



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



WALKER NONATO FERREIRA OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**REGULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: PAPEL DE IL-10, TGF- β E IL-27**

Salvador

2012

WALKER NONATO FERREIRA OLIVEIRA

**REGULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: PAPEL DE IL-10, TGF- β E IL-27**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Olívia Amado Ramos Bacellar

Salvador

2012

Dedico este trabalho a meu pai, minha mãe e meus irmãos pelo apoio e amor demonstrados durante toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Jeová Deus por ter me dado vida, saúde e muita ajuda para lidar com os mais diferentes obstáculos encontrados no caminho.

Aos meus pais, Rita e João, por toda a dedicação e esforço que empenharam na minha educação e formação, por terem me ensinado padrões de moral que orientam minha vida, pelos princípios éticos que inculcaram em mim e, sobretudo pelo amor que a mim dedicaram.

Aos meus irmãos, Sara e João, meus melhores amigos, por terem compartilhado comigo todos esses anos de vida, por me presentear com grandes lembranças da infância e por todo apoio que deram ao irmão mais novo.

A Dr^a. Olivía Bacellar, pela atenção, empenho, carinho, compreensão. Por ser um exemplo de dedicação, responsabilidade e compromisso. Pela oportunidade e por ter confiado em mim mais do que eu mesmo. Por ter me convencido de que essa jornada, apesar de exigir esforço, traria grandes benefícios. Por demonstrar preocupação comigo, me escutar e entender meus problemas. Por ter sido muito mais que uma orientadora – um exemplo de profissional e uma grande amiga.

Aos colegas do laboratório de Imunorregulação (Aline, Álvaro, Eduardo, Ludmila, Michael, Thiago) pela ajuda, pelos momentos de descontração, pelo intercâmbio de conhecimento.

Aos colegas do Serviço de Imunologia - que não vou arriscar citar por nomes para não cometer o erro de esquecer algum- pelas dicas, pelo apoio, pela ajuda com experimentos e por dividirem comigo as ansiedades e angústias da pós-graduação e pesquisa científica.

A Dr. Ricardo Riccio e Professora Leda Alcântara por terem me apresentado ao serviço de Imunologia e terem me indicado a minha orientadora. Vocês são corresponsáveis por essa etapa da minha vida.

A toda minha família e amigos que são tantos que não seria possível citá-los por nome.

Aos colegas do PPGIm que enfrentaram os mesmos desafios e me ajudaram a vencê-los também. Alguns que se tornaram mais do que colegas, amigos de verdade. Cintia Machado e Silvia Oliveira, obrigado pela companhia, pelos momentos felizes e por me darem apoio nesses dois anos.

A Dr. Edgar Carvalho por permitir que esse trabalho fosse desenvolvido, por dar o suporte necessário para que este fosse realizado da forma correta e por todo o conhecimento compartilhado e ajuda dada para a concretização desse projeto.

APOIO FINANCEIRO

NIH Grant AI088650

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

“...a vida é realmente escuridão, exceto quando há um impulso. E todo impulso é cego, exceto quando há saber. E todo saber é vazio, exceto quando há trabalho. E todo trabalho é vazio, exceto quando há amor.”

Gibran

I. RESUMO

REGULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: PAPEL DE IL-10, TGF- β E IL-27.

Introdução: A forte resposta do tipo Th1, com produção exagerada de IFN- γ e TNF- α , observada na leishmaniose tegumentar humana causada por *Leishmania braziliensis* está associada com a destruição tecidual e desenvolvimento de lesão observada em pacientes com leishmaniose cutânea (LC) e em pacientes com leishmaniose mucosa (LM). Em contraste com essas formas clínicas, 10% dos indivíduos residentes em área endêmica, apesar de apresentarem reação de hipersensibilidade tardia para o antígeno de *Leishmania*, não apresentam evidências de doença clínica e são considerados como tendo a forma subclínica (SC) da doença. A produção de IFN- γ e TNF- α nestes indivíduos é menor quando comparada com pacientes com LC. Existem várias evidências que a forte resposta inflamatória não modulada está associada com a patogênese da LC e da LM. Embora os indivíduos SC apresentem uma resposta inflamatória mais fraca, ainda não é bem conhecido como eles controlam a infecção. Uma resposta Th1 eficiente e modulada pode estar envolvida na proteção da infecção por *L. braziliensis*. A modulação da resposta imune é feita principalmente por citocinas moduladoras como IL-10, TGF- β e mais recentemente por IL-27. **Objetivo:** Avaliar o papel de citocinas regulatórias e de antagonistas de citocinas na modulação da resposta imune na infecção por *L. braziliensis*. **Metodologia:** Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de 40 pacientes com LC, 18 com LM e 13 indivíduos com infecção subclínica foram estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) na presença e ausência de citocinas regulatórias (IL-10, IL-27 e TGF- β) ou antagonistas de citocinas (α -TNF- α e α -IFN- γ). A produção de citocinas (IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ) foi mensurada através da técnica de ELISA e de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Resultados:** IL-10 e TGF- β apresentaram atividade moduladora da produção de TNF- α e IL-17, sobretudo na LC, enquanto IL-27 não apresentou efeito modulador na produção de TNF- α , IFN- γ e IL-17 em nenhuma das formas clínicas da leishmaniose tegumentar. A neutralização de TNF- α diminuiu a produção de IFN- γ , mas não alterou a produção de IL-10, enquanto a neutralização de IFN- γ diminuiu a produção de

TNF- α e aumentou a produção de IL-10 nesses pacientes. A produção de IL-17 foi maior nos indivíduos SC, embora sem significância estatística e a neutralização de IL-10 não alterou a produção de IFN- γ nesses indivíduos. Entretanto a expressão de IL-27 foi maior em pacientes com LC quando comparado com os indivíduos SC. **Conclusões:** IL-10 e TGF- β parecem ser as citocinas mais envolvidas na modulação da resposta imune em pacientes com LC e LM, principalmente IL-10, desde que a neutralização de IFN- γ diminui a produção de TNF- α de uma forma dependente de IL-10. A produção de IL-17 nos indivíduos SC sugere que essa citocina pode estar envolvida na proteção contra a infecção por *L. braziliensis*.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar americana; resposta imune; citocinas regulatórias; infecção por *L. braziliensis*.

II. ABSTRACT

REGULATION OF INFLAMMATORY RESPONSE IN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS: ROLE OF IL-10, TGF- β AND IL-27.

Introduction: The strong Th1-type response, with exaggerated production of IFN- γ and TNF- α observed in human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* is associated with tissue destruction and development of the lesions observed in cutaneous leishmaniasis patients (CL) and mucosal leishmaniasis patients (ML). In contrast to these clinical forms, 10% of individuals living in endemic areas, showed delayed hypersensitivity reaction to *Leishmania* antigen, and there isn't evidence of clinical disease. These individuals are considered as subclinical patients (SC). The production of IFN- γ and TNF- α in these individuals is lower compared to CL. There are several evidences that the non modulated strong inflammatory response is associated with CL and ML pathogenesis. Although SC individuals display a weaker inflammatory response, it is not well known how they control the infection. An efficient modulated Th1 response may be involved in protection from infection by *L. braziliensis*. The modulation of immune response is primarily performed by modulatory cytokines such as IL-10, TGF- β and more recently by IL-27.

Objective: To evaluate the role of regulatory cytokines and cytokine antagonists in the modulation of immune response in the infection by *L. braziliensis*. **Methodology:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 40 CL patients, 18 ML and 13 subjects with subclinical infection were stimulated with soluble *Leishmania* antigen (SLA) in the presence or absence of regulatory cytokines (IL-10, IL-27 and TGF- β) or antagonists of cytokines (α -TNF- α and α -IFN- γ). Cytokines production (IL-10, IL-17, TNF- α and IFN- γ) was measured by ELISA and by Polymerase Chain Reaction (PCR). **Results:** IL-10 and TGF- β presented regulatory function in TNF- α and IL-17 production, mainly in CL, whereas IL-27 had no effect in the production of TNF- α , IFN- γ and IL-17 in CL and ML patients. The neutralization of TNF- α decreased IFN- γ but not presented effect in IL-10 production. The neutralization of IFN- γ decreased production of TNF- α and increased IL-10 production in these patients. IL-17 production was higher in SC compared to one produced by CL patients, although not statistically significant. The neutralization of IL-10 did not alter the

production of IFN- γ in these individuals. However the expression of IL-27 was higher in CL patients compared to SC individuals. **Conclusions:** IL-10 and TGF- β are the cytokines that appear to be more involved cytokines in modulation of immune response in CL and ML patients, mainly IL-10, since the neutralization of IFN- γ decreases the production of TNF- α in a way -dependent IL-10. IL-17 production in SC individuals suggests that this cytokine may be involved in protection against infection *L. braziliensis*.

Key words: American tegumentary leishmaniasis; immune response; regulatory cytokines; infection by *L. braziliensis*.

III. LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Atividade moduladora de IL-10 na produção de TNF- α e IL-17 em pacientes com LC e LM.....	35
Figura 2: Avaliação da ação moduladora de TGF- β na produção de TNF- α e IL-17 em pacientes com LC e LM.....	37
Figura 3: Avaliação da atividade moduladora de IL-27 em pacientes com LC (N=19) e LM (N=7).....	39
Figura 4: Indução de IL-10 por IL-27 em pacientes com LC (N=15) e LM (N=7).....	41
Figura 5: Efeito da neutralização de TNF- α na produção de IFN- γ em pacientes com LC (N=15) e LM (N=6).....	43
Figura 6: Avaliação do efeito da neutralização de IFN- γ na produção de TNF- α em pacientes com LC (N=14) e LM (N=7).....	45
Figura 7: Efeito da neutralização de IFN- γ na produção de IL-10 em pacientes com LC (N=13) e LM (N=7).....	47
Figura 8: Produção de citocinas em indivíduos com infecção subclínica e em pacientes com leishmaniose cutânea.....	49
Figura 9: Expressão de RNAm para IL-10 (A) e de IL-27(B) em CMSP de indivíduos com infecção subclínica e pacientes com leishmaniose cutânea.....	51
Figura 10: Efeito da neutralização de IL-10 na produção de IFN- γ em indivíduos com infecção subclínica.....	53

IV. LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes com leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa e indivíduos com infecção subclínica.	33
---	----

V. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-IL-10	Anticorpo Monoclonal anti-IL-10
Anti-IFN-γ	Anticorpo Monoclonal anti-IFN- γ
Anti-IL-17	Anticorpo Monoclonal anti-IL-17
Anti-TNF-α	Anticorpo Monoclonal anti-TNF- α
Células Th1	Células T “helper” (auxiliadoras) do tipo 1
Células Th2	Células T “helper” (auxiliadoras) do tipo 2
IFN-α	Interferon alfa
IFN-γ	Interferon gama
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-27	Interleucina 27
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
SLA	Antígeno solúvel de <i>L. braziliensis</i> .
TCD4+	Células T apresentando a molécula CD4 na superfície
TCD8+	Células T apresentando a molécula CD8 na superfície
TGF-β	Fator de crescimento e transformação Beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Células T regulatórias
WSX-1^{-/-}	“Knockout” para o receptor WSX-1

SUMÁRIO

I. RESUMO.....	8
II. ABSTRACT.....	10
III. LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	12
IV. LISTA DE TABELAS.....	13
V. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar.....	17
1.2 Agentes etiológicos e transmissão.....	17
1.3 Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	18
1.4 Resposta Imune e Patogênese da Leishmaniose Tegumentar.....	19
1.5 Mecanismos imunológicos e lesão tecidual na leishmaniose.....	21
1.6 Modulação da Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar.....	22
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo Geral.....	25
2.2 Objetivos Específicos.....	25
3 JUSTIFICATIVA.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 Área de Estudo.....	27
4.2 Definição de casos.....	27
4.2.1 Leishmaniose Cutânea.....	27
4.2.2 Leishmaniose Mucosa.....	27
4.2.3 Infecção Subclínica por <i>L. Braziliensis</i>	27
4.2.4 Critérios de Inclusão.....	28
4.2.5 Critérios de Exclusão.....	28
4.2.6 Considerações Éticas.....	28
4.3 Cálculo do Tamanho da Amostra.....	29
4.4 Desenho e Métodos.....	29

4.4.1 Avaliação da Atividade Moduladora de IL-10, IL-27 e TGF- β	29
4.4.2 Avaliação do Efeito da neutralização de IFN- γ e TNF- α na produção de citocinas inflamatórias e IL-10.....	30
4.4.3 Avaliação do efeito combinado de dois moduladores.....	30
4.4.4 Avaliação do efeito modulador de IL-10 e IL-27 em Indivíduos com Infecção Subclínica.....	31
4.4.5 Reação da Polimerase em Cadeia Semi-quantitativa para detectar IL-10 e IL-27.....	31
4.5 Análise Estatística.....	32
5 RESULTADOS.....	33
6 DISCUSSÃO.....	54
7 SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	60
8 CONCLUSÃO.....	61
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
10 ANEXOS.....	74

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar

As leishmanioses são um grupo de doenças que afetam cerca de 12 milhões de pessoas no mundo com 2 milhões de novos casos por ano, sendo 1.5 milhão de leishmaniose tegumentar e 500 mil de leishmaniose visceral. Além disso, cerca de 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção com 70.000 mortes a cada ano (Reithinger et al. 2007). Nos últimos anos, a globalização econômica e o aumento do fluxo migratório estenderam a distribuição da doença para países desenvolvidos. A doença é considerada um grave problema de saúde pública, causando significativa morbidade e mortalidade.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) tem alta incidência no estado da Bahia, 22/100.000 habitantes, sendo distribuída em áreas agrícolas, associadas ao desmatamento. A doença afeta indivíduos jovens, produtivos e mesmo crianças que se expõem à infecção durante atividades agrícolas.

1.2 Agentes Etiológicos e Transmissão:

Os protozoários causadores da leishmaniose pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. Nas Américas são conhecidas atualmente 11 espécies de *Leishmania* dermatrópicas causadoras de doença em humanos. No Brasil, as principais espécies de *Leishmania* causadoras de LTA são: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania amazonensis* (Jones et al. 1987; Lainson e Shaw 1987). A *L. braziliensis* é o agente causal da leishmaniose cutânea e da leishmaniose mucosa na América Central e América do Sul. Na Bahia, principalmente em Corte de Pedra (região endêmica), esta também é a espécie predominante.

Todas as espécies de *Leishmania* são transmitidas ao homem por fêmeas infectadas do inseto da família Phlebotomidae e subfamília phlebotominae que inocula as formas promastigotas metacíclicas na pele durante o repasto sanguíneo. A *Leishmania* apresenta duas formas evolutivas em seu ciclo de

vida, a forma promastigota e a amastigota. Promastigotas são encontrados no inseto e podem ser classificadas como procíclicas, que se multiplicam no intestino, ou como metacíclicas infectantes, que são encontrados em partes da boca e do intestino anterior do inseto. Ao picar outro animal e eventualmente o homem, o inseto regurgita o material aspirado misturado com os parasitos e ocorre à inoculação das formas promastigotas metacíclicas infectantes, que são englobadas por células fagocíticas do hospedeiro (como os macrófagos) recrutadas ao sítio da infecção. Os parasitos internalizados se diferenciam em amastigotas no interior do fagolisossoma e se multiplicam por divisão binária. Quando a célula hospedeira está altamente parasitada há o rompimento da sua membrana e as amastigotas disseminam-se pelos tecidos infectando novos macrófagos, propagando assim a infecção (Killick-Kendrick e Molineux 1981; Killick-Kendrick 1981; Lainson *et al.* 1987).

1.3 Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A leishmaniose tegumentar pode apresentar uma diversidade de formas clínicas no homem incluindo leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose disseminada (LD) e leishmaniose cutânea difusa (LCD).

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum de apresentação da doença, caracterizada por uma lesão de pele benigna, que pode ser autocurável, sendo causada por diferentes espécies de *Leishmania*. (Carvalho *et al.* 1995). A lesão inicia-se habitualmente com uma área de vermelhidão e edema no sítio de inoculação pelo inseto e depois de 3 a 4 semanas desenvolve-se, na maioria dos casos, uma única úlcera com bordas elevadas, endurecida e eritematosa, onde os parasitos são encontrados, principalmente nas bordas da lesão (Marsden 1985; Marsden e Jones 1985). Em cerca de 3% dos pacientes com leishmaniose cutânea, os parasitos podem persistir na pele após resolução da úlcera levando o paciente para a forma mais grave da doença, a leishmaniose mucosa (LM). O principal agente causador desta doença é a *L. braziliensis*. As lesões são múltiplas, acima da cintura pélvica, são infiltradas, com ulcerações destrutivas nas mucosas do nariz, boca e faringe. Existem também casos raros de lesão mucosa em indivíduos sem histórico de lesão cutânea (Marsden 1986; Jones *et al.* 1987; Marsden 1994).

Alguns indivíduos residentes em áreas de transmissão de *L. braziliensis* apresentam o teste de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* positivo e não apresentam sinais de doença sendo considerados como tendo uma forma subclínica da doença (SC) (Follador *et al.* 2002).

1.4 Resposta Imune e Patogênese da Leishmaniose Tegumentar

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório e o controle da infecção é dependente da resposta imune mediada por células.

Em 1986, MOSMANN iniciou uma revolução experimental e conceitual na imunologia por dividir as células T CD4⁺ (T helper) em duas subpopulações (Th1 e Th2) baseadas na produção de citocinas (Mosmann *et al.* 1986; Mosmann e Coffman 1989). Em camundongos, na infecção por *Leishmania major* a resistência é dependente do desenvolvimento de um tipo de resposta imune Th1 que está associada com a produção de IFN- γ enquanto que susceptibilidade está associada com o desenvolvimento de resposta Th2 com produção de IL-4 e IL-5 (Heinzel *et al.* 1989; Heinzel *et al.* 1991).

Em humanos a resposta imune do tipo Th1 também tem importância no controle da infecção por *Leishmania*. Já está bem documentado que a produção de IFN- γ é importante para o controle da infecção por *Leishmania* por estimular a produção de oxidantes derivados dos macrófagos (Murray *et al.* 1983; Liew *et al.* 1991; Bogdan *et al.* 2000). A produção de derivados do oxigênio pelo macrófago tem sido identificada como crítica no controle da infecção por *Leishmania*. Um importante oxidante leishmanicida é o óxido nítrico (NO), que é gerado após ativação do macrófago pelo IFN- γ e TNF- α (Scott *et al.* 1983; Scott *et al.* 1988; Liew *et al.* 1990). Entretanto estes mecanismos microbicidas não são às vezes eficazes na destruição dos parasitos havendo progressão da infecção para a doença.

Na ausência da ativação de células Th1 a produção de IFN- γ é baixa ou ausente e os macrófagos perdem a capacidade de destruir leishmanias e formas como a leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea difusa são observadas (Carvalho *et al.* 1988; Bomfim *et al.* 1996). Todavia, nas formas cutânea e mucosa da leishmaniose tegumentar a despeito de existir uma

resposta imune protetora, os pacientes evoluem para a doença. Do ponto de vista histopatológico as lesões de LC e LM são caracterizadas por um processo inflamatório com linfócitos e plasmócitos e com raros ou até mesma ausência de parasitos (Bittencourt e Barral 1991). Na realidade, evidências têm sido acumuladas de que a resposta imune participa da lesão tecidual da leishmaniose tegumentar: 1) Os pacientes com LC e LM produzem níveis altos de IFN- γ e TNF- α , mas apesar de controlar a infecção, desenvolvem úlceras cutâneas e mucosas (Ribeiro-de-Jesus *et al.* 1998); 2) Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com LM e LC quando estimuladas com antígeno de *L. braziliensis in vitro* produzem pouco ou não produzem IL-10 e a adição exógena dessa citocina não regula a produção de IFN- γ e TNF- α nestes pacientes (Bacellar *et al.* 2002); 3) Embora IL-10 seja expressa em células da lesão de pacientes com LM e LC, em células da lesão mucosa há uma menor expressão do receptor de IL-10 do que células da lesão cutânea (Faria *et al.* 2005); 4) Os níveis de TNF- α e IFN- γ no soro e em sobrenadantes de culturas de células estimuladas com o antígeno de *Leishmania* diminuem significativamente após o tratamento (Da-Cruz *et al.* 1996; Ribeiro-de-Jesus *et al.* 1998).

Interleucina 17 (IL-17) é membro de uma relativamente nova família de citocinas, produzidas predominantemente por células Th17, e desempenha um importante papel em estimular fibroblastos, células endoteliais, neutrófilos, macrófagos e células epiteliais a produzir múltiplos mediadores inflamatórios, incluindo IL-1, IL-6, TNF- α , óxido nítrico sintase 2, metaloproteinases e quimiocinas (Kolls e Linden 2004). Tem sido bem documentado o papel protetor de IL-17 em infecções bacterianas, fúngicas e por protozoários (Matsuzaki e Umemura 2007). Células Th17 produzem IL-17, mas não IFN- γ ou IL-4. Ao mesmo tempo, o desenvolvimento de células Th17 é inibido por essas citocinas. (Harrington *et al.* 2005). IL-17 tem um papel importante no desenvolvimento de algumas doenças inflamatórias como encefalite auto-imune experimental (Langrish *et al.* 2005; Komiyama *et al.* 2006), doenças inflamatórias intestinais e artrite reumatóide (Sato *et al.* 2006; Yen *et al.* 2006). Mais recentemente, ênfase tem sido dada ao papel de IL-17 em induzir inflamação crônica e destruição tecidual (Kotake *et al.* 1999; Kurasawa *et al.*

2000). A produção de IL-17 é mantida pela IL-6, IL-23 e pelo fator de crescimento TGF- β (Mangan *et al.* 2006; Veldhoen *et al.* 2006). A IL-17 estimula a produção de TNF- α e também de outras substâncias envolvidas na resposta inflamatória e induz a secreção de metaloproteinases e NO (Kolls e Linden 2004; Lehmann *et al.* 2005), moléculas envolvidas em lesão tecidual.

Na leishmaniose tegumentar a produção de IL-17 está aumentada e esta citocina encontra-se presente na lesão causada por *L. braziliensis* (Bacellar *et al.* 2009; Boaventura *et al.* 2010).

Em contraste com estas formas clínicas de infecção causada por *L. braziliensis*, cerca de 10% dos indivíduos residentes em uma área de transmissão de *L. braziliensis*, a despeito da exposição a esse parasito, não apresentam evidências de doença clínica. Esses indivíduos apresentam reação de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* positiva (teste de Montenegro) e são considerados como tendo uma forma subclínica da doença (Follador *et al.* 2002). Linfócitos de indivíduos com a forma subclínica (SC) da infecção por *L. braziliensis* não produzem ou apresentam uma produção menor de IFN- γ e TNF- α quando comparados com pacientes com LC após estimulação *in vitro* com antígeno de *L. braziliensis*. Por outro lado, células de indivíduos com a forma subclínica produzem mais IL-5 que pacientes com leishmaniose cutânea (Follador *et al.* 2002). Até o momento não é claro porque os indivíduos com a forma subclínica da infecção por *L. braziliensis* tem a capacidade de controlar a doença.

1.5 Mecanismos imunológicos e lesão tecidual na leishmaniose

A destruição celular e tecidual que leva ao aparecimento da lesão é a responsável pela mais importante manifestação clínica na leishmaniose tegumentar que é a úlcera leishmaniótica. Vários estudos têm mostrado a importância da resposta inflamatória na destruição tecidual na leishmaniose tegumentar e a incapacidade de IL-10 modular esta resposta na leishmaniose mucosa. Por exemplo, existe uma associação entre produção de IFN- γ e TNF- α e tamanho da lesão assim como o aparecimento de formas mais graves da doença (Antonelli *et al.* 2005). O uso da pentoxifilina, um inibidor de TNF- α , associado ao antimonial -medicamento utilizado no tratamento convencional à

leishmaniose- cura pacientes com LC e LM que são refratários ao tratamento com antimonial (Lessa *et al.* 2001; Bafica *et al.* 2003) e acelera a cura de pacientes virgens de tratamento (Machado *et al.* 2007). Também tem sido identificada uma grande atividade de células citotóxicas em lesões de pacientes com LC (Machado *et al.* 2002; Faria *et al.* 2005; Faria *et al.* 2009).

1.6 Modulação da Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar

A modulação da resposta do tipo Th1 é feita principalmente por citocinas moduladoras como a IL-10 e o TGF- β e através de células regulatórias que expressam CD4, CD25, IL-10 e TGF- β (Belkaid *et al.* 2001; Sacks e Noben-Trauth 2002; Belkaid 2003). Em doenças infecciosas as células T regulatórias (Treg) têm mostrado ser importantes na manutenção do patógeno no hospedeiro e para minimizar a patologia (Belkaid *et al.* 2002; Montagnoli *et al.* 2002). .As células Treg estão presentes no sangue periférico e em lesões de pacientes com LC e são capazes de diminuir a proliferação de célula T CD4+CD25- alogênicas quando estimuladas com phitoemaglutinina (PHA), embora essa supressão tenha sido bastante variável entre os pacientes e em alguns pacientes essa atividade não foi observada (Campanelli *et al.* 2006).

Historicamente o papel modulador de IL-10 é bem conhecido. Esta citocina inibe a síntese de citocinas produzidas por macrófagos como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α (de Waal Malefyt *et al.* 1991; Oswald *et al.* 1992). IL-10 pode inibir a expressão de genes indutores de IFN- α e IFN- γ (Ito *et al.* 1999).

No modelo experimental de infecção por *Leishmania* um estudo avaliou os efeitos de IL-10 em camundongos susceptíveis BALB/c infectados com *L. major* e mostrou que a neutralização de IL-10 com anticorpo anti-IL-10 não altera o desenvolvimento das lesões. Na infecção crônica, quantidades semelhantes de IL-10 são produzidas tanto em linhagens resistentes quanto susceptíveis. Entretanto, no início da infecção, a produção de IL-10 é significativamente maior nos animais susceptíveis. Dessa forma, IL-10 não apresenta um papel importante na diferenciação de sub-classes de células T auxiliares na infecção por *L. major*, embora a alta produção de IL-10 no início da infecção e a inibição da produção de IFN- γ possam contribuir para o desenvolvimento de células Th2 (Chatelain *et al.* 1999).

Na leishmaniose visceral humana, onde há uma ausência ou diminuição da produção de IFN- γ , já foi documentado que neutralização de IL-10 restaura a produção dessa citocina (Carvalho *et al.* 1994).

TGF- β é outra citocina com atividade anti-inflamatória, com múltiplas ações sob as células da resposta imune, principalmente sob células T. TGF- β inibe proliferação de células através da inibição de IL-2, inibe ativação de macrófagos e produção de IFN- γ (Brabletz *et al.* 1993; Yoshimura *et al.* 2010). Ela também tem sido associada com a atividade das células Treg, através da indução de Foxp3 (Chen *et al.* 2003). Entretanto, TGF- β também tem sido identificado com um indutor de células T efectoras, como células Th17 (Korn *et al.* 2007).

Em modelos experimentais de infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, onde a proteção contra a doença está relacionada com a resposta Th1, o tratamento com TGF- β favorece a infecção (Barral *et al.* 1995). Em humanos, culturas de CMSP de indivíduos vacinados contra *Mycobacterium tuberculosis* que apresentam o teste de hipersensibilidade tardio positivo para PPD (*Purified protein derivative*) estimuladas com essa proteína *in vitro*, a adição de TGF- β resultou em uma supressão de 70% na produção de IFN- γ (Othieno *et al.* 1999).

Mais recentemente foi identificada uma citocina, a IL-27 e o seu receptor (WSX-1/gp130), que também está estruturalmente relacionada com a IL-12 (Pflanz *et al.* 2002). Entretanto, enquanto IL-12 tem um papel importante no desenvolvimento de células Th1, IL-27 modula tanto a resposta Th1 como Th2e Th17 (Villarino *et al.* 2003; Artis *et al.* 2004). Estudos com animais deficientes de WSX-1 demonstraram que esse receptor é importante para a indução de uma resposta Th1 e produção de IFN- γ . Em estudos em camundongos deficientes de WSX-1, infectados com *L. major* foi demonstrado uma supressão do desenvolvimento de células Th1 e da produção de IFN- γ , mas isso só foi observado na fase inicial da infecção (Yoshida *et al.* 2001). Também animais deficientes da sub-unidade EBI-3 da IL-27 quando foram infectados com *L. major* apresentaram uma supressão da resposta Th1, reforçando a importância da IL-27/WSX-1 na diferenciação de células Th1. Em contraste com os

achados que IL-27 é importante para o desenvolvimento de células Th1, outros estudos demonstram que IL-27 tem um papel regulatório na resposta imune. Por exemplo, camundongos deficientes do receptor WSX-1 infectados com *T. gondii* durante a primeira semana de infecção desenvolvem uma resposta de células TCD4+ e TCD8+ com produção normal de IFN- γ e essas respostas são suficientes para controlar a multiplicação do parasito. No entanto, duas semanas após infecção esses animais deficientes de WSX-1 desenvolvem uma doença inflamatória letal caracterizada por áreas de necrose no fígado, com produção elevada de IFN- γ assim como um aumento da proliferação e acúmulo de células TCD4+ e TCD8+ ativadas (Villarino *et al.* 2003). Similarmente, camundongos deficientes do receptor de IL-27 (WSX-1^{-/-}) infectados com *M. tuberculosis* tem uma baixa carga bacteriana quando comparados aos animais selvagens, desenvolvem uma patologia pulmonar mais grave e morrem em consequência da resposta imune (Pearl *et al.* 2004; Holscher *et al.* 2005). Do mesmo modo, IL-27 pode também estar envolvida na regulação da resposta imune na leishmaniose tegumentar.

Levando em conta os efeitos danosos que a imunidade não modulada parece causar em pacientes com leishmaniose tegumentar, a regulação da resposta imune pode ter um papel de destaque em eliminar o parasito e não permitir desenvolvimento de lesão tecidual.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o papel de citocinas regulatórias e inflamatórias na modulação da resposta imune na infecção por *L. braziliensis*.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar o papel de IL-10, IL-27 e TGF- β na modulação da resposta imune em pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa.

2.2.2 Avaliar os efeitos da neutralização de TNF- α e IFN- γ na resposta imune de pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa.

2.2.3 Avaliar o papel de IL-10 e IL-27 em indivíduos com infecção subclínica por *L. braziliensis*.

3. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose tegumentar americana representa um importante problema de saúde pública, devido às altas taxas de prevalência mundial e de difícil controle epidemiológico. No Brasil tem-se observado um elevado crescimento do número de casos de LTA, tanto devido à expansão geográfica da doença, como devido à ocorrência de surtos epidêmicos em todas as regiões. Na área endêmica de Corte de Pedra, no município de Tancredo Neves, Bahia, só no ano de 2010 foram registrados 1556 novos casos da doença.

Muito se avançou na compreensão da imunopatogênese da leishmaniose tegumentar humana causada por *L. braziliensis*, tendo como base aspectos relacionados à documentação que a forte resposta do tipo Th1 não modulada estaria associada à destruição tecidual observada nesta doença. Estudos avaliando a resposta imune à *Leishmania* têm mostrado relação entre a resposta exacerbada com produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias e o desenvolvimento de lesão tecidual. O uso de drogas moduladoras da resposta imune também confirmam as evidências que a resposta imune exagerada e não modulada está associada com a patogênese da doença.

Desse modo, destaca-se a importância de uma resposta modulada que seja capaz de conter o avanço do parasita mas que não resulte em lesão tecidual. Conhecendo alguns mecanismos reguladores da resposta Th1, pode-se analisar possíveis moduladores da resposta à infecção por *Leishmania*. Torna-se, então, relevante a avaliação da ação de IL-10 e TGF- β (citocinas conhecidas por sua atividade imunorreguladora) bem como de IL-27, citocina que pode desempenhar um papel duplo, ativando a resposta Th1 ou modulando essa resposta. Além disso, a neutralização de TNF- α e IFN- γ pode lançar luz sobre a ação que uma citocina inflamatória pode ter sobre a outra. Conhecer como esses fatores se comportam na leishmaniose tegumentar pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias para essa enfermidade.

4. DESENHO EXPERIMENTAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo: Os pacientes incluídos no estudo são residentes de Corte de Pedra, uma região endêmica para leishmaniose tegumentar, município de Tancredo Neves, localizada a 280 km a sudeste de Salvador, Bahia. Por volta de 1980 um posto de saúde foi estabelecido na vila de Corte de Pedra e desde então médicos do Serviço de Imunologia visitam a área a cada duas semanas. A partir de 2001 um médico radicado na região dá assistência a esta população, juntamente com médicos da Universidade Federal da Bahia. O Posto também conta com o apoio de 4 agentes de saúde treinados, todos lá residentes. Eles prestam assistência aos pacientes, visitam as famílias, e participam das atividades de pesquisa. Médicos da Universidade incluindo clínicos, imunologistas, dermatologistas e otorrinolaringologistas trabalham quinzenalmente no posto de saúde. O posto tem se tornado um centro de referência para o diagnóstico e tratamento da leishmaniose tegumentar em 12 municípios que estão dentro de uma área de 35 km do posto de saúde.

4.2. Definição de casos:

4.2.1. Leishmaniose Cutânea (LC): é definida como a presença de uma lesão ulcerada na pele, sem evidência de envolvimento da mucosa. O diagnóstico é realizado pela detecção do parasito através da cultura do aspirado da lesão, da histopatologia ou pelo achado da lesão típica e por dois dos seguintes testes: teste positivo de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* (Reação de Montenegro), e histopatologia compatível com leishmaniose tegumentar.

4.2.2. Leishmaniose Mucosa (LM): é definida pela presença de uma lesão mucosa metastática, localizada mais frequentemente no septo nasal ou estendida para o palato, faringe e orofaringe. Quase todos os pacientes com LM tiveram a doença cutânea. Por definição, as lesões mucosas não são contíguas com a lesão cutânea primária. O diagnóstico é realizado pelos mesmos métodos utilizados para LC.

4.2.3. Infecção Subclínica por *L. braziliensis* (SC): Indivíduos residentes na área endêmica sem história atual ou passada de leishmaniose, com teste positivo de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania*.

4.2.4 Critérios de Inclusão: Pacientes com LC, LM e infecção subclínica de *L. braziliensis* foram selecionados baseados nos critérios de definição de caso estabelecidos nos itens acima. Pacientes com LC e LM apresentaram duração da doença não superior a 60 dias e eram virgens de tratamento para leishmaniose. Pacientes com LC tinham no máximo 3 lesões cutâneas. Todos os pacientes diagnosticados com leishmaniose tegumentar, independente de participarem do estudo são tratados com antimonial pentavalente, o tratamento padrão recomendado pela Organização Mundial de Saúde e pelo Ministério da Saúde. Os pacientes recebem N-metil-Antimonial Meglumine em uma dose de 20mg/kg de peso administrado intravenosamente diariamente por 20 dias para LC e 30 dias para LM. Apesar da duração da participação na pesquisa (de 20 dias para o paciente com LC e 30 dias para o paciente com LM) coincidir com o período de tratamento, todos os pacientes foram acompanhados até a cura da doença. Os indivíduos com infecção subclínica são identificados durante as visitas aos domicílios pelo médico residente na área e por um dos assistentes de saúde que fazem busca ativa da doença entre os familiares dos pacientes com LC e LM. Nesses casos além da informação clínica é realizada a Reação de Montenegro para saber se houve contato com a *Leishmania*. Os indivíduos com reação de Montenegro positiva e que não apresentam a doença são então convidados a participar do estudo. Todos os participantes desse estudo foram voluntários que consentiram em participar dos estudos. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) explicando nossa proposta e procedimento foi lido pelo participante ou por um dos médicos da equipe na presença de uma testemunha, e assinado pelo paciente. Menores com idade entre 15 e 18 anos, assinaram TCLE para menores.

4.2.5. Critérios de Exclusão: Crianças com idade inferior a 15 anos e gestantes não participaram do estudo considerando a necessidade da retirada de 30ml de sangue para realização dos estudos da resposta imune e outras interferências imunológicas.

4.2.6 Considerações Éticas: Este estudo foi submetido e Aprovado pelo comitê de ética através do Parecer/Resolução 61/2007 do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/MCO/UFBA – Maternidade Climério de Oliveira.

4.3. Cálculo do Tamanho da Amostra:

O tamanho da amostra foi baseado nos dados já publicados da supressão da produção de IFN- γ por IL-10 em CMSP de controles sadios estimuladas com PPD que foi de 86% comparado com 48% observado em CMSP de pacientes com LC estimulados com SLA. ($p < 0.05$). Como na área endêmica o número de casos de pacientes com LM é menor do que os casos de LC, nós propomos para cada 1 paciente com LM, avaliar 2 ou mais pacientes com LC. Ao final do estudo foram avaliados 40 pacientes com LC e 18 com LM. Foram avaliados também 13 pacientes com a forma subclínica da leishmaniose. Esse foi o número total de pacientes incluídos, mas nem todos foram avaliados para todos os objetivos. Criamos grupos com número amostral diferente para cada objetivo, considerando que esse número deveria obedecer aos critérios determinados para o tamanho amostral. Com esses números de pacientes nosso poder de estudo foi de 80% com erro alfa de 0,05.

4.4. Avaliação da Resposta Imune:

Para todos os experimentos foram coletados 30ml de sangue venoso dos pacientes incluídos no estudo. A partir daí, as células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram separadas por meio de gradiente de centrifugação utilizando Ficoll-Hypaque. As células foram colocadas em cultura em meio completo RPMI 1640 (Life Technologies GibcoBRL, Grand Island, NY, USA), 10% soro AB humano (Sigma, St. Louis, MO, USA), com gentamicina, e HEPES. Um total de 3×10^6 células/mL foram colocados em cultura em placa de 24 poços (Falcon; Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA). As células foram estimuladas ou não com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) na concentração de 5 μ g/mL na presença ou não de citocinas ou antagonistas de citocinas. Foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 72 horas (para determinações de IL-17 as culturas foram incubadas por 96 horas).

4.4.1 Avaliação da atividade moduladora de IL-10, IL-27 e TGF- β

Para determinar a capacidade das diversas citocinas de modular a resposta imune, foi adicionada nas culturas estimuladas com SLA, IL-10 (10ng/ml), TGF-

β (10ng/ml) e IL-27 recombinantes (100ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Para IL-27 foi realizada uma curva dose resposta baseada em estudos anteriores. (Murugaiyan *et al.* 2009). As concentrações de IL-10 e TGF- β utilizados no presente estudo foram adotadas de acordo com outros estudos já realizados anteriormente (Bacellar *et al.* 2002).

4.4.2 Avaliação do efeito da neutralização de IFN- γ e TNF- α na produção de citocinas:

Para avaliar o efeito que a neutralização de IFN- γ exerce sobre a produção de TNF- α e IL10, foram adicionados 100 μ g/mL de anti-human IFN- γ (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) às culturas de CMSP estimuladas com SLA. Para avaliar o efeito que a neutralização de TNF- α tem na produção de IFN- γ e IL-10 foi adicionado anti-human TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) na concentração de 20 μ g/mL nas culturas de CMSP estimuladas com SLA.

As culturas de células foram incubadas a uma temperatura de 37°C com 5% CO₂ por 72 horas. A produção de IFN- γ , TNF- α , IL-10 foi determinada em sobrenadantes das culturas de células usando o método imunoenzimático de ELISA sandwich (BD Bioscience Pharmingen, San Jose, CA, USA). Os resultados foram expressos em pg/mL.

Nos ensaios de neutralização foi utilizado um isotipo controle (IgG inespecífica) na concentração de 100 μ g/mL. O objetivo desse experimento controle foi assegurar-se que a ação avaliada era proveniente da neutralização das citocinas inflamatórias e não devido à presença de uma imunoglobulina. O procedimento do experimento controle foi o mesmo para a avaliação do efeito da neutralização das citocinas descritas acima.

4.4.3 Produção de citocinas em indivíduos com infecção subclínica

O procedimento para separação e cultura de células de indivíduos subclínicos foi o mesmo adotado para os pacientes com LC e LM. As culturas de células foram incubadas a uma temperatura de 37°C com 5% CO₂ por 72 horas (e 96 horas para os casos de determinação da produção de IL-17). A produção de

IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-17 foram determinadas em sobrenadantes das culturas de células usando o método imunoenzimático de ELISA sandwich (BD Bioscience Pharmingen, San Jose, CA, USA). Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.4.4 Avaliação do papel de IL-10 e IL-27 na infecção SC por *L.braziliensis*

Em indivíduos com infecção SC foi avaliado o efeito da adição de IL-27 e da neutralização de IL-10 na produção de IFN- γ . Para determinar se a neutralização de IL-10 altera a produção de IFN- γ em SC foram adicionados 100ng/mL de anticorpo monoclonal anti-IL-10 (BD Bioscience Pharmigen USA) em culturas estimuladas com SLA. Para avaliar o efeito modulador de IL-27 na produção de IFN- γ , rIL-27 (100ng/mL) foi adicionado as culturas estimuladas com SLA.

Após 72 horas de incubação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para posterior dosagem de citocinas. As determinações das concentrações de citocinas foram realizadas pelo método imunoenzimático (ELISA) usando reagentes disponíveis comercialmente.

4.4.5 Reação da Polimerase em Cadeia Semi-quantitativa para detectar IL-10 e IL-27

Isolamento de RNA total a partir de CMSP *ex vivo* e após 12 horas de cultura com SLA foi realizado utilizando Tri Reagent®Soln. (Ambion, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). DNA complementar (cDNA) foi sintetizado usando 1 μ g do RNA total e transcriptase reversa. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizado em um volume final de 50 μ L contendo 2.0 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's mix (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 10x tampão PCR, 2.5 U de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), e primers específicos de 25-50 pmoles usando o Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA). O processo envolveu 30 ciclos de 1 minuto a 95°C para desnaturação, 1 minuto a 60°C para religação e extensão de 1 minuto e 30 segundos a 72°C e adicional ao passo de extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação do PCR foram visualizados em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de etídio 0,2% (SIGMA, St. Louis, USA).

A intensidade das bandas foram calculadas usando o programa Vision WorksLS Analysis Software (UVP, Upland, CA, USA). Os resultados foram expressos em Unidades Relativas (R.U). corrigidas para expressão de HPRT. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Mann-Withney.

4.5. Análise Estatística:

Para comparação das médias obtidas da produção de citocinas entre os pacientes com LM, LC e indivíduos com infecção subclínica, utilizamos o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para a análise da capacidade das citocinas modular a resposta imune foi utilizado o teste pareado de Wilcoxon, através do programa GraphPad Prism3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Um erro α de 5% ($p= 0.05$) foi considerado para significância estatística.

5. RESULTADOS

Aspectos epidemiológicos e clínicos da população estudada

Foram avaliados pacientes com leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa e indivíduos com infecção subclínica residentes em Corte de Pedra, região endêmica para leishmaniose tegumentar. Os dados epidemiológicos e clínicos da população estudada estão resumidos na Tabela 1.

TABELA 1: Aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes com leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa e indivíduos com infecção subclínica.

	Leishmaniose Cutânea (n=40)	Leishmaniose Mucosa (n=18)	Subclínicos (n=13)	Valor de P
Idade (anos)	31,4±13,7	38,3±15,3	28,2±12,2	<0,05
Gênero (% masculino)	29 (72,5%)	9 (50%)	6 (46%)	<0,05
Tempo de doença (dias)	39,8±20,3	66,2±34,0		<0,05
Reação de Montenegro (média mm)	17x16	19x17	16x13	<0,05

IL-10 e TGF- β modulam a produção de TNF- α e IL-17 por células de pacientes com leishmaniose tegumentar:

Como demonstrado anteriormente, IL-10 não modula a produção de IFN- γ em pacientes com LM (Bacellar *et al.* 2002) e a produção de IL-17 também está aumentada em pacientes com LC e LM (Bacellar *et al.* 2009). A capacidade de IL-10 de modular a produção de TNF- α e IL-17 é demonstrada na Figura 1. Como observado anteriormente em relação à produção de IFN- γ , IL-10 modula a produção de TNF- α apenas em pacientes com LC, mas não apresenta o mesmo efeito em pacientes com LM. (Figura 1A). Em pacientes com LC a produção de TNF- α apresentou mediana de 1893pg/mL (0-7440pg/mL) estimuladas apenas com SLA e a adição de IL-10 resultou em uma mediana de 280 pg/mL (0-6280 pg/mL), 85% de supressão, $P < 0,0005$. Em células de pacientes com LM estimuladas com SLA a concentração de TNF- α foi 1790pg/mL (892–9173pg/mL) enquanto que a concentração na cultura com adição de IL-10 foi 1715pg/mL (320-2526 pg/mL) ($P > 0,05$). IL-10 também apresentou um efeito inibitório na produção de IL-17 (Figura 1B). Em cultura de células de pacientes com LC estimuladas com SLA a produção de IL-17 foi de 28pg/mL (0-680pg/mL) e de 0 pg/ml (0-178pg/mL) em cultura de células estimuladas com SLA após adição de IL-10. ($P < 0,05$). Em pacientes com LM IL-10 também diminuiu a produção dessa citocina de 58pg/mL (0-141pg/mL) em cultura com SLA para 23pg/mL (4-129pg/mL) em cultura com SLA+IL-10, 60% de supressão ($P < 0,05$).

Figura 1

Figura 1A

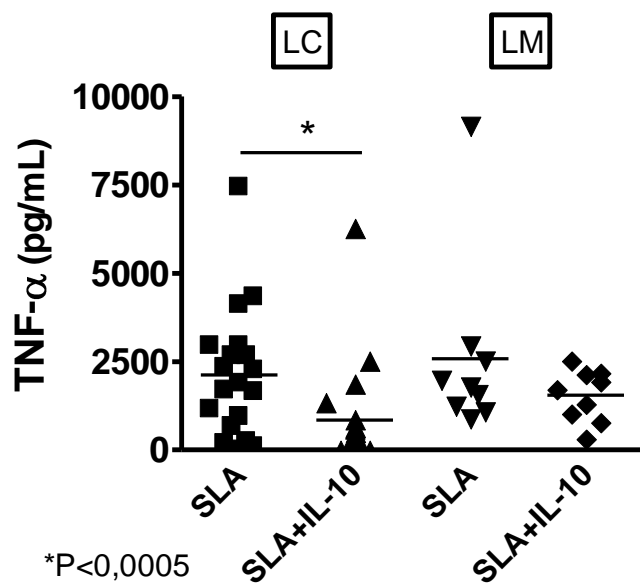


Figura 1B

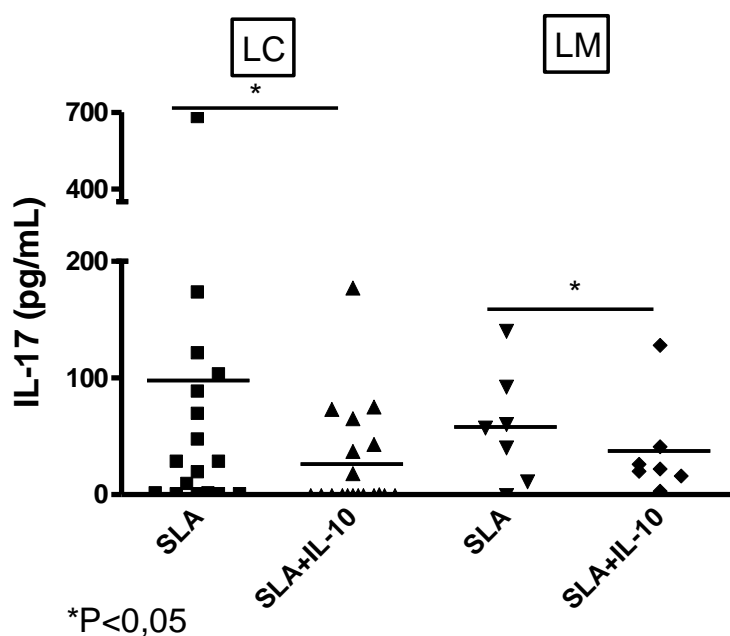


Figura 1: Atividade moduladora de IL-10 na produção de TNF- α e IL-17 em pacientes com LC e LM. CMSP de pacientes com LC (N=19) e LM (N=9) foram estimuladas com SLA (5 μ g/mL) na presença ou não de IL-10 (10ng/ml). A produção de TNF- α (A) e IL-17 (B) foi avaliada através de ensaio imunoenzimático (ELISA) e as concentrações expressas em pg/mL. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Wilcoxon.

A atividade moduladora de TGF- β na produção de TNF- α e IL-17 também foi avaliada. TGF- β diminuiu a produção de TNF- α de 1320pg/mL (15-7440pg/mL) para 367pg/mL (0-7100pg/mL) em LC, 72% de supressão, ($P < 0.0005$) e de 2080pg/mL (110-9173pg/mL) para 117pg/mL (0-8127pg/mL) em LM, 94% de supressão, ($P < 0.05$) (Figura 2A). Em relação à produção de IL-17, a adição de TGF- β na cultura de células diminuiu a produção de IL-17 de 36pg/mL (1-680pg/mL) para 15pg/mL (0-382pg/ml) em LC, 58% de supressão, ($P < 0,005$), mas não apresentou efeito modulador em pacientes com LM (de 173pg/mL (93-305pg/mL) para 48 (0-263pg/mL) (Figura 2B) ($P > 0,05$).

Figura 2

Figura 2A

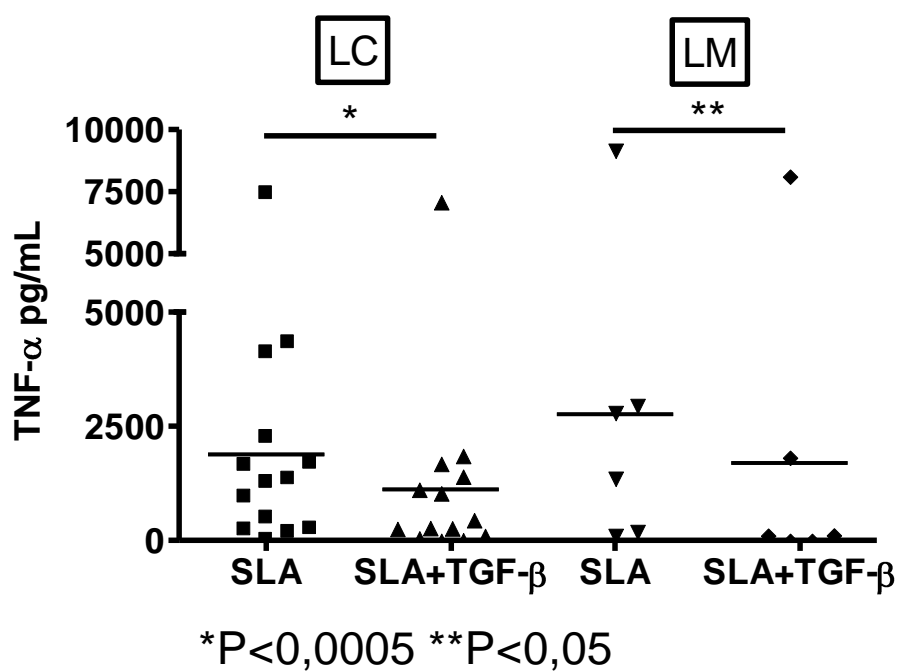


Figura 2B

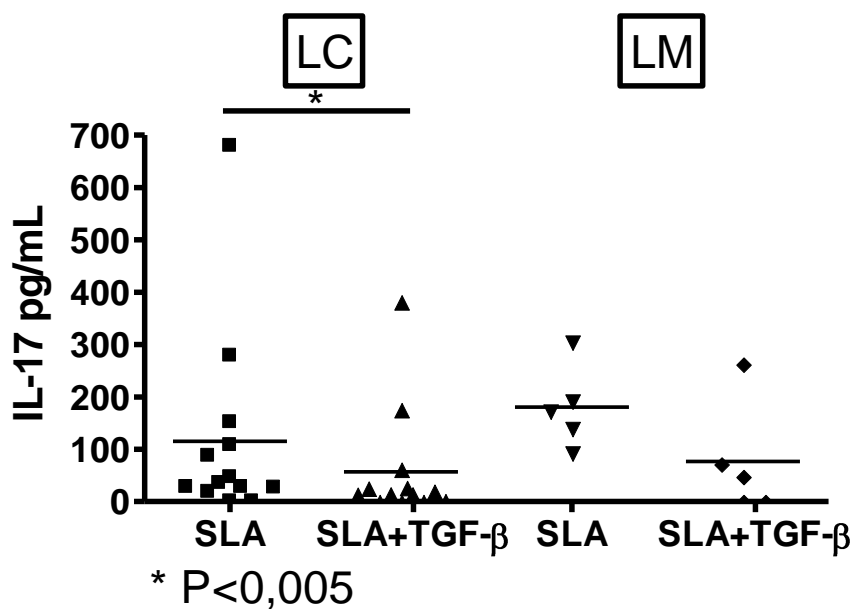


Figura 2: Avaliação da ação moduladora de TGF- β na produção de TNF- α e IL-17 em pacientes com LC e LM. CMSP de pacientes com LC (N=14) e LM (N=6) foram estimuladas com SLA (5 μ g/mL) na presença ou não de TGF- β (10ng/ml). A produção de TNF- α (A) e IL-17 (B) foi mensurada por ensaio imunoenzimático (ELISA) e as concentrações expressas em pg/mL. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Wilcoxon.

IL- 27 não suprime a produção de citocinas inflamatórias por células de pacientes com leishmaniose tegumentar:

Além de seu papel em estimular uma resposta imune do tipo Th1, IL-27 tem sido descrita como uma citocina moduladora da resposta inflamatória (Villarino *et al.* 2003; Artis *et al.* 2004). Entretanto, no presente estudo IL-27 não apresentou atividade supressora na produção de IFN- γ (Figura 3). A produção de IFN- γ em pacientes com LC foi de 2203pg/mL (105-12560pg/mL) quando o estímulo foi apenas SLA e de 2670pg/mL (0-9150pg/mL) quando IL-27 foi adicionado à cultura ($P>0,05$). (Figura 3A). IL-27 também falhou em modular a produção desta citocina em pacientes com LM [2370pg/mL (0-24880pg/mL) estimuladas com SLA e 1785pg/mL (65-13106pg/mL) quando estimuladas com SLA na presença de IL-27) ($P>0,05$)]. A adição de IL-27 também não apresentou efeito modulador na produção de TNF- α em pacientes com LC [1893 pg/mL (0-7440pg/mL) em culturas estimuladas com SLA e 1833pg/mL (46-7420pg/mL) em culturas estimuladas com SLA na presença de IL-27], nem em pacientes com LM [1699 pg/mL (892-9173pg/mL) em culturas estimuladas com SLA e 1317pg/mL (487-9942pg/mL) em culturas estimuladas com SLA na presença de IL-27]. (Figura 3B). IL-27 também não apresentou efeito modulador na produção de IL-17 em pacientes com LC [28 pg/mL (0-680pg/mL) em culturas estimuladas com SLA e 42pg/mL (0-700pg/mL) em culturas estimuladas com SLA na presença de IL-27] e com LM [77pg/mL (0-305pg/mL) em culturas estimuladas com SLA e 83,5pg/mL (0-709pg/mL) em culturas estimuladas com SLA na presença de IL-27].

Figura 3

Figura 3A

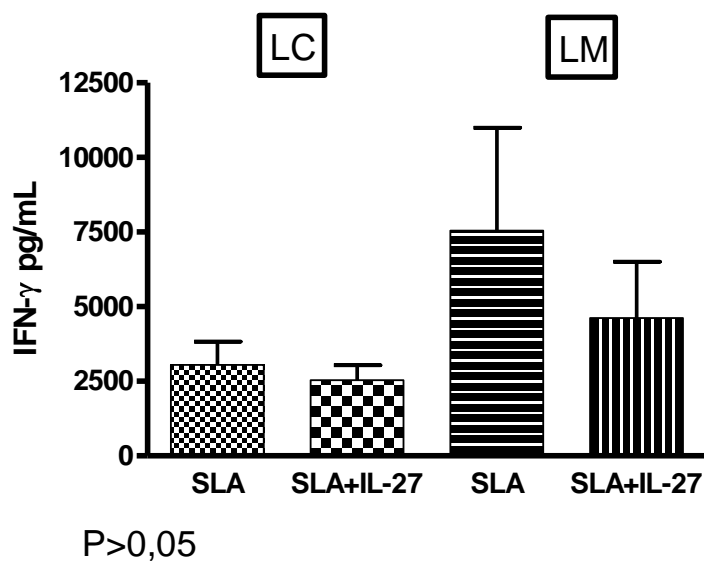


Figura 3B

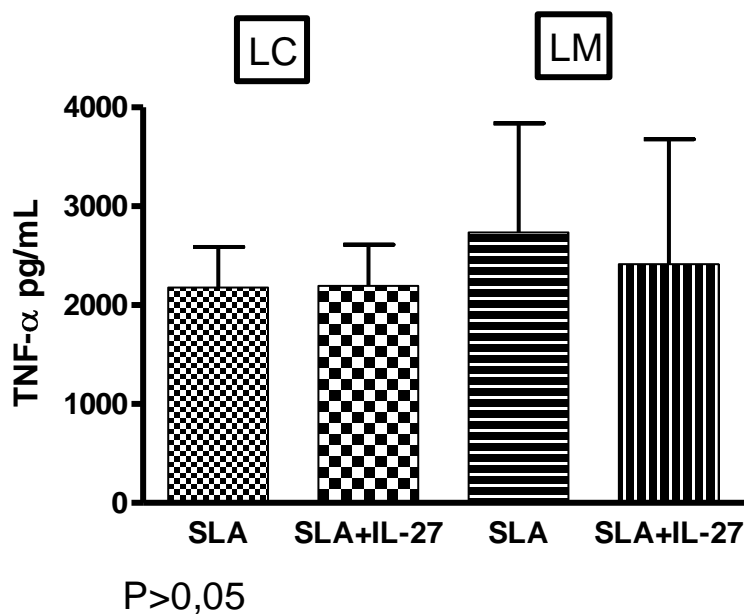


Figura 3: Efeito da atividade moduladora de IL-27 em pacientes com LC (N=19) e LM (N=7). CMSP foram estimuladas com SLA (5ug/ml) na presença ou não de IL-27 (100ng/ml). A produção de IFN- γ (A) e TNF- α (B) foram mensuradas por ensaio imunoenzimático (ELISA) e as concentrações são apresentadas em pg/mL. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Wilcoxon.

Como parte de seu papel regulatório da resposta imune, IL-27 foi apontada como indutora da produção de IL-10 por células TCD4⁺ humanas (Murugaiyan *et al.* 2009). Nesse estudo, células de pacientes com LC e LM estimuladas com SLA na presença de IL-27 produziram mais IL-10 quando comparadas com células estimuladas apenas com SLA (Figura 4). Em pacientes com LC a produção aumentou de 84pg/mL (2-925pg/M) para 98pg/mL (10-864pg/mL) e em pacientes com LM aumentou de 43pg/mL (8-184pg/mL) para 77pg/mL(32-308pg/mL). Essa diferença, porém, não apresentou significância estatística.

Figura 4

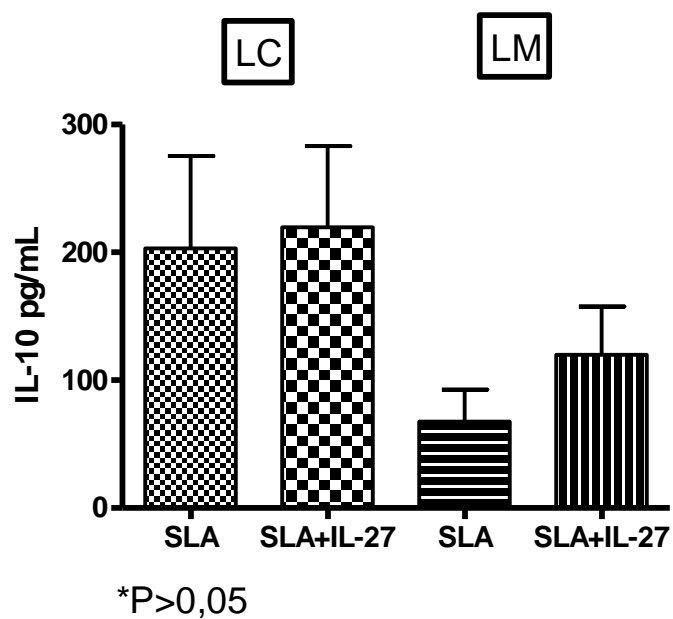


Figura 4: Indução de IL-10 por IL-27 em pacientes com LC (N=15) e LM (N=7). PBMC foram estimuladas com SLA (5ug/ml) na presença ou não de IL-27 (100ng/mL). A produção de IL-10 foi mensurada por ensaio imunoenzimático (ELISA) e as concentrações são apresentadas em pg/mL. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Wilcoxon.

Neutralização de TNF- α inibe a produção de IFN- γ e não induz a produção de IL-10:

Alguns estudos já demonstraram que macrófagos contribuem para a produção de TNF- α na leishmaniose tegumentar humana (Bacellar *et al.* 2002; Giudice *et al.* 2012). Como TNF- α é produzida por macrófagos durante a resposta imune inata, essa produção inicial pode contribuir na produção exagerada de IFN- γ pelas células T CD4⁺. Estimulamos células de pacientes com LC e LM com SLA na presença ou não de mAb anti-TNF- α . A produção de IFN- γ é mostrada na Figura 5. A neutralização de TNF- α diminui a produção de IFN- γ de 2820 pg/ml (1120-10280 pg/ml) para 2440 pg/ml (250-9050 pg/ml) em pacientes com LC, $p < 0.005$ e de 5687pg/ml (1040-17160 pg/ml) para 3255 pg/ml (80-13420 pg/ml) em pacientes com LM, $p < 0.05$. Por outro lado, a neutralização de TNF- α não interferiu na produção de IL-10. A produção de IL-10 por células de pacientes com LC após estímulo com SLA foi de 153 pg/mL (31-925 pg/mL) e após neutralização de TNF- α foi de 173 pg/mL (18-625 pg/mL) $P > 0,05$. Em LM a produção dessa citocina em culturas estimuladas com SLA foi de 184 pg/mL (37-265 pg/mL) e 86 pg/mL (34-603 pg/mL) após a neutralização de TNF- α ($P > 0,05$).

Figura 5

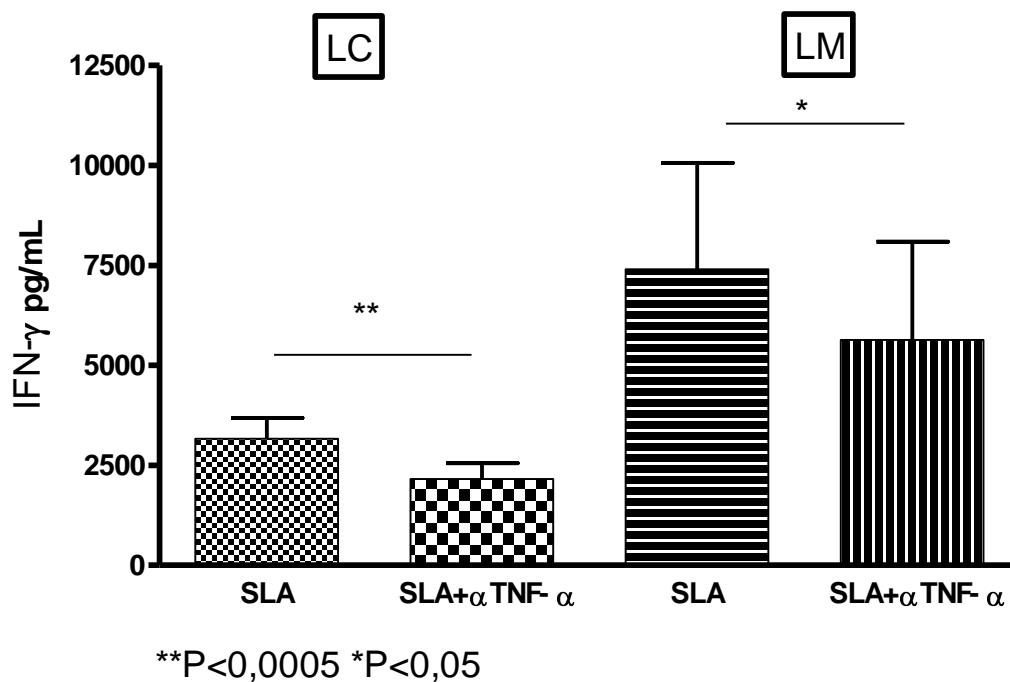


Figura 5: Efeito da neutralização de TNF- α na produção de IFN- γ em pacientes com LC (N=15) e LM (N=6). CMSP foram estimuladas com SLA (5 μ g/ml) em presença e ausência de anticorpo anti-TNF- α (20 μ g/ml). As determinações foram realizadas por método imunoenzimático (ELISA) e as concentrações são dadas em pg/mL. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Wilcoxon.

Para assegurar que os resultados obtidos foram devidos especificamente à neutralização de TNF- α e não devido à presença de um anticorpo, foi realizado um experimento controle com uma IgG inespecífica. A análise estatística não revelou diferença significativa na presença ou ausência da imunoglobulina, sendo a produção de IFN- γ de 3433pg/mL (1864-11943pg/mL) quando o estímulo foi apenas SLA e de 2455pg/mL (1792-4476pg/mL) na presença de SLA e IgG inespecífica.

Neutralização de IFN- γ inibe a produção de TNF- α e induz a produção de IL-10:

Como a produção exagerada de IFN- γ poderia também estar envolvida na alta produção de TNF- α , nós investigamos o efeito da neutralização de IFN- γ na produção de TNF- α por células de pacientes com LTA. A neutralização de IFN- γ diminuiu a produção de TNF- α em LC e LM (Figura 6). Em cultura de células de pacientes com LC a produção de TNF- α foi de 802 pg/mL (0-9173pg/mL) quando estimulada apenas com SLA e de 494pg/mL (0-2210pg/mL) após neutralização de IFN- γ , $P < 0.05$. Nos pacientes com LM a produção de TNF- α foi 2800pg/mL (110-9173pg/mL) em culturas estimuladas com SLA e a adição de anti-IFN- γ resultou em 401pg/mL (100-2309pg/mL), $P < 0,05$.

Figura 6

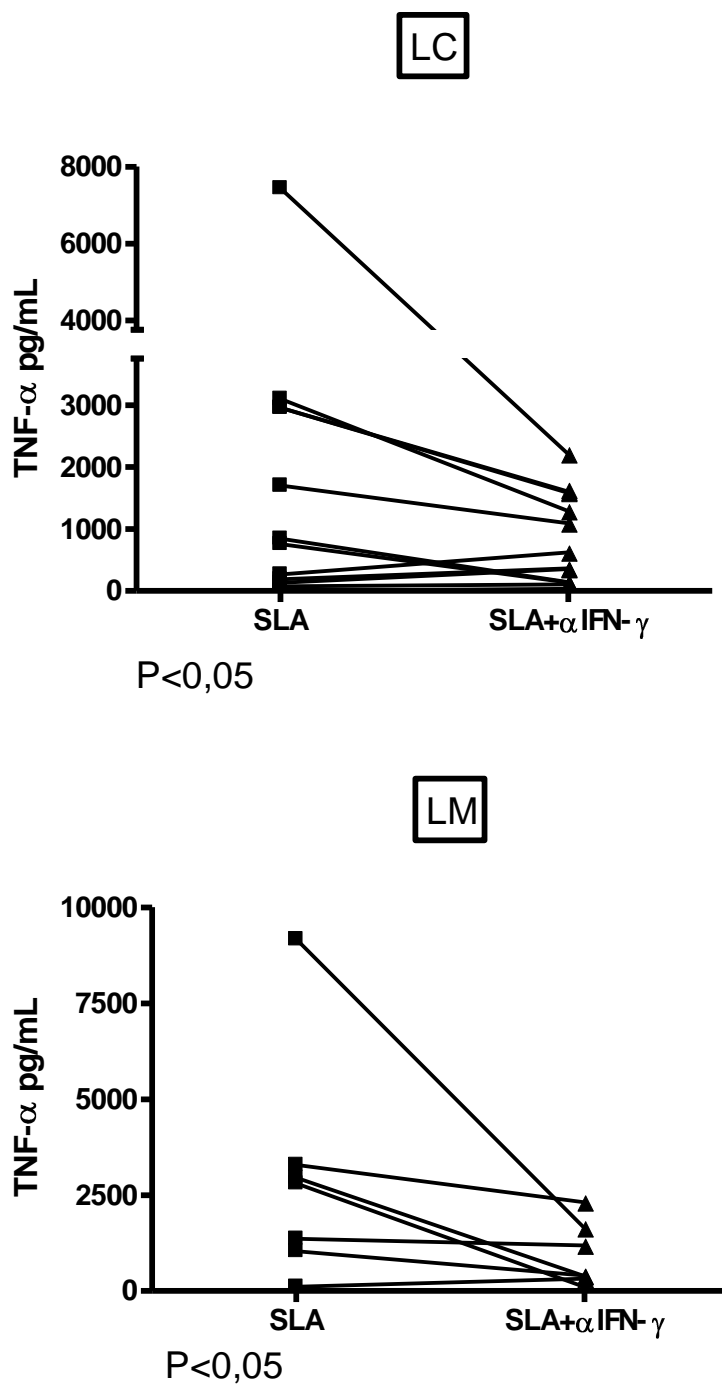


Figura 6: Avaliação do efeito da neutralização de IFN- γ na produção de TNF- α em pacientes com LC (N=14) e LM (N=7). CMSP foram estimuladas com SLA (5 μ g/mL) em presença e ausência de anticorpo anti-IFN- γ (100 μ g/mL). As determinações foram realizadas pelo método de ELISA e as concentrações são dadas em pg/mL. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Wilcoxon.

A neutralização de IFN- γ também aumentou a produção de IL-10 por células de pacientes com LM e LC. Em pacientes com LC a produção de IL-10 foi de 107pg/mL (31-925pg/mL) quando o estímulo foi SLA e 1001pg/mL (51-1365pg/mL) após a neutralização de IFN- γ . Em LM a produção foi de 92,5pg/mL (12-265pg/mL) quando estimuladas com SLA e 671pg/mL (51-886pg/mL) após a neutralização de IFN- γ ($P < 0.005$ e $P < 0.05$, respectivamente) (Figura 7).

Figura 7

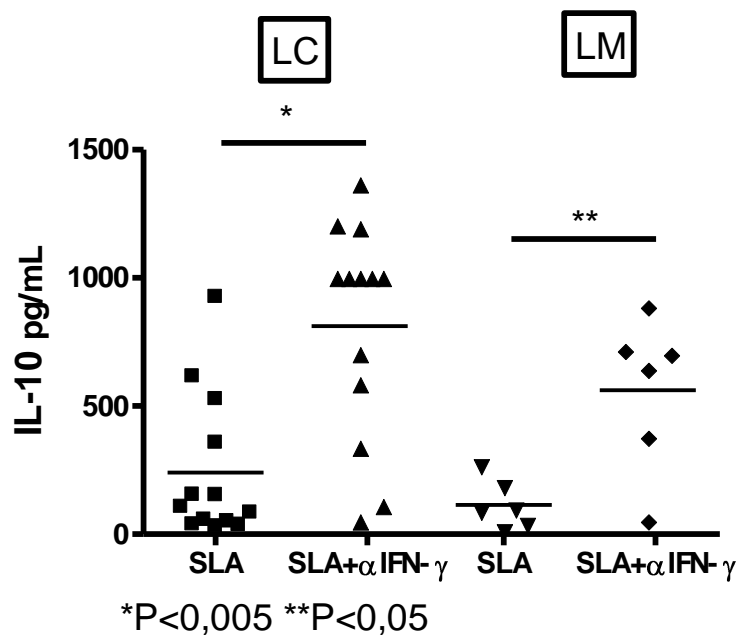


Figura 7: Efeito da neutralização de IFN- γ na produção de IL-10 em pacientes com LC (N=13) e LM (N=7). CMSP foram estimuladas com SLA (5 μ g/mL) em presença e ausência de anticorpo anti-IFN- γ (100 μ g/mL). As determinações foram realizadas pelo método de ELISA e as concentrações são dadas em pg/mL. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Wilcoxon.

Também foi realizado o experimento controle para a confirmação do efeito da neutralização de IFN- γ . Assim como no caso da neutralização de TNF- α , foi utilizada uma IgG inespecífica para comprovar que os resultados obtidos não foram devidos a presença de uma imunoglobulina mas sim devido, especificamente, ao efeito da neutralização de IFN- γ . Não houve diferença significativa na produção de TNF- α na presença da IgG, 387pg/mL (0-1268pg/mL), ou ausência, 104pg/mL (0-845pg/mL), P>0,05.

Resultados objetivo 3

Avaliar a modulação da resposta imune em indivíduos com infecção subclínica por IL-10 e IL-27.

Produção de citocinas em indivíduos com infecção sub-clínica:

A Figura 8 apresenta a produção de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-17 em 13 indivíduos com infecção sub-clínica. A produção de IFN- γ e de TNF- α foi menor nos indivíduos SC quando comparada com a produção observada nos pacientes com LC, confirmando dados anteriores (Follador *et al.* 2002). Entretanto, a produção de IL-17 foi maior nos indivíduos SC, 26pg/mL(0-278pg/mL), quando comparada com a produção observada nos pacientes com LC, 0 (0-144pg/mL), embora sem significância estatística. Em relação à produção de IL-10 não houve diferença estatística entre indivíduos com infecção subclínica (9pg/mL, 0-461pg/mL) e pacientes com LC (0pg/mL, 0-75pg/mL), P=0,6.

Figura 8

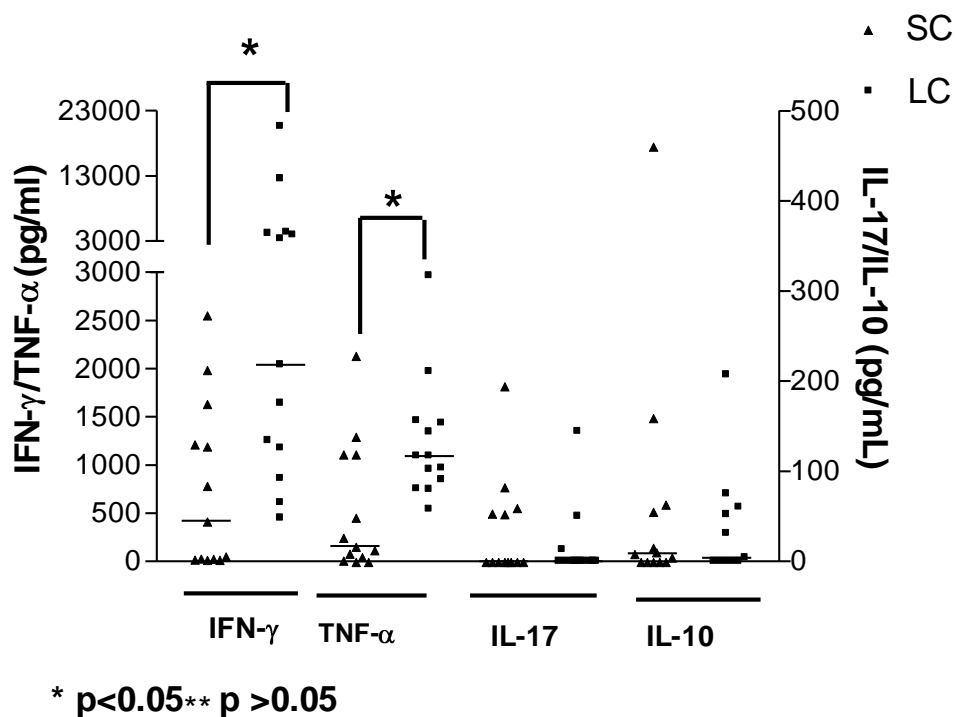


Figura 8: Produção de citocinas em indivíduos com infecção subclínica e em pacientes com leishmaniose cutânea. CMSP foram estimuladas com SLA (5 μ g/ml) por 72 horas (96 horas para IL-17). As determinações foram realizadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) e as concentrações são dadas em pg/mL. Para análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney. * $P < 0,05$ ** $P > 0,05$

Avaliação da produção de IL-10 e IL-27 na infecção subclínica por *L. braziliensis*

Como os indivíduos com infecção SC produzem menos IFN- γ e TNF- α do que os pacientes com LC e controlam a infecção, foi avaliado se esses indivíduos tinham uma resposta imune mais modulada do que os pacientes com LC.

Como a produção de IL-27 não foi detectada nos sobrenadantes de cultura, e a produção de IL-10 foi semelhante nos 2 grupos, a expressão destas citocinas foi avaliada através de PCR.

A Figura 9 apresenta a expressão de RNAm para IL-10 (A) e de IL-27 (B) em células de indivíduos SC e de pacientes com LC. A expressão de IL-10 em indivíduos com infecção subclínica foi similar à expressão observada em pacientes com leishmaniose cutânea. Entretanto a expressão de IL-27 foi significativamente maior em pacientes com LC, 36 (19-122) em experimento *ex vivo* e de 44 (7-212) na presença de SLA, quando comparada com a expressão observada nos indivíduos SC 17,5 (1-66) em experimento *ex vivo* e 34 (16-94) na presença de SLA, $p < 0,05$.

Figuras 9

Figura 9A

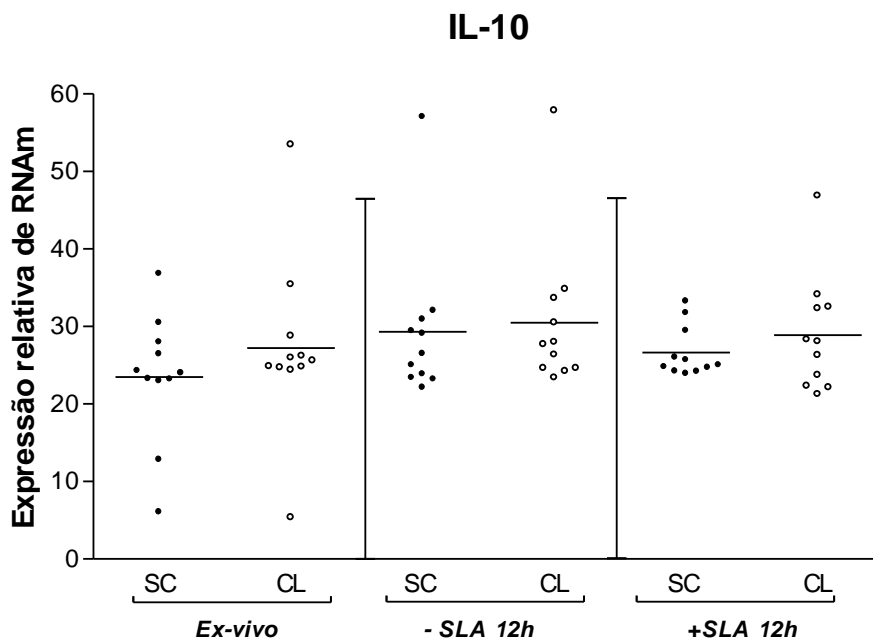


Figura 9B

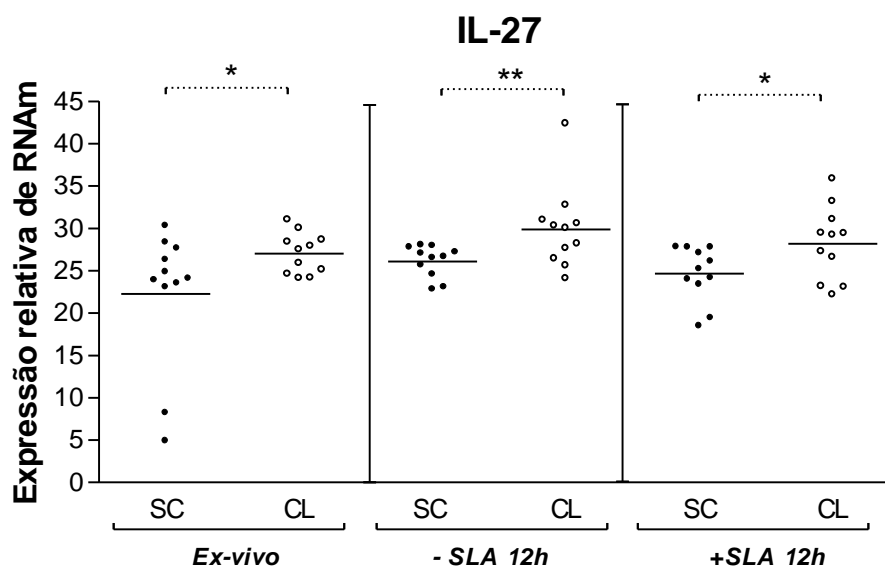


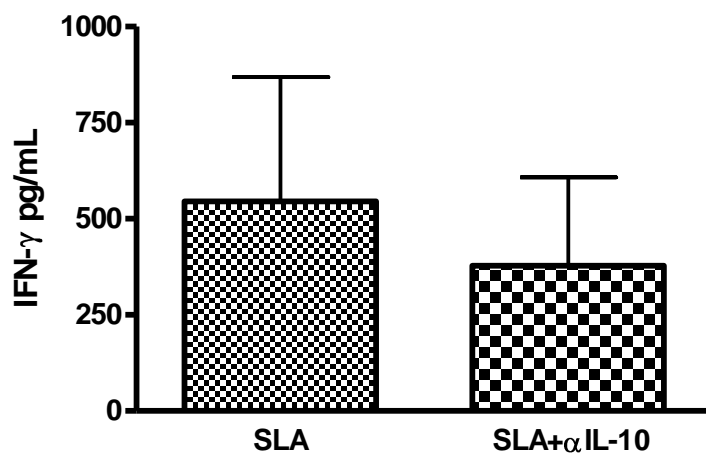
Figura 9: Expressão de RNAm para IL-10 (A) e IL-27(B) em CMSP de indivíduos com infecção subclínica e pacientes com leishmaniose cutânea. RNAm total para citocinas *ex vivo* e em resposta a SLA, após 12 horas de cultura. Cada ponto representa um paciente diferente e cada barra representa a mediana. Para análise estatística foi utilizado o teste Mann-Withney.

* $P < 0,05$ e ** $P = 0,01$

Neutralização de IL-10 não altera a produção de IFN- γ em indivíduos com infecção subclínica:

Outros estudos têm mostrado que a produção de IL-10 é maior em SC que em LC (Bittar *et al.* 2007). Para avaliar se uma maior produção de IL-10 estaria modulando a produção de IFN- γ nesses indivíduos, foi adicionado anticorpo monoclonal anti-IL-10 nas culturas de células estimuladas com SLA. A neutralização de IL-10 não interfere na produção de IFN- γ (Figura 10). A mediana da produção de IFN- γ foi de 46 pg/mL (24-2560 pg/mL) e de 61 pg/mL, 22-1920 pg/mL após a adição de anti-IL-10, $p>0.05$.

Figura 10



$P > 0,05$

Figura 10: Efeito da neutralização de IL-10 na produção de IFN- γ em indivíduos com infecção subclínica. CMSP foram estimuladas com SLA (5 μ g/mL) em presença e ausência de anticorpo anti-IL-10 (100ng/mL). As determinações foram realizadas pelo método de ELISA e as concentrações são dadas em pg/mL. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Wilcoxon.

6. DISCUSSÃO

Apesar de CMSP de pacientes com LC e LM produzirem grandes quantidades de IFN- γ , a principal citocina responsável pela ativação dos macrófagos para matar a *Leishmania*, esses pacientes desenvolvem a lesão. Várias evidências já mostraram que a forte resposta do tipo Th1, através da produção de citocinas pro-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) e a ausência de produção de IL-10, estão envolvidas na forte resposta inflamatória que é responsável pelo desenvolvimento da lesão nesses pacientes (Antonelli *et al.* 2005; Faria *et al.* 2005; Oliveira *et al.* 2011). Além disso, a observação que a pentoxifilina, uma droga que modula a produção de TNF- α , associada ao antimonial pentavalente, cura pacientes resistentes ao tratamento convencional e acelera a cura nesses pacientes (Lessa *et al.* 2001; Lessa *et al.* 2007; Machado *et al.* 2007) fortalece a hipótese que a ausência de modulação da resposta inflamatória está associada com a patogênese da leishmaniose tegumentar. Por outro lado, alguns indivíduos residentes em área de transmissão de *L. braziliensis* apresentam uma reação de hipersensibilidade tardia ao antígeno de leishmania mas não desenvolvem a doença. As CMSP desses indivíduos produzem menos IFN- γ e TNF- α quando comparados com os pacientes com LC (Follador *et al.* 2002). Até o momento não está completamente elucidado porque esses indivíduos SC tem a capacidade de controlar a infecção.

Neste estudo foi mostrado que enquanto IL-10 e TGF- β modulam a produção de TNF- α e de IL-17, IL-27 não apresentou um papel importante em modular a produção de citocinas inflamatórias.

IL-10 é uma citocina com propriedades antiinflamatórias, necessárias para controlar a forte resposta inflamatória que pode acompanhar a resposta imune local no tecido (O'Garra *et al.* 2004). IL-10 é a citocina regulatória importante na leishmaniose humana (Carvalho 1994), mas na LC e na LM apresenta uma capacidade diminuída de modular a produção de IFN- γ (Bacellar *et al.* 2002). Neste estudo mostramos que IL-10 apresenta atividade moduladora sobre a produção de TNF- α em LC, revelando uma supressão de 85%, mas não apresenta o mesmo efeito em LM. A ação

regulatória de IL-10 depende da expressão de seu receptor (Ding *et al.* 2003). Estudos anteriores já haviam mostrado que pacientes com LM produzem mais TNF- α e menos IL-10 quando comparados com pacientes com LC (Bacellar *et al.* 2002). Uma explicação possível para a diminuição da capacidade de IL-10 modular a produção de TNF- α na leishmaniose mucosa está na observação de que células da lesão mucosa expressam menos receptor de IL-10 quando comparados com células da lesão cutânea (Faria *et al.* 2005).

Um importante achado nesse estudo é a observação que IL-10 diminui a produção de IL-17 nas formas clínicas cutânea e mucosa da leishmaniose tegumentar. Embora IL-17 esteja envolvida na defesa de várias agentes intracelulares (Miyazaki *et al.* ; Matsuzaki e Umemura 2007; Bueno *et al.* 2012), essa citocina contribui para a inflamação através do recrutamento de neutrófilos e indução de vários mediadores inflamatórios como IL-1, IL-6, TNF- α (Korn *et al.* 2007). Quando comparados a indivíduos não infectados, CMSP de pacientes com LC e LM produzem mais IL-17 e essa citocina também está presente nas lesões desses pacientes (Bacellar *et al.* 2009; Boaventura *et al.* 2010), indicando que ela pode participar da destruição tecidual observada nessa doença. A observação que IL-10 diminui a produção de IL-17 na leishmaniose tegumentar corrobora com outros estudos que apontam IL-10 como uma molécula reguladora da produção de IL-17 em outras doenças inflamatórias, como colite e doença pulmonar por *Mycobacterium avium* (Lim *et al.* 2010; Chaudhry *et al.* 2011; Liu *et al.* 2011).

TGF- β é outra citocina que tem capacidade de regular a resposta imune inflamatória através da supressão da diferenciação de células T CD4⁺ efectoras, induzir a conversão de células T virgens em células Treg, inibição da produção de IL-2 e IFN- γ e supressão da atividade de macrófagos, células dendríticas e células Natural Killer (NK) (Brabletz *et al.* 1993; Yoshimura *et al.* 2010).

Na leishmaniose tegumentar humana, a adição *in vitro* de TGF- β em cultura de CMSP de pacientes com LC e LM não inibiu a produção de IFN- γ específica para o antígeno de *Leishmania*, mas inibiu a produção de IFN- γ por células de indivíduos sadios estimulados com PPD em 47% (Bacellar *et al.* 2002). Entretanto nesse estudo, TGF- β suprimiu a produção de TNF- α

por células de pacientes com LC e com LM. O efeito inibitório de TGF- β sobre células Th1 é mínimo em células T ativadas, onde existe diminuição de expressão de receptores de TGF- β , e essa expressão é dependente de IL-10 (Cottrez e Groux 2001). A observação anterior que a produção de IFN- γ é maior que a produção de TNF- α e a produção de IL-10 é baixa ou ausente nesses pacientes (Bacellar *et al.* 2002) pode explicar porque TGF- β tem um efeito maior na produção de TNF- α do que na produção de IFN- γ nos pacientes com leishmaniose tegumentar.

Embora controverso já está documentado que IL-6 e TGF- β induzem produção de IL-17 em células T virgens (Korn *et al.* 2007). Entretanto, os resultados aqui apresentados apontam para o papel de TGF- β como modulador da produção de IL-17 por células de pacientes com LC. Como as células desses pacientes já estão ativadas e re-estimuladas *in vitro* pelo antígeno de *Leishmania*, TGF- β talvez tenha um papel mais modulador do que indutor de IL-17 nesses pacientes.

Os estudos iniciais sobre a biologia da IL-27 fornecem evidências do papel desta citocina na iniciação da resposta imune do tipo Th1 (Pflanz *et al.* 2002; Takeda *et al.* 2003). Entretanto, estudos subsequentes indicaram que IL-27 tem uma ampla ação inibitória em células Th1, prevenindo imunopatologia causada por essa classe de células T (Yoshimura *et al.* 2006; Findlay *et al.* 2010). Nossos resultados mostraram que IL-27 não interferiu na produção de IFN- γ , TNF- α e IL-17 por células de pacientes com LC ou LM. Os efeitos antiinflamatórios de IL-27 são em parte devido à produção de IL-10 (Murugaiyan *et al.* 2009; Freitas do Rosário *et al.* 2012). A adição de IL-27 às culturas de CMSP de pacientes com LC e LM também não interferiu na produção de IL-10 por essas células, confirmando que nesse estudo IL-27 não exerce efeito regulatório na forte resposta inflamatória observada na leishmaniose tegumentar humana.

Já foi observado que os macrófagos de pacientes com LC e LM infectados com *L. braziliensis* produzem grande quantidade de TNF- α quando comparado com os macrófagos de indivíduos SC (Giudice *et al.* 2012). Como essa produção inicial de TNF- α por macrófagos durante a resposta imune inata poderia contribuir para a produção exagerada de IFN- γ pelas células T desses pacientes, a neutralização desta citocina poderia

interferir na secreção de IFN- γ . Nesse estudo foi observado que a neutralização de TNF- α diminuiu a produção de IFN- γ , mas não interferiu na produção de IL-10 por CMSP de pacientes com LM e LC. Esses resultados junto com os dados iniciais que demonstraram que o tratamento com pentoxifilina, um inibidor de TNF- α , cura pacientes refratários e acelera a cura desses pacientes (Lessa *et al.* 2001; Bafica *et al.* 2003; Machado *et al.* 2007) sugere que essa citocina pode estar contribuindo para a produção exagerada de IFN- γ e para destruição tecidual observada nessa doença.

Por outro lado, a neutralização de IFN- γ diminuiu significativamente a produção desta TNF- α por CMSP de pacientes com LC e LM. Dessa forma, a produção de IFN- γ pelas células Th1 poderia também estar estimulando a produção de TNF- α por essas células. A diminuição de TNF- α foi acompanhada do aumento da produção de IL-10 nesses pacientes. Esse achado é relevante desde quando a IL-10 tem se mostrado ter um papel protetor em algumas doenças inflamatórias (Cardoso *et al.* 2006; Faith *et al.* 2012; Freitas do Rosário *et al.* 2012).

O conhecimento de como a resposta imune do hospedeiro pode controlar a infecção por *L. braziliensis* é importante no desenvolvimento de vacinas e no controle das leishmanioses. Enquanto várias evidências apontam para o papel da forte resposta imune inflamatória no desenvolvimento da lesão, pouco se sabe sobre como os indivíduos expostos à infecção por *L. braziliensis* controlam a infecção. Em uma área endêmica de transmissão de *Leishmania major* o teste de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* foi associado com proteção para LC (Ben Salah *et al.* 2005).

Nesse estudo a produção de IFN- γ e de TNF- α nesses indivíduos foi menor quando comparado com os pacientes com LC, confirmando resultados anteriores (Follador *et al.* 2002). Em relação à produção de IL-17, foi maior nos indivíduos SC, embora não fosse estatisticamente significativa. Alguns aspectos em relação à avaliação da resposta imune nesses indivíduos devem ser observados. Primeiramente, não se sabe quando esses indivíduos foram expostos à infecção por *L. braziliensis*. Depois, o período entre a positividade do teste intradérmico e a avaliação da resposta imune pode interferir nos resultados obtidos. De fato, os níveis mais baixos

de IFN- γ , TNF- α e IL-17 foram observados em indivíduos que foram avaliados 1 ano após a detecção do teste intradérmico positivo.

Embora IL-17 seja produzida por CMSP de pacientes com LC e LM, essa produção é bem menor quando comparada com a produção de IFN- γ . E existe uma correlação inversa entre a produção de IL-17 e a produção de IFN- γ nesses pacientes (Bacellar *et al.* 2009). Vários estudos já demonstraram que a produção de IFN- γ regula negativamente a produção de IL-17 (Harrington *et al.* 2005; Park *et al.* 2005). Dessa forma, nesses indivíduos SC, uma menor produção de IFN- γ e uma maior produção de IL-17 poderiam estar associadas com proteção nesses indivíduos. Um estudo realizado em uma área de transmissão de *Leishmania donovani* mostrou uma associação entre a produção de IL-17 e resistência na leishmaniose visceral (Pitta *et al.* 2009). Entretanto, mais estudos ainda são necessários para melhor avaliar o papel desta citocina na proteção contra a infecção por *L. braziliensis*.

Como os pacientes com LC e LM apresentam uma incapacidade de modular IFN- γ (Bacellar *et al.* 2002), foi avaliado se a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias nos grupos dos SC, estava relacionada com a capacidade de citocinas regulatórias (IL-10 e IL-27) em controlar a resposta imune e consequentemente impedir o desenvolvimento da lesão. A produção de IL-10 foi baixa no grupo SC e semelhante aos encontrados no grupo LC. Além disso, a neutralização de IL-10 não aumentou a produção de IFN- γ nesses indivíduos. Dessa forma, nos indivíduos com infecção SC, a IL-10 parece não ter um papel importante na regulação da resposta imune.

Em relação à expressão de IL-27, ela foi maior *ex vivo*, e em culturas de CMSP estimuladas com SLA em pacientes com LC quando comparados com os indivíduos SC. Como IL-27 não mostrou um papel modulador da resposta imune nesses pacientes, é possível que essa citocina possa estar envolvida no desenvolvimento da resposta Th1.

O papel de células Treg em modelos experimentais de infecção por *Leishmania* tem sido bastante estudado (Aseffa *et al.* 2002; Belkaid *et al.* 2002; Falcão *et al.* 2012). Na leishmaniose tegumentar humana, as células Treg estão presentes no sangue periférico e em lesões de pacientes com LC

e são capazes de diminuir a proliferação de células T CD4+CD25-alogênicas quando estimuladas com phitohemaglutinina (PHA), mas essa supressão foi bastante variável entre os pacientes e em alguns pacientes essa atividade não foi observada (Campanelli *et al.* 2006). Também não foi observada diferença no número dessas células no sangue periférico de pacientes com LC e de indivíduos resistentes à infecção residentes em uma área endêmica de *L. braziliensis* (Salhi *et al.* 2008). E mais recentemente, em pacientes com LC crônica causada por *Leishmania panamensis* e *L. braziliensis* foi observada um aumento no número de células Treg no sangue periférico quando comparado com indivíduos SC. Entretanto a capacidade das células Treg desses pacientes de controlar a resposta inflamatória foi inferior à capacidade das células Treg dos SC e foi independente da produção de IL-10 por essas células (Rodriguez-Pinto *et al.* 2012).

Nesse estudo foi mostrado que a modulação da resposta inflamatória de pacientes com leishmaniose tegumentar causada por *L. braziliensis* está associada com o aumento da produção de IL-10. Estudos futuros devem ser realizados para identificar que células são responsáveis pela produção dessa citocina na leishmaniose tegumentar americana.

Um estudo recente mostrou que macrófagos de indivíduos SC são menos infectados e produzem menos moléculas inflamatórias quando comparado com os macrófagos de pacientes com LC e LM (Giudice *et al.* 2012). Como a erradicação do parasito e conseqüentemente a ocorrência de formas assintomáticas da infecção não pode ser explicada pela ação efetiva da resposta imune adaptativa, é necessário um maior aprofundamento no conhecimento do papel da resposta imune inata na infecção por *L. braziliensis*.

7. Sumário de Resultados

1. IL-10 e TGF- β desempenham importante papel na modulação da resposta imune na leishmaniose tegumentar, sobretudo na LC, modulando a produção de TNF- α e IL-17.
2. IL-27 não diminui a produção de IFN- γ , TNF- α e de IL-17 em pacientes com LC e com LM, sugerindo que IL-27 não desempenha função moduladora na leishmaniose tegumentar.
3. A observação de que a neutralização de TNF- α diminui a produção de IFN- γ sugere que essa citocina produzida no início da resposta imune pode contribuir para a produção exagerada de IFN- γ pelas células T CD4+.
4. A observação que a neutralização de IFN- γ diminui a produção de TNF- α e aumenta a produção de IL-10 reforça a hipótese de que a deficiência de modulação da resposta Th1, sobretudo na LM, está relacionada com a produção exagerada de IFN- γ e ausência de IL-10.
5. Como não foi observada diferença na produção de IL-10 entre indivíduos SC e pacientes com LC e a expressão de IL-27 foi menor no grupo de SC, estas citocinas parecem não ter um papel importante no controle da infecção por *L. braziliensis*.

8. CONCLUSÃO

IFN- γ parece ser a citocina mais envolvida na patogênese da LTA por interferir na produção de TNF- α e IL-10

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antonelli, L. R., W. O. Dutra, et al. (2005). "Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis." Immunology Letters **101**(2): 226-30.

Artis, D., A. Villarino, et al. (2004). "The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity." Journal of Immunology **173**(9): 5626-34.

Aseffa, A., A. Gumy, et al. (2002). "The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4+CD25+ T cells." Journal of Immunology **169**(6): 3232-41.

Bacellar, O., D. Faria, et al. (2009). "Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis." Journal of Infection Diseases **200**(1): 75-8.

Bacellar, O., H. Lessa, et al. (2002). "Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients." Infection Immunology **70**(12): 6734-40.

Bafica, A., F. Oliveira, et al. (2003). "American cutaneous leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline." International Journal of Dermatology **42**(3): 203-7.

Belkaid, Y. (2003). "The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection." Expert Opinion on Biological Therapy **3**(6): 875-85.

Belkaid, Y., K. F. Hoffmann, et al. (2001). "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 **194**(10): 1497-506.

Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, et al. (2002). "CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity." Nature **420**(6915): 502-7.

Ben Salah, A., H. Louzir, et al. (2005). "The predictive validity of naturally acquired delayed-type hypersensitivity to leishmanin in resistance to *Leishmania major*-associated cutaneous leishmaniasis." Journal of Infection Diseases **192**(11): 1981-7.

Bittar, R. C., R. S. Nogueira, et al. (2007). "T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **102**(5): 625-630.

Bittencourt, A. L. and A. Barral (1991). "Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **86**(1): 51-6.

Boaventura, V. S., C. S. Santos, et al. (2010). "Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines." European Journal of Immunology **40**(10): 2830-6.

Bogdan, C., M. Rollinghoff, et al. (2000). "The role of nitric oxide in innate immunity." Immunol Rev **173**: 17-26.

Bomfim, G., C. Nascimento, et al. (1996). "Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis." Experimental Parasitology **84**(2): 188-94.

Brabletz, T., I. Pfeuffer, et al. (1993). "Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T

cells through a noncanonical octamer-binding site." Molecular and Cellular Biology **13**(2): 1155-62.

Bueno, L. L., C. G. Morais, et al. (2012). "Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural *Plasmodium vivax* infection." Acta Tropica **123**(1): 53-7.

Campanelli, A. P., A. M. Roselino, et al. (2006). "CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells." Journal of Infection Diseases **193**(9): 1313-22.

Cardoso, L. S., S. C. Oliveira, et al. (2006). "*Schistosoma mansoni* antigen-driven interleukin-10 production in infected asthmatic individuals." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **101**: 339-43.

Carvalho, E. M. (1994). "Immunoregulation in leishmaniasis." Ciência e Cultura **46**: 441-445.

Carvalho, E. M., O. Bacellar, et al. (1994). "Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis." Journal of Immunology **152**(12): 5949-56.

Carvalho, E. M., O. A. Bacellar, et al. (1988). "Visceral leishmaniasis: a disease associated with inability of lymphocytes to activate macrophages to kill leishmania." Brazilian Journal of Medical and Biological Research **21**(1): 85-92.

Carvalho, E. M., D. Correia Filho, et al. (1995). "Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **53**(3): 273-7.

Chatelain, R., S. Mauze, et al. (1999). "Experimental *Leishmania major* infection in mice: role of IL-10." Parasite Immunology **21**(4): 211-8.

- Chaudhry, A., R. M. Samstein, et al. (2011). "Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation." Immunity **34**(4): 566-78.
- Chen, W., W. Jin, et al. (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." Journal of Experimental Medicine **198**(12): 1875-86.
- Cottrez, F. and H. Groux (2001). "Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10." Journal of Immunology **167**(2): 773-8.
- Da-Cruz, A. M., M. P. de Oliveira, et al. (1996). "Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **91**(2): 225-9.
- de Waal Malefyt, R., J. Abrams, et al. (1991). "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes." Journal of Experimental Medicine **174**(5): 1209-20.
- Ding, Y., D. Chen, et al. (2003). "Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IL-10-mediated immune responses." Journal of Immunology **170**(3): 1383-91.
- Faith, A., N. Singh, et al. (2012). "T cells producing the anti-inflammatory cytokine IL-10 regulate allergen-specific Th2 responses in human airways." Allergy.
- Falcão, S. C., T. R. de Moura, et al. (2012). "The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with *Leishmania braziliensis*." International Journal for Parasitology.

- Faria, D. R., K. J. Gollob, et al. (2005). "Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis." Infection and Immunity **73**(12): 7853-9.
- Faria, D. R., P. E. Souza, et al. (2009). "Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis." Parasite Immunol **31**(8): 432-9.
- Findlay, E. G., R. Greig, et al. (2010). "Essential role for IL-27 receptor signaling in prevention of Th1-mediated immunopathology during malaria infection." Journal of Immunology **185**(4): 2482-92.
- Follador, I., C. Araujo, et al. (2002). "Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection." Clinical Infectious Diseases **34**(11): E54-8.
- Follador, I., C. Araujo, et al. (2002). "Immune responses to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." Vaccine **20**(9-10): 1365-8.
- Freitas do Rosário, A. P., T. Lamb, et al. (2012). "IL-27 promotes IL-10 production by effector Th1 CD4+ T cells: a critical mechanism for protection from severe immunopathology during malaria infection." Journal of Immunology **188**(3): 1178-90.
- Giudice, A., C. Vendrame, et al. (2012). "Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection." BMC Infection Diseases **12**: 75.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, et al. (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nature Immunology **6**(11): 1123-32.

- Heinzel, F. P., M. D. Sadick, et al. (1989). "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 **169**(1): 59-72.
- Heinzel, F. P., M. D. Sadick, et al. (1991). "Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis." Proceedings of the National Academy of Sciences USA **88**(16): 7011-5.
- Holscher, C., A. Holscher, et al. (2005). "The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis." Journal of Immunology **174**(6): 3534-44.
- Ito, S., P. Ansari, et al. (1999). "Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1." Blood **93**(5): 1456-63.
- Jones, T. C., W. D. Johnson, Jr., et al. (1987). "Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*." Journal of Infection Diseases **156**(1): 73-83.
- Killick-Kendrick, R. and D. H. Molineux (1981). "Transmission of Leishmaniasis by the Bite of Phlebotomine Sandflies: Possible mechanisms." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **75**(1): 152-154.
- Killick-Kendrick, R. M., D. H. (1981). "Transmission of Leishmaniasis by the Bite of Phlebotomine sandflies: Possible mechanisms." Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **75**(1): 152-154.
- Kolls, J. K. and A. Linden (2004). "Interleukin-17 family members and inflammation." Immunity **21**(4): 467-76.

- Komiyama, Y., S. Nakae, et al. (2006). "IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis." Journal of Immunology **177**(1): 566-73.
- Korn, T., M. Oukka, et al. (2007). "TH17 cells: Effector T cells with inflammatory properties." Seminars in Immunol **19**(6): 362-371.
- Kotake, S., N. Udagawa, et al. (1999). "IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis." J Clin Invest **103**(9): 1345-52.
- Kurasawa, K., K. Hirose, et al. (2000). "Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis." Arthritis Rheum **43**(11): 2455-63.
- Lainson, R., L. Ryan, et al. (1987). "Infective Stages of *Leishmania* in the Sandfly Vector and Some Observations on the Mechanism of Transmission." Mem. Inst. Oswaldo Cruz **82**(3): 421-424.
- Lainson, R. and J. J. Shaw (1987). Evolution, classification and geographical distribution. London.
- Langrish, C. L., Y. Chen, et al. (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." J Exp Med **201**(2): 233-40.
- Lehmann, W., E. M. Carvalho, et al. (2005). "Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing." Bone **36**(2): 300-10.
- Lessa, H. A., P. Machado, et al. (2001). "Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony." Am J Trop Med Hyg **65**(2): 87-9.

- Lessa, M. M., H. A. Lessa, et al. (2007). "Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects." Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed) **73**(6): 843-7.
- Liew, F. Y., Y. Li, et al. (1991). "Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages." Eur J Immunol **21**(12): 3009-14.
- Liew, F. Y., S. Millott, et al. (1990). "Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine." J Immunol **144**(12): 4794-7.
- Lim, A., C. Allison, et al. (2010). "Susceptibility to pulmonary disease due to *Mycobacterium avium*-intracellulare complex may reflect low IL-17 and high IL-10 responses rather than Th1 deficiency." Clinical Immunology **137**(2): 296-302.
- Liu, B., S. L. Tonkonogy, et al. (2011). "Antigen-presenting cell production of IL-10 inhibits T-helper 1 and 17 cell responses and suppresses colitis in mice." Gastroenterology **141**(2): 653-62.
- Machado, P., J. Kanitakis, et al. (2002). "Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis." Eur J Dermatol **12**(5): 449-51.
- Machado, P. R., H. Lessa, et al. (2007). "Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis." Clin Infect Dis **44**(6): 788-93.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, et al. (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." Nature **441**(7090): 231-4.
- Marsden, P. D. (1985). "Clinical presentations of *Leishmania braziliensis* braziliensis." Parasitol Today **1**(5): 129-33.

- Marsden, P. D. (1986). "Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911)." Trans R Soc Trop Med Hyg **80**(6): 859-76.
- Marsden, P. D. (1994). "Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Tres Bracos, Bahia-Brazil." Rev Soc Bras Med Trop **27**(2): 93-101.
- Marsden, P. D. and T. C. Jones (1985). Clinical manifestations, diagnosis and treatment of leishmaniasis. Amsterdam, Elsevier Science Publisher.
- Matsuzaki, G. and M. Umemura (2007). "Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infection." Microbiology and Immunology **51**(12): 1139-47.
- Miyazaki, Y., S. Hamano, et al. "IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection." J Immunol **185**(2): 1150-7.
- Montagnoli, C., A. Bacci, et al. (2002). "B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*." J Immunol **169**(11): 6298-308.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, et al. (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol **136**(7): 2348-57.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-73.
- Murray, H. W., B. Y. Rubin, et al. (1983). "Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine." J Clin Invest **72**(4): 1506-10.

- Murugaiyan, G., A. Mittal, et al. (2009). "IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4+ T cells." The Journal of Immunology **183**(4): 2435-43.
- O'Garra, A., P. L. Vieira, et al. (2004). "IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage." The Journal of Clinical Investigation **114**(10): 1372-8.
- Oliveira, F., A. Bafica, et al. (2011). "Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **85**(1): 70-3.
- Oswald, I. P., T. A. Wynn, et al. (1992). "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 U S A **89**(18): 8676-80.
- Othieno, C., C. S. Hirsch, et al. (1999). "Interaction of *Mycobacterium tuberculosis*-induced transforming growth factor beta1 and interleukin-10." Infect Immun **67**(11): 5730-5.
- Park, H., Z. Li, et al. (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nature Immunology **6**(11): 1133-41.
- Pearl, J. E., S. A. Khader, et al. (2004). "IL-27 signaling compromises control of bacterial growth in mycobacteria-infected mice." J Immunol **173**(12): 7490-6.
- Pflanz, S., J. C. Timans, et al. (2002). "IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells." Immunity **16**(6): 779-90.

- Pitta, M. G., A. Romano, et al. (2009). "IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*." The Journal of Clinical Investigation **119**(8): 2379-87.
- Reithinger, R., J. Dujardin, et al. (2007). "Cutaneous Leishmaniasis." The Lancet Infectious Diseases **7**: 581-596.
- Ribeiro-de-Jesus, A., R. P. Almeida, et al. (1998). "Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis." Braz J Med Biol Res **31**(1): 143-8.
- Rodriguez-Pinto, D., A. Navas, et al. (2012). "Regulatory T cells in the pathogenesis and healing of chronic human dermal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)* species." PLoS Neglected Tropical Diseases **6**(4): e1627.
- Sacks, D. and N. Noben-Trauth (2002). "The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice." Nat Rev Immunol **2**(11): 845-58.
- Salhi, A., V. Rodrigues, et al. (2008). "Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*." Journal of Immunology **180**(9): 6139-48.
- Sato, K., A. Suematsu, et al. (2006). "Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction." J Exp Med **203**(12): 2673-82.
- Scott, P., P. Natovitz, et al. (1988). "Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens." J Exp Med **168**(5): 1675-84.

- Scott, P., D. Sacks, et al. (1983). "Resistance to macrophage-mediated killing as a factor influencing the pathogenesis of chronic cutaneous leishmaniasis." J Immunol **131**(2): 966-71.
- Takeda, A., S. Hamano, et al. (2003). "Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment." Journal of Immunology **170**(10): 4886-90.
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, et al. (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." Immunity **24**(2): 179-89.
- Villarino, A., L. Hibbert, et al. (2003). "The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection." Immunity **19**(5): 645-55.
- Yen, D., J. Cheung, et al. (2006). "IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6." J Clin Invest **116**(5): 1310-6.
- Yoshida, H., S. Hamano, et al. (2001). "WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to *L. major* infection." Immunity **15**(4): 569-78.
- Yoshimura, A., Y. Wakabayashi, et al. (2010). "Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF- β ." The Journal of Biochemistry **147**(6): 781-792.
- Yoshimura, T., A. Takeda, et al. (2006). "Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4⁺ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4⁺ T cells partially through STAT3-dependent mechanism." J Immunol **177**(8): 5377-85.

9. ANEXO