saúde [Internet]. MINISTÉRIO. SVS/MS JB da SJ–, editor. Brasília – DF; 2014. 524-546 p. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/novembro/27/guia-vigilancia-saude-linkado-27-11-14.pdf>
6. Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991;86(1):51–6.
7. Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, De Andrade J, Dos Santos WLC,

- Clarêncio J, et al. Human mucosal leishmaniasis: Neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol*. 2010;
8. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de bolso doenças infecciosas e parasitárias [Internet]. 8ª. Vol. 33, Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. BRASÍLIA - DF; 2010. p. 286–286. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46651991000400018&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 9. Saúde FN de, Fundação Nacional de Saúde. Manual de controle da Leishmaniose tegumentar americana. Ministério da Saúde. 2000. 1-62 p.
 10. Carvalho LP, Passos S, Schriefer A, Carvalho EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol*. 2012;3(OCT):1–9.
 11. Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J, Schriefer A, Machado PRL, Lessa H, et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun*. 2005;73(12):7853–9.
 12. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, De Jesus AR, Dutra WO, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun*. 2002;70(12):6734–40.
 13. Goto H LJ. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2010;8(4):419–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20377337
 14. Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*. 1995;83(6):841–50.
 15. McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear

- receptors and coregulators. *Cell*. 2002;108(4):465–74.
16. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995;83:835–9.
 17. Chuu C-P, Kokontis JM, Hiipakka R a, Liao S. Modulation of liver X receptor signaling as novel therapy for prostate cancer. *J Biomed Sci*. 2007;14(5):543–53.
 18. Valledor AF. The innate immune response under the control of the LXR pathway. 2005;210:127–32.
 19. Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors ?? and ?? *J Biol Chem*. 2002;277(21):18793–800.
 20. Ricote M, Valledor AF, Glass CK. Decoding Transcriptional Programs Regulated by PPARs and LXRs in the Macrophage: Effects on Lipid Homeostasis, Inflammation, and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(2):230–9.
 21. Castrillo A, Joseph SB, Marathe C, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *J Biol Chem*. 2003;278(12):10443–9.
 22. Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med*. 2003;9(1078–8956):213–9.
 23. Terasaka N, Hiroshima A, Koieyama T, Ubukata N, Morikawa Y, Nakai D, et al. T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *FEBS Lett*. 2003;536(1–3):6–11.
 24. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson M a, Collins AR, Laffitte B a, et al. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(11):7604–9.
 25. J S. Apoptosis. 1997;61(April):375–80.

26. Joseph SB, Bradley MN, Castrillo A, Bruhn KW, Mak PA, Pei L, et al. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell*. 2004;119(2):299–309.
27. Valledor AF, Hsu L, Ogawa S, Sawka-Verhelle D, Karin M, Glass CK. Activation of liver X receptors and retinoid X receptors prevents bacterial-induced macrophage apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(51):17813–8.
28. Bruhn KW, Marathe C, Maretta-Mira AC, Nguyen H, Haskell J, Tran TA, et al. Lxr deficiency confers increased protection against visceral leishmania infection in mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(11).

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisas – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz- FIOCRUZ

