

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental

Curso de Mestrado

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO DAS INTERLEUCINAS IFN-  $\gamma$ , TNF-  $\alpha$ , IL-12p70, IL-6,  
IL-8, IL-10 E IL-  $1\beta$ , EM PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR  
AMERICANA (LTA) RESIDENTES EM XAPURI – ACRE.**

**Imelidiane Silva Leite**

Rio Branco

2018

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO DAS INTERLEUCINAS IFN-  $\gamma$ , TNF-  $\alpha$ , IL-12p70, IL-6,  
IL-8, IL-10 E IL- 1 $\beta$  EM PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR  
AMERICANA (LTA) RESIDENTES EM XAPURI – ACRE.**

**Imelidiane Silva Leite**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane de Oliveira Cardoso

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Rio Branco

2018



## **DEDICATÓRIA**

A todas as pessoas queridas que compartilharam essa trajetória comigo, às novas amizades que se formaram e às antigas que se tornaram mais fortes. A todos que me ensinaram que ninguém cresce sozinho. Àqueles que mostraram que um projeto não se completa por si só e que o caminho é apenas um: trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup> Dra<sup>a</sup> Cristiane de Oliveira Cardoso pela orientação, incentivo e compreensão. Sem sua orientação jamais concluiria este projeto. Obrigada por direcionar o caminho e me acompanhar todo o tempo.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Marcos por toda a contribuição no processamento das amostras, na análise dos dados. Sua ajuda foi essencial para a conclusão do estudo.

À coordenação do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental pelo trabalho e assistência em todas as fases desse processo de formação.

Aos membros da banca examinadora por participarem da avaliação e pela contribuição com a escrita e finalização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental pelo ensino e troca de experiências.

Aos acadêmicos do curso de Medicina da Universidade Federal do Acre pela enorme disposição e compromisso com o trabalho de coleta de dados.

Aos meus amigos e minha família por acompanharem de perto o caminho percorrido com todos os momentos altos e baixos, pela torcida e pela alegria a cada etapa concluída.

Aos colegas de mestrado pela ajuda, incentivo e companhia.

Agradeço a existência das Leis Universais que sempre nos permitem os recomeços.

“Sei de vossa cordialidade e conto com a vossa boa vontade para com as incertezas  
e falhas do neófito.”

**Carlos Chagas Filho**



## RESUMO

**Introdução:** a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença causada por protozoários de *Leishmania* após a inoculação do parasito através da picada de mosquitos do gênero *Lutzomyia*. Estima-se um registro de 2000 casos novos por ano no mundo, sendo a América Latina e países em desenvolvimento, as regiões com maior número de casos. O município de Xapuri – Acre possui altos índices de prevalência e incidência, associados ao ecoturismo e o alto risco de transmissão.

**Objetivo:** dosar a produção das interleucinas IFN-  $\gamma$ , TNF-  $\alpha$ , IL-12p70, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-  $1\beta$  em portadores de LTA residentes em no município de Xapuri.

**Materiais e métodos:** coleta de sangue em residentes no município que apresentam ou apresentaram ao menos uma lesão de leishmaniose. Uso do ELISA para quantificar as citocinas.

**Resultados:** a amostra se apresentou um maior numero de mulheres acima de 15 anos e com lesões antigas cicatrizadas. IFN- $\gamma$  e IL-12p70 foram as únicas citocinas que apresentaram resultados estatisticamente significantes. Ambos encontrados em maiores quantidades no grupo controle e a IL-12p70 ainda apresentou diferença importante quando comparado apenas controle e indivíduos com cicatrizes antigas.

**Conclusão:** Níveis séricos significantes de interleucinas relacionadas à resposta Th1 no sangue de indivíduos que nunca foram acometidos de LTA, se comparados àqueles que estão com LTA e àqueles que já se curaram.

**Palavras-chave:** Leishmania. Leishmaniose tegumentar americana. Imunologia.

## **.ABSTRACT**

**Introduction:** American tegumentary leishmaniasis (ALT) is a disease caused by *Leishmania* protozoa after the inoculation of the parasite through the mosquito bite of the *Lutzomya* genus. It is estimated a record of 2000 new cases per year in the world, with Latin America and developing countries being the regions with the highest number of cases. The city of Xapuri – Acre has high prevalence and incidence rates, associated with ecotourism and high risk of transmission. **Objective:** Quantify the production of interleukins IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IL-6, IL-8, IL-10 and IL-1 $\beta$  in patients with ALT residing in the city of Xapuri. **Materials and methods:** Blood collection in residents of the municipality who present or have had at least one lesion of leishmaniasis. It was used ELISA to quantify cytokines. **Results:** the sample presented a greater number of women over 15 years old and with old healed lesions. IFN- $\gamma$  and IL-12p70 were the only cytokines that presented statistically significant results. Both were found in greater amounts in the control group and IL-12p70 still presented important difference when compared to control only and individuals with old scars. **Conclusion:** Significant serum levels of interleukins related to the Th1 response in the blood of individuals who have never been affected by ACL, compared to those with ACL and those who have already cured.

**Key words:** leishmania. American tegumentary leishmaniasis. Immunology.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Fatores envolvidos no desenvolvimento das leishmanioses

**Figura 2** – Determinantes imunológicos que influenciam a infecção por Leishmania.

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Distribuição da amostra entre os grupos controle, cicatrizes e lesão ativa
- Gráfico 2** – Distribuição da amostra de acordo com o local de moradia
- Gráfico 3** – Produção de TNF da amostra total
- Gráfico 4** – Produção de TNF nos grupos cicatriz antiga e cicatriz recente
- Gráfico 5** – Produção de TNF nos grupos cicatriz antiga e controle
- Gráfico 6** – Produção de TNF nos grupos cicatriz antiga e lesão ativa
- Gráfico 7** – Produção de TNF nos grupos cicatriz recente e controle
- Gráfico 8** – Produção de TNF nos grupos cicatriz recente e lesão ativa
- Gráfico 9** – Produção de TNF nos grupos controle e lesão ativa
- Gráfico 10** – Produção de IL-12p70 da amostra total
- Gráfico 11** – Produção de IL-12p70 nos grupos cicatriz antiga e cicatriz recente
- Gráfico 12** – Produção de IL-12p70 nos grupos cicatriz antiga e controle
- Gráfico 13** – Produção de IL-12p70 nos grupos cicatriz antiga e lesão ativa
- Gráfico 14** – Produção de IL-12p70 nos grupos cicatriz recente e controle
- Gráfico 15** – Produção de IL-12p70 nos grupos cicatriz recente e lesão ativa
- Gráfico 16** – Produção de IL-12p70 nos grupos controle e lesão ativa
- Gráfico 17** – Produção de IL-10 da amostra total
- Gráfico 18** – Produção de IL-10 nos grupos cicatriz antiga e cicatriz recente
- Gráfico 19** – Produção de IL-10 nos grupos cicatriz antiga e controle
- Gráfico 20** – Produção de IL-10 nos grupos cicatriz antiga e lesão ativa
- Gráfico 21** – Produção de IL-10 nos grupos cicatriz recente e controle
- Gráfico 22** – Produção de IL-10 nos grupos cicatriz recente e lesão ativa
- Gráfico 23** – Produção de IL-10 nos grupos controle e lesão ativa
- Gráfico 24** – Produção de IL-6 da amostra total
- Gráfico 25** – Produção de IL-6 nos grupos cicatriz antiga e cicatriz recente
- Gráfico 26** – Produção de IL-6 nos grupos cicatriz antiga e controle
- Gráfico 27** – Produção de IL-6 nos grupos cicatriz antiga e lesão ativa
- Gráfico 28** – Produção de IL-6 nos grupos cicatriz recente e controle
- Gráfico 29** – Produção de IL-6 nos grupos cicatriz recente e lesão ativa
- Gráfico 30** – Produção de IL-6 nos grupos controle e lesão ativa
- Gráfico 31** – Produção de IL-8 na amostra total
- Gráfico 32** – Produção de IL-8 nos grupos cicatriz antiga e cicatriz recente
- Gráfico 33** – Produção de IL-8 nos grupos cicatriz antiga e controle
- Gráfico 34** – Produção de IL-8 nos grupos cicatriz antiga e lesão ativa

- Gráfico 35** – Produção de IL-8 nos grupos cicatriz recente e controle
- Gráfico 36** – Produção de IL-8 nos grupos cicatriz recente e lesão ativa
- Gráfico 37** – Produção de IL-8 nos grupos controle e lesão ativa
- Gráfico 38** – Produção de IL-1 da amostra total
- Gráfico 39** – Produção de IL-1 nos grupos cicatriz antiga e cicatriz recente
- Gráfico 40** – Produção de IL-1 nos grupos cicatriz antiga e controle
- Gráfico 41** – Produção de IL-1 nos grupos cicatriz antiga e lesão ativa
- Gráfico 42** – Produção de IL-1 nos grupos cicatriz recente e controle
- Gráfico 43** – Produção de IL-1 nos grupos cicatriz recente e lesão ativa
- Gráfico 44** – Produção de IL-1 nos grupos controle e lesão ativa

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SINAN	Sistema de Informação e Agravos de Notificação
IMAC	Instituto de Meio Ambiente do Acre
PAHO	Organização Pan Americana de Saúde
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
OMS	Organização Mundial de Saúde
WHO	World Health Organization
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
IL	Interleucinas
IL-1	Interleucina 1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1, forma $\beta$
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-12p70	Interleucina 12, porção 70
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-23	Interleucina 23
IFN- $\gamma$	Interferon Fator Gama
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Fator Alfa
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase Induzida
LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Mucosa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral

TCD4 <sup>+</sup>	Linfócito TCD4
TGF-β	Fator de Transformação do Crescimento Fator Beta
Th <sub>1</sub>	Linfócito Thelper 1
Th <sub>2</sub>	Linfócito Thelper 2
Thp	Linfócito Thelper
Th <sub>17</sub>	Linfócito Thelper 17
Treg	Linfócito Tregulador
UFAC	Universidade Federal do Acre

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1 ASPECTOS GERAIS.....	15
1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LTA.....	17
1.3 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS NA LTA.....	18
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>21</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
4.1 ÁREA DE ESTUDO.....	23
4.2 TIPO DE ESTUDO, POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	24
4.3 COLETA DE DADOS.....	25
4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	26
4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	26
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4.7 ASPECTOS ÉTICOS.....	27
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
5.1 RESULTADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	28
5.2 RESULTADOS IMUNOLÓGICOS.....	29
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ASPECTOS GERAIS

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma infecção protozoária, causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*.<sup>1</sup> Várias espécies dentro dos subgêneros *L. Leishmania* e *L. Viannia* podem causar a LTA após serem inoculadas na pele do homem através da picada de insetos vetores pertencentes a espécies de flebotomíneos.<sup>2,3</sup>

No Brasil, sete espécies que se encontram inseridas nos subgêneros *Leishmania* (*L.*) e *Viannia* (*V.*) foram identificadas. A *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*, sendo as três últimas identificadas em estados das regiões norte e nordeste.<sup>4</sup> Nesse contexto a *L. (V.) braziliensis* recebe destaque por estar distribuída em todos os estados brasileiros.<sup>5</sup> Alexandre Cerqueira foi o primeiro a identificar a moléstia em 1885 na Bahia e a suspeitar do papel dos flebotomíneos como vetores. Mas foi Gaspar Vianna que propôs, no ano em 1911, a denominação de *Leishmania braziliensis* para o agente específico da LTA no Brasil.<sup>6</sup>

O espectro de formas clínicas da LTA abrange manifestações clínicas caracterizadas por lesões cutâneas ou mucocutâneas que vão desde uma forma cutânea benigna até formas severas.<sup>7</sup> Formalmente conhecidas como leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose cutânea difusa anérgica (LCDA).<sup>8,9</sup>

A picada do vetor infectado não é o único fator determinante para o desenvolvimento da LTA. Esse amplo espectro de formas clínicas é determinado por vários fatores, tais como hábitos do inseto vetor, características epidemiológicas, fatores genéticos e status imune do hospedeiro, além da espécie, virulência e tropismo do parasito<sup>10,11,12,13,14</sup> As condições necessárias para o desenvolvimento das leishmanioses estão representadas na **figura 1**.

**Figura 1** – Fatores envolvidos no desenvolvimento das leishmanioses



**Fonte:** elaborada pela autora

## 1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LTA

Em relação à LTA, segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS), existem cerca de 350 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas. Estas, distribuídas nas áreas tropicais e subtropicais de 98 países entre os continentes Africano, Americano, Asiático e Europeu. Porém, as populações majoritariamente afetadas estão na América Latina e em países em desenvolvimento.<sup>15</sup>

O Brasil por sua vez, está entre os 10 países que detém o maior número de casos. Juntos, Brasil, Afeganistão, Argélia, Norte do Sudão, Costa Rica, Colômbia, Iran, Síria, Etiópia e Peru concentram de 70-75% dos casos em todo o mundo.<sup>16</sup> Em relação às formas clínicas da LTA, em 2014 aproximadamente 96% dos casos corresponderam à forma cutânea localizada e 4% à forma mucosa; esta última sendo mais prevalente no Brasil (1.016 casos notificados), Peru (343 casos) e Bolívia (228 casos).<sup>17</sup>

De acordo com os dados notificados no Sistema de Informação e Agravos de Notificação - SINAN/DATASUS, no período de 2005 a 2015 houve um crescente aumento dos números de casos confirmados da LTA no Brasil. Os maiores índices foram registrados no período de 2010 e 2015, tendo sido a Região Norte, em especial o estado do Pará, que mais contribui com o número de casos. Dentre os mais de 20 mil casos confirmados de LTA 46% deles foram registrados na região Norte, dos quais 40% foram confirmados no estado do Pará e 12% no estado do Acre.<sup>18</sup>

Apesar de o Pará responder pelo maior número de casos, a maior incidência da LTA entre os estados do Brasil está no estado do Acre (12.8 casos/10,000 habitantes). No município de Rio Branco, entre os anos 2005 e 2015, foram registrados 2.486 casos de LTA e a incidência média nesse período foi de 80, 73 por 100.000 habitantes. Mas é o município de Xapuri é quem se destaca tanto pelo alto número de casos (14% do total) como pela alta incidência da doença: 81,9 casos/10.000 habitante entre os anos de 2007 e 2013.<sup>19,20</sup>

Segundo estudo realizado, foram notificados 932 casos de LTA no município de Xapuri, no período de 2008 a 2014, destes, 906 foram registrados como autóctones e residentes no próprio município. As áreas pertencentes à zona rural do

município compreendem espaços cercados pela floresta e destinados às plantações de seringueira e respondem por 98% do total de casos. O estudo também aponta que o risco relativo de acometimento da LTA é 13,5 vezes maior do que em toda a Região Amazônica.<sup>21</sup>

### 1.3 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS NA LTA

A infecção por *Leishmania* implica na expansão de várias células, na ação de células dendríticas, na apresentação de antígenos para linfócitos e consequente ativação do sistema imune do hospedeiro.<sup>22,23</sup> Os macrófagos desempenham um papel chave na determinação do controle ou multiplicação da *Leishmania*. Dependendo da via de ativação, eles podem se diferenciar em subpopulações distintas que irão desempenhar funções papéis imunológicas opostas, mas complementares.<sup>24,25</sup>

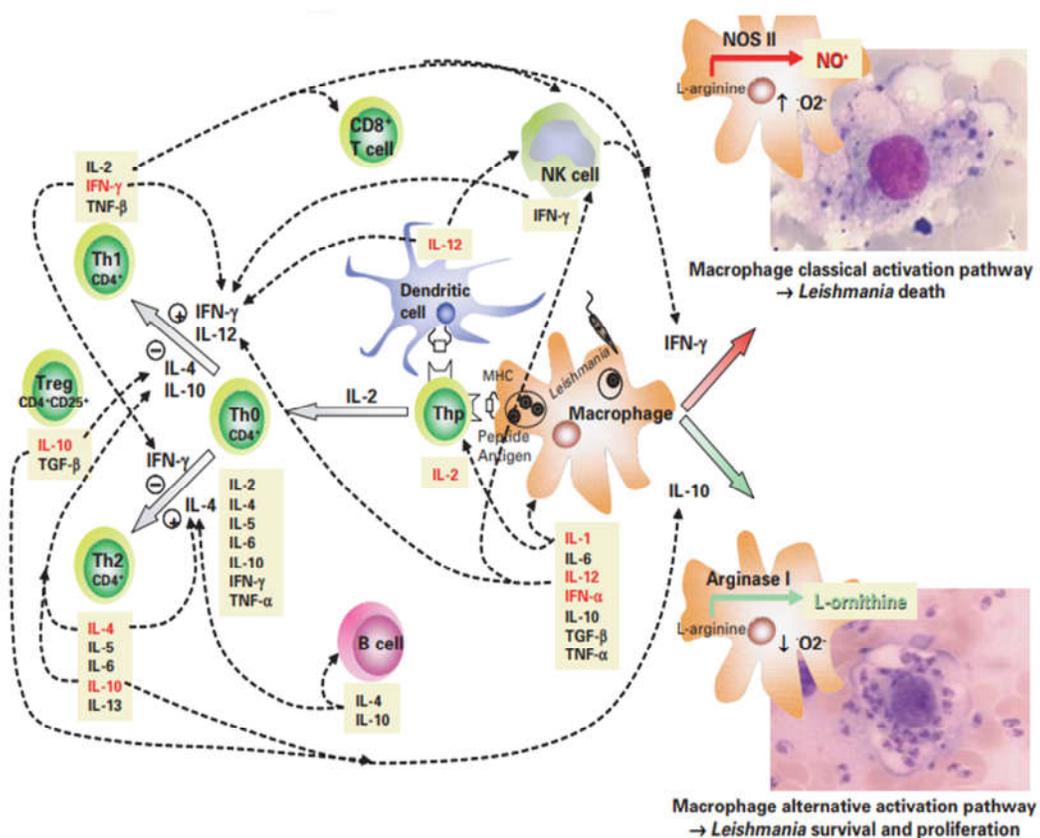
A patogênese da *Leishmania* envolve a diferenciação das formas promastigotas metacíclicas para amastigotas<sup>26</sup>, a sua adaptação a diversas condições hostis do hospedeiro e a seleção dos indivíduos mais aptos para continuar o processo infeccioso.<sup>27</sup> O mecanismo de resposta à presença da *Leishmania* inicia quando células dendríticas e macrófagos são atraídos pela saliva do inseto transmissor após a picada, sendo então invadidas pelo parasito.<sup>28,29,30</sup>

Pesquisas têm demonstrado que a *Leishmania* é capaz de ativar especificamente o tipo de resposta imunológica do indivíduo infectado, definindo qual o perfil de diferenciação dos Linfócitos no hospedeiro.<sup>31,32,33</sup> O controle da leishmaniose envolve uma resposta Th1 dominante, que levará à ativação dos macrófagos pela via clássica, promovendo a eliminação das amastigotas intracelulares através da indução da sintase do óxido nítrico do tipo II (NOS II) e síntese do óxido nítrico (NO) da L-arginina.<sup>34,35,36</sup>

Quando o parasito é fagocitado é desencadeado um processo no qual os macrófagos são estimulados a produzir várias citocinas, entre elas a IL-1, auxiliando a interação com células T-helper (Thp) via MHC (complexo principal de histocompatibilidade) nos órgãos linfoides secundários. As células Thp assumem um fenótipo CD4+naive (Th0CD4+) e passam a secretar novas citocinas. A resposta Th1 caracteriza-se por um aumento de IFN- $\gamma$  e IL-12 e diminuição de IL-4 e IL-10 e

estas estão, geralmente, relacionadas com a ativação dos macrófagos e morte do parasito. A resposta Th2, por sua vez, é caracterizada por aumento de IL-4 e diminuição de IFN- $\gamma$ , que se relacionam à ativação das células B, produzindo anticorpos que não são capazes de combater o parasito. As citocinas expressas por macrófagos, células dendríticas e linfócitos T e B determinam o resultado dos parasitas de *Leishmania*: da sobrevivência e proliferação até a morte.<sup>37</sup>

**Figura 2** - Determinantes imunológicos que influenciam a infecção por *Leishmania*.



Fonte: Halzmuller, 2006.

