

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

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES IL1B, IFNG E NÍVEIS DE
CITOCINAS COM A SUSCETIBILIDADE A LEISHMANIOSE CUTÂNEA
CAUSADA POR *Leishmania guyanensis*

GEORGE ALLAN VILLAROUCO DA SILVA

MANAUS

Setembro - 2019

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

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES IL1B, IFNG E NÍVEIS DE
CITOCINAS COM A SUSCETIBILIDADE A LEISHMANIOSE CUTÂNEA
CAUSADA POR *Leishmania guyanensis*

GEORGE ALLAN VILLAROUCO DA SILVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, para obtenção do título de Doutor em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Dr. Rajendranath Ramasawmy

MANAUS

Setembro - 2019

S586a Silva, George Allan Villarouco da
Associação de polimorfismos dos genes IL1B, IFNG e níveis de citocinas com a suscetibilidade a Leishmaniose Cutânea causada por *Leishmania guyanensis* : Polimorfismos genéticos de IL1B e IFNG associados com a Leishmaniose Cutânea causada por *Leishmania guyanensis* / George Allan Villarouco da Silva. 2019 57 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Leishmaniose cutânea. 2. Resposta imune. 3. Inflamação. 4. Citocinas. 5. Marcador de Resistência. I. Ramasawmy, Rajendranath II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedicatória

Dedico esta obra incansavelmente a minha mãe, minha principal incentivadora, meu sol de cada dia. Tudo que alcancei é fruto de seu apoio e dedicação, nada disso teria valor sem você.

Aos meus familiares (*in memoriam*)

Elon Villarouca Monteiro (bisavô)

Luíza Villarouca Monteiro (bisavó)

Elonina Villarouca Monteiro (avó)

Edemir Villarouca Monteiro (tio)

Elozina Villarouca Monteiro (tia)

Edemita Villarouca Monteiro (tia-madrinha)

Elenir Villarouca Monteiro (tio-padrinho)

Francisco Ferreira Monteiro (tio)

Manoel Côrrea da Silva (avô)

Zenildo Magalhães Leite (pai)

Agradecimentos

Ao meu amigo e orientador, Prof Dr Rajendranath Ramasawmy, amizade de 7 anos, inicialmente compartilhando sua experiência na redação de artigos, atualmente com seu conhecimento na Genética. A sua contribuição foi essencial para minha formação, obrigado por ter acreditado no meu potencial, serei eternamente grato.

Aos meus amigos e a toda equipe do Laboratório de Genética Molecular/FMT, especialmente a Luan Silva, Felipe Jules, José do Espírito Santo Junior, Tirza Mesquita, Hélia Valéria, Nayene. Compartilhamos momentos de alegrias e tristeza nestes últimos anos, nossos momentos de lanches “rachados” na nossa humilde copa, momentos que serão lembrados. E que todos possam ter um futuro brilhante. O fim de semana não existia para nós!!!

Ao Sr Cláudionor e a Sra Rita pelo apoio na coleta e entrevista dos pacientes com Leishmaniose na Fundação, ajuda fundamental para este trabalho.

Ao nosso grande motorista Sr Assis, que dispôs de seus domingos de estar com sua família e nos ajudou nesta caminhada na coleta dos indivíduos controles nas áreas endêmicas. Sua ajuda foi também essencial.

À Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia e a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, por fornecer a infraestrutura para realização deste estudo.

Agradecimento especial ao Instituto René Rachou – Fiocruz de Minas Gerais, aos Professores Andréa Teixeira, Olindo Assis, Ana Carolina Campi e a todo seu grupo pelo carinho e apoio na realização da dosagem de citocinas através do método Luminex.

Às plataformas associadas ao Instituto Fiocruz, Plataforma Genômica/AM e Plataforma de Citometria de Fluxo/MG.

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, pela sua grande contribuição a minha formação, mestrado e doutorado.

Em especial aos Professores, Aya Sadahiro, Adriana Malheiro e Antonio Luiz Boechat. Não tem como não expressar o enorme prazer de ter sido aluno de vocês, excelentes professores, conduzem uma aula como uma simples conversa envolvente, inspiração para muitos alunos. A admiração a vocês também será eterna!!! Professores de excelência.

Ao meu irmão de laboratório, amigo e agora padrinho de casamento, Victor Souza. Sempre disposto a ajudar no que possível. Grande amigo.

A minha irmã de laboratório, e também agora minha madrinha de casamento, Maísa Pôrto, também pelo apoio e palavras de incentivo.

A minha amiga e também agora Doutora Andréa Tarragô, como se diz, “uma mão lava a outra”, o fundamental é a amizade, nossas conversas rendiam uma PCR inteira, rrsrs. Compartilhamos conhecimentos e cada conversa novas idéias, muito obrigado por tudo.

A minha nova família, Barbosa e Sousa, pelas palavras de apoio e incentivo, meu grande carinho a essas duas famílias. Especialmente agradeço ao meu sogro, seu Raimundo, responsável por um churrasco de primeira, fundamental para iniciar a semana com força total. Minha sogra não.

E por fim, como a ordem de agradecimentos seguiu conforme a altura das pessoas, chegamos a 1,5 m, minha esposa Katianne Barbosa. Ao seu grande carinho, atenção e companheirismo nestes anos, ao meu lado nos momentos de felicidades e tristezas; suas palavras foram essenciais em muitos momentos, e sua confiança no meu trabalho não tem como medir. Meu grande amor obrigado por tudo, e agora é a sua vez no doutorado!!!

A minha família Villarouca, com todo respeito a todas as famílias, eu tive a melhor família. Aquela família de propaganda de margarina ou de coca-cola, o melhor happy hour de todos. O grande carinho e amor jamais esquecerei, as lágrimas caem de saudade, o Natal era inesquecível.

A minha mãe, nada disso seria possível sem você, sem seu apoio e amor. A sua alegria de ver meus cachos (quando criança), agora seus olhos brilham de orgulho, muito obrigado por tudo!!!

Ao Zenildo Magalhães Leite um agradecimento e dedicatória especial. Infelizmente veio falecer um dia antes o que seria a data da minha defesa de doutorado. Esteve conosco e acompanhou cada passo na academia, ele que acreditou sempre nesta conquista. Meu carinho e agradecimento por tudo que fez a nossa família descanse em paz.

Dessa vida não levo nada de material.

E sim o carinho e amor de todos vocês.

“Tudo posso naquele que me fortalece”

RESUMO

A Leishmaniose Cutânea (LC) é causada por diferentes espécies de protozoários *Leishmania*, apresenta importante impacto na saúde pública, com significativa morbidade e também letalidade dos casos mais graves da doença. Diferentes estudos clínicos e experimentais têm relatado o envolvimento de citocinas inflamatórias no desenvolvimento da LC. Aspectos da patogenicidade da LC têm sido relacionados a características imunogenéticas do hospedeiro como determinantes para o resultado da doença. Neste estudo investigamos se polimorfismos genéticos em *IL1B*, *IL1RN* e *IFNG* estão associados com a suscetibilidade ou a proteção a LC. A genotipagem dos SNPs foi realizada através do sequenciamento nucleotídico e pela PCR-RFLP em 881 pacientes com LC e 837 indivíduos controles. As concentrações de citocinas foram também avaliadas entre pacientes e indivíduos controles através do Luminex. Os níveis das citocinas IL-1 β , IL-6, CXCL-8, MCP-1 e IFN- γ foram significativamente superiores em pacientes com LC ($p < 0,0001$), enquanto elevados níveis de IL-1Ra foram observados em controles. Polimorfismos genéticos de *IL1B* e *IFNG* estão associados com o desenvolvimento da LC e com os níveis de citocinas. O genótipo rs16944 C/C *IL1B* está relacionado a baixos níveis de IL-1Ra e associado com a suscetibilidade a LC (OR=1.5 [95%CI 1.1–2.0]; $p=0.004$). Microsatélite e diferentes SNPs do gene *IFNG* foram associados com a resistência e a suscetibilidade a LC, como rs2069705 T e rs2430561 T estão associados ao risco a LC (OR=1.5 [95%CI 1.2-2.0]; $p=0.0004$ / OR=1.4 [95%CI 1.2-1.6]; $p=0.0002$). Alelos de *IFNG* associados ao risco a LC estão combinados em haplótipo (H1), este associado com a suscetibilidade a LC (OR=1.7 [95%CI 1.2-2.2]; $p=5 \times 10^{-5}$) e relacionado aos baixos níveis de IFN- γ . Polimorfismos genéticos em *IL1B* e *IFNG* são determinantes para o resultado da LC causada por *Leishmania guyanensis*, portanto variações genéticas estão relacionadas com a produção de citocinas, como IL-1 β , IL-1Ra e IFN- γ .

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea; IFNG; IL1B; Citocinas; Marcador de Resistência.