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ - FIOCRUZ/BA</p> </div> <div style="text-align: right;">  </div> </div>								
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA								
<p>Título da Pesquisa: Biologia de Sistemas aplicada ao entendimento da patogênese da leishmaniose tegumentar americana de importância para a Bahia.</p> <p>Pesquisador: Aldina Maria Prado Barral</p> <p>Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);</p> <p>Versão: 4</p> <p>CAAE: 38573414.1.0000.0040</p> <p>Instituição Proponente: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA</p> <p>Patrocinador Principal: Financiamento Próprio</p>								
DADOS DO PARECER								
Número do Parecer: 1.437.205								
<p>Apresentação do Projeto:</p> <p>A leishmaniose tegumentar americana (LTA) constitui um importante problema de saúde pública no Brasil, de caráter endêmico, sendo o Glucantime® a droga de escolha para seu tratamento e que apresenta sérios efeitos adversos. As tentativas de obtenção de novas opções terapêuticas não têm sido bem sucedidas, e como estratégia para identificar novos alvos para tratamento, propõe-se o estudo de amostras de tecido de portadores das diferentes formas de leishmaniose e de doadores normais, através de métodos de alta performance.</p>								
<p>Objetivo da Pesquisa:</p> <p>Objetivos Primário "Obter a assinatura gênica e perfil proteômico das diferentes formas da leishmaniose cutânea".</p> <p>Objetivos secundários:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) "Descrever o conjunto de genes expressos (transcriptoma) em biópsias de lesões de pacientes com LCL, LM, LRC, pele e mucosa normal". 2) "Descrever o conjunto de proteínas presentes (proteoma) em biópsias de lesões de pacientes 								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121</td> <td style="padding: 2px;">CEP: 40.296-710</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Bairro: Candeal</td> <td style="padding: 2px;">Município: SALVADOR</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">UF: BA</td> <td style="padding: 2px;">E-mail: cep@bahia.fiocruz.br</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Telefone: (71)3176-2327</td> <td style="padding: 2px;">Fax: (71)3176-2285</td> </tr> </table>	Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121	CEP: 40.296-710	Bairro: Candeal	Município: SALVADOR	UF: BA	E-mail: cep@bahia.fiocruz.br	Telefone: (71)3176-2327	Fax: (71)3176-2285
Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121	CEP: 40.296-710							
Bairro: Candeal	Município: SALVADOR							
UF: BA	E-mail: cep@bahia.fiocruz.br							
Telefone: (71)3176-2327	Fax: (71)3176-2285							
<small>Página 01 de 04</small>								

CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA



Continuação do Parecer: 1.437.205

com LCL, LM,LRC,pele e mucosa normal".

- 3) "Identificar, entre as vias diferentemente expressas nas LCL e nas formas graves, quais os potenciais alvos para intervenções terapêuticas através de ferramenta de bioinformática.
- 4) Integrar, através de modelos estatísticos, a expressão gênica e protéica das moléculas encontradas em (1) e (2)', a fim de identificar as vias de regulação da LTA..
- 5) Validar os genes e proteínas expressos diferencialmente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Relacionados à biópsia de pele e mucosa: sangramento de pequeno volume, autolimitado.

Benefícios: Os resultados desse estudo poderão sugerir novas ferramentas de tratamento para a leishmaniose tegumentar, doença cujo arsenal terapêutico atual tem alta toxicidade e em alguns casos falência da resposta clínica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo está apresentado em sua versão no 4, na qual são respondidas pendências assinaladas no Parecer Consubstanciado CEP CPqGM/FIOCRUZ 1.176.209, de 30/07/2015, a saber:

NO PROTOCOLO DE PESQUISA:

- 1) Apresentar justificativa para uso do material em pesquisas futuras.

RESPOSTA: "Algumas dessas amostras são extremamente raras. A esporadicidade desses achados reforçam a importância de mantê-los armazenados em biorrepositório durante a pesquisa. Essas amostras somente serão utilizadas em pesquisas futuras, durante o período de armazenamento em biorrepositorio, caso novo projeto de pesquisa seja aprovado pelo CEP e com TCLE específico para cada novo projeto aplicado a cada paciente".

ATENDIDA

- 2) Apresentar justificativa para dissociação dos dados das amostras a serem mantidas em biorrepositório,em atendimento às Resoluções 441/2011 e 466/2012.

RESPOSTA: "As amostras não serão dissociadas dos dados. Esse adendo foi acrescentado ao texto original e está marcado em amarelo".

ATENDIDA

- 3) Apresentar o questionário a ser aplicado aos portadores de leishmaniose entre os procedimentos metodológicos, conforme explícito no TCLE para Pacientes com Leishmaniose

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121
Bairro: Candeal CEP: 40.296-710
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3176-2327 Fax: (71)3176-2285 E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

**CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA**



Continuação do Parecer: 1.437.205

Mucosa e Leishmaniose Cutânea.

RESPOSTA: "Envio o questionário em anexo".

ATENDIDA

NOS TERMOS DE APRESENTAÇÃO OBRIGATÓRIA:

1) Anexar declaração de anuência da pesquisadora DEBORACI PRATES, listada na equipe do projeto como Pesquisadora Colaboradora do Departamento de Biomorfologia- UFBA.

RESPOSTA: "A pesquisadora DEBORACI PRATES, listada na equipe do projeto como Pesquisadora Colaboradora do Departamento de Biomorfologia- UFBA, está afastada das atividades da pesquisa por Licença Maternidade, portanto não contribuirá mais nesse projeto e seu nome foi retirado da lista".

ATENDIDA

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

São anexados o questionário, o "Regulamento de Biorrepositório", o projeto original e o Formulário "Informações Básicas do Projeto", com as correções solicitadas e acima referidas.

Recomendações:

Corrigir a resposta do Formulário "Informações Básicas do Projeto" para "Sim", no item "Haverá retenção de amostras em banco"?

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em cumprimento da Res. 466/2012 e Norma Complementar vigente, enviar relatórios semestrais a partir desta data, e relatório final em até um mês após o término da vigência do projeto conforme cronograma aprovado neste protocolo. Caso haja inclusão de outra fonte de financiamento após esta aprovação, informar ao CEP como emenda ao protocolo incluindo o Termo de Outorga ou documento equivalente e realizando as alterações pertinentes na Folha de Rosto para indicar modificação do patrocinador principal.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_370256.pdf	17/02/2016 21:27:41		Aceito

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121
 Bairro: Candeal CEP: 40.296-710
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3176-2327 Fax: (71)3176-2385 E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA



Continuação do Parecer: 1.437.205

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2.pdf	17/02/2016 21:26:40	Riam Rocha França	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	17/02/2016 21:25:59	Riam Rocha França	Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	17/02/2016 21:25:03	Riam Rocha França	Aceito
Outros	Questionario_V4.doc	17/02/2016 20:40:00	Riam Rocha França	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio_V4.docx	17/02/2016 20:37:58	Riam Rocha França	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Pronex_V4.docx	17/02/2016 20:37:29	Riam Rocha França	Aceito
Outros	Carta_resposta_ao_CEP_V4.docx	17/02/2016 20:36:34	Riam Rocha França	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 03 de Março de 2016

Assinado por:
THEOLIS COSTA BARBOSA BESSA
(Coordenador)

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121
Bairro: Candeal CEP: 40.296-710
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3176-2327 Fax: (71)3176-2285 E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

ANEXO 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pacientes com Leishmaniose Mucosa e Leishmaniose Cutânea



FIOCRUZ
 CPqGM
 Rua Waldemar Falcão, 121
 Salvador - BA
 Brasil - 40296-710
 Fone +55 71 3176 2351
 Fax +55 71 3176 2279
 abarral@bahia.fiocruz.br

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pacientes com Leishmaniose Mucosa e Leishmaniose Cutânea

Convidamos _____ (nome do paciente -LTA),
 RGn° _____ residente _____

(endereço), a participar de deste estudo intitulado **BIOLOGIA DE SISTEMAS APLICADA AO ENTENDIMENTO DA PATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR DE IMPORTÂNCIA PARA A BAHIA**, que é uma pesquisa que tem por objetivo avaliar as características genéticas e de expressão das proteínas das diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar, na tentativa para descobrir outras opções terapêuticas e será realizada no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA. A participação neste estudo é voluntária e não remunerada e não haverá qualquer prejuízo no seu acompanhamento ou tratamento caso não queira participar. Está prevista a utilização de um fragmento da amostra do tecido obtida por biópsia durante seu exame rotineiro para diagnóstico da leishmaniose tegumentar. Parte dessa amostra será destinada ao exame de anatomia patológica para fins de diagnóstico. O outro fragmento será congelado e utilizado nesse estudo. Os resultados dos exames realizados para a confirmação diagnóstica serão disponibilizados a você, sendo que os laudos serão entregues impressos na consulta médica entre dez e 30 dias após a realização do exame. Você responderá a um questionário com perguntas sobre a sua doença e possíveis vias e contaminação. Ao final do estudo as amostras serão descartadas ou armazenadas no laboratório, respeitando a legislação vigente. Os resultados serão considerados confidenciais e divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a sua identificação individual. Os resultados do presente estudo poderão sugerir novas opções de tratamento da leishmaniose tegumentar, doença cujo tratamento atual tem alta toxicidade e em alguns casos não funciona adequadamente. Para utilização do material biológico em pesquisas futuras, será apresentado um novo projeto de pesquisa ao CEP e o um novo TCLE específico será solicitado para cada novo projeto de pesquisa. O exame da retirada do pequeno fragmento da pele da ferida para confirmação do diagnóstico é realizado por pessoas qualificadas, com anestesia no local para evitar dor e pode sangrar um pouco, algo que é resolvido com um curativo. Você não terá nenhum tipo de gasto decorrente de sua participação no estudo e não receberá nenhum benefício financeiro pela sua participação neste estudo.

Você receberá uma cópia desse formulário e a doutora Viviane Boaventura que discutiu comigo esta informação colocou-se à disposição para outras perguntas e esclarecimentos a qualquer momento através do telefone – (71) 3176-2351 ou no endereço – FIOCRUZ – Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz- Rua Waldemar Falcão, 121, Brotas - Caixa Postal 701- CEP – 40296-710, Salvador-Bahia. Você também poderá entrar em contato com o comitê de ética que julgou esse estudo (Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Osvaldo Cruz - Rua Waldemar Falcão, 121, Brotas. Tel – 3176-2385).



FIOCRUZ
 CPqGM
 Rua Waldemar Falcão, 121
 Salvador - BA
 Brasil - 40296-710
 Fone +55 71 3176 2351
 Fax +55 71 3176 2279
 abarral@bahia.fiocruz.br

A sua participação neste estudo é voluntária e você está livre para recusar participar ou se retirar em qualquer época após seu início sem afetar ou prejudicar o cuidado médico que deverá receber.

Consentimento: Eu li e entendi o documento e fui suficientemente esclarecido e concordo em participar deste estudo.

_____/_____/_____
 Local e data

 Assinatura do Voluntário



Impressão do
 Polegar do Paciente

 Assinaturas das Testemunhas (no caso impressão datiloscópica)

Caso autorize o armazenamento do material biológico para uso na pesquisa em análise favor assinalar abaixo:

() SIM, autorizo () NAO autorizo

 Nome e RG do Investigador

 Assinatura do Investigador

ANEXO 3

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Doadores de Pele e Mucosa Normal



FIOCRUZ
 CPqGM
 Rua Waldemar Falcão, 121
 Salvador - BA
 Brasil - 40296-710
 Fone +55 71 3176 2385
 Fax +55 71 3176 2279
 sbarral@bahia.fiocruz.br

Termos de Consentimento Livre e Esclarecido Para Doadores de Pele e Mucosa Normal.

Convidamos _____ (nome do paciente),
 residente à _____ (endereço),

a participar de deste estudo intitulado **BIOLOGIA DE SISTEMAS APLICADA AO ENTENDIMENTO DA PATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR DE IMPORTÂNCIA PARA A BAHIA**, que é uma pesquisa que tem por objetivo avaliar as características genéticas e de expressão das proteínas das diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar, na tentativa para descobrir outras opções terapêuticas e será realizada no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA. A participação neste estudo é voluntária e não remunerada e não haverá qualquer prejuízo no seu acompanhamento ou tratamento caso não queira participar. A sua participação nesse estudo é na condição de doador normal e está restrita à doação de um fragmento da pele ou da mucosa que foi extraída durante a rotina da sua cirurgia plástica. Não haverá qualquer procedimento adicional. Ao final do estudo as amostras serão descartadas ou armazenadas no laboratório, respeitando a legislação vigente. Os resultados serão considerados confidenciais, serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a sua identificação individual. Os resultados do presente estudo poderão sugerir novas opções de tratamento da leishmaniose tegumentar, doença cujo tratamento atual tem alta toxicidade e em alguns casos não funciona adequadamente. Para utilização do material biológico em pesquisas futuras, será apresentado um novo projeto de pesquisa ao CEP e o um novo TCLE específico será solicitado para cada novo projeto de pesquisa. A retirada do pequeno fragmento da pele será realizada por pessoas qualificadas, mediante anestesia no local. Você não terá nenhum tipo de gasto decorrente de sua participação no estudo e não receberá nenhum benefício financeiro pela sua participação neste estudo.

Você receberá uma cópia desse formulário e a doutora Viviane Boaventura que discutiu comigo esta informação colocou-se à disposição para outras perguntas e esclarecimentos a qualquer momento através do telefone - (71) 3176-2351 ou no endereço - FIOCRUZ - Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz- Rua Waldemar Falcão, 121, Brotas - Caixa Postal 701- CEP - 40296-710, Salvador-Bahia. Você também poderá entrar em contato com o comitê de ética que julgou esse estudo (Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz - Rua Waldemar Falcão, 121, Brotas. Tel - 3176-2385).



FIOCRUZ
 CPqGM
 Rua Waldemar Falcão, 121
 Salvador - BA
 Brasil - 40296-710
 Fone +55 71 3176 2385
 Fax +55 71 3176 2279
 abarral@bahia.fiocruz.br

A sua participação neste estudo é voluntária e você está livre para recusar participar ou se retirar em qualquer época após seu início sem afetar ou prejudicar o cuidado médico que deverá receber.

Consentimento: Eu li e entendi o documento e fui suficientemente esclarecido e concordo em participar deste estudo.

_____/_____/_____
 Local e data

 Assinatura e RG do Voluntário



**Impressão do
 Polegar do Paciente**

 Ass: Testemunhas (no caso impressão datiloscópica)

Caso autorize o armazenamento do material biológico para uso na pesquisa em análise favor assinalar abaixo:

() SIM, autorizo () NAO autorizo

 Nome e RG do Investigador

 Assinatura do Investigador

ANEXO 4

Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: Biologia de Sistemas aplicada ao entendimento da patogênese da leishmaniose tegumentar americana de importância para a Bahia.		2. Número de Participantes da Pesquisa: 60	
3. Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.)			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 2. Ciências Biológicas			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: aldina maria prado barral			
6. CPF: 082.052.645-20	7. Endereço (Rua, n.º): WALDEMAR FALCAO 1/99999 CANDEAL SALVADOR BAHIA 40296710		
8. Nacionalidade: BRASILEIRO	9. Telefone: (71) 3176-2279	10. Outro Telefone:	11. Email: abarral@bahia.fiocruz.br
12. Cargo:			
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.			
Data: <u>06/04/2015</u>		<u>Aldina Barral</u> Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
13. Nome: Fundação Oswaldo Cruz	14. CNPJ: 33.781.055/0006-40	15. Unidade/Orgão: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/BA	
16. Telefone: (71) 3176-2327	17. Outro Telefone:		
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Responsável: <u>Manoel Barral Netto</u>		CPF: <u>100.600.145-04</u>	
Cargo/Função: <u>Director</u>			
Data: <u>06/04/2015</u>		<u>Manoel</u> Assinatura Manoel Barral Netto Diretor do CPqGM/Fiocruz Mat. SIAPE 628424-3	
PATROCINADOR PRINCIPAL			
Não se aplica.			