Estudos realizados com camundongos têm demonstrado os fatores envolvidos na resposta imunológica do hospedeiro, tanto os relacionados à resistência quanto àqueles envolvidos na suscetibilidade à infecção. Em uma pesquisa feita com camundongos infectados com *L. major* foi observada uma resposta imunológica Th1 (linfócitos T auxiliares do tipo 1) relacionada à resistência a *L. major*. Nessa resposta houve elevada produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e consequente ativação de macrófagos, células dendríticas e células NK.<sup>38,39</sup>

Ainda em estudos com *L. major* foram observadas respostas do tipo Th2 (linfócitos T auxiliares do tipo 2) com aumento da produção das interleucinas IL-4, IL-13 e IL-10, as quais estão relacionadas à suscetibilidade à infecção por *L. major*.<sup>40,41</sup>

Quando o parasito é inoculado na pele do hospedeiro é desencadeada uma reação inflamatória local para tentar estabelecer a homeostasia. Tem sido demonstrado que os neutrófilos são importantes no controle e disseminação do parasito, nessa fase da inflamação.<sup>42</sup> Pesquisas anteriores ainda referem-se a componentes presentes na saliva do inseto vetor e estes estão associados à vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, coagulação sanguínea.<sup>43</sup> Além destas, foi descrita a presença de componentes imunossupressores que inibem a resposta imune contra o parasito, facilitando o estabelecimento da infecção.<sup>44</sup>

Há uma estreita relação entre a interação do parasito com o tipo de resposta imune do hospedeiro e com o desenvolvimento das diversas formas clínicas da leishmaniose. Tanto células da imunidade inata quanto adaptativa participam desse processo, gerando mecanismos imunológicos que definem a resistência ou a suscetibilidade a estes patógenos intracelulares.<sup>45</sup> Diversas citocinas interagem com os parasitas causadores da leishmaniose para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora.<sup>46</sup>

## 2 JUSTIFICATIVA

A LTA é uma zoonose presente, sobretudo, nas regiões mais pobres de países em desenvolvimento. No município de Xapuri encontra-se alta incidência e alta prevalência de casos de LTA. Esses índices elevados relacionam-se com a localização geográfica e os hábitos socioeconômicos da população do município. O ecoturismo, presente no município devido a seu passado histórico, é uma das atividades socioeconômicas responsáveis pela grande circulação de pessoas vindas de todas as regiões do país.

Além de um ambiente favorável, o desenvolvimento da LTA exige a participação de mediadores imunológicos. Estes são responsáveis por criar caminhos na resposta imunológica que determinarão a suscetibilidade ou resistência aos patógenos.

Dentro deste cenário, um estudo que relacione perfil imunológico, perfil epidemiológico e LTA, soma-se com o grupo de pesquisas já realizadas e de futuros estudos que, juntos ampliam o conhecimento acerca da patologia e contribuem no seu processo de vigilância e controle.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a produção das interleucinas IFN-  $\gamma$ , TNF-  $\alpha$ , IL-12p70, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-  $1\beta$  em portadores de LTA residentes em no município de Xapuri, estado do Acre.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar e discutir os aspectos epidemiológicos dos portadores de LTA no município de Xapuri;
2. Dosar as interleucinas IFN-  $\gamma$ , TNF-  $\alpha$ , IL-12p70, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-  $1\beta$  em indivíduos acometidos e não acometidos por LTA residentes no município de Xapuri;
3. Descrever e correlacionar a produção das interleucinas IFN-  $\gamma$ , TNF-  $\alpha$ , IL-12p70, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-  $1\beta$  em indivíduos acometidos e não acometidos por LTA residentes no município de Xapuri;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ÁREA DE ESTUDO

O município de Xapuri (10839 007 00S, 6883001400W) localiza-se no Estado do Acre, a aproximadamente 180 km da capital Rio Branco. É banhado pelos Rios Acre e Xapuri e faz fronteira com os municípios de Epitaciolândia, Capixaba, Rio Branco, Brasiléia e Sena Madureira.<sup>47</sup> A sua população em 2016 era estimada em 17.894 habitantes divididos entre a zona rural e urbana que juntas possuem 5.347,468 km<sup>2</sup> de área territorial.<sup>48</sup>

**Figura 2** – Mapa político do Brasil destacando a localização do estado do Acre e município de Xapuri.



**Fonte:** Brilhante, 2017

O nome Xapuri origina-se da tribo indígena Xapurys que habitava a região que viria a ser o município de Xapuri. A colonização da região, localizada na confluência dos Rios Acre e Xapury se deu em 1861. Tornou-se uma vila no ano de 1904, após ser tomada pelas tropas do Coronel Plácido de Castro na Revolução Acreana e município, oficialmente, no ano de 1912. <sup>48</sup>

**Figura 3** – Margem do Rio, no município de Xapuri



**Fonte:** Registro feito pela autora

#### 4.2 TIPO DE ESTUDO, POPULAÇÃO E AMOSTRA

É um estudo de caráter qualitativo e retrospectivo com amostra aleatória convencional. A população do estudo é composta por todos os indivíduos residentes no município de Xapuri. Dentre a população obteve-se uma amostra que foi dividida em dois grupos: casos positivos e controle.

O grupo de casos positivos compreende indivíduos de ambos os sexos, maiores de 18 anos que apresentam ou apresentaram uma ou mais lesões de LTA ou cicatrizes de LTA até o ano 2017. O grupo controle compreende aqueles

indivíduos de ambos os sexos, maiores de 18 anos, que não apresentaram lesões de LTA ou cicatrizes de LTA até o ano 2017.

#### 4.3 COLETA DE DADOS

A coleta de dados foi realizada tanto na zona urbana de Xapuri quanto em áreas rurais. As comunidades onde se deram as coletas foram o Seringal Sibéria, Seringal Boa Vista, Assentamento Equador, Assentamento Recanto do Equador e Assentamento Cachoeira Chico Mendes. Para os dados sócioepidemiológicos foi utilizado um questionário preestruturado com questões de abordagem pessoal, clínica e epidemiológica. A abordagem dos habitantes foi realizada no Hospital de Xapuri, no Centro de saúde Dr. Félix Bestene Neto e em suas próprias residências.

A equipe foi composta pela pesquisadora e orientadora do mestrado de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Acre (UFAC), mestrandos de Ciências da Saúde (biomédica, biólogo e gestora em saúde coletiva), alunos do curso de medicina da Ufac e um agente de saúde do município de Xapuri que foi o guia local para as coletas. Estes foram treinados para o preenchimento do questionário, coleta sanguínea e coleta de células da mucosa oral.

As coletas foram realizadas em locais distintos tanto dentro da cidade como na zona Rural. Para tanto foram necessárias 10 visitas à campo com tempo de permanência de 3 dias na cidade e uma visita com tempo de permanência de 8 dias. A coleta de sangue total foi realizada por punção venosa, na própria residência do indivíduo ou na unidade de saúde, utilizando um tubo sem coagulante (para dosagem de interleucinas), com volume de 10 ml, para análise do soro. Outro tubo de 4 ml com EDTA foi utilizado para coleta do plasma (extração de DNA).

Os tubos com o sangue foram armazenados em isopor com gelox entre 2°C e 8°C. Após as coletas do dia, as amostras eram centrifugadas por 15 minutos a 3400 rpm para separação do soro e plasma e aliqüotados em microtubos de 1,5 ml e armazenadas em freezer a -20°C.

As amostras foram armazenadas numa temperatura entre 2 e 8°C e transportadas para o laboratório de genética da Ufac, onde eram armazenadas em freezer a -20°C. As amostras de soro congeladas foram encaminhadas, em isopor com gelo seco, para laboratório. Os dados laboratoriais foram obtidos a partir da

dosagem das interleucinas IFN $\gamma$ , TNF-  $\alpha$ , IL-12p70, IL-6, IL-8, IL-10 e IL- 1 $\beta$  através do método imunoenzimático chamado de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Imunologia do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro em Uberaba – Minas Gerais.

As interleucinas e quimiocinas presentes no soro, foram dosadas com kits da BD-PHARMINGEM - USA, utilizando-se placas com 96 poços de fundo chato (NUNC-Maxisorp, USA). As placas foram sensibilizadas com 50 $\mu$ l de anticorpo primário (1 $\mu$ g/ml) em tampão carbonato para sensibilização (pH = 7,4).

As placas recobertas pelos anticorpos permaneceram incubadas “overnight” à 4-8°C e posteriormente foram lavadas com PBS/Tween a 0,05% em lavadora automática, bloqueadas com 20 $\mu$ l para IFN- $\gamma$  e 40 $\mu$ l para TNF-  $\alpha$ , IL-12p70, IL-6, IL-8, IL-10 e IL- 1 $\beta$ ) e PBS/BSA 0,1% (4 horas/temperatura ambiente) e lavadas novamente com PBS/Tween 0,05%.

As amostras de sobrenadante ou plasma diluídas 1:1 em PBS/BSA 1% foram adicionadas às placas, e paralelamente realizada a curva padrão com diluição seriada da respectiva citocina ou quimiocina recombinante. As amostras juntamente com a curva padrão foram incubadas “overnight” a 4° C. As cavidades foram então lavadas com PBS/Tween 20 à 0,05 % e distribuíam-se posteriormente 50 $\mu$ l/poço de anticorpo secundário (1 $\mu$ g/ml) permanecendo por três a quatro horas à temperatura ambiente e lavando-se com solução de PBS/Tween 20 à 0,05%.

Após essa etapa, pipeta-se 50  $\mu$ l/poço de estreptoavidina conjugada à fosfatase alcalina (0,5 $\mu$ l/ml em solução de PBS/BSA 1%), permanecendo por uma hora à temperatura ambiente e posteriormente lava-se com solução de PBS/Tween à 0,05% adicionando-se 100 $\mu$ l por poço do substrato p-nitrofenilfosfato (pNpp tabletes, SIGMA- USA) dissolvido em água destilada e realiza-se leitura a 405 nm.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados clínico-epidemiológicos foram agrupados em planilha eletrônica no programa EXCEL, de acordo com os critérios de relevância do estudo, para análise de frequência absoluta e frequência simples de idade e localidade, além da prevalência de portadores de acordo com sexo dos indivíduos estudados, para sua

caracterização. Para avaliação da produção das interleucinas os dados foram processados pelo aplicativo Statview. Os testes utilizados para avaliar os níveis de significância foram: Teste de Kruskal-Wallis e U de Mann-Whitney. As correlações foram feitas através do teste de Spearman. O nível de significância para todos os testes foi de 5%.

#### 4.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

1. Indivíduos diagnosticados com LTA até o ano de 2017, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e o termo de uso de imagem, autorizando a sua participação na pesquisa.
2. Indivíduos de ambos os sexos, maiores de 18 anos, que nunca foram diagnosticados com LTA, que vivem no mesmo ambiente dos indivíduos que alguma vez já foram diagnosticados com LTA e que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e o termo de uso de imagem, autorizando a sua participação na pesquisa.

#### 4.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

1. Menores de 18 anos;
2. Indivíduos não residentes em Xapuri;
3. Indivíduos que no momento da coleta estiveram com alguma comorbidade;
4. Indígenas;
5. Indivíduos que não concordaram em participar da pesquisa.

#### 4.7 ASPECTOS ÉTICOS

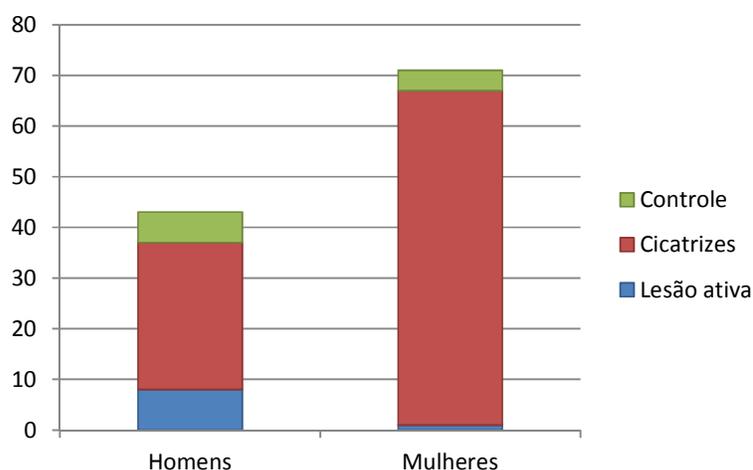
A realização da pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da União Educacional do Norte (UNINORTE) de Rio Branco - Acre, conforme parecer favorável (CAEE 63499416.1.0000.5009) dado ao projeto apresentado.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 RESULTADOS EPIDEMIOLÓGICOS

A amostra total foi composta de 114 indivíduos, dentre os quais 10 (9%) fizeram parte do grupo controle e 104 (91%) compuseram o grupo de casos positivos. O segundo grupo foi subdividido em indivíduos com lesões ativas, representando 9% (09 casos) dos casos positivos e o grupo de lesões cicatrizadas, com 95 pessoas, compondo 91% dos casos positivos.

**Gráfico 1** – Distribuição da amostra entre os grupos controle, cicatrizes e lesão ativa



Analisando os dados através da variável gênero, temos uma amostra formada por 71 (62,3%) mulheres e 43 (37,7%) homens. Apesar do número de mulheres na amostra total superar o de homens, no grupo de lesões ativas os homens representaram 89% (08 casos) enquanto as mulheres, apenas 11% (01 caso). O grupo de lesões cicatrizadas foi representado por 66 (69,5%) mulheres e 29 (30,5%) homens. O restante dos casos formou o grupo controle.

Em relação à idade, a amostra total variou entre 7 e 83 anos. No grupo de lesões ativas a idade esteve entre 7 e 30 anos, sendo 2 casos com 7 anos, 1 caso com 13 anos, 2 com 14 anos e 1 caso para cada uma das idades 15, 19, 22 e 30

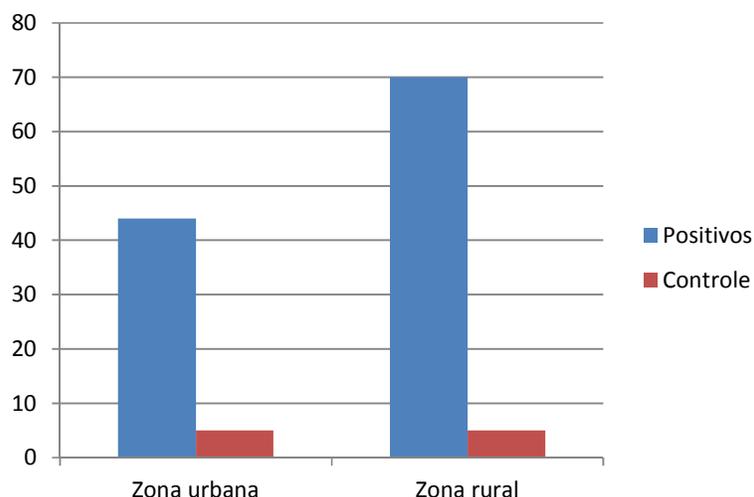
anos. No grupo de cicatrizes a idade variou entre 10 e 83 anos, dentre eles 71 casos (74%) com idade maior ou igual a 30 anos.

Outras duas variáveis analisadas foram a quantidade e o tempo de lesão/cicatriz.. Em relação à quantidade de lesões cicatrizadas, 67 (70,5%) apresentavam apenas 01 lesão e 28 (29,5%) apresentava entre 02 e 07 lesões. No grupo de lesões ativas apenas 01 indivíduo apresentava 02 lesões, o restante possuía apenas 01 lesão.

Quanto ao tempo de lesões, o grupo de lesões cicatrizadas foi dividido entre cicatrizes recentes, dos últimos cinco anos, com 26 (27,5%) indivíduos e antigas, com 59 (62%) indivíduos, com tempo de lesão variando entre 6 e 65 anos. 10 indivíduos (10,5%) não lembraram o tempo de lesão.

Por fim, foi feita a análise da variável local de moradia. No grupo de positivos 70 (61,5%) indivíduos, residiam na zona rural e 44 (38,5%) na zona urbana de Xapuri. No grupo controle, a frequência foi igual para a zona rural e urbana com 05 (50%) pessoas para cada grupo.

**Gráfico 2 – Distribuição da amostra de acordo com o local de moradia**



## 5.2 RESULTADOS IMUNOLÓGICOS

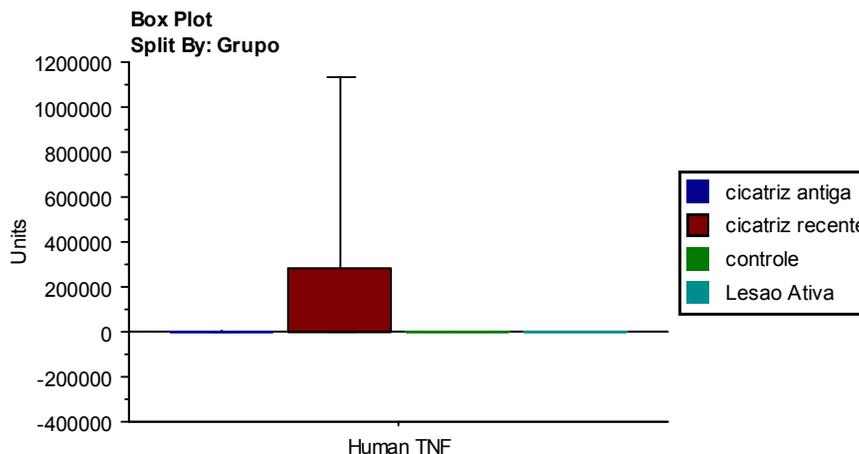
Para a dosagem das interleucinas foram processadas um total de 114 amostras de soro. A amostra total foi dividida em dois grupos com 57 amostras cada.

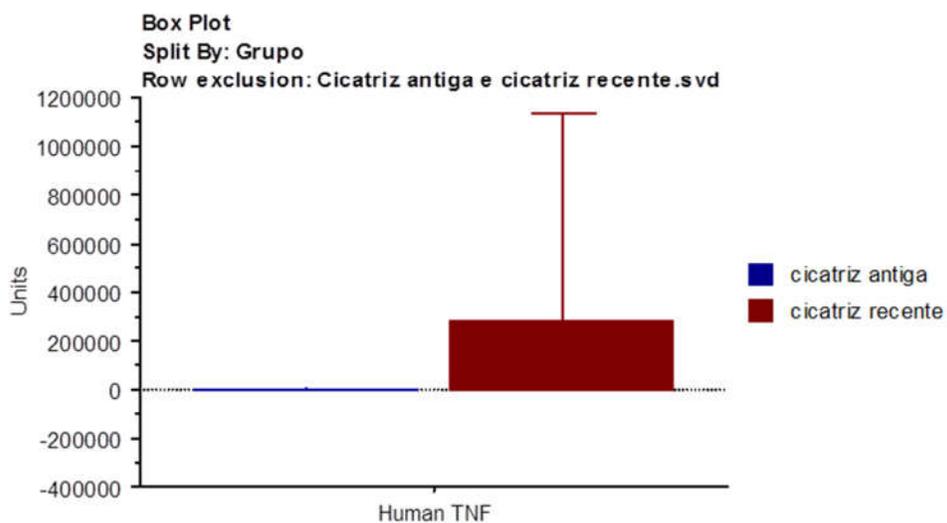
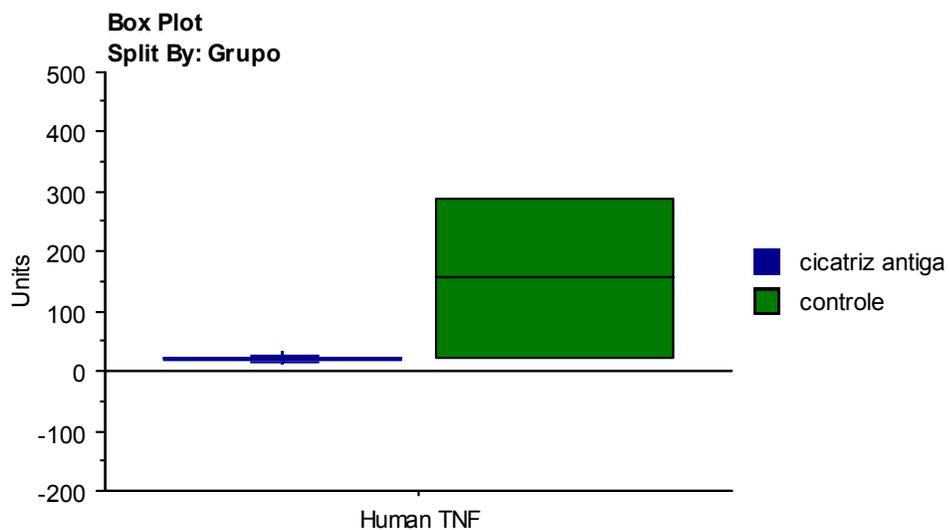
57 amostras foram usadas para dosagem de IFN-  $\gamma$ , das quais 6 amostras do grupo controle, 7 amostras no grupo de lesões ativas e 44 no grupo de cicatrizes. No segundo grupo foram dosadas as demais citocinas (TNF-  $\alpha$ , IL-12p70, IL-6, IL-8, IL-10, IL-  $1\beta$ ) foram processadas 57 amostras. Destas, 2 amostras estão no grupo de lesões ativas, 04 amostras no grupo controle e 51 no grupo de cicatrizes.

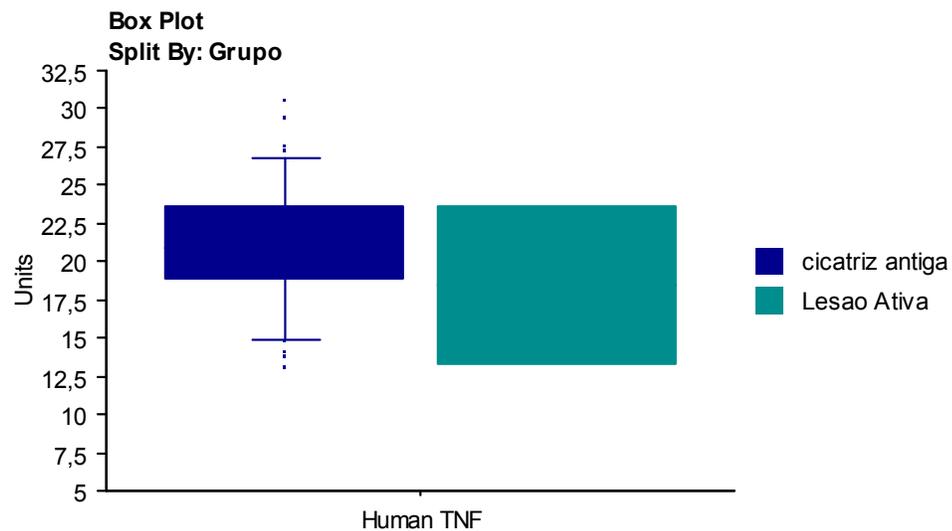
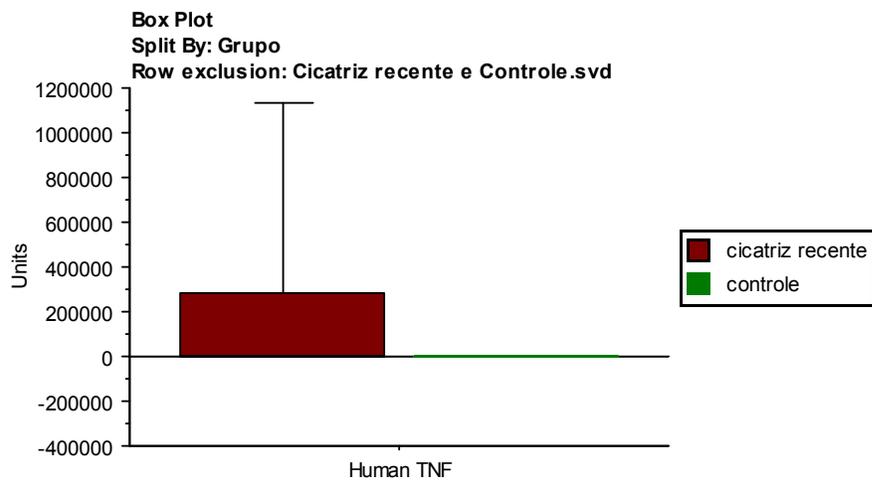
A produção de IFN- $\gamma$  se mostrou pequena, mas obteve diferença significativa na comparação entre todos os grupos da amostra (p-valor = 0,048), tendo sido maior no grupo controle. Nas lesões ativas a produção foi maior se comparada com os grupos de cicatrizes, no entanto, essa diferença não se mostrou significativa estatisticamente (p-valor = 0,290).

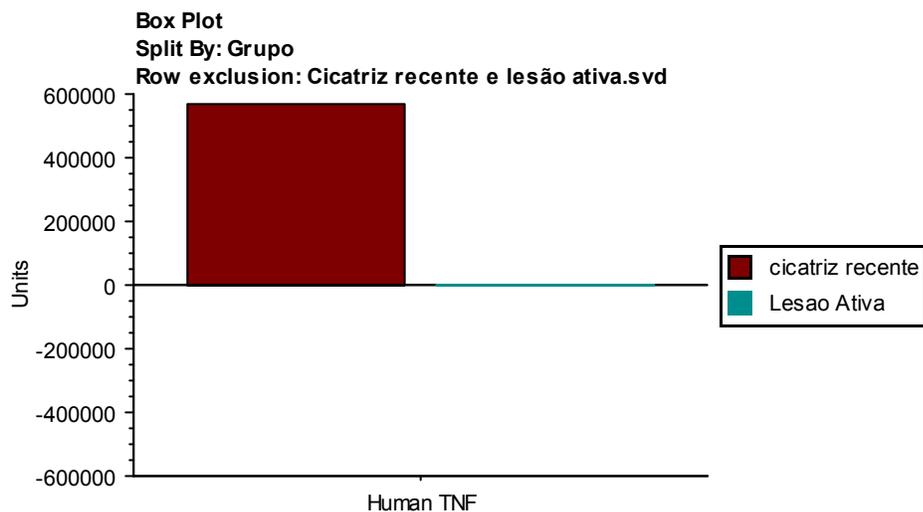
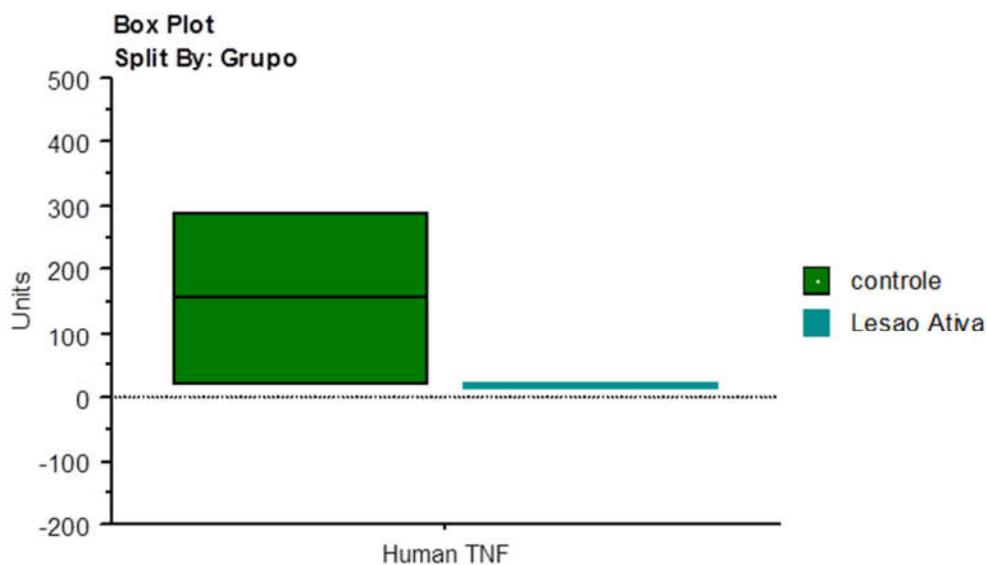
A diferença na produção de TNF- $\alpha$  não teve significância estatística quando comparado os quatro grupos (p-valor = 0,205). Também não houve diferença estatística significativa quando comparados os grupos lesões ativas com cicatrizes recentes (p-valor= 0,164) ou lesões ativas com cicatrizes antigas (p-valor=0,060) ou lesões ativas com controle (p-valor = 0,121) ou cicatrizes recentes com o controle (p-valor=0,769) ou cicatrizes antigas e controle (p-valor=0,069) ou cicatrizes antigas com cicatrizes recentes (p-valor=0,265).

**Gráfico 3 – Produção de TNF da amostra total**



**Gráfico 4 – Produção de TNF nos grupos cicatriz antiga e cicatriz recente****Gráfico 5 – Produção de TNF nos grupos cicatriz antiga e controle**

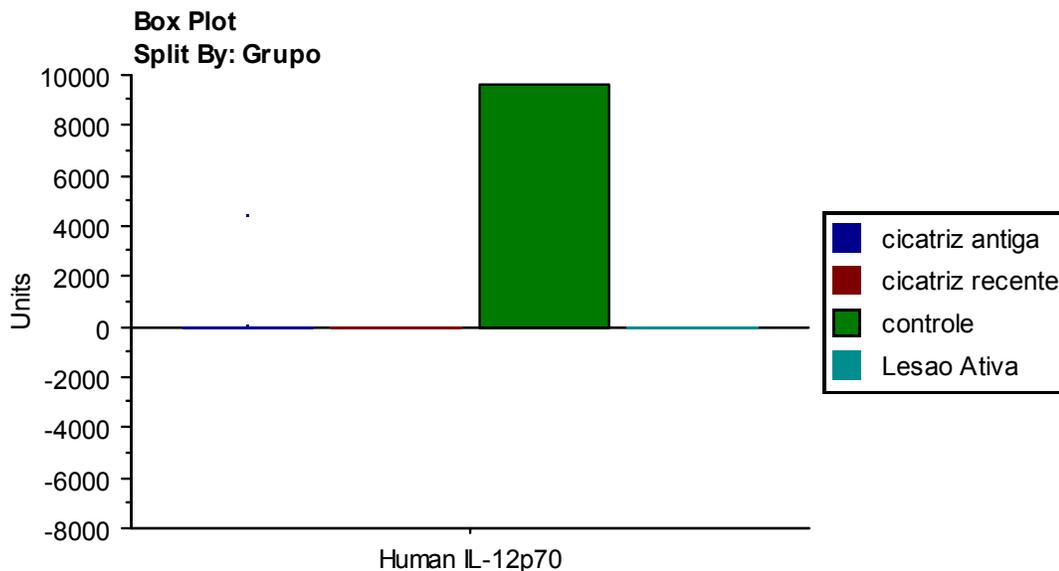
**Gráfico 6 – Produção de TNF nos grupos cicatriz antiga e lesão ativa****Gráfico 7 – Produção de TNF nos grupos cicatriz recente e controle**

**Gráfico 8** – Produção de TNF nos grupos cicatriz recente e lesão ativa**Gráfico 9** – Produção de TNF nos grupos controle e lesão ativa

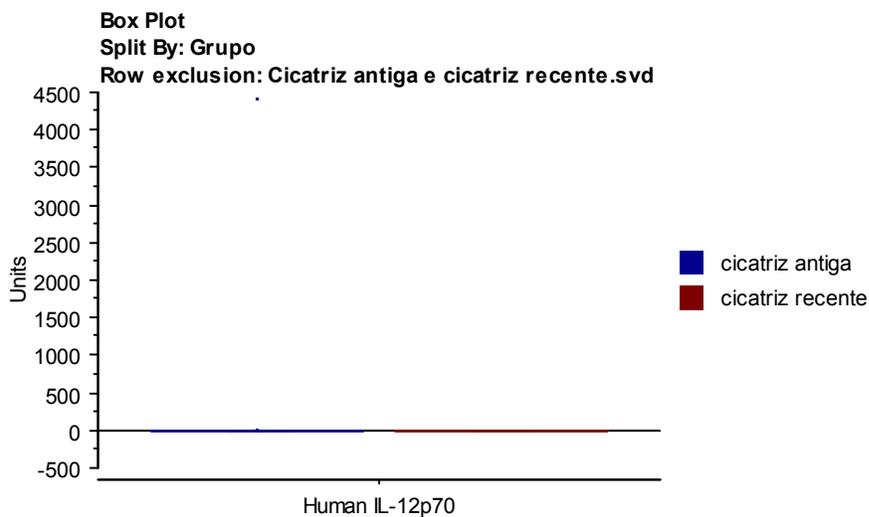
A produção de IL-12p70 apresentou diferença significativa quando comparados os quatro grupos ( $p$ -valor = 0,049) quando comparados o grupo de cicatrizes antigas com o controle ( $p$ -valor=0,015). Não houve diferença estatística quando comparados os grupos lesões ativas com cicatrizes recentes ( $p$ -valor= 0,638), lesões ativas com cicatrizes antigas ( $p$ -valor= 0,162) lesões ativas com o

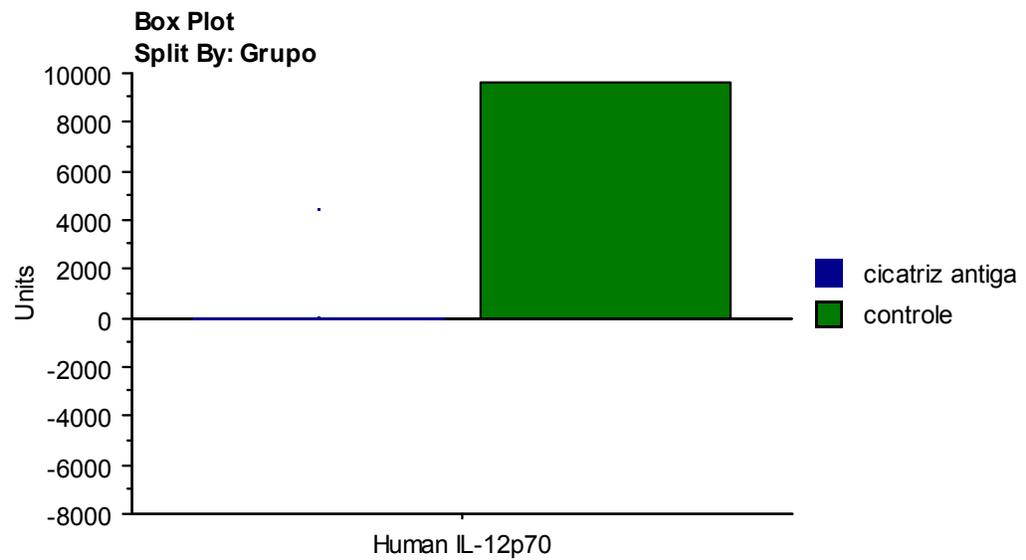
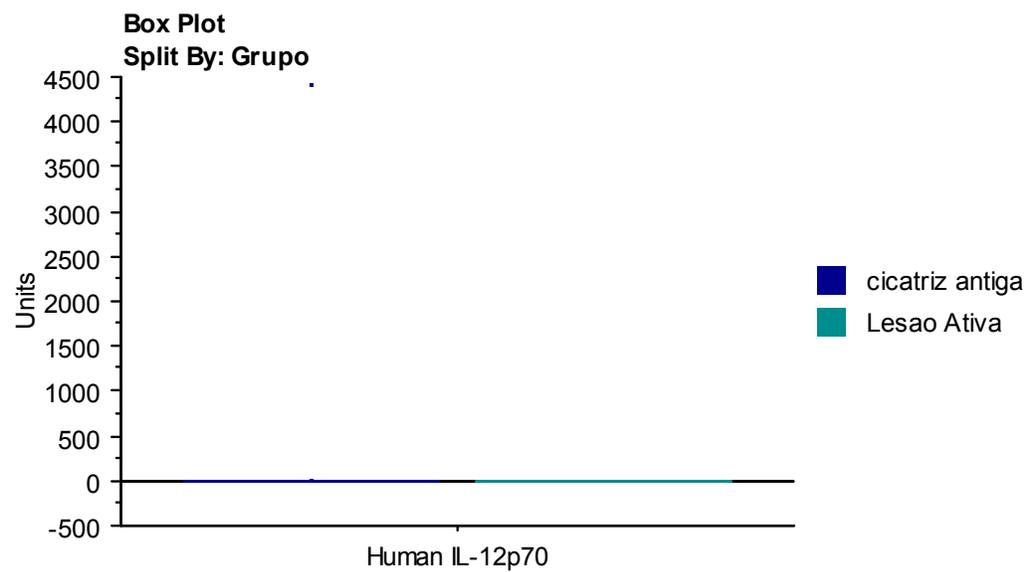
controle (p-valor = 0,354), cicatrizes recentes com controle (p-valor=0,092), e cicatrizes antigas com cicatrizes recentes (p-valor=0,958).

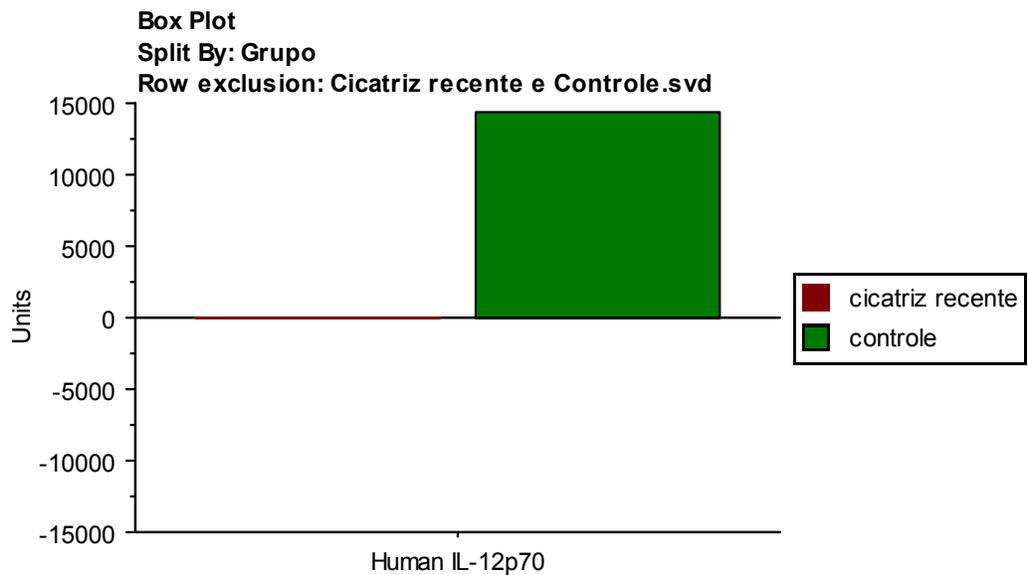
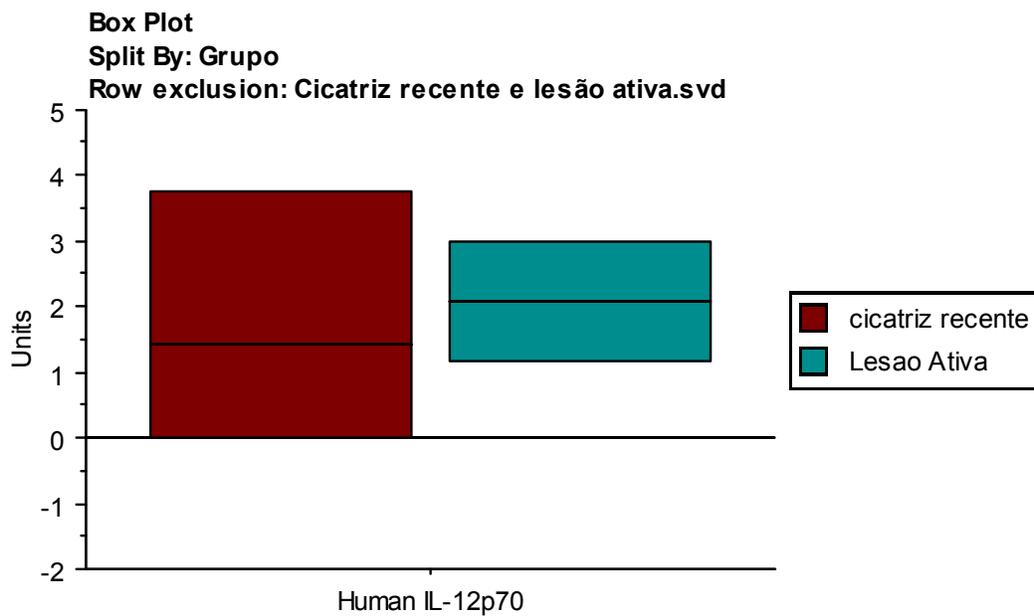
**Gráfico 10 – Produção de IL-12p70 da amostra total**

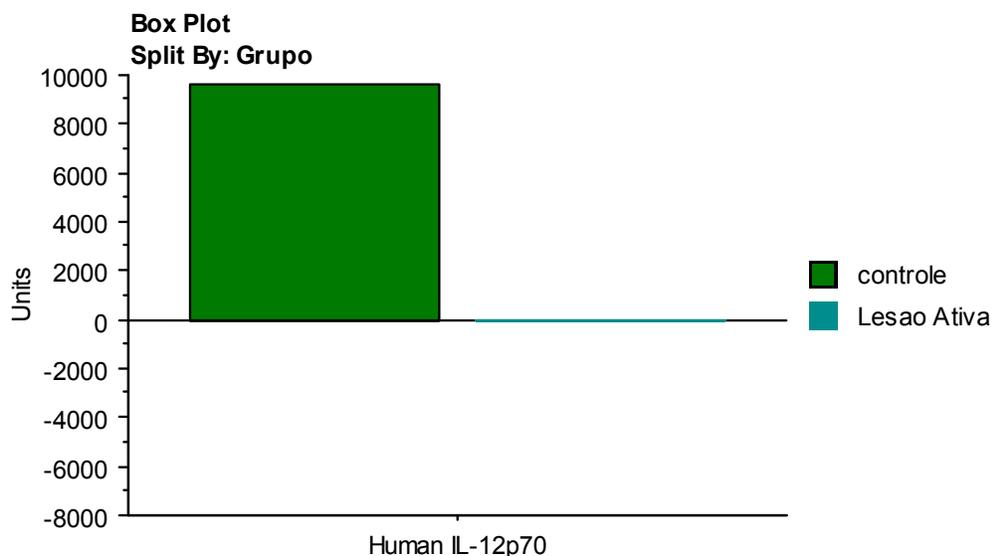


**Gráfico 11 – Produção de IL-12p70 nos grupos cicatriz antiga e cicatriz recente**

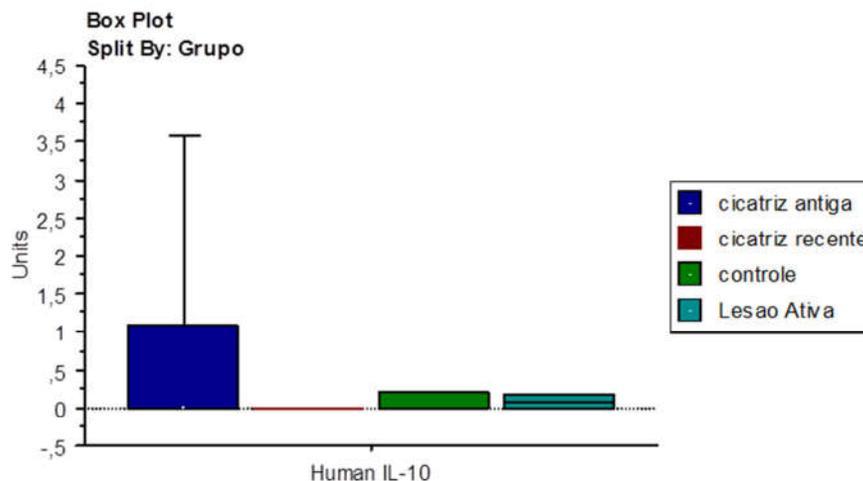


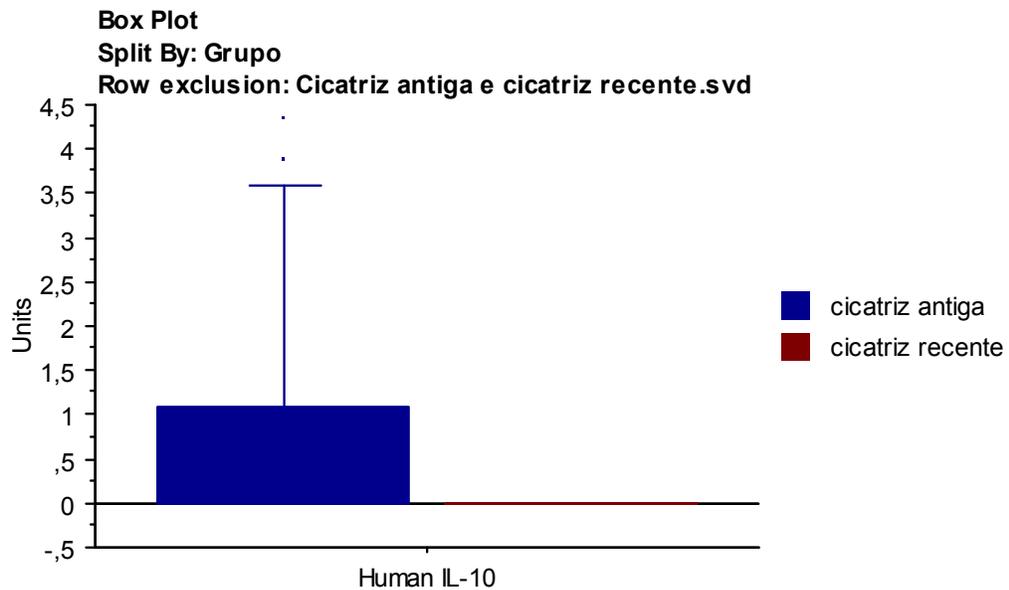
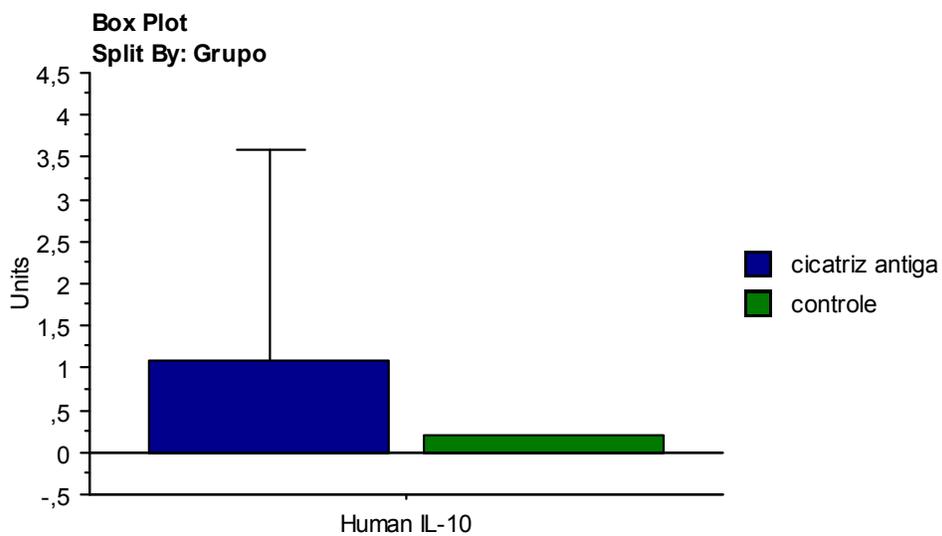
**Gráfico 12 – Produção de IL-12p70 nos grupos cicatriz antiga e controle****Gráfico 13 – Produção de IL-12p70 nos grupos cicatriz antiga e lesão ativa**

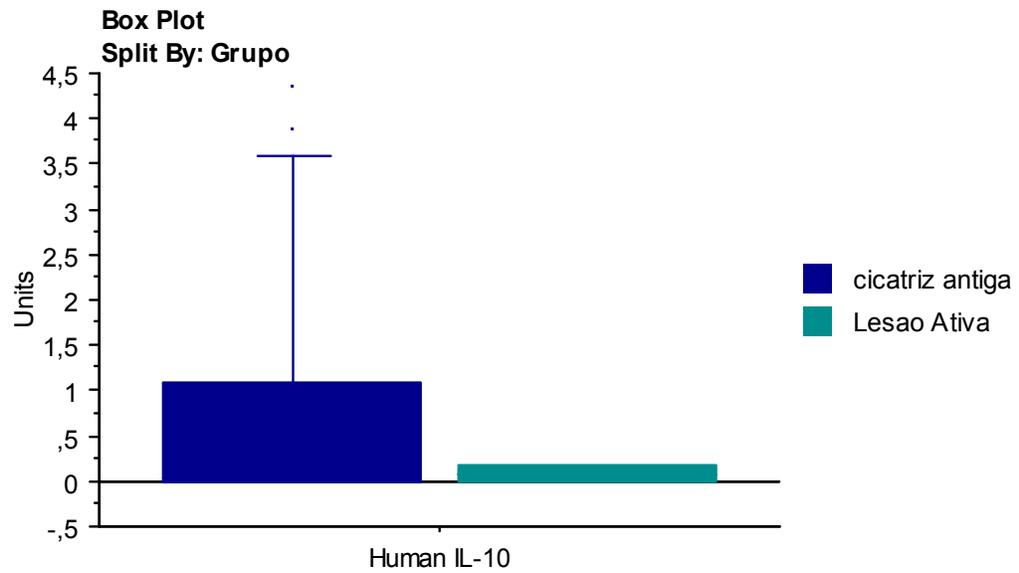
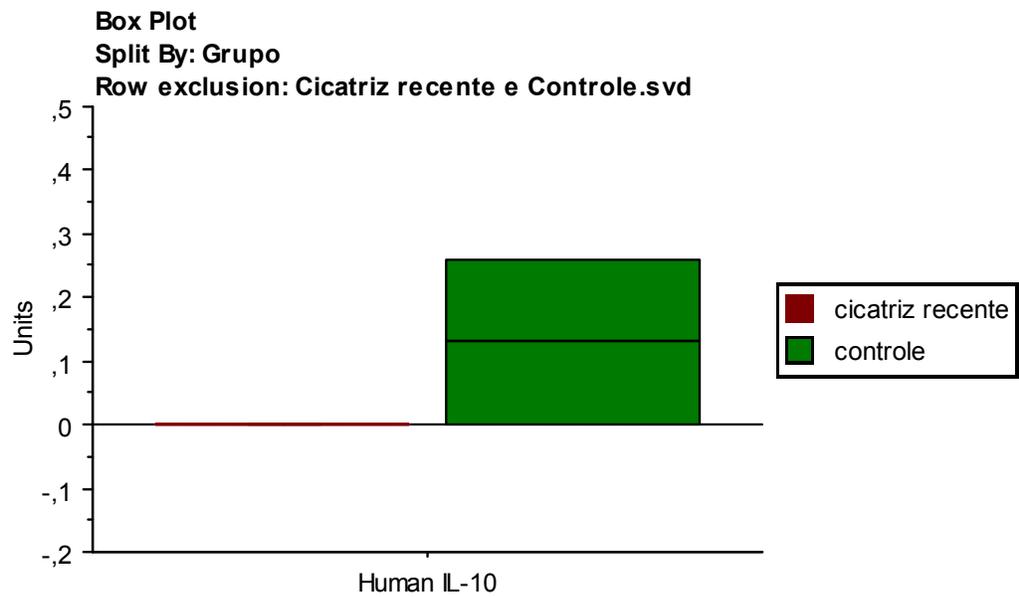
**Gráfico 14** – Produção de IL-12p70 nos grupos cicatriz recente e controle**Gráfico 15** – Produção de IL-12p70 nos grupos cicatriz recente e lesão ativa

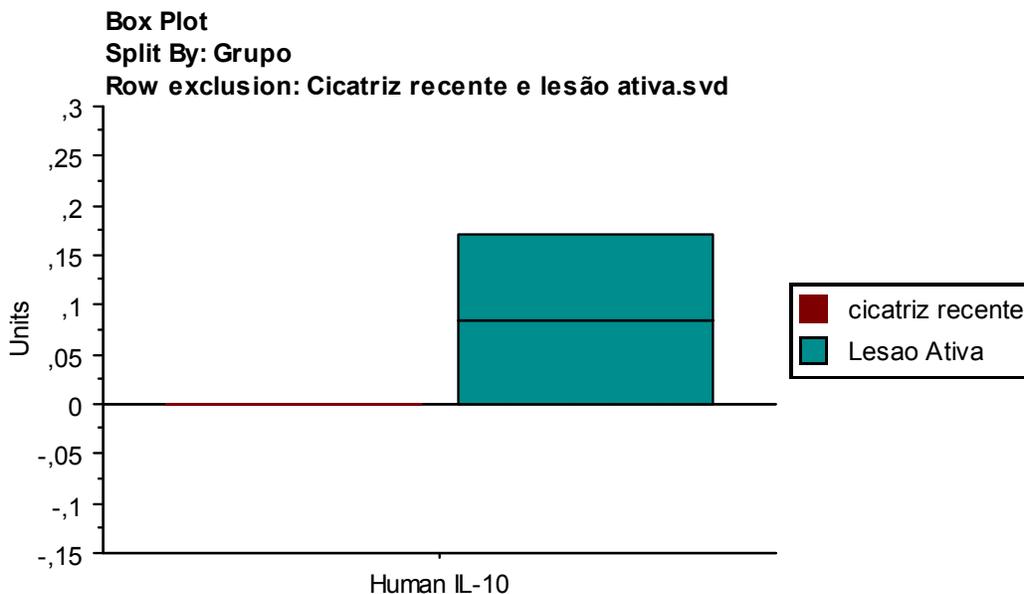
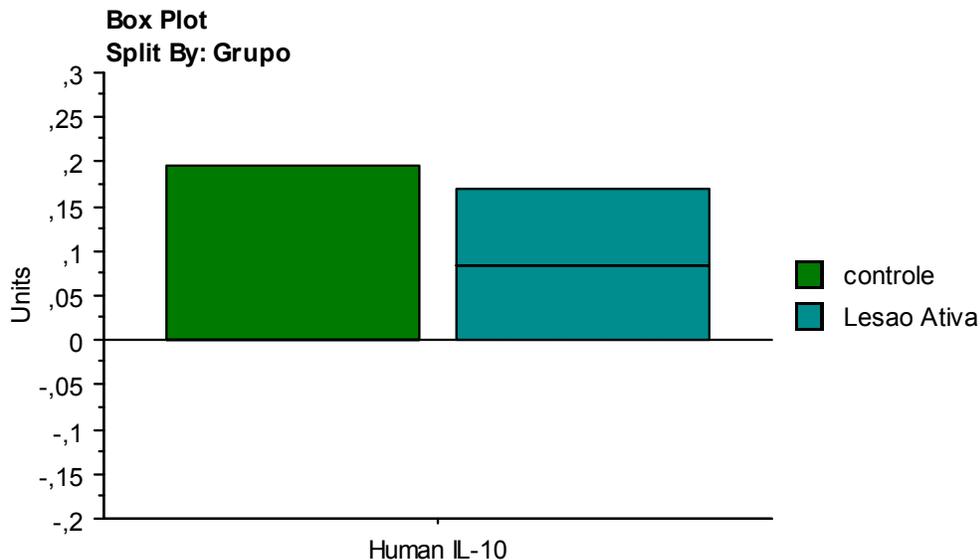
**Gráfico 16 – Produção de IL-12p70 nos grupos controle e lesão ativa**

A diferença na produção de IL-10 não teve significância estatística em nenhuma das análises. Quando comparados os quatro grupos (p-valor=0,326), cicatrizes antigas e recentes (p-valor = 0,086), cicatrizes antigas e controle (p-valor=0,533); cicatrizes antigas e lesão ativa (p-valor=0,782), lesão ativa e controle (p-valor>0,999), lesão ativa e cicatriz recente (p-valor=0,157), cicatriz recente e controle (p-valor=0,113).

**Gráfico 17 – Produção de IL-10 da amostra total**

**Gráfico 18 – Produção de IL-10 nos grupos cicatriz antiga e cicatriz recente****Gráfico 19 – Produção de IL-10 nos grupos cicatriz antiga e controle**

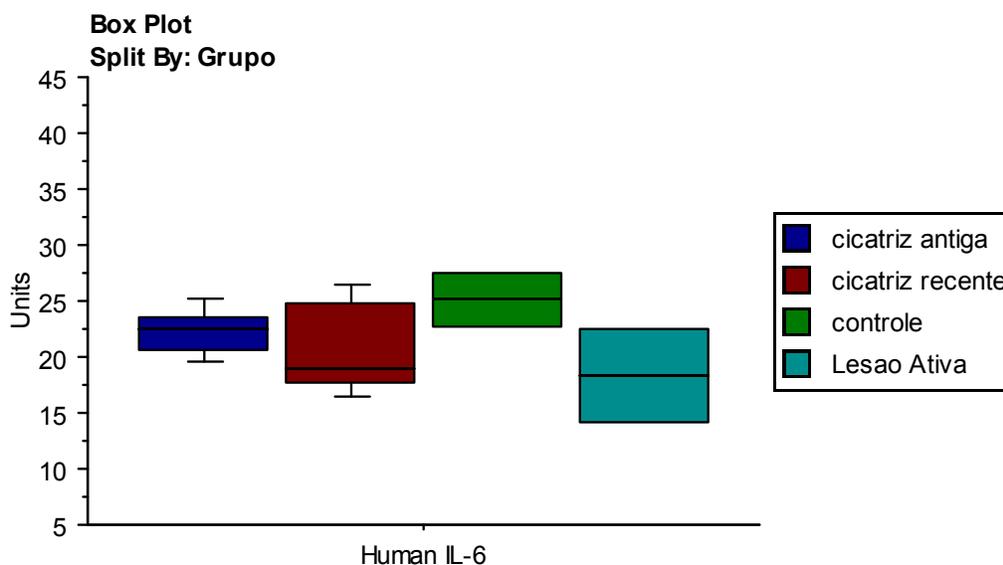
**Gráfico 20** – Produção de IL-10 nos grupos cicatriz antiga e lesão ativa**Gráfico 21** – Produção de IL-10 nos grupos cicatriz recente e controle

**Gráfico 22** – Produção de IL-10 nos grupos cicatriz recente e lesão ativa**Gráfico 23** – Produção de IL-10 nos grupos controle e lesão ativa

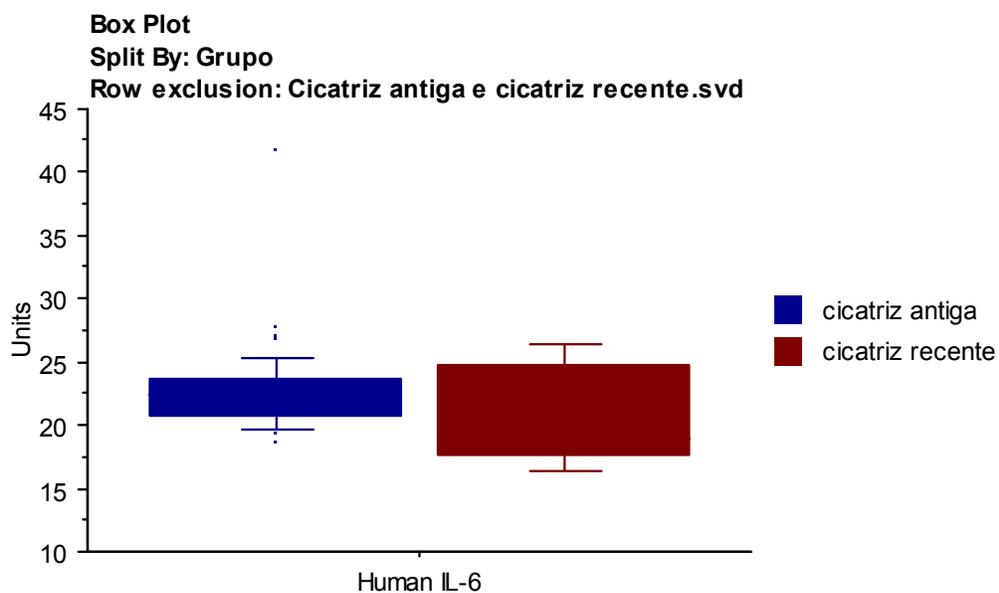
A produção de IL-6 não apresentou diferença significativa entre os grupos (p-valor = 0,265). Não houve diferença estatística quando analisados apenas dois grupos separados: lesões ativas com cicatrizes antigas (p-valor= 0,236), lesões ativas com cicatrizes recentes (p-valor=0,643) lesões ativas com controle (p-valor =

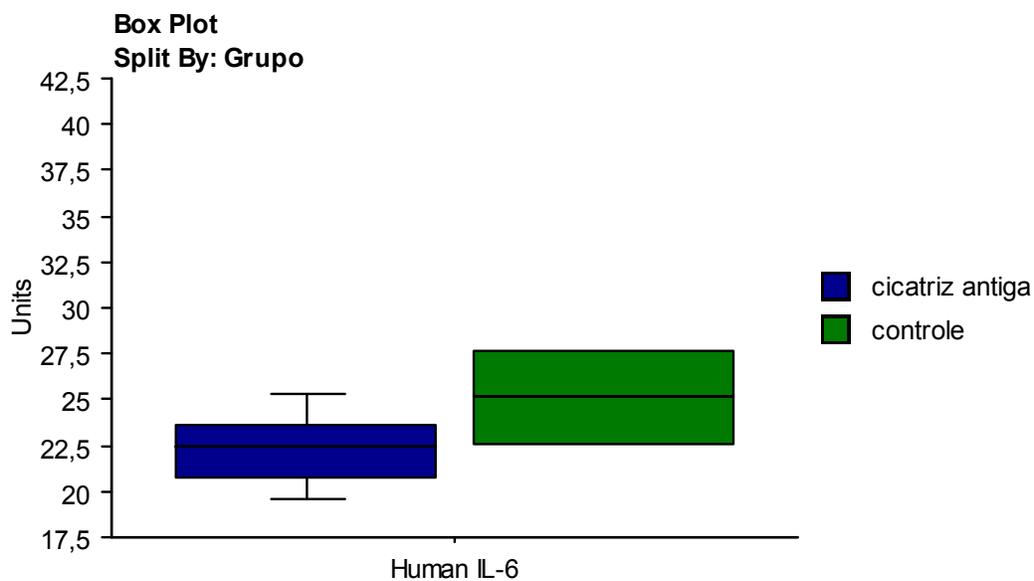
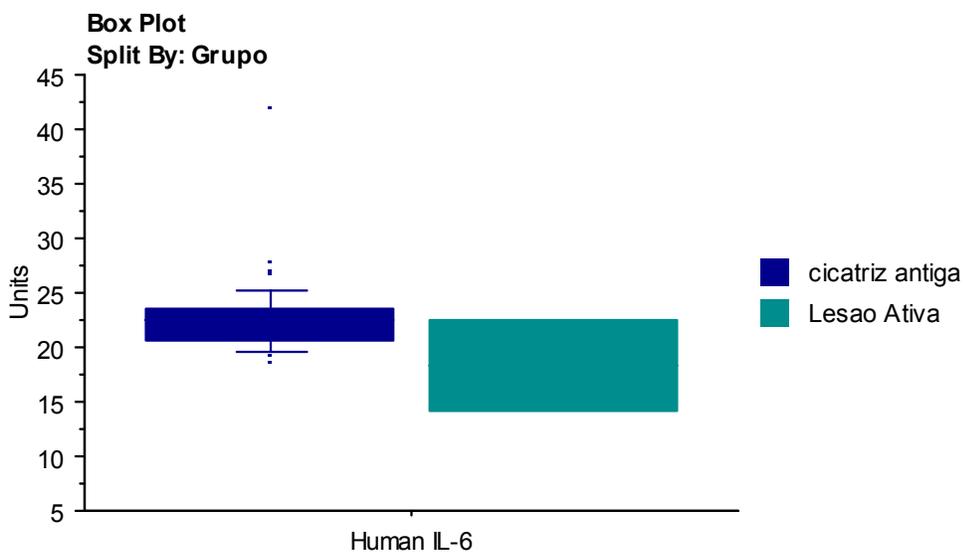
0,121) e cicatrizes antigas com o controle (p-valor=0,225) e cicatrizes recentes com o controle (p-valor=0,143).

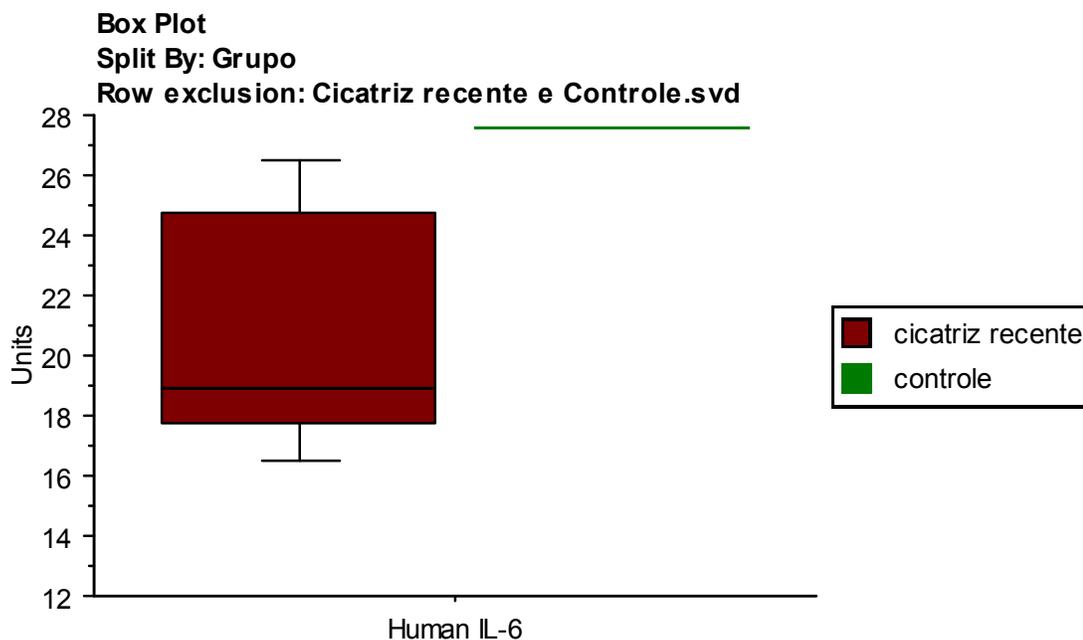
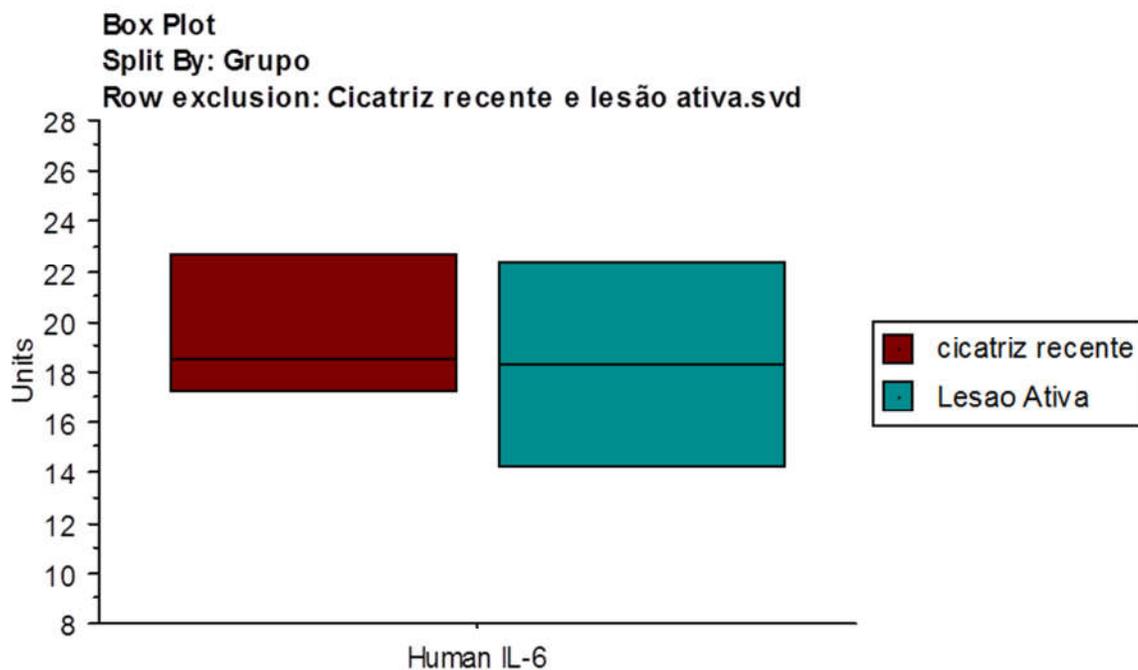
**Gráfico 24 – Produção de IL-6 da amostra total**

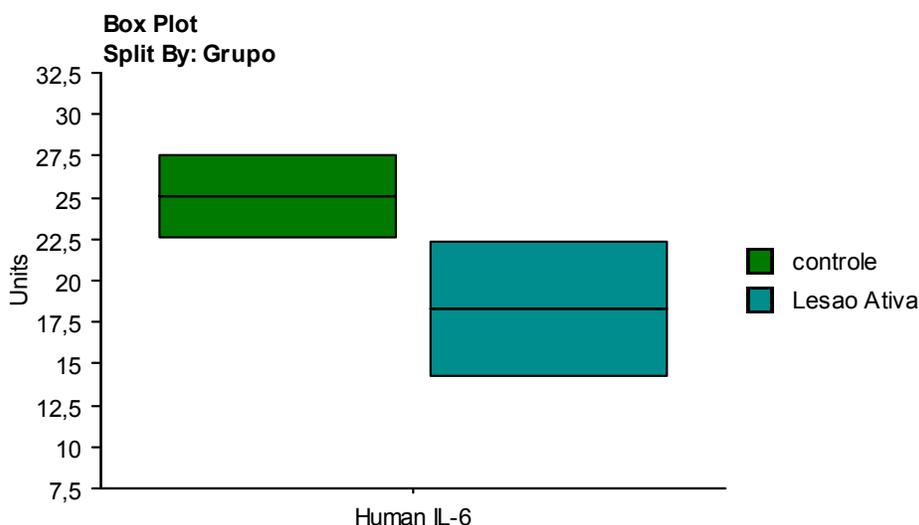


**Gráfico 25 – Produção de IL-6 nos grupos cicatriz antiga e cicatriz recente**

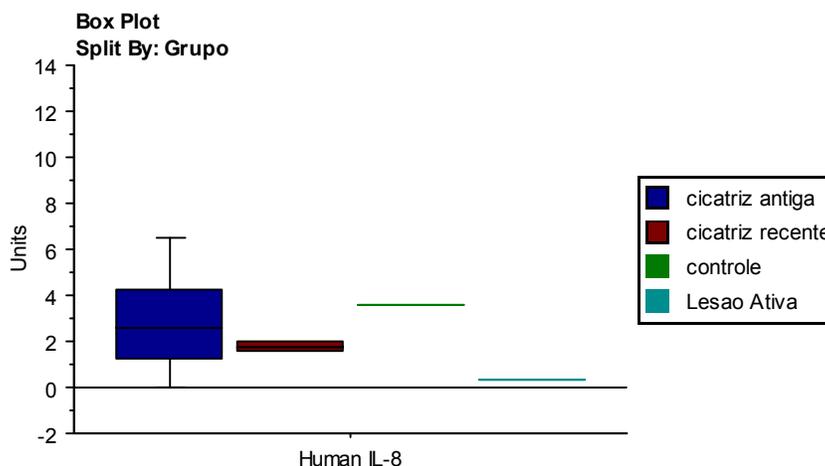


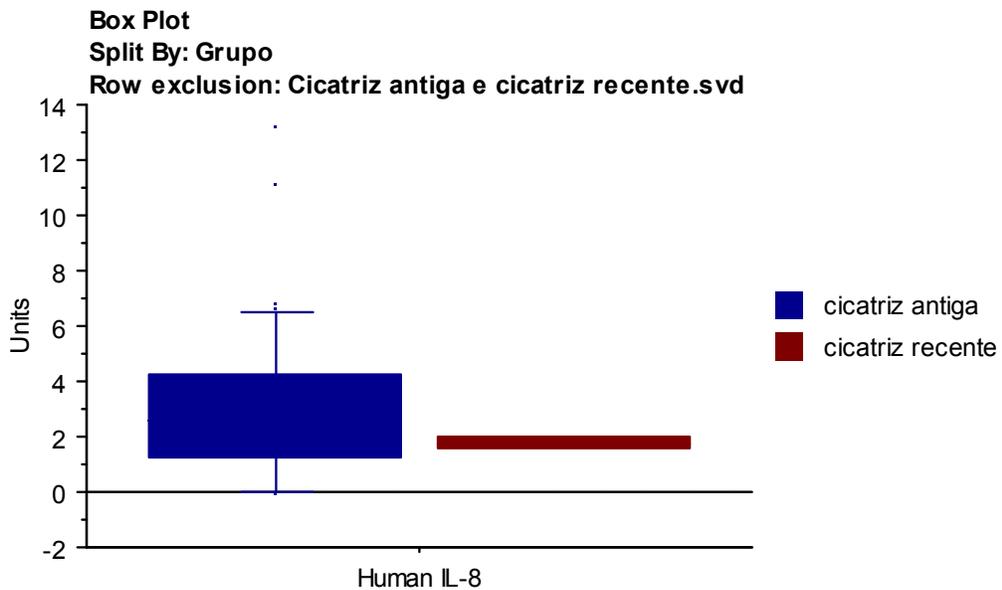
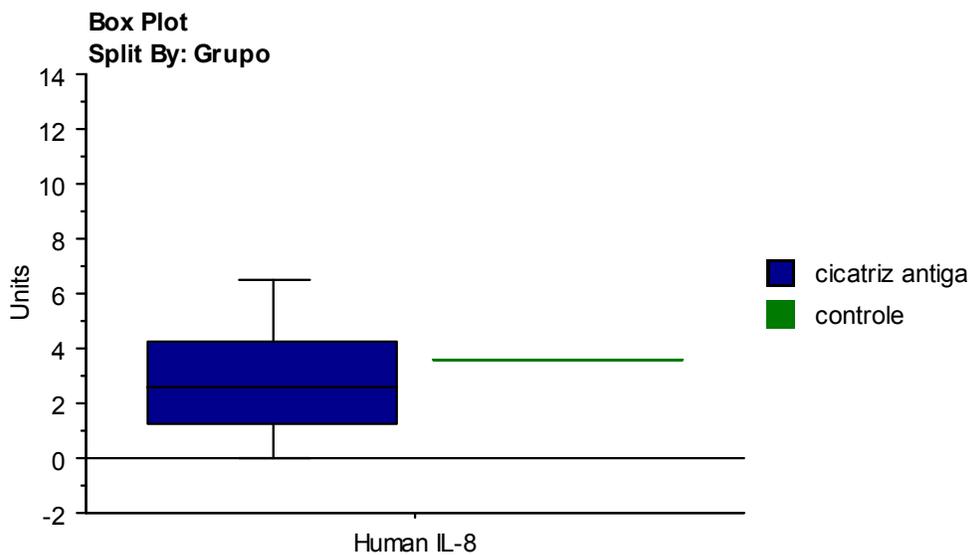
**Gráfico 26 – Produção de IL-6 nos grupos cicatriz antiga e controle****Gráfico 27 – Produção de IL-6 nos grupos cicatriz antiga e lesão ativa**

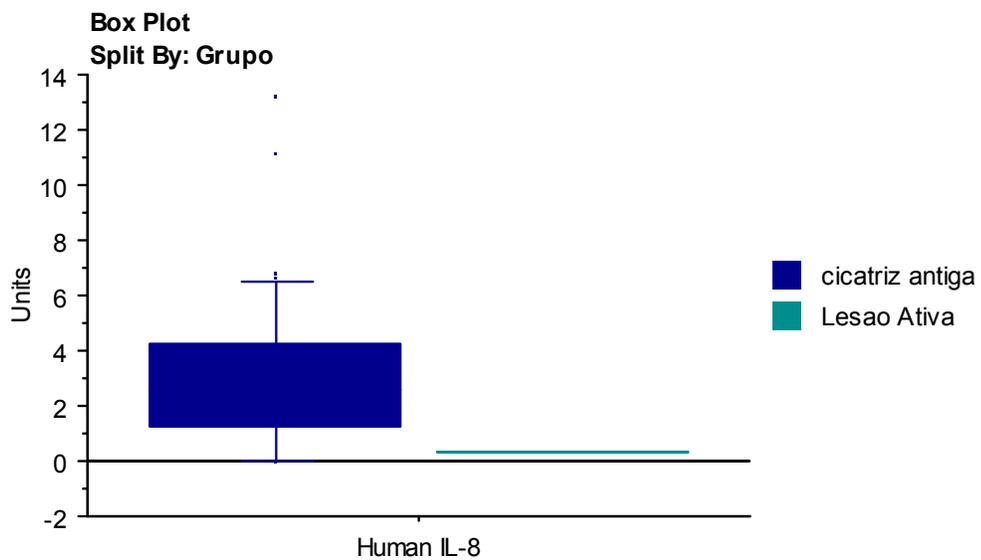
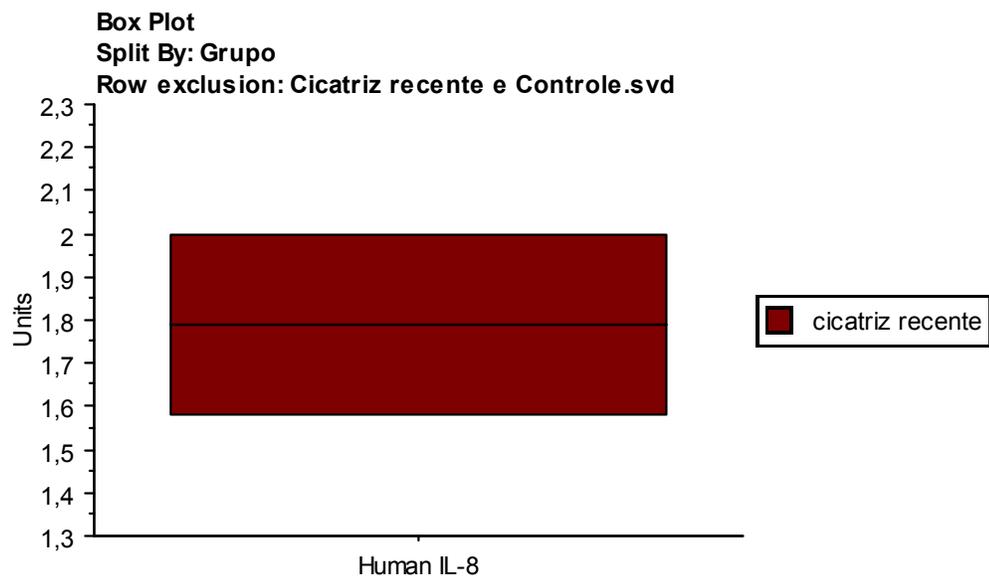
**Gráfico 28** – Produção de IL-6 nos grupos cicatriz recente e controle**Gráfico 29** – Produção de IL-6 nos grupos cicatriz recente e lesão ativa

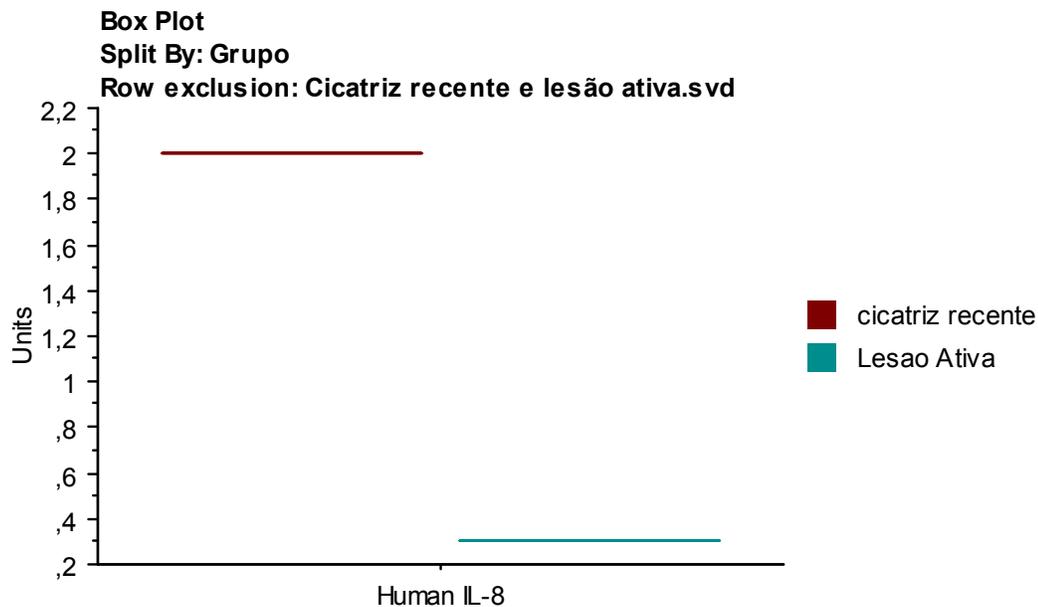
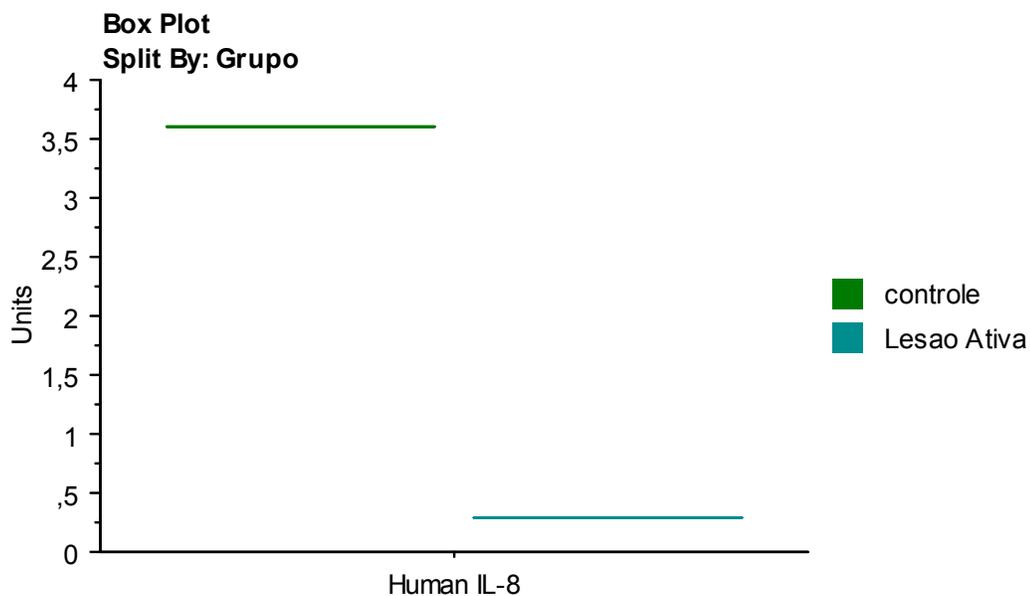
**Gráfico 30 – Produção de IL-6 nos grupos controle e lesão ativa**

A produção de IL-8 foi maior no grupo cicatrizes antigas, no entanto, a diferença entre os grupos não foi significativa ( $p$ -valor = 0,619). Comparando-se o grupo de lesões ativas com cicatrizes antigas ( $p$ -valor= 0,258), lesões ativas com cicatrizes recentes ( $p$ -valor=0,317), lesões ativas com o controle ( $p$ -valor = 0,317), cicatrizes antigas com o controle ( $p$ -valor=0,746), cicatrizes recentes com o controle ( $p$ -valor>0,999) ou cicatrizes antigas com cicatrizes recentes ( $p$ -valor=0,611), conclui-se que não houve diferença significativa em nenhuma das análises.

**Gráfico 31 – Produção de IL-8 na amostra total**

**Gráfico 32 – Produção de IL-8 nos grupos cicatriz antiga e cicatriz recente****Gráfico 33 – Produção de IL-8 nos grupos cicatriz antiga e controle**

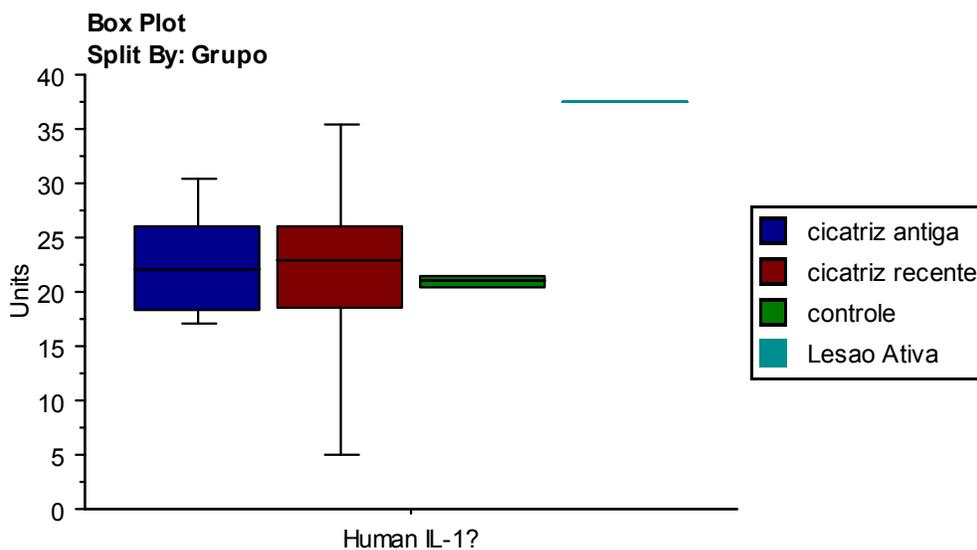
**Gráfico 34 – Produção de IL-8 nos grupos cicatriz antiga e lesão ativa****Gráfico 35 – Produção de IL-8 nos grupos cicatriz recente e controle**

**Gráfico 36 – Produção de IL-8 nos grupos cicatriz recente e lesão ativa****Gráfico 37 – Produção de IL-8 nos grupos controle e lesão ativa**

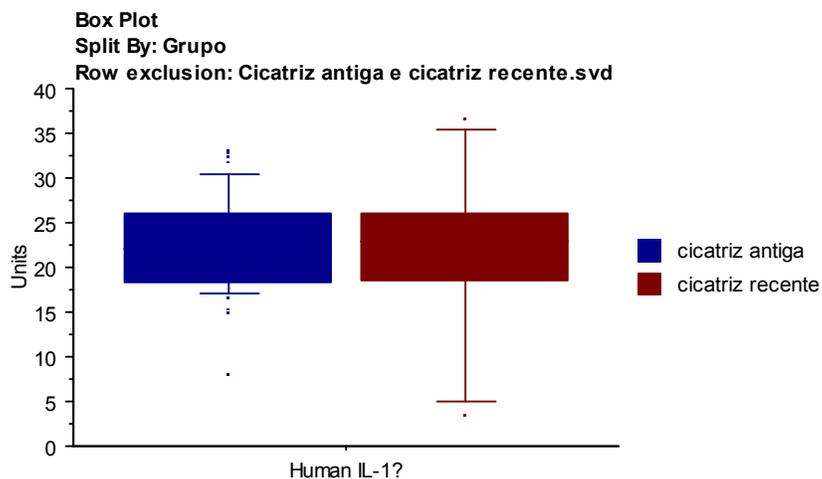
Em relação à produção de IL- 1 $\beta$  não houve diferença significativa nas análises. Comparados os quatro grupos (p-valor = 0,380), o grupo lesão ativa com

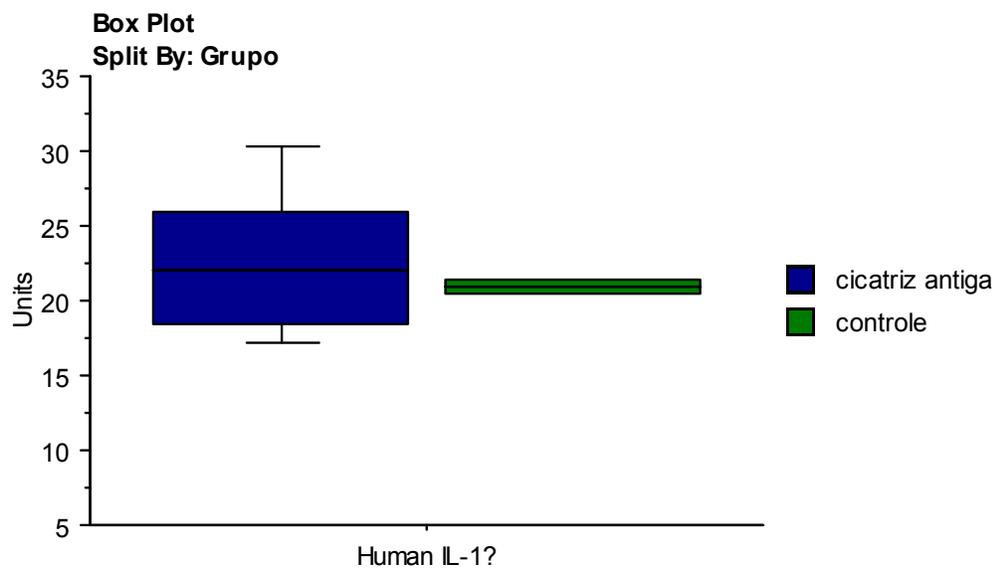
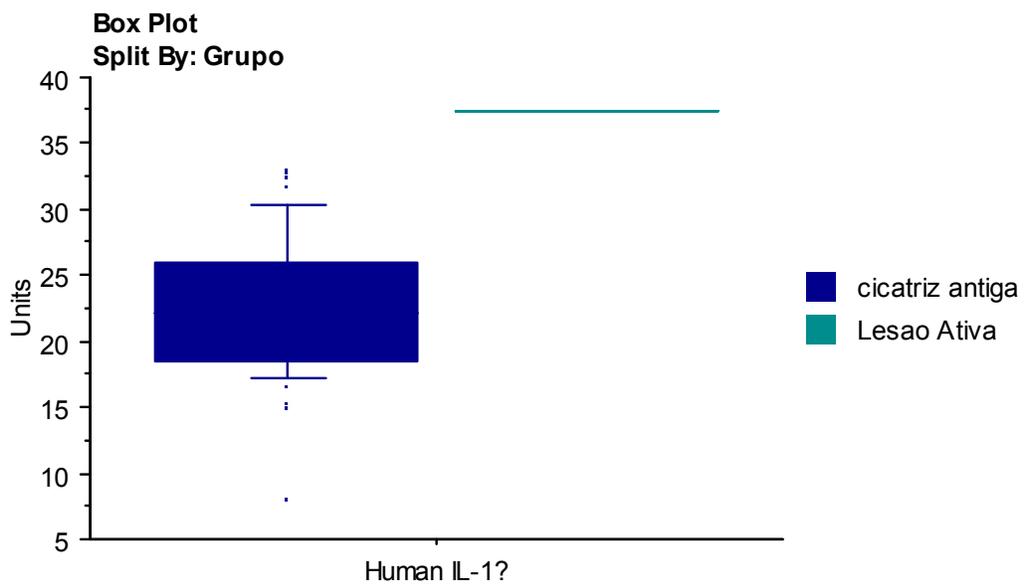
cicatrices recentes (p-valor= 0,317), lesão ativa com cicatrizes antigas (p-valor=0,095) e lesão ativa com o controle (p-valor = 0,220). O grupo de cicatrizes antigas com o controle (p-valor=0,821), cicatriz recente com controle (p-valor = 0,617) e cicatrizes antigas com cicatrizes recentes (p-valor = 0,767).

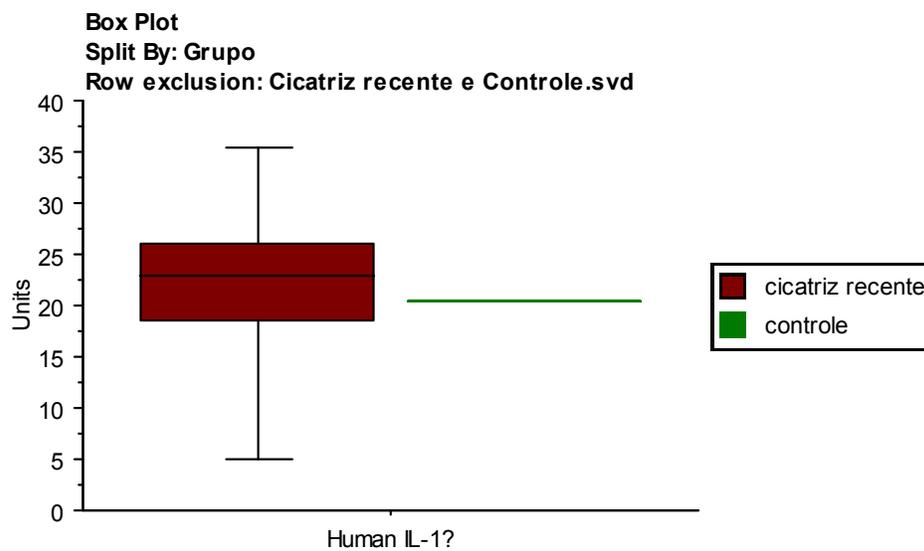
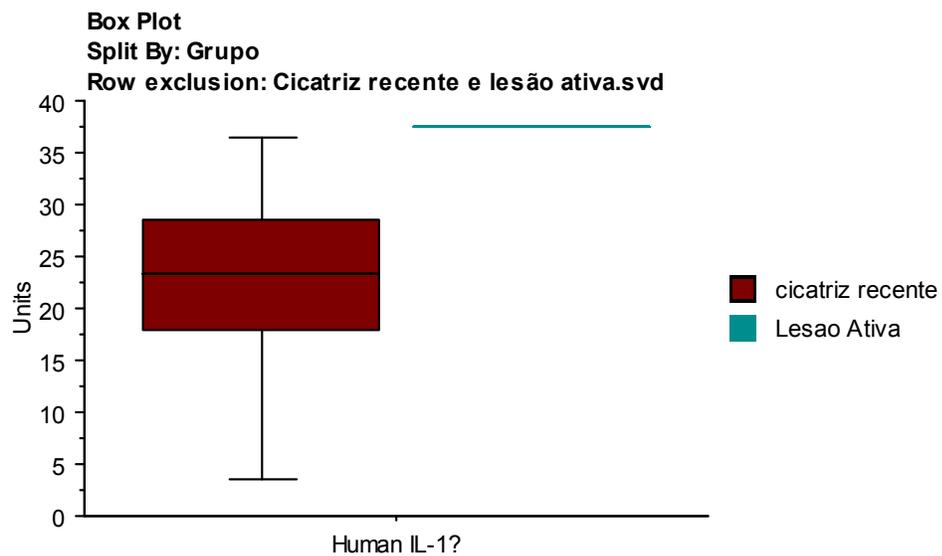
**Gráfico 38 – Produção de IL-1 da amostra total**

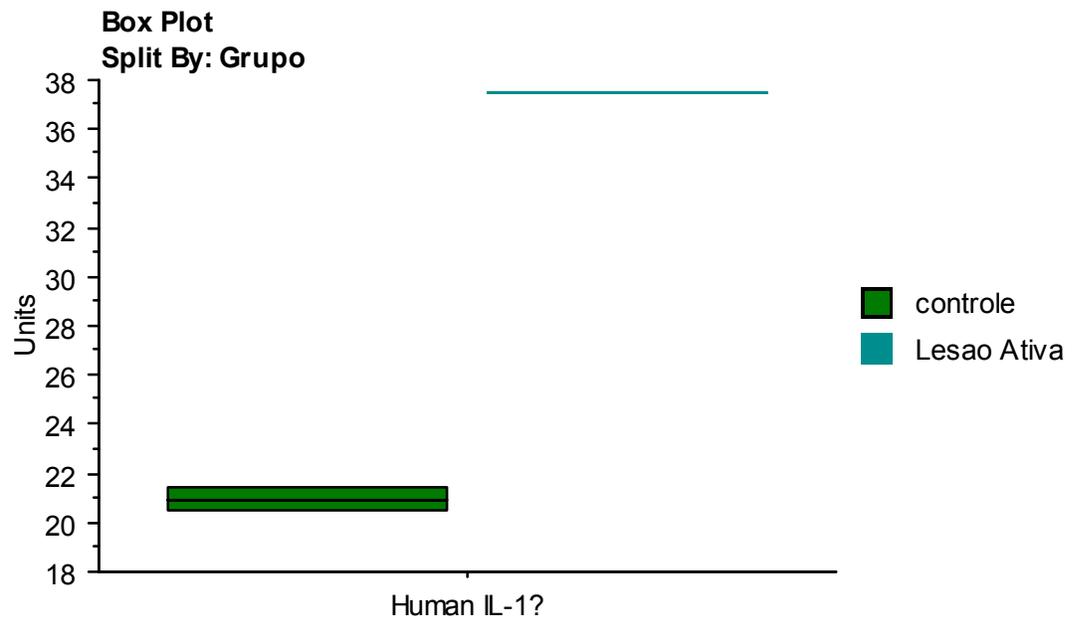


**Gráfico 39 – Produção de IL-1 nos grupos cicatriz antiga e cicatriz recente**



**Gráfico 40** – Produção de IL-1 nos grupos cicatriz antiga e controle**Gráfico 41** – Produção de IL-1 nos grupos cicatriz antiga e lesão ativa

**Gráfico 42 – Produção de IL-1 nos grupos cicatriz recente e controle****Gráfico 43 – Produção de IL-1 nos grupos cicatriz recente e lesão ativa**

**Gráfico 44 – Produção de IL-1 nos grupos controle e lesão ativa**

## 6 DISCUSSÃO

A maior parte da amostra deste estudo é de mulheres. Este é dado está em concordância com o estudo realizado no Estado do Acre por Silva e Muniz onde o município de Xapuri foi apontado como o que mais contribuiu com o número de casos entre as mulheres. Porém, maior parte dos estudos traz que os indivíduos do sexo masculino são os mais acometidos.<sup>49.50</sup>

Alguns ainda apontam a maior exposição dos homens ao vetor como causa para o maior numero de casos estarem entre os homens.<sup>51.52</sup> Esta maior exposição se deve ao fato de que na maioria das vezes, o trabalho dentro da floresta é feito pelos homens e este trabalho geralmente está relacionado ao desenvolvimento da LTA.<sup>53</sup>

Em 2017 98% dos casos de LTA se encontravam nas propriedades rurais, sobretudo nas mais isoladas. Nestas áreas os trabalhadores rurais dependem da extração de recursos da floresta para sobreviver.<sup>21</sup> O mesmo foi constatado por Oliart Guzman ao realizar estudo no município de Assis Brasil. Ele mostrou que os casos de LTA ocorridos entre os anos de 2003 e 2010, acometeram mais homens, moradores da zona rural e com ocupação relacionada ao meio ambiente.<sup>54</sup>

Em relação à idade houve uma predominância de indivíduos acima de 15 anos, no entanto, nessa faixa etária as lesões cicatrizadas predominaram acima das lesões ativas. Enquanto isso, na faixa etária abaixo de 15 anos predominaram as lesões ativas, indicando acometimento recente. Em concordância, pesquisas veem demonstrando que, em áreas endêmicas, a incidência de LTA é maior na faixa etária até 15 anos<sup>55</sup> e que esta incidência na zona rural diminui conforme a idade aumenta, tanto para homens quanto para mulheres.<sup>21</sup>

A localização das casas muito próximas aos reservatórios e a livre circulação de pessoas sugere a existência de transmissão peridomiciliar e intradomiciliar. Este padrão de transmissão contribui com a alta incidência principalmente entre crianças e mulheres.<sup>56</sup>

A análise dos resultados epidemiológicos mostrou-se em consonância com vários achados anteriores e ajudam a compreender a alta prevalência e alta incidência de LTA no município de Xapuri. Quanto aos dados que relacionam a LTA com a resposta imune do hospedeiro, estes dizem respeito à produção de citocinas

e funções de algumas células envolvidas nos mecanismos imunológicos em resposta à presença da *Leishmania*.

A produção de IFN- $\gamma$  mostrou-se maior nos indivíduos que nunca apresentaram lesão tecidual decorrente da infecção por *Leishmania*. Em concordância com trabalhos que demonstraram a importância da produção de IFN- $\gamma$  para o controle da infecção por *Leishmania* por estimular a produção de oxidantes derivados dos macrófagos.<sup>57,58</sup> O IFN- $\gamma$  é uma citocina regulatória produzida principalmente pelas células Th1 e NK, principal ativador de macrófagos e inibe a produção de células Th2.<sup>59</sup>

As interleucinas IL-1b, IL-6 e IL-8 também foram analisadas devido ao importante papel que estas possuem no processo de inflamação. No entanto, nenhuma destas citocinas apresentou diferença estatística na produção entre os grupos. Ressalta-se o tamanho da amostra como um possível viés do estudo e sugere-se a realização de novas pesquisas com estas citocinas com uma amostra maior.

A IL-8 é uma quimiocina necessária para a transformação de uma resposta imune inata em uma resposta adquirida. Células dendríticas ativadas com o antígenos estranhos viajam até os linfonodos regionais e ativam o sistema imunológico adquirido. Este tráfico de células dendríticas e linfócitos é regulado pelo sistema de quimiocinas que se torna necessário para modificar a resposta imune inata e permitir a existência de uma resposta adaptativa.<sup>60</sup> Pesquisadores sugeriram o uso de quimiocinas como imunoproliferação ou terapia para a leishmaniose.<sup>61</sup>

A infecção por *L. major* pode desencadear a produção de citocinas inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .<sup>60,62</sup> Essas citocinas, por sua vez, induzem a produção de mediadores inflamatórios adicionais, incluindo quimiocinas.<sup>60,63</sup> Assim, a produção de citocinas e quimiocinas precoces é fundamental para o desenvolvimento do controle imunológico efetivo da infecção por *L. major*.<sup>64</sup>

Apesar da análise de produção do TNF- $\alpha$  não se mostrar estatisticamente relevante, notou-se que ela está presente em maior quantidade no grupo de cicatrizes recentes, se comparados com qualquer um dos grupos. Em modelos murinos o TNF- $\alpha$  atua em sinergia com o IFN- $\gamma$  para a eliminação da leishmania, através da indução de óxido nítrico (NO).<sup>58,59</sup> A presença de altos níveis de TNF- $\alpha$  tem sido correlacionada com a ulceração da pele durante infecção.<sup>65</sup>

A IL-10 parece ser a citocina mais envolvidas na modulação da resposta imune em indivíduos com leishmaniose.<sup>23,66,67</sup> É uma citocina inibitória do grupo de células Th2 e principal moduladora da resposta do tipo Th1, produção de TNF- $\alpha$  e IL-17. A IL-17 não foi quantificada no presente estudo, mas sabe-se que é uma das principais citocinas responsável pela persistência do parasito.<sup>68</sup>

A IL-10 é capaz de inibir a síntese de citocinas produzidas por macrófagos como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8<sup>69,70</sup> e está ligada a funções dos linfócitos T reguladores (Treg).<sup>71</sup> Acredita-se que as Treg exerçam papel importante na regulação negativa do sistema imune. Podendo estar envolvidas no controle da imunidade anti infecção.<sup>72</sup> e terem sua função associada a resolução de lesões crônicas.<sup>73,74,75,76 77,78</sup>

Assim, a liberação de IL-10 pode induzir linfócitos TCD4+ a se transformarem em linfócitos T regulatórios (Treg) e com isso, suprimir a atividade de macrófagos, controlar os perfis Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub>, e evitar o possível aumento da infecção em consequência de uma resposta imune exacerbada.<sup>79,80</sup> Em doenças infecciosas as células Treg têm mostrado ser importantes na manutenção do patógeno no hospedeiro e para minimizar a patologia.<sup>81,82</sup> Sabe-se ainda que altos níveis de IL-10 intralesional, estão associados à persistência do parasito.<sup>83</sup>

Analisando as condições necessárias à persistência do parasito, a presença da IL-10 foi essencial. A necessidade de IL-10 no estabelecimento da latência associada à infecção natural foi confirmada por estudo com camundongos infectados e deficientes em IL-10. Camundongos não modificados foram tratados durante a fase crônica com anticorpos anti-receptores da IL-10 atingiram a cura estéril. Este resultado sugere a possibilidade de uma nova abordagem para eliminar o parasita latente risco e o risco de reativação.<sup>81</sup>

Em relação à produção de IL-12p70 a análise mostrou uma diferença importante na comparação entre indivíduos que apresentaram ao menos uma lesão em algum momento da vida com indivíduos que nunca apresentaram alguma lesão. Sendo significativamente maior nos últimos. Esse achado está em acordo com estudos que demonstraram uma redução de IL-12 em pacientes com lesões ativas.<sup>84,85</sup>

IL-12 tem um papel importante na resposta imune clássica (Th1).<sup>86,87</sup> Experimentos mostraram que camundongos infectados com *L. major* curam-se com

o desenvolvimento da imunidade mediada por células Th1 através da produção de IFN- $\gamma$  dependente da IL-12. Usando células fagocitárias deficientes de IL-12 mostrou-se que estas perdem totalmente sua capacidade de mediar a proteção contra a leishmaniose.<sup>88</sup>

Destaca-se que na infecção crônica por *L. amazonensis*, a IL-12 é suprimida diante da produção de IL-2, independente da presença de células Treg. Assim, a IL-2 desempenha um papel negativo ao limitar a capacidade da IL-12 de promover a proliferação de células TCD4+. A neutralização da IL-2 durante a infecção crônica por *L. amazonensis* promoveu maior proliferação linfócitos em resposta à IL-12. Ambos resultados sugerem que a IL-2 seja um importante fator limitante na resposta Th1.<sup>89,90</sup>

Diante dos resultados deste estudo e da vasta literatura acerca da relação entre leishmaniose e imunologia conclui-se que todas as citocinas compartilham muitas funções e que o compartilhamento e a combinação de citocinas é o que vai definir a evolução da doença. Inúmeros estudos têm sido realizados com o objetivo de entender melhor os mecanismos imunes envolvidos nas infecções por diversas espécies de *Leishmania*, porém ainda há muitas funções a serem elucidadas.

## 6 CONCLUSÃO

A LTA está entre as doenças negligenciadas, apesar de estar presente em quase todos os continentes e manter índices elevados de novos casos todos os anos. Atinge, sobretudo, as regiões mais pobres do Brasil e representa um desafio para a população e para gestores em relação ao controle, prevenção e tratamento.

A amostra apresentou um perfil diferente daquele considerado o mais comum em relação ao sexo. Houve um número maior de mulheres do que o esperado. A presença de mulheres e crianças entre os mais acometidos sugere uma transmissão peri e intradomiciliar importante. Além disso, a maior parte da amostra apresentou lesões cicatrizadas, principalmente cicatrizes antigas.

A dosagem dos níveis sérios das citocinas se mostraram em acordo com a literatura ao mostrarem níveis significantes de algumas citocinas muito importantes para o desenvolvimento da LTA. O IFN- $\gamma$  e a IL-12p70 apresentaram os resultados mais consistentes. Ambos foram mais presente no sangue de indivíduos que nunca foram acometidos de LTA. E de forma geral, são enzimas co-dependetes na formação de uma resposta imune do tipo Th1, relacionada com a eliminação do parasita e resistência à LTA.

Muitos estudos ainda são necessários para esclarecer todas as funções das citocinas no processo inflamatório, no tipo de resposta imune formado e principalmente na criação de meios que possam ajudar na prevenção, tratamento e controle da LTA.

## REFERÊNCIAS

1. LAINSON, R; SHAW, J.J. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *Br Med Bull*, London, v. 1, n. 28, p.44-48,1972.
2. LAINSON, R; SHAW, J.J; A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Ciência e Cultura**, v.1, n.44, p. 94-106, 1992.
3. LAINSON, R; et al. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.1, n.89, p. 435-443, 1994.
4. SILVEIRA, FT, et al. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil caused by *Leishmania* (*Viannia*) *lindenbergi* n.sp., a new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite**, v.1, n. 9, p. 43-50, 2002.
5. RANGEL, EF. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. *Tropical Diseases, Society and the Environment*. Proceedings from a Research Seminar, p.103-110, 1995.
6. VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania*. **Bras Méd.**, v.25, p.411-441, 1911.
7. CARVALHO, EM; et al., Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis, **J. Clin. Invest.** v. 6, n. 76 p. 2066–2069, 1985.
8. CÁSTES, M; et al. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clin Immunol Immunopathol.** v.1, n. 27, p.176-186, 1983.
9. LAINSON, R; SHAW, JJ. New World Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* Species. In: COX FEG, KREIER JP, WAKELIN D, **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. London, v.5, p. 242-266, 1998.
10. ROGERS, ME; CHANCE, ML; BATES, PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpi*. **Parasitology**, v.124, p.495-507, 2002.
11. DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol.* **Infect. Dis.** v.27, p.305–318. 2004.
12. SCHRIEFER, A.; et al. Multiclonal *Leishmania braziliensis* Population Structure and Its Clinical Implication in a Region of Endemicity for American

- Tegumentary Leishmaniasis. **Infection And Immunity**, v. 72, n. 1, p.508-514, 2003.
13. CASTELLUCCI, Léa ; et al. IL6–174 G/C Promoter Polymorphism Influences Susceptibility to Mucosal but Not Localized Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. *The Journal Of Infectious Diseases*, v. 194, n. 4, p.519-527, 2006.
  14. MATOS, GI, et al. IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence Leishmania induced IFN-gamma production. **BMC Infect. Dis**, v.7 p.33-38, 2007.
  15. World Health Organization. Gamapserver.who.int [Internet]. WHO. 2015. Disponível em:<[http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis\\_2015\\_CL.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2015_CL.png)> Acesso em: 20. set. 2018.
  16. ALVAR, J; YACTAYO, S; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol**, v. 22, p. 552–557, 2006.
  17. PAHO. Pan-American Health Organization. **Leishmaniasis: epidemiological reports in the Americas**. Washington: PAHO/Leishmaniasis Report v. 4; 2016.
  18. SILVA, PAM. **Avaliação da produção das interleucinas ifn- $\gamma$ , tnf- $\alpha$ , il-17a, il-23 em portadores da leishmaniose tegumentar americana na Amazônia Ocidental**. 2018. 76 f. dissertação (mestrado) - Curso de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2018.
  19. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Leishmaniose Tegumentar Americana [Internet]. SINAN. Disponível em:<<http://portalsinan.saude.gov.br/leishmaniose-tegumentar-americana>.> cesso em: 21. set. 2018.
  20. **ACRE**. Governo do Estado do Acre. Disponível em: <<http://www.ac.gov.br/wps/portal/acre/Acre/estado-acre/municipios>> Acesso em: 03. dez. 2018.
  21. BRILHANTE, AF.; et al. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in an endemic area of forest extractivist culture in western Brazilian Amazonia, **Rev. Inst. Med. Trop**. v.59, 2017.
  22. Scott, P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 147, p.3149–3155, 1991.
  23. SACKS, D; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews**, v.2, p.845–858, 2002.

24. BOGDAN, C; ROLLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.121–134, 1998.
25. NOEL, W.; et al. Alternatively activated macrophages during parasite infections. **Trends in Parasitology**. v.20, p.126–133, 2004.
26. MALLINSON, DJ.; COOMBS, GH. Interaction of Leishmania metacyclics with macrophages. **International Journal for Parasitology**, v.19, p.647–656, p.1989.
27. ALEXANDER, J; RUSSELL, DG. The interaction of Leishmania species with macrophages. **Advances in Parasitology**, v.31, p.175–254, 1992.
28. LOUZIR, H; et al. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major. **J. Infect. Dis.** v.177, p.1687–95, 1998.
29. MELBY, PC. Vaccination against cutaneous leishmaniasis: current status. **Am. J. Clin. Dermatol.** v.3, p. 557–570, 2002.
30. Qi, H, et al. Enhanced replication of Leishmania amazonensis amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. **Infect Immun.** v.72, p.988–95, 2004.
31. PINHEIRO, R. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma**. v.16, p.7-8, 2004;
32. MENEZES, J. **Expressão de Foxp3, IL-17 e IL-23 na Leishmaniose Tegumentar Americana causada por Leishmania (Leishmania) amazonenses e Leishmania (Viannia) braziliensis**. dissertação (mestrado) Curso em ciência. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2013.
33. ASSIS, M. **Quantificação de mediadores dos perfis Th1, Th2, Th17 e Treg na resposta imune contra Leishmaniose Tegumentar Americana ativa e após cura clínica**. Tese (Doutorado) Curso em Inovação Terapêutica. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2014.
34. GREEN, SJ., et al. Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **Journal of Immunology**, v.145, n.12, p.290-297.
35. PANARO, MA.; et al. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in Leishmania infantum-infected human macrophages stimulated with interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, v.29, p.122–127, 1999.

36. SISTO, M.; et al. Inducible nitric oxide synthase expression in Leishmania-infected dog macrophages. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.24, p.247–254, 2001.
37. HOLZMULLER, P.; BRAS-GONÇALVES, R.; LEMESRE, J.-I.. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in Leishmania. **Parasitology**, v. 132, n. 1, p.19-32, mar. 2006
38. HEINZEI, FP, SADICK, MD ; et al. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **Journal of Experimental Medicine**, v.169, n.1, p.59-7, 1989.
39. JONES, DE.; BUXBAUM, LU.; SCOTT, P. IL-4-Independent Inhibition of IL-12 Responsiveness During *Leishmania amazonensis* Infection. **The Journal Of Immunology**, v. 165, n. 1, p.364-372, 2000.
40. BUXBAUM, LU & Scott P. Interleukin 10- and Fcγ receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. **Infect Immun**, v.73, n.4, p. 2101-2108, 2005.
41. TRIPATHI, P; SINGH, V; NAIK, S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 51, p.229-242, 2007.
42. OLIVEIRA, WN; et al. O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, v.66, p.127–32, 2014.
43. RIBEIRO, JMC. Role of Saliva in Blood-Feeding by Arthropods. **Annual Review of Entomology**, v.32, n.1, p.463–478, 1987.
44. RIBEIRO-DE-JESUS, et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, n.1, p.143–148, 1998.
45. GORAK, PM.; ENGWERDA, CR.; KAYE, PM. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. **European journal of immunology**, v. 28, n. 2, p. 687–95, 1998.
46. PEARSON, R. D.; STEIGBIGEL, R. T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **Journal of immunology**, v. 127, n. 4, p.1438–1443, 1981.
47. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Xapuri - Acre. Acre: IBGE; 2016. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=120070>. Acesso em> 03. set. 2018.

48. **ASSOCIAÇÃO DOS MUNICÍPIOS DO ACRE.** Xapuri - Acre. Acre: AMAC; 2016. Disponível em: [http://www.amac-acre.com.br/site/?page\\_id=698](http://www.amac-acre.com.br/site/?page_id=698). Acesso em> 03. set. 2018.
49. MELCHIOR, L, BRILHANTE, A, CHIARAVALLLOTI-NETO, F. Spatial and temporal distribution of American cutaneous leishmaniasis in Acre state, Brazil. **Infectious Diseases of Poverty.** v.6, n.1, 2017.
50. ALMEIDA, SCB; LEITE, IS; CARDOSO, COC. American cutaneous leishmaniasis: epidemiological profile in the municipality of Rio Branco – Acre. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological,** v.5, n. 1, p. 26-31, 2018.
51. CHAGAS, AC, et al. Leishmaniose tegumentar americana (LTA) em uma vila de exploração de minérios - Pitinga, município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. **Rev Bras Epidemiol,** v.9, p.186-92, 2006.
52. SILVA-NUNES, M, et al. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar e descrição das populações de flebotomíneos no município de Acrelândia, Acre, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia,** v.11, n.2, p.241-251, 2008.
53. RODRIGUES, AM; et al. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 39, n. 2, p. 139-145, 2006.
54. OLIART-GUZMAN, H ; et al. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana na fronteira amazônica: estudo retrospectivo em Assis Brasil, Acre. **Rev Patol Trop.** v.42, p.187-200, 2013.
55. REITHINGER, J.C; et al., Cutaneous Leishmaniasis, **Lancet Infect Dis.** v.7, p.581-596, 2007.
56. AMPUERO, J; MACÊDO, V; MARSDEN, P. Características clínicas da leishmaniose tegumentar em crianças de 0 a 5 anos em uma área endêmica de Leishmania (Viannia) braziliensis. **Rev Soc Bras Med Trop,** v.39, p.22-6. 2006.
57. MURRAY HW, CARTELLI DM. Killing of intracellular Leishmania donovani by human mononuclear phagocytes: evidence for oxygen-dependent and - independent leishmanicidal activity. **J Clin Invest.** v. 72, p.32–39, 1983.
58. BOGDAN, CN ;et al. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. **J. Exp. Med.** v.194, p.2121-2130, 2000.
59. LIEW, FYS. et al.. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from l-arginine. **J. Immunol.** v.144, p.4794-4797, 1990.
60. LUSTER, AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. **Curr. Opin. Immunol.** v.14, p.129-135, 2002.

61. GUPTA, G; OGHUMU, S; SATOSKAR, AR.. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. *Advances In Applied Microbiology*, p.155-184, 2013.
62. ARNOLDI, J.; Moll, H. Langerhans cell migration in murine cutaneous leishmaniasis: regulation by tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ . *Dev. Immunol.* v. 6, p.3-11, 1998.
63. TAPIA, FJG; GACERES-DITTMAR, MA. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol.* v.15, p.160-165, 1994.
64. OHMORI, Y; et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines in vivo. *Am. J. Pathol.* v.142, p.861-870, 1993.
65. SCHWARTZ, J.; et al. Combination of paromomycin plus human anti-TNF- $\alpha$  antibodies to control the local inflammatory response in BALB/ mice with cutaneous leishmaniasis lesions. *Journal Of Dermatological Science*, v. 92, n.1, p.78-88, 2018.
66. BELKAID, YKF; et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *The Journal of Experimental Medicine*, v.194, n.10, p.1497-1506, 2001.
67. BELKAID, Y. The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection. *Expert Opinion on Biological Therapy*, v. 3, n.6, p. 875-85, 2003.
68. MARTINS, LM, REBELO, et al. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar no Município de Buriticupu, Amazônia do Maranhão, Brasil, 1996 a 1998. *Cad Saúde Pública*, v.20, p.735-743, 2004.
69. WAAL MALEFYT, R.; et al. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *Journal of Experimental Medicine*, v.174, n.5, p. 1209-20, 1991.
70. OSWALD, IP ; et al. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 89, n.18, p. 8676-8680, 1992.
71. OLIVEIRA, WNF. **Regulação da resposta inflamatória na leishmaniose tegumentar**: papel de IL-10, TGF- $\beta$  E IL-27. 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Universidade Federal da Bahia, 2012.
72. BELKAID, Y; et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, v.420, n.6915, p. 502-507, 2002.

73. BOURREAU, E. et al. Intralésional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. **Infection and Immunity**, v. 77, n.4, p.1465-74, 2009.
74. CAMPANELLI, A. P. et al. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic of natural regulatory T cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v.193, p. 1313-1322, 2006.
75. CARNEIRO, F.P. et al. Foxp3 expression in lesions of the different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. *Parasite Immunology*, Oxford, v31, n.10, p.646-651, 2009.
76. DÍAZ, YR, ROJAS, R, VALDERRAMA, L, SARAVIA, NG. T-bet, GATA-3, and Foxp3 expression and Th1/Th2 cytokine production in the clinical outcome of human infection with *Leishmania* (*Viannia*) species. **J Infect Dis**, v.202, n.3, p.406-415, 2010.
77. RODRIGUEZ-PINTO, D. et al. Regulatory T cells in the pathogenesis and healing of chronic human dermal leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) species. **Plos neglected tropical diseases**, v.6, n.4, p. 16-27, 2012.
78. SALHI, A. et al. Immunological and Genetic Evidence for a Crucial Role of IL-10 in Cutaneous Lesions in Humans Infected with *Leishmania braziliensis*. **Journal of Immunology**, v. 180, p. 6139 – 6148, 2008.
79. BENTES, P. **Estudo de associação de polimorfismos dos genes IL-10 e IL10RA com Leishmaniose cutânea em uma população caso-controle do Estado do Amazonas, Brasil**. Dissertação (Mestrado) curso em doenças Tropicais e Infecciosas. Manaus: Universidade do Estado do Amazonas; 2014.
80. BELKAID, Y, TARBELL, K. REGULATORY, T. Cells in the control of host-microorganism interactions. **Annual Review of Immunology**. v. 27, p.551-589, 2009.
81. BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nat Rev Immunol**. v. 7, n.11, p. 875-888, 2007.
82. MONTAGNOLI, C.; et al. B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. **J Immunol**, v.169, n.11, p.298-308, 2002.
83. BELKAID, Y ; et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **J. Exp. Med.** v.194. p.1497-1506, 2001.
84. SYPEK, JP. ; et al. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. **J. Exp. Med.** v.177, 1793.

85. HEINZEL, FP. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, v. 177, p.150-155, 1993.
86. VILLARINO, A.; et al. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. **Immunity**, v. 19, n.5, p.645-655, 2003.
87. ARTIS, D; et al. The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. **Journal of Immunology**, v.173, n.9, p.626-634, 2004.
88. BERBERICH, C.; et al. Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens. **J. Immunol.** v.170, p.3171-3179, 2003.
89. RAKOFF-NAHOUM S, HAO L, MEDZHITOV R. Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. **Immunity**, v. 25, p.319–329, 2006.
90. KNOECHEL, B. Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. **J. Exp Med.** V.202, v. 1375–1386, 2005.