Abstract

Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania* species, present an important health problem, as significant morbidity and also lethality of the most severe cases of the disease. Different clinical studies and experimental have related the involvement from inflammatory cytokines in the development of CL. Features of CL pathogenicity to be associated with as host immunogenetics components to determine for the outcome of the disease. We investigated whether single nucleotide polymorphisms in *IL1B*, *IL1RN* and *IFNG* may be associated with elevated or decreased risk in the development of the CL. Nucleotide sequencing and PCR-RFLP were performed in 881 patients with CL and 837 controls. Circulating plasma cytokines were also assayed between CL patients and control subjects. The cytokine levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1 and IFN- γ were significantly higher in patients compared to controls ($p < 0.0001$), levels elevated of IL-1ra were observed among the controls. *IL1B* and *IFNG* polymorphisms are associated with CL and cytokine levels. The *IL1B* rs16944 C/C genotype is related with lower levels of IL-1ra and associated with susceptibility to CL (OR=1.5 [95%CI 1.1–2.0]; $p=0.004$). Different SNPs and microsatellite of the *IFNG* gene were associated with protection and susceptibility to CL, those rs2069705 T and rs2430561 T were associated for the risk to CL (OR=1.5 [95%CI 1.2-2.0]; $p=0.0004$ / OR=1.4 [95%CI 1.2-1.6]; $p=0.0002$). *IFNG* alleles related with risk to CL are combined into haplotype (H1), this associated with susceptibility to CL (OR=1.7 [95%CI 1.2-2.2]; $p=5 \times 10^{-5}$) and related with lower levels of IFN- γ . Although, SNPs present in *IL1B* and *IFNG* may mark to the development of CL caused by *Leishmania guyanensis*, genetic variants are associated with the production of the IL-1 β , IL-1Ra e IFN- γ .

Palavras-chave: Cutaneous Leishmaniasis; IFNG; IL1B; Cytokine; Genetic marker.

Sumário

CAPÍTULO I.....	12
REVISÃO DA LITERATURA NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO.....	12
Resposta imunológica a Leishmaniose Cutânea: fatores relacionados ao equilíbrio e seu papel no resultado da doença.....	12
1. Introdução	13
2. Metodologia.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1 Manifestações clínicas das Leishmanioses.....	15
3.2 Protozoário <i>Leishmania</i> e interação parasito-hospedeiro	17
3.3 Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar	19
3.4 Resposta imunológica à <i>Leishmania</i>	23
3.4.1 Resposta imune inata à <i>Leishmania</i>	24
3.4.1.1 Polarização de macrófagos em infecções por <i>Leishmania</i>	28
3.4.3 Resposta Imune adaptativa à <i>Leishmania</i> é determinante para o resultado da Leishmaniose.....	30
3.5 Influência das características genéticas do hospedeiro na Leishmaniose.....	32
3.6 miRNA e regulação da resposta imunológica	34
4.0 Considerações finais.....	36
DISCUSSÃO	37
CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

Carta de Apresentação

Este estudo foi proposto a partir de objetivos contemplados pelo projeto “*Polimorfismos genéticos dos genes envolvidos na resposta imune e na cicatrização das lesões em pacientes com leishmaniose cutânea*”, coordenado pelo Prof. Dr. Rajendranath Ramasawmy, com o consentimento do CEP da FMT-HVD sob parecer do CAAE: 09995212.0.0000.0005. Projeto financiado pelas instituições Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

A Tese é estruturada em três capítulos. No primeiro capítulo é abordada uma revisão bibliográfica quanto à resposta imunológica a Leishmaniose Cutânea, com base aos diferentes estudos clínicos e experimentais, neste foram também relatados os aspectos imunogenéticos do hospedeiro envolvidos na resposta imune frente ao protozoário *Leishmania*, assim como elementos envolvidos na patogênese da LC. Nos capítulos seguintes foram apresentados os resultados dos estudos genéticos de associação. Os resultados encontram-se publicados e, por motivos autorais não estão disponíveis no decorrer da Tese.

Capítulo 2: “*A polymorphism in the IL1B gene (rs16944 T/C) is associated with cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania guyanensis and plasma cytokine interleukin receptor antagonist*”, publicado na revista **Cytokine**, Vol. 123, 154788. Qualis A2, Fator de Impacto: 3.45.

Capítulo 3: “*A single haplotype of IFNG correlating with low circulating levels of interferon- γ is associated with susceptibility to Cutaneous Leishmaniasis caused by Leishmania guyanensis*”, aceito para publicação na revista **Clinical Infectious Diseases**. Qualis A1, Fator de Impacto: 9.055.

CAPÍTULO I

REVISÃO DA LITERATURA NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

Resposta imunológica a Leishmaniose Cutânea: fatores relacionados ao equilíbrio e seu papel no resultado da doença

George Allan Villarouco da Silva¹, Rajendranath Ramasawmy^{1,2,3}

1: Programa de Pos-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada-PPGIBA, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil.

2: Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil.

3: Faculdade de Medicina, Universidade Nilton Lins, Manaus, Amazonas, Brazil.

Resumo

A Leishmaniose consiste em uma doença infecciosa re-emergente causada por protozoários do gênero *Leishmania*, e tem se expandido em diferentes países nas últimas décadas. O desenvolvimento da resposta imunológica do hospedeiro é determinante para eliminação do parasito, a evolução da doença tem sido relacionada ao desequilíbrio das respostas imunes e produção de citocinas inflamatórias. Diferenças quanto à intensidade das respostas imunológicas são observadas entre as formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar (LT). A resposta mediada por linfócitos Th1 está associada à resistência a infecção causada por *Leishmania*, entretanto elevados níveis de citocinas, como IL-1 β e IFN- γ é correlacionado às formas graves da LT. A Leishmaniose Cutânea (LC) é a forma mais prevalente da LT, é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões de pele ulceradas e diferenças quanto ao perfil imunológico são observadas em relação às lesões iniciais da doença. Diferentes estudos, como estudos experimentais ressaltam a importância do equilíbrio das respostas efetoras, sendo relatado o importante papel de citocinas e moléculas regulatórias em promover resistência à infecção aguda. Nesta revisão, relatamos mecanismos imunológicos e moleculares envolvidos na resposta imune frente ao protozoário *Leishmania*, assim como elementos envolvidos na patogênese da LC.

Palavras-Chave: *Leishmania*; Resistência; Inflamação aguda; IFN- γ .

1. Introdução

A Leishmaniose está entre as principais doenças parasitárias, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Estes foram inicialmente descritos na primeira década do século XX pelos médicos William Leishman e Charles Donovan, e assim homenageados com o nome da doença *Leishmania-Donovani* (Jogas, 2017). A Leishmaniose é considerada uma doença negligenciada endêmica em mais de 80 países. A estimativa de novos casos anualmente é de 0,7-1 milhão com 20-30 mil mortes, com número de óbitos relacionados às formas mais graves da doença, como Leishmaniose Mucosa e Leishmaniose Visceral (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>).

Aproximadamente 94% das infecções ocorrem em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão e Sudão do Sul, com estimativa de ¼ da população mundial vivem em áreas de risco para Leishmaniose (WHO, 2018). Em países das Américas tem sido relatado aumento de 6% de casos detectados no ano de 2016 quando comparado ao ano anterior. O Brasil encontra-se entre os países em destaque com maior número de registros (12.690), com aumento de óbitos causados pela Leishmaniose Visceral e proporcional aumento de Leishmaniose Cutânea em crianças menores de 10 anos (WHO, 2018).

A transmissão da doença ocorre através da picada de flebotomíneos infectados pelo protozoário e atualmente mais de 20 espécies de *Leishmania* são conhecidas por infectar humanos. A doença apresenta-se em três formas principais, diferenciam-se quanto à distribuição geográfica da espécie do parasito e de vetores (Jones et al., 1987; Sampaio et al., 1997). A forma mais prevalente entre os países é a Leishmaniose Cutânea com mais de 70% dos casos de Leishmaniose (Alvar et al., 2012) sendo amplamente distribuída em diferentes continentes (Alvar et al., 2012; Pigott et al., 2014).

O amplo espectro clínico das Leishmanioses está associado às espécies de *Leishmania* envolvidas na infecção, distribuição de vetores, resposta

imunológica e aspectos genéticos do hospedeiro (Blackwell et al., 2009; Ameen, 2010; Pigott et al., 2014; Kevric et al., 2015; DaMata et al., 2015; Scott e Novais, 2016). Os insetos transmissores das Leishmanioses do Velho Mundo (Ásia, África e Europa) e Novo Mundo (América) são identificados como *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, respectivamente (Pigott et al., 2014; Kevric et al., 2015). No Brasil, as espécies de vetores *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* são responsáveis pela transmissão de *L. (L.) infantum*, espécie causadora da forma Visceral. A forma Tegumentar é causada por diferentes espécies, entre elas: uma do subgênero *Leishmania*, *L. (L.) amazonensis* e espécies do subgênero *Viannia*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* (Grimaldi e Tesh, 1993). Aspectos imunológicos e genéticos do hospedeiro humano relacionados ao resultado da doença serão discutidos a seguir.

Atual conhecimento evidencia uma melhor compreensão da resposta imunológica do hospedeiro humano em infecções que causam Leishmaniose Visceral em comparação à Leishmaniose Tegumentar (Gollob et al., 2014). Possivelmente devido à importância da infecção estritamente associada à letalidade dos casos, algo que as autoridades buscam reduzir em anos atuais, como realizado em Bangladesh (WHO). A Leishmaniose Tegumentar também apresenta impacto na saúde pública, a forma predominante no continente americano, com considerável morbidade e também letalidade dos casos mais graves da doença. A identificação de moléculas de superfície do parasito tem sido apontada como importante alvo para desenvolvimento de vacina, entretanto, até o momento, não há vacina para a Leishmaniose (Mendonça et al., 2015). Diferentes estudos imunológicos têm relatado importantes marcadores moleculares relacionados com o resultado da doença, e seu envolvimento com a resistência natural a infecção. Este estudo visa relatar avanços quanto à compreensão dos aspectos imunológicos da Leishmaniose Tegumentar, com destaque para a LC, ocorridos nos últimos anos.

2. Metodologia

O levantamento bibliográfico foi realizado em bancos de dados, *Medline* (via pubmed), Scientific Eletronic Library Online (SciELO), *World Health Organization* (WHO) e Ministério da Saúde. O período da pesquisa foi realizado de Outubro de 2014 a Julho de 2019. A busca de artigos científicos incluídos neste estudo foi realizada com as seguintes palavras-chave: “*Immune response Leishmania*”, “*Immunopathogenesis Leishmaniasis*”, “*Clinical forms Leishmaniasis*”, “*Cutaneous Leishmaniasis inflammation*”, “*Leishmania guyanensis cytokines*”, “*Cutaneous Leishmaniasis Lesion*”, “*Macrophage Leishmania*”, “*Lymphocyte Th Leishmaniasis*”, “*Regulatory response Leishmaniasis*”, “*Mouse Leishmania resistance*”, “*Mouse knockout Leishmania*”, “*miRNA immune response infectious diseases*”, “*Genetic polymorphism Leishmania*”. Artigos originais na língua portuguesa e inglesa foram avaliados e selecionados contendo tema relacionado à busca. Os artigos selecionados consistiam de estudos de revisão bibliográfica, estudos clínicos e/ou experimental, estudo genético e/ou funcional de associação caso-controle; informações extraídas foram de acordo com o tipo de estudo e resultados obtidos pela pesquisa.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Manifestações clínicas das Leishmanioses

As manifestações clínicas da Leishmaniose apresentam duas formas principais: a Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT), que diferem quanto à espécie do parasita causador da doença no ser humano (Sampaio et al., 1997; BRASIL, 2007).

A Leishmaniose Visceral está relacionada aos casos letais da doença, causando manifestações clínicas mais graves com acometimento de órgãos como fígado e baço, muitos dos casos evoluem a óbito (Gontijo e Carvalho, 2003).

A Leishmaniose Tegumentar apresenta um amplo espectro clínico e sua classificação é decorrente do número de lesões cutâneas e outras regiões afetadas, como as mucosas. A necessidade de classificar corretamente cada forma clínica possibilita a aplicação de tratamento adequado ao paciente. A LT é classificada em: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), a Cutânea Difusa (LCD), Disseminada (LD) e a forma Mucocutânea (LM) (BRASIL, 2007). A forma cutânea pode apresentar desde lesão única a múltiplas lesões cutâneas. A forma difusa e disseminada apresenta inúmeras lesões pelo corpo e alterações da resposta imunológica do paciente. A mucocutânea pode ainda apresentar lesões cutâneas e acometimento de regiões da mucosa (Marzochi e Marzochi, 1994).

A Leishmaniose Cutânea Localizada se caracteriza por lesões de pele mais superficiais, variando de 1 a 6 lesões de pele ulcerada. O local da lesão consiste no ponto de inoculação do parasita. Essa forma clínica está mais associada às infecções pela *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* (Goto e Lindoso, 2010; Gontijo e Carvalho, 2003).

A Leishmaniose Cutânea Difusa é caracterizada por apresentar múltiplas lesões de pele, lesões do tipo nodular ou pápula distribuídas por todo o corpo como na face e pelo tronco. Os indivíduos acometidos apresentam parasitemia elevada e dificuldades em responder ao tratamento (Goto e Lindoso, 2010; Moraes e Silveira, 1994). Estas apresentações clínicas são associadas a infecções causadas por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (BRASIL, 2007; Ministério da Saúde, 2007).

A Leishmaniose Disseminada destaca-se como forma intermediária em relação à forma LCD, com lesões crônicas em forma de placa e evoluem com múltiplas lesões nodulares não ulceradas. Os pacientes que apresentam essa forma da doença apresentam resposta imune celular parcialmente inibida ou anérgica. As manifestações clínicas estão principalmente associadas a infecções por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (Silveira et al., 2004; Silveira et al., 2008^a; Silveira et al., 2008^b).

A Leishmaniose Mucosa apresenta a forma clínica mais agressiva da doença, consistindo em lesões infiltradas e ulceradas com evolução para

destruição de tecidos mucosos. As regiões da cavidade nasal, faringe e laringe são as mais acometidas (Veloza et al., 2006; Goto et al., 2010). Estas manifestações clínicas são menos frequentes, com aproximadamente de 3-5% dos casos das LT e está comumente associada a infecções pela *L. (V.) braziliensis* (Llanos-Cuentas et al., 1984; Veloza et al., 2006).

3.2 Protozoário *Leishmania* e interação parasito-hospedeiro

A Leishmaniose causada pelo protozoário *Leishmania* pertence à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* (Simpson, 1987). O gênero *Leishmania* é constituído por mais de 20 espécies classificadas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, parasita adaptado a infectar hospedeiros animais, animais silvestres e seres humanos. O ciclo biológico da *Leishmania* envolve hospedeiros vertebrados e invertebrados, entre estes diferem as formas evolutivas do protozoário (Killick-Kendrick, 1999).

O protozoário *Leishmania* pode ter evoluído a partir de ancestral comum adaptado e com relação de endossimbiose ao seu hospedeiro, no entanto aqueles da ordem *Kinetoplastida* foram definidos como parasitas obrigatórios. Estima-se que as diferentes espécies de *Leishmania* evoluíram a partir de uma infecção de hospedeiro imunocomprometido, adaptaram-se com importante aspecto de manipular as células do hospedeiro e resistir aos mecanismos de eliminação das células fagocíticas (Lukes et al., 2014). Apresenta importantes moléculas de superfície e constantemente são secretadas pelo parasita *Leishmania*, lipofosfoglicano (LPG), glicoproteína gp63, glicosilinositol fosfolípido (GIPL) e peptidases cisteína, com evidências de envolvimento destas moléculas na sobrevivência do parasito e na regulação das ações das células do sistema imune como de macrófagos (Olivier et al., 2005).

O *Leishmania* apresenta diferentes moléculas de superfícies, essenciais para interação e manipulação das células do hospedeiro, são abundantes em promastigotas e estão envolvidas nos processos de interação com receptores presentes nas células do hospedeiro (Naderer et al., 2004; Naderer et al., 2008; Assis et al., 2012). A presença dessas moléculas na superfície de amastigotas auxilia na sobrevivência nos fagossomos de macrófagos, atuam no transporte de nutrientes essenciais como vitaminas e aminoácidos além de proporcionar

resistência aos componentes microbicidas dos macrófagos (Sacks e Kamhawi, 2001; Naderer et al., 2004; Guimarães-Costa et al., 2009; Naderer e Mcconville, 2011). A secreção de fosfatase pelo parasita está relacionada à regulação das atividades celulares através da desfosforilação de proteínas quinase MAP-1 e MAP-2 e que afetam a ativação de enzimas celulares (Nandan et al., 1999).

As formas apresentadas pelo parasita destacam a eficiência em sobreviver e resistir às ações imunológicas do hospedeiro. A forma amastigota demonstra atuar sobre as células do sistema fagocítico mononuclear. Quando não eliminado, consegue manipular especialmente células apresentadoras de antígenos, reduzindo a sua atividade na estimulação de uma resposta imune adequada para eliminação do parasita (Soong, 2008).

As infecções causadas por parasitas *Leishmania* necessitam de ações das células dendríticas e de linfócitos. Estas células regulam as ações inatas e adaptativas do sistema imune, uma vez que a falta de atividade destas células é determinante para a evolução da doença.

O perfil de linfócitos apresentados na resposta imune adaptativa do hospedeiro reflete nos aspectos de resistência a infecção, assim como a patogenicidade das lesões cutâneas. As formas graves da Leishmaniose, visceral e difusa, são caracterizadas pela ausência da produção de citocinas do tipo Th1 (Gollob et al., 2014). A diferenciação das respostas em Th1 e Th2 é dependente da apresentação de antígenos pelas células dendríticas após contato com o *Leishmania*. Em lesões cutâneas ativas, há predominância de linfócitos T-CD4⁺ com produção de citocinas de diferentes perfis de respostas, tipo Th1 e Th2 (Coutinho et al., 1996). Elevadas concentrações de citocinas como Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interferon gama (IFN- γ) estão associadas com a proteção à infecção em lesões ativas de pacientes com a forma cutânea (Castellano et al., 2009). Em resumo, a resposta imunológica frente ao *Leishmania* constituída por linfócitos T-CD4⁺ e T-CD8⁺ favorece a eliminação do parasita (Coutinho et al., 1996).

A resposta imunológica à infecção por *Leishmania* também é determinante para desenvolvimento de lesões cutâneas. Em comparação a relatos anteriores, atualmente a Leishmaniose Cutânea é mais compreendida pela falta do equilíbrio das ações das respostas Th1 e Th2 (Castellano et al., 2009). Níveis elevados de linfócitos T-CD4⁺ e T-CD8⁺ estão também associados com a gravidade da Leishmaniose Cutânea (Santos e Brodskyn, 2014). A resposta imunológica eficaz para eliminação do parasita e ausência de lesões, como em indivíduos assintomáticos, é compreendida pelo envolvimento de elementos regulatórios das respostas imunológicas, com citocinas IL-10, TGF- β e IL-1Ra, favorecendo um equilíbrio das ações e regulação da resposta inflamatória (Bittar et al., 2007).

Deste modo, o componente imunológico do hospedeiro é determinante para o resultado da doença e suas manifestações clínicas. Curiosamente, o equilíbrio da resposta imunológica favorece a eliminação do parasita, entretanto, ausência de elementos que regulam a resposta inflamatória deve resultar no desenvolvimento de lesões ulceradas características da Leishmaniose Tegumentar.

3.3 Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar

A apresentação de diferentes formas clínicas das Leishmanioses está relacionada às infecções causadas por diferentes espécies de *Leishmania* e à resposta imune apresentada pelo hospedeiro humano. Estudos em modelos experimentais nos últimos anos têm demonstrado diferenças na Leishmaniose entre espécies distintas de *Leishmania* (DaMata et al., 2015; Scoot e Novais, 2016). A LC tem sido relacionada à maior patogenicidade da doença em infecções causadas por *L. amazonensis* em comparação a *L. guyanensis* (DaMata et al., 2015). As diferenças na patogênese estão relacionadas à expressão de moléculas imunomodulatórias, como descrita em infecções por *L. amazonensis* (Cortez et al., 2011). Os aspectos imunogenéticos dos hospedeiros podem ser determinantes para o resultado da doença (Bourreau et al., 2007; Silveira et al., 2008^a; Ameen, 2010).

As moléculas de superfície presentes no parasito desencadeiam diferentes reações sobre o hospedeiro humano. As glicoproteínas e o

lipofosfoglicano são responsáveis por inativar a ação lítica das proteínas do sistema complemento, e conseguinte as promastigotas metacíclicas utilizam os receptores de complemento presentes nos fagócitos como uma das formas de entrada e internalização na célula (Russel e Talamas-Rohama, 1989; Puentes et al., 1990). As amastigotas apresentam resistência à ação de enzimas lisossomais e aos componentes microbicidas naturais dos macrófagos (Figura 1C) (Murray, 1982; El-On et al., 1980; Sacks e Kamhawi, 2001; Naderer et al., 2004; Naderer et al., 2011). Assim, o protozoário *Leishmania* consegue resistir e evadir da resposta imunológica do hospedeiro humano.

As células fagocíticas, monócitos, macrófagos e neutrófilos são importantes alvos para o reconhecimento e infecção pelo *Leishmania* (Figura 1B-C). As sucessivas infecções pelo parasita resultam na apresentação das manifestações clínicas com desenvolvimento de lesão ulcerada (Gollob et al., 2014). O paciente sintomático não apresenta resistência ao parasita com posterior evolução para o desenvolvimento de lesão em forma de úlcera com bordas bem delimitadas e granulações grosseiras (Figura 1A).

Algumas formas clínicas apresentadas na LT, como em pacientes com a Leishmaniose Difusa, não apresentam resistência à *Leishmania*, pois apresentam imunidade mediada por células reduzida e geralmente são negativos ao teste intradérmico de Montenegro. Enquanto os pacientes com Leishmaniose Mucosa apresentam intensa imunidade mediada por células, porém, a resposta é ineficaz na eliminação do parasita (Scott e Novais, 2016).

A LC é caracterizada pela apresentação de lesões iniciais em forma de pápula ou pequeno nódulo, e de acordo com a resposta imune do hospedeiro desenvolvida, esta pode evoluir para a cura da doença ou para o desenvolvimento de lesões ativas ulceradas (Figura 1A). As lesões iniciais e tardias são caracterizadas por apresentar diferentes aspectos imunológicos (Figura 1C) (Faria et al., 2009; Gollob et al., 2014); como em lesões iniciais de pacientes infectados por *L. braziliensis*, que apresentam infiltrado de polimorfonucleares (PMN), neutrófilos e eosinófilos em comparação a lesões ulceradas (Faria et al., 2009). Enquanto em lesões tardias ulceradas são notáveis aumento de células como macrófagos, linfócitos T CD4+ e T CD8+

(Figura 1C) (Faria et al., 2009; Saldanha et al., 2017); destacando a superatividade dos linfócitos T-citotóxicos nestas lesões (Faria et al., 2009). Portanto, a progressão da doença para lesões ulceradas está associada ao perfil de células presentes no infiltrado inflamatório durante as respostas imunológicas iniciais que falham em eliminar o parasita.

A evolução para lesões ulceradas de Leishmanioses causadas por *L. braziliensis* não estão associadas à carga parasitária, e sim à participação de macrófagos M1 (Figura 1C). Segundo Saldanha e colaboradores (2017), a elevada quantidade de amastigotas tem sido identificada em lesões iniciais papulares em comparação às lesões tardias (Figura 1C). Neste estudo, as lesões tardias foram definidas com tempo de doença superior a 30 dias (Saldanha et al., 2017). Em diferentes lesões foram observadas correlações positivas entre o número de amastigotas e presença de macrófagos CD68+ (macrófagos M1).

As infecções causadas por espécies distintas de *Leishmania* foram associadas às diferentes formas de morte celular dos macrófagos. Infecções causadas por *L. amazonensis* estimulam a apoptose de macrófagos infectados, enquanto as infecções por *L. guyanensis* causam a morte celular através da necrose das células fagocíticas (DaMata et al., 2015).

O desenvolvimento de lesões de pele causada pela infecção por *L. braziliensis* está associado ao reconhecimento inicial da *Leishmania* e à produção de citocinas IL-1 β (Figura 1B). As células mieloides, monócitos, macrófagos e neutrófilos apresentam significativos níveis de pró-IL-1 β em comparação aos camundongos com linfócitos T CD8⁺ inativos. Os diferentes experimentos demonstram a combinação existente entre os elevados níveis de IL-1 β apenas na presença de linfócitos T CD8⁺ ativos. Entretanto, a redução do tamanho da lesão somente foi observada na presença de anticorpos para o receptor de IL-1 (anti-IL1R) ou para a citocina (anti-IL1). Deste modo, a ação combinada de linfócitos T-citotóxicos e elevada produção de IL-1 β influenciam diretamente para resposta inflamatória exacerbada (Figura 1C), que são responsáveis pelo desenvolvimento de lesões ulceradas (Novais et al., 2017).

O desenvolvimento e falta de equilíbrio das respostas imunes adaptativa têm sido associadas com a Leishmaniose, resultando em elevada resposta inflamatória e dano tecidual. A ativação excessiva de determinadas populações de células T que regulam as respostas Th1 pode ser determinante para a evolução da doença (Gollob, 2014) como ativação da resposta Th17 (Gonzales-Lombana et al, 2013). Em lesões ulceradas de pacientes infectados por *L. braziliensis* foram identificadas a presença de células com elevada expressão de IFN- γ e IL-10 em comparação às lesões iniciais (Faria et al., 2009). Embora as citocinas TNF- α e IFN- γ sejam associadas com a resolução da doença através da eliminação do parasita, os níveis elevados de IFN- γ tem sido relacionados com a patogênese de lesões tardias em pacientes infectados por *Leishmania* (Figura 1C). Elevada produção de IFN- γ também tem sido associada ao desenvolvimento das formas mais graves da Leishmaniose (Bittar et al., 2007; Faria et al., 2009; Dutra et al., 2011), assim como, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em resposta a antígenos *Leishmania* apresentam significativa produção de IFN- γ (Bottrel et al., 2001).

Níveis elevados de IL-4, IL-10 e IL-13 e baixa produção de IFN- γ foram observados em amostras de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e biópsias de lesões de pacientes infectados por *L. guyanensis* (Bourreau et al., 2001; Bourreau et al., 2007). Embora estimulados com IL-12, PBMC de indivíduos infectados por *L. guyanensis* apresentaram níveis similares de IFN- γ em comparação ao encontrado nas lesões (Bourreau et al., 2001^a). Portanto, pacientes infectados por *L. guyanensis* são caracterizados por apresentar regulação negativa das ações da resposta Th1, resposta protetora contra o parasita.

A citocina IL-17 produzida pela resposta Th17 também atua na regulação dos níveis de IFN- γ em infecções por *Leishmania*. O papel da resposta mediada por linfócitos Th17 na Leishmaniose tem sido evidenciado recentemente (Gonçalves-Albuquerque et al., 2017). A citocina IL-17 atua no recrutamento especialmente de neutrófilos para o local da infecção (Tesmer et al., 2008). Diferentes estudos destacam o envolvimento da citocina IL-17 com a patogênese de lesões, em infecções causadas por *L. major*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* (Figura 1C) (Gonzales-Lombana et al, 2013;

Oliveira et al., 2014; Gonçalves-Albuquerque et al., 2017). A citocina IL-17 contribui para resposta inflamatória e dano tecidual na Leishmaniose Cutânea e Mucosa (Gonzales-Lombana et al, 2013; Oliveira et al., 2014), assim como atua na regulação da citocina IFN- γ .

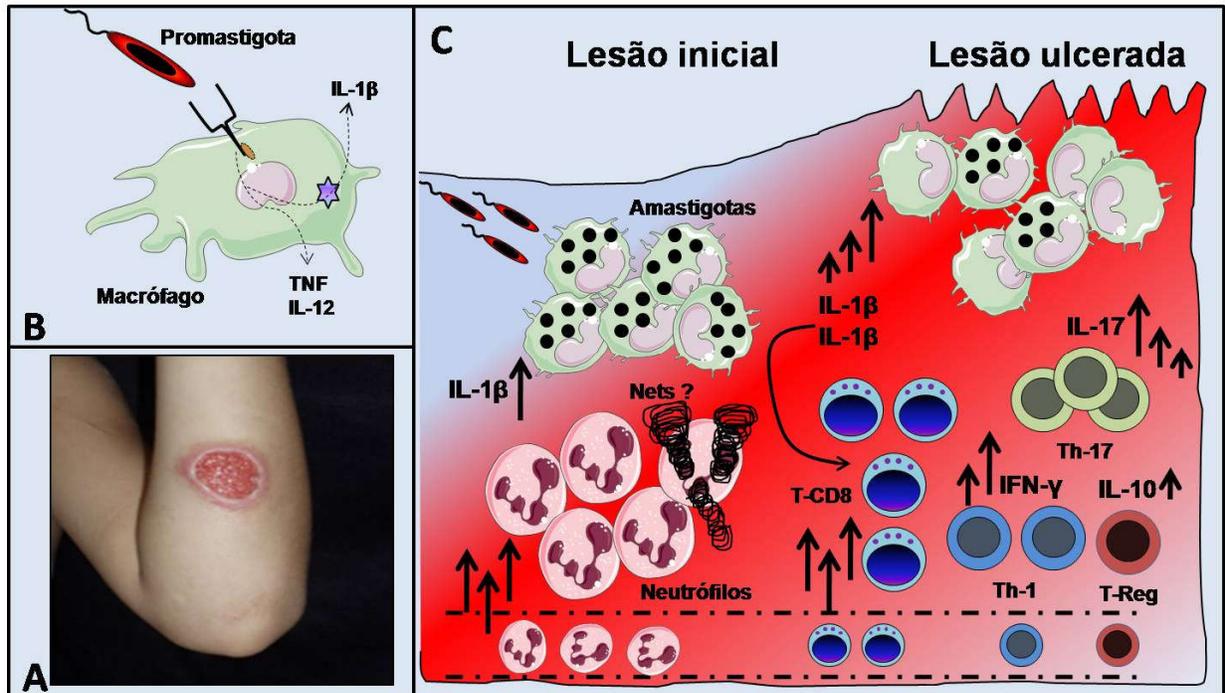


Figura 1: Esquema representativo da Imunopatogênese da Leishmaniose Cutânea. (A) Lesão ulcerada característica de Leishmaniose Cutânea causada por *Leishmania guyanensis*. (B) Reconhecimento da forma promastigota metacíclica pelos macrófagos residentes e produção de citocinas pró-inflamatórias. (C) Resposta inflamatória em lesões iniciais e tardias com o desenvolvimento de lesão ulcerada. Em lesão inicial é caracterizada pelo aumento no número de amastigotas em macrófagos infectados com produção de citocinas IL-1 β e de neutrófilos no local da infecção. Em lesões ulceradas encontram-se poucos macrófagos infectados por amastigotas, porém aumento da produção de citocinas IL-1 β e IL-17 que contribuem para a patologia; a ativação de linfócitos T-CD8 combinado com IL-1 β e participação de resposta Th17 têm sido relatadas em estudos anteriores.

3.4 Resposta imunológica à Leishmania

As respostas imunológicas frente ao protozoário da *Leishmania* têm início após inoculação das formas promastigotas metacíclicas durante atividade hematofágica do vetor ao hospedeiro humano (Figura 2A) (Mosser et al., 1985). Como a *Leishmania* é um parasita intracelular obrigatório, a imunidade mediada por células é importante para a eliminação deste patógeno.

Inicialmente, os macrófagos são infectados pela promastigota metacíclica, e estes são responsáveis pela eliminação dos parasitas fagocitados. Os indivíduos assintomáticos são capazes de limitar a evolução da infecção através do controle da replicação das amastigotas no interior de macrófagos (Gollob et al., 2014). As células T e NK são estimuladas a produzir IFN- γ através da citocina IL-12 (Figura 2B) e ativam a produção dos componentes microbicidas dos macrófagos da via clássica relacionada à proteção e resistência a infecção por *Leishmania* (Figura 2F) (Novais et al., 2009; Sousa-Franco et al., 2006; Saldanha et al., 2017; Glennie et al., 2017).

3.4.1 Resposta imune inata à *Leishmania*

A imunidade inata à *Leishmania* é mediada através das células fagocíticas, monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Figura 2A) (Scoot e Novais, 2016). O início das respostas imunológicas é caracterizado pela chegada de células fagocíticas e de proteínas do sistema complemento (Figura 2C), mecanismos envolvidos como primeira linha de defesa contra os micro-organismos (Mosser et al., 1985).

A proteína lectina ligadora de manose (MBL) atua na ativação do sistema complemento, esta resulta na lise e aumento de fagocitose do *Leishmania*. A alta expressão das proteínas MBL tem sido sugerida estar associada com a proteção a infecção causada por *L. guyanensis* (Araujo et al., 2015^a). Portanto, indivíduos que apresentam baixa expressão de MBL são mais suscetíveis ao desenvolvimento da LC.

As células dendríticas (DC) destacam-se entre as células fagocíticas infectadas pela *Leishmania* após a inoculação do parasita (Figura 2A). As DC são cruciais para o direcionamento das respostas imunológicas (Figura 2E), além de suas interações com a *Leishmania* serem determinantes para a evolução da doença (Liu e Uzonna, 2012). As DC quando infectadas pelas diferentes formas do parasita, apresentam diferentes níveis de expressão da citocina IL-12p40. A infecção pela forma promastigota resulta em maior expressão mRNA IL-12p40 em comparação à infecção causada pela amastigota (Soong, 2008).

Estudos realizados com camundongos C57BL/6 identificaram populações distintas de DC, que apresentam diferentes formas de responder a infecção causada por *Leishmania* (Henri et al., 2002). No tecido cutâneo são identificadas populações de células dendríticas: as células de langerhans e dois tipos de células dendríticas migratórias convencionais (Soong, 2008; Liu e Uzonna, 2012). As diferentes espécies de *Leishmania* são capazes de suprimir a ativação das DC, afetando a imunidade mediada pelas células T (Bottrel et al., 2001; Feijó et al., 2016). Assim como, as células de langerhans têm sido relacionadas com a regulação das respostas efetoras ao estimular a resposta T regulatória em infecções causadas por *L. major*. Portanto, a imunidade efetora é iniciada por células dendríticas convencionais capazes de produzir IL-12p40 e IFN- γ (Figura 2E) (Henri et al., 2002; Kautz-Neu et al., 2011).

As respostas inflamatórias com neutrófilos e macrófagos são relacionadas com a proteção e cura da lesão, acompanhada pela redução da parasitemia em infecções causadas por *L. major*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. chagasi* (Figura 2D) (Novais et al., 2009). Estudo experimental realizado com camundongos C57BL/6 relata rápida resposta inflamatória nas primeiras horas após a inoculação do parasito, ocorrendo inflamação rica de neutrófilos e macrófagos (Figura 2C) (Ribeiro-Gomes et al., 2012). As quimiocinas MCP-1 e CXCL-8 atuam no recrutamento destas células fagocíticas para o local da infecção (Goncalves et al., 2011).

Diferentes estudos realizados têm apresentado definições contraditórias quanto ao papel dos neutrófilos durante as respostas iniciais ao parasita. Entre as diferentes formas de morte celular dos neutrófilos, a *NETosis* é a morte que resulta na formação de armadilhas extracelulares (NETs) e liberação de enzimas como elastases e colagenases (Guimarães-Costa et al., 2009). O envolvimento destas armadilhas com a resistência a infecções por *L. amazonensis* tem sido relatada, apresentando efeito leishmanicida (Guimarães-Costa et al., 2009). Contudo, resultados contraditórios foram observados na infecção causada por *L. braziliensis*. A formação de NETs está associada à suscetibilidade à infecção por *L. braziliensis* e evolução da doença, com aumento da parasitemia (Figura 1C) (Morgado et al., 2015). Estes resultados contraditórios podem ser devido a diferenças existentes quanto à expressão de

moléculas LPG apresentadas pelo parasita, uma vez que o lipofosfoglicano induz a formação de NETs durante a infecção (Guimarães-Costa et al., 2009).

As células fagocíticas, como as dentríticas e macrófagos são inativadas após ingerir neutrófilos infectados por *Leishmania* (Ribeiro-Gomes et al., 2012). Deste modo, os neutrófilos podem atuar como “Cavalo de Tróia” em infecções causadas por *Leishmania*, contribuindo para evolução da Leishmaniose e aumento da parasitemia (Laskay et al., 2003). A detecção de células apoptóticas pelos macrófagos resulta na ativação e polarização para macrófago da via alternativa (macrófago M2), célula destinada para reparo tecidual e regulação da inflamação (Bohlsón et al., 2014). Porém, o papel destas armadilhas em infecções causadas por *L. guyanensis* ainda não está totalmente compreendido.

Estudo experimental com camundongos C57BL/6 destaca a importância dos receptores do tipo Toll (TLR) e de moléculas adaptadoras para TLRs no reconhecimento inicial de *L. guyanensis*. Camundongos knockout para proteína adaptadora MyD88 ou para TLR-9 falham em induzir respostas inflamatórias após infecção por *L. guyanensis* e conseqüentemente apresentam progressão da doença com desenvolvimento da resposta Th2 e aumento da parasitemia (Glennie et al., 2017). MyD88 associa-se a diferentes receptores TLRs atuando na amplificação da transdução de sinal celular. A ação da proteína Myd88 pode estar relacionada à maior produção de IFN- γ por estimular a produção de IL-12p40 nas infecções por *Leishmania* (Naik et al., 2012; Glennie et al., 2017), o IFN- γ estimula a produção de reativos de oxigênio e de óxido nítrico, essencial para eliminação da infecção causada por *L. guyanensis* (Figura 2F) (Sousa-Franco et al., 2006).

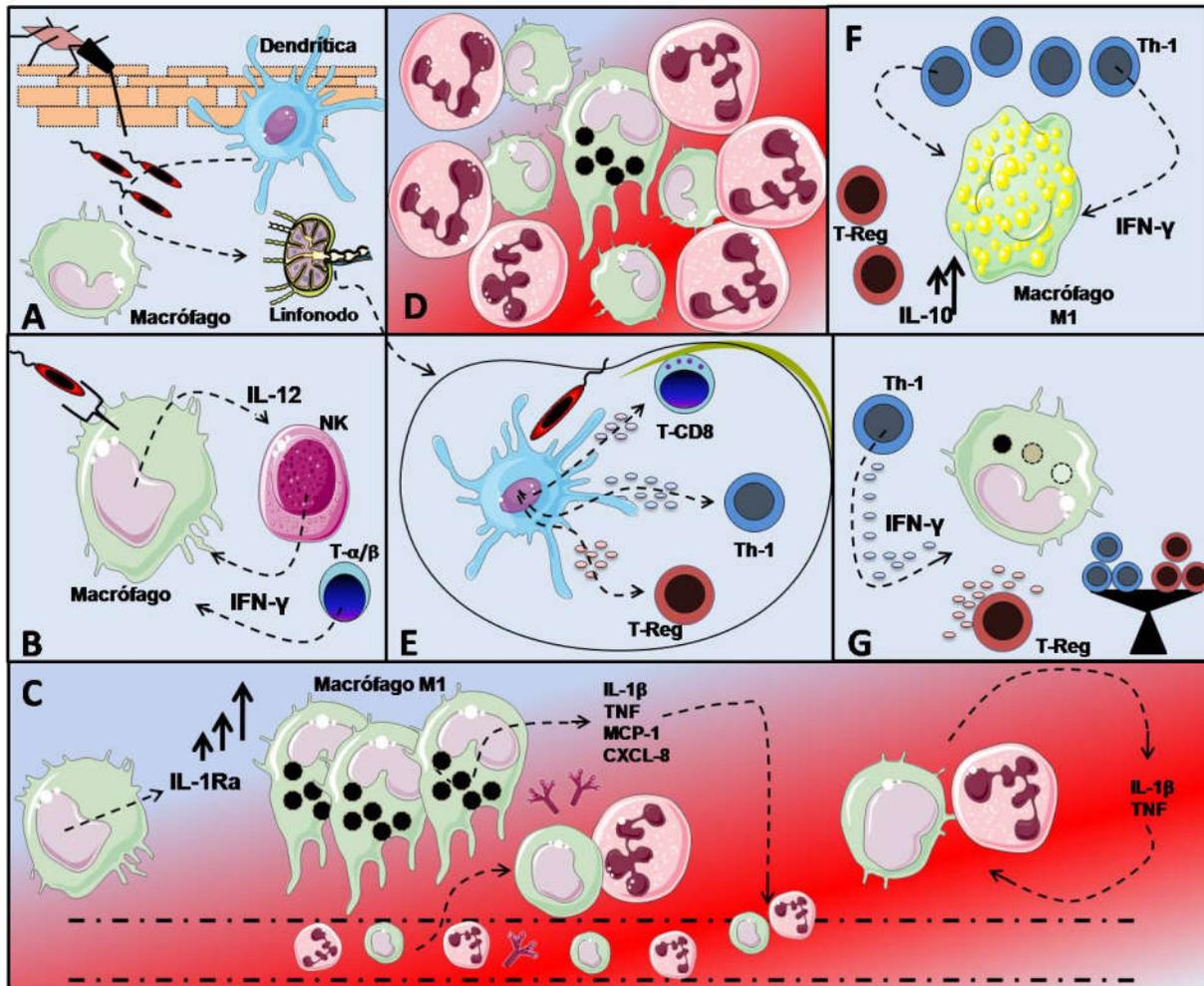


Figura 2: Esquema representativo da Resposta Imunológica à *Leishmania*. (A) Células envolvidas na resposta inicial à infecção causada por *Leishmania*. (B) Ativação inicial de macrófagos e produção de citocinas IL-12 e IFN- γ por células NK e linfócitos inatos T- α/β . (C) Resposta inflamatória inicial com neutrófilos, macrófagos e proteínas do complemento. (D) A resposta inflamatória com neutrófilos e macrófagos relacionada à redução da parasitemia. (E) Migração de células dendríticas para o linfonodo regional e ativação da resposta imune adaptativa, T-citotóxico (CD8), T-auxiliar Th1 e ativação de linfócitos T-regulatório. (F) Resposta imune adaptativa na ativação de macrófagos M1 acompanhada de resposta T-regulatória. (G) Resposta imune adaptativa essencial para eliminação da *Leishmania*, equilíbrio nos níveis de citocinas IFN- γ e IL-10 são determinantes para eliminação do parasito.

As células linfoides inatas (ILCs) incluem diferentes subgrupos de linfócitos, que são originados na medula óssea e pertencem à imunidade inata. Estes linfócitos apresentam receptores com diversidade limitada e estão localizados estrategicamente em regiões anatômicas para responder no momento inicial da infecção (Abbas et al., 2015). Entre estes linfócitos estão os linfócitos T duplo-negativos, negativos para CD4 e CD8, que são caracterizados por expressar receptor gama (γ) e delta (δ) ou receptor alfa (α) e beta (β). Entre indivíduos saudáveis e pacientes com Leishmaniose Cutânea são observadas diferenças quanto à distribuição dos linfócitos duplo-negativos,

com baixa frequência de linfócitos T duplo-negativo associada ao desenvolvimento de lesões mais graves (Antonelli et al., 2006).

Os linfócitos T α/β são constantemente encontrados como células circulantes no sangue periférico de pacientes com Leishmaniose Cutânea (Antonelli et al., 2006), enquanto em indivíduos controles 75% dos linfócitos duplo-negativos são linfócitos T γ/δ . Os linfócitos T α/β estão associados ao perfil de citocinas pró-inflamatórias, enquanto os linfócitos T γ/δ com perfil de citocinas regulatórias (Antonelli et al., 2006). A distribuição de linfócitos T duplo-negativos é determinante para o equilíbrio da produção de citocinas em infecções por *Leishmania* (Bottrel et al., 2001; Antonelli et al., 2006), em destaque aqueles que produzem IFN- γ (Figura 2B) (Antonelli et al., 2006). Em pacientes com Leishmaniose Cutânea, infectados por *L. braziliensis*, os linfócitos T duplo-negativos consistem a segunda população de células mais frequentes e produtoras da citocina de IFN- γ (Bottrel et al., 2001). Portanto, estas células apresentam importante papel nas respostas imunes frente ao parasito.

3.4.1.1 Polarização de macrófagos em infecções por *Leishmania*

Em infecções causadas por *Leishmania*, o subgrupo de macrófagos envolvido na infecção é determinante para o resultado e evolução da Leishmaniose. O envolvimento e ativação de macrófagos em infecções por *Leishmania* é crucial para resistência e/ou desenvolvimento de lesões e patogenicidade (Tomiotto-Pellissier et al., 2018).

O desequilíbrio da polarização de macrófagos para Macrófagos M1 (clássico) e de Macrófagos M2 (alternativo) tem sido relatado em diferentes infecções por *Leishmania spp.*, espécies relacionadas às formas Cutânea e Visceral. A polarização para Macrófagos M2 é observada na Leishmaniose Visceral e está associado à gravidade da doença devido ausência de efeitos microbicidas apresentados neste fenótipo (Chan et al., 2012), destacando a importância dos macrófagos M1 no controle da infecção. Por outro lado, em infecções cutâneas, que são caracterizadas por uma resposta inflamatória exacerbada, apresentam polarização para macrófagos M1 (Figura 2C), a resposta imunológica é caracterizada pelos altos níveis de citocinas pró-

inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , determinante para o desenvolvimento de lesões ulceradas.

Estudo experimental com camundongos C57BL/6 e BALB/c evidencia envolvimento de macrófagos clássico e da via alternativa em infecções por *Leishmania* na Leishmaniose Cutânea. Camundongos submetidos a infecções por *L. amazonensis* e *L. guyanensis* e, acompanhados por 10 semanas apresentam diferenças quanto à evolução da doença entre diferentes espécies (DaMata et al., 2015). As diferenças quanto ao desenvolvimento de lesões destacam o envolvimento de Macrófagos M1 (clássico) e de Macrófagos M2 (alternativo) em lesões de infecções por *L. guyanensis* e *L. amazonensis*, respectivamente. Macrófagos M1 são essenciais para eliminação do parasita *Leishmania* (Naderer et al., 2004; Naderer et al., 2011).

Macrófagos com fenótipos M1 e M2 diferem quanto a apresentação de marcadores moleculares e produção de citocinas, apresentando efeitos pró-inflamatório e anti-inflamatório, respectivamente (Tomiotto-Pellissier et al., 2018). Macrófagos M1 são responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos, monócitos, células NK e linfócitos, enquanto macrófagos M2 recrutam linfócitos B e T do tipo Th2, monócitos e eosinófilos.

A polarização de macrófagos em locais de lesões pode ser influenciada por sinais químicos presente no microambiente e por produtos químicos liberados pela saliva do vetor (Tomiotto-Pellissier et al., 2018). O perfil de linfócitos inatos difere entre pacientes com Leishmaniose e indivíduos saudáveis, como descrito anteriormente (Antonelli et al., 2006), sugere a presença de linfócitos inatos pró-inflamatórios que podem influenciar na polarização de macrófagos M1. Entretanto, produtos presentes na saliva do vetor atuam como imunomoduladores, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e componentes microbicidas, com isso havendo redução de macrófagos M1 e, aumento de macrófagos M2 e citocinas do tipo Th2 no curso da infecção (Tomiotto-Pellissier et al., 2018).

3.4.3 Resposta Imune adaptativa à *Leishmania* é determinante para o resultado da Leishmaniose

A ativação inicial das respostas imunológicas é essencial para o progresso da doença, uma vez que o protozoário utiliza as células fagocíticas para realizar sua replicação. A resposta imune mediada por células é a principal resposta efetora dos linfócitos TCD₄⁺ Th1 que atuam contra parasitas intracelulares obrigatórios (Figura 2F) (Abbas et al., 2015).

O desenvolvimento inicial da resposta imune adaptativa é determinante para a cura ou para evolução da Leishmaniose (Scoot, 2016). A reação inflamatória é acompanhada simultaneamente pela ação de células dendríticas, que migram para os linfonodos e apresentam antígenos aos linfócitos T, em conjunto com sinais coestimulatórios e as citocinas produzidas que estimulam a diferenciação dos linfócitos T (Xu et al., 2004). Estudos demonstraram o importante papel das células dendríticas do tecido cutâneo na ativação de linfócitos T através da apresentação de antígenos da *Leishmania* (Blank et al., 1993; Moll, 1993; Akuffo et al., 1993).

As células dendríticas apresentam os antígenos aos linfócitos T através das moléculas de MHC classe I e de classe II, e também moléculas CD1 que atuam na apresentação de lipídeos. Após a apresentação de antígenos, as células dendríticas estimulam através da citocina IL-12 a ativação dos linfócitos Th1 (Figura 2E), responsáveis por mediar a resposta imune relacionada à resistência a *Leishmania*. A IFN- γ produzida por linfócitos Th1 estimula os macrófagos a produzirem seus componentes microbicidas e eliminar o parasita fagocitado (Figura 2F) (Henri et al., 2002; Kautz-Neu et al., 2011; Scoot e Novais, 2016).

Diferentes modelos experimentais destacam a importância das respostas imunes adaptativas no controle da infecção causada por *Leishmania*. As diferentes espécies de camundongo são caracterizadas por apresentarem determinados perfis imunológicos, como Th1 e Th2 em camundongos C57BL/6 e BALB/c respectivamente, conferindo total proteção ou suscetibilidade a infecção por *Leishmania* (DaMata et al., 2015).

Em pacientes com leishmaniose cutânea (LC), existe uma correlação positiva entre o número de monócitos do sangue periférico produzindo TNF e IL-10 com a forma mais branda da Leishmaniose. Diferenças nas intensidades das respostas imunes celular são observadas entre diferentes infecções, como uma superior produção de IFN- γ e TNF- α em infecções por *L. (V.) braziliensis*, enquanto em pacientes com *L. (V.) guyanensis* são caracterizadas por apresentar uma resposta imune celular menos intensa relacionada a um maior número de parasitas (Figura 1C) (Convit et al., 1993; Matta et al., 2009).

A resposta imune adaptativa Th1 está associada à eliminação da *Leishmania*, porém é evidente a importância da regulação desta resposta imunológica. A resposta Th1 quando exacerbada também está relacionada ao desenvolvimento da Leishmaniose. A ativação da resposta Th1 e de linfócitos T regulatórios é considerada como resposta imune ideal contra a *Leishmania* (Figura 2E-F). A imunidade adaptativa eficaz frente à *Leishmania* tem início com a ativação dos linfócitos Th1 responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IFN- γ , acompanhada pelo desenvolvimento de linfócitos T regulatórios que atuam na regulação da resposta inflamatória através da citocina IL-10 (Gollob et al., 2014).

O papel da resposta T regulatória na Leishmaniose Cutânea tem sido demonstrado através da produção da citocina IL-10 (Figura 1C) (Bittar et al., 2007; Dutra et al., 2011). A citocina IL-10 proporciona um equilíbrio da resposta imunológica, assim como atuando na regulação da resposta Th17, resposta esta que tem sido relacionado em regular os níveis de IFN- γ em pacientes infectados que apresentam resposta inflamatória exacerbada (Oliveira et al., 2014). Curiosamente, as concentrações das citocinas IFN- γ e TNF- α não são afetadas pela produção de IL-10 (Antonelli et al., 2004; Bittar et al., 2007).

A citocina IFN- γ é crucial para ativação da resposta imune e eliminação de micro-organismos intracelulares (Figura 2F). Indivíduos assintomáticos para Leishmaniose ou que evoluíram para a cura são caracterizados por apresentarem equilíbrio das citocinas IFN- γ e IL-10 (Figura 2G). Aqueles que evoluíram para a forma mais grave, como forma mucosa, apresentam níveis elevados de IFN- γ e níveis reduzidos de IL-10 (Bittar et al., 2007). A falta de

equilíbrio entre as citocinas IFN- γ e IL-10 pode ser determinante para o desenvolvimento da Leishmaniose (Figura 1C) (Antonelli et al., 2004; Bittar et al., 2007; Gomes-Silva et al., 2007). Portanto, a resposta imune adaptativa Th1 acompanhada pela resposta T regulatória se tornam essenciais para promover a proteção contra parasito ou cura natural à infecção (Figura 2F).

3.5 Influência das características genéticas do hospedeiro na Leishmaniose

Aproximadamente 80-90% dos indivíduos são naturalmente resistentes à infecção por *Leishmania*. Esses são positivos para teste intradérmico, não apresentam histórico de Leishmaniose ou são assintomáticos para a doença (Follador et al., 2002^a; Follador et al., 2002^b; Blackwell et al., 2009). Os indivíduos assintomáticos são caracterizados por apresentar forte resposta imune celular quando expostos a antígenos *Leishmania*, enquanto indivíduos sintomáticos são positivos para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (Salhi et al., 2008; Blackwell et al., 2009). Assim, fatores genéticos do hospedeiro podem evidenciar motivos reais que justifiquem os indivíduos com a mesma exposição à infecção diferirem quanto à suscetibilidade ou resistência à Leishmaniose (Blackwell et al., 2009).

A evolução para determinadas manifestações clínicas da Leishmaniose está intimamente associada à falta de equilíbrio da resposta imune do hospedeiro. As diferenças quanto perfil genético apresentadas em diferentes indivíduos podem influenciar no equilíbrio das respostas, uma vez que a infecção, por uma mesma espécie de *Leishmania*, pode resultar na apresentação de diferentes desfechos patológicos, que estão relacionados à intensidade das respostas imunológicas (Bittar et al., 2007; Silveira et al., 2008^a; Ameen, 2010; Dutra et al., 2011; Gollob et al., 2014; Scoot e Novais, 2016).

Em estudo prospectivo foi identificado, em indivíduos infectados por *Leishmania*, apresentam um mesmo perfil inflamatório mesmo após o tratamento da doença. Ao avaliar aqueles que evoluíram para a forma mais grave da doença foram observados níveis elevados de citocinas inflamatórias e baixa produção de citocinas anti-inflamatórias em comparação a indivíduos

assintomáticos ou aqueles que evoluíram para a cura da doença (Bittar et al., 2007).

Fatores genéticos associados com a suscetibilidade da Leishmaniose Visceral foram observados em estudo de ligação genômica ampla (GWLS), com famílias de origem do Sudão, Brasil e Índia. Genes relacionados à polarização das respostas imune adaptativa Th1 e Th2 foram associados como fator de risco para Leishmaniose, assim como determinadas variações genéticas foram relacionadas com a resistência a infecção (Blackwell et al., 2009). Este destaca a importância da realização de estudos genéticos em infecções como a Leishmaniose e, assim permitir nova compreensão sobre a influência do perfil genético sobre a resposta imunológica do hospedeiro. Deste modo, variações em genes de citocinas ou receptores moleculares podem influenciar na polarização da resposta imune adaptativa.

Diferentes estudos realizados para mais de 40 genes envolvidos na resposta imune do hospedeiro e localizados nos cromossomos 1, 3, 5, 6 e 10, descrevem associação de variações genéticas com o desenvolvimento da Leishmaniose (Blackwell et al., 2009; Oliveira et al., 2015; Weirather et al., 2017). As variações genéticas que foram associadas à doença, consistiram de SNPs presentes em genes responsáveis pela regulação da resposta imunológica do hospedeiro ou de moléculas que regulam a produção de citocinas efetoras de linfócitos Th1. Deste modo, estudos genéticos em genes da resposta imune podem fornecer novas compreensões quanto ao desequilíbrio das respostas imunológicas observada entre pacientes com Leishmaniose.

Diversos estudos realizados descrevem variações presentes em genes da resposta imune sendo associada à suscetibilidade ou à proteção a Leishmaniose (Cabrera et al., 1995; Castelluci et al., 2006; Ajdray et al., 2011; Ramasawmy et al., 2010; Oliveira et al., 2015; Weirather et al., 2017). Determinados polimorfismos genéticos identificados como funcionais, que podem afetar a ligação de fatores de transcrição que regulam a expressão do gene, como demonstrado para o gene de *IL10* e *TNFA* (Hudson, 2003; Bayley et al., 2004; Salhi et al., 2008).

Polimorfismos presente no gene *MBL2* e *TOLLIP* têm sido associados com a suscetibilidade para Leishmaniose Cutânea causada por *L. guyanensis* (Araujo et al., 2015^a; Araujo et al., 2015^b). Polimorfismos genéticos presentes na região promotora do gene *IL6* e *CCL2/MCP1* está associado ao desenvolvimento da forma mucosa. Variação genética confere duas vezes mais chance de risco para desenvolvimento da forma mais grave da doença (Castelluci et al., 2006; Ramasawmy et al., 2010). Mutações genéticas presentes em região codificadora do gene *TLR4* tem sido responsáveis por aumentar o risco para infecção causada por *L. major*, assim como com a gravidade da doença (Ajdary et al., 2011).

As características genéticas do hospedeiro podem atuar como um fator determinante na promoção da resistência à infecção ou ao desenvolvimento e evolução da doença, associado à Leishmaniose *per se*, assim como à evolução e apresentação das formas clínicas mais graves da doença (Castelluci et al., 2006; Dutra et al., 2011; Ramasawmy et al., 2010; Weirather et al., 2017).

3.6 miRNA e regulação da resposta imunológica

Os micro-RNAs (miRNA) são pequenos RNA nucleares endógenos, de regiões do genoma que não codificam informações para a tradução de proteínas (Bartel, 2004; Asirvatham et al., 2009), originados após processos de *splicing* dos pré-mRNA. Os miRNA são sequências curtas de RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos e estão envolvidos em processos de regulação da expressão do RNA mensageiro e tradução da proteína (Bartel, 2004; Asirvatham et al., 2009). O envolvimento de miRNA na regulação de genes envolvidos no desenvolvimento e diferenciação celular, sendo sugestivo à progressão de células cancerígenas (Chen et al., 2004), assim como relacionado à regulação de diferentes genes da resposta imunológica (Baltimore et al., 2008; Zhang e LI, 2013). Diferentes estudos relatam um único miRNA pode regular múltiplos genes afetando desenvolvimento da resposta imune (Chen et al., 2004; Thai et al., 2007; Rodriguez et al., 2007).

Os diferentes miRNA regulam a expressão gênica através da ligação as regiões 3' não traduzida de diferentes moléculas de mRNA. Deste modo, mais de 30% dos genes que codificam proteínas são regulados por miRNA (Griffiths-

Jones et al., 2008), portanto, 275 genes da resposta imune são importantes alvos para miRNA (Asirvatham et al., 2008). A complementaridade do miRNA ao mRNA alvo determina a forma de ação deste miRNA associado à enzima DICER, de forma a clivar o mRNA quando houver complementariedade de 100% ao mRNA alvo, ou apenas com papel de regular a expressão do gene quando existe complementariedade parcial (Bartel, 2004; Filipowicz et al., 2005). O complexo miRNA e enzima DICER contribuem para a homeostasia, desenvolvimento e diferenciação celular, uma vez demonstrado em camundongos o desenvolvimento de células natural killer é afetada quando deficiente para enzima DICER (Sullivan et al., 2012).

Diferentes estudos têm caracterizado a ação de miRNA sobre os mecanismos efetores das respostas imunológicas. Estudos experimentais tem associado envolvimento de miR-15a/16 na regulação da fagocitose e produção de reativos de oxigênio pelos macrófagos (Moon et al., 2014), assim como envolvimento de miR-155 e miR-146a com evolução da esquistossomose (Wang et al., 2014^a). O envolvimento de miRNA em diferentes doenças infecciosas tem sido associado à evolução da doença. Estes regulam a expressão de receptores TLR em infecções causadas pelo vírus da Hepatite B (Jiang et al., 2014^a), miR-155 atua na regulação de células T regulatórias e de macrófagos em infecções bacterianas (Connell et al., 2007; Wang et al., 2014^b). miR-155 está também associado à regulação das respostas imunes contra o vírus da Hepatite C (Jiang et al., 2014^b). Diferentes perfis de miRNA em macrófagos podem ser regulados em função da presença do patógeno, como sugerido em infecção por *L. major*, podendo ou não regular a expressão de quimiocinas envolvidas nas respostas imunológicas, em ser reguladas por miR-23b, miR-25, miR-26a, miR-132, miR-140, miR-146a, miR-146b, miR-155 e miR-210 (Lemaire et al., 2013).

A expressão de miRNA pode ser determinante para resultado da tuberculose, forma crônica ou ativa (Wang et al., 2011). O miR-223 regula a inflamação e recrutamento de leucócitos em infecções crônicas causadas por *Mycobacterium tuberculosis* (Dorhoi et al., 2013). Entre os quais, o miR-146a pode estar envolvido na regulação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , regulando as respostas inflamatórias e auxiliando na multiplicação

bacteriana em macrófagos (Lis et al., 2013), assim como, o miR-187 possivelmente de origem do gene de IL-10 atua na regulação de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-12p40 (Rossato et al., 2012).

Polimorfismos genéticos presentes em miRNA podem ser determinantes para o desenvolvimento das respostas imunes frente a doenças infecciosas, como SNP em miR-146 (rs2910164 G>C), associado à suscetibilidade a hanseníase (Cezar-de-Mello et al., 2014), assim como nas infecções virais pelo vírus da hepatite B (Wang et al., 2013). Portanto, diferentes SNPs localizados em miRNA podem afetar de forma significativa a regulação de diferentes genes e conseqüentemente regular as respostas imune inata e adaptativa, como em miR-29 e miR-26 (Ma et al., 2011; Kleinstaubler et al., 2013).

4.0 Considerações finais

A Leishmaniose é uma doença com importante variação clínica em função as diferentes espécies de *Leishmania* e ao componente imunogenético do hospedeiro. É uma doença em que a resposta imune celular é fundamental para eliminação do parasita, o equilíbrio das respostas Th1 e Th2 é determinante para eliminação do parasita, mas que necessariamente deva ser acompanhada pela resposta regulatória. Os pacientes com Leishmaniose Cutânea apresentam concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e IL-6, acompanhada pela baixa produção das citocinas IFN- γ , IL-10 e de IL-1Ra. Além das variações genéticas, estudos moleculares quanto ao miRNA na Leishmaniose, como miR-15a/16, miR-146a e miR-155 podem fornecer uma nova visão quanto ao equilíbrio da resposta imunológica. Portanto, pacientes com histórico de LC naturalmente apresentam falta de equilíbrio na produção destas citocinas, influenciado por variações genéticas e devido regulação pós-transcricional de genes da resposta imunológica, estudos futuros .

DISCUSSÃO (estudos genéticos de associação)

Em lesões ulceradas de Leishmaniose Cutânea (LC), o envolvimento de células e citocinas que retroalimentam a inflamação contribuem para o desenvolvimento de lesões. Como discutido anteriormente (Artigo de Revisão), lesões tardias de LC apresentam baixa carga parasitária, mas falha no equilíbrio da resposta inflamatória. Algumas evidências, como o aumento dos níveis da citocina IL-1 β e linfócitos T-citotóxicos apresentam efeitos significativos sobre a patogenicidade e evolução da doença (Fernández-Figueroa et al., 2012; Novais et al., 2015; Novais et al., 2017). Experimento realizado com camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados por *L. braziliensis*, a patogenicidade por linfócitos T-citotóxicos e desenvolvimento de lesões é dependente da citocina de IL-1 β . É evidente que o bloqueio de NLRP3, IL1R ou IL-1 β reflete na ausência de lesões em camundongos infectados.

Neste estudo, pacientes com LC causada por *L. guyanensis*, caracterizam-se por apresentar ativação de macrófagos M1 com resposta Th1, apresentam altas concentrações de IL-1 β e ausência de regulação por IL-1Ra. Macrófagos de pacientes infectados por *L. guyanensis* evoluem para a necrose (DaMata et al., 2015), assim como a infecção por *L. braziliensis* (Santos et al., 2018), tipo de morte celular contribui para inflamação. Como demonstrado nas análises de citocinas, pacientes com LC comparados a controles apresentam elevados níveis de IL-1 β ao longo da evolução da doença o que contribui para a patogenicidade. A citocina IL-1 β não é essencial para induzir a morte de *Leishmania* e está relacionada à resposta inflamatória com neutrófilos e macrófagos (Santos et al., 2018). Como demonstrado em diferentes estudos, a produção de IL-1 β e falta de regulação é estritamente relacionada à patogenicidade de lesões da LC (Fernández-Figueroa et al., 2012; Novais et al., 2017; Santos et al., 2018).

Polimorfismos genéticos e concentrações de IL-1 β e IL-1Ra apresentam efeitos significativos para o resultado da LC causada por *L. guyanensis*. Notavelmente, pacientes infectados por *L. guyanensis* apresentam elevados níveis de IL-1 β e baixa produção do receptor antagonista IL-1Ra, enquanto indivíduos controles caracterizam-se por elevada produção de IL-1Ra. Aqui

destacamos diferenças quanto à genética em dois Tags SNPs de *IL1B* entre pacientes e controles, com os polimorfismos -511 T/C (rs16944) e +3954 C/T (rs1143634). O genótipo -511 C/C é associado à suscetibilidade a LC, enquanto -511 T/T conferem proteção; indivíduos com genótipos relacionados a proteção para LC apresentam níveis superiores de IL-1Ra, como demonstrado o genótipo +3954 T/T correlacionado com altos níveis de IL-1Ra (35.4±64.95pg/mL) comparado ao +3954 C/C (16.7±24.25pg/mL). Pacientes que desenvolvem LC apresentam baixos níveis de elementos regulatórios, como destacado para o receptor antagonista. Curiosamente, independente da presença de antígenos de *Leishmania*, indivíduos tratados para LC continuam a apresentar níveis elevados ou intermediários de citocinas pró-inflamatórias, como a citocina IL-1 β em comparação a indivíduos controles. Os pacientes com LC naturalmente apresentam uma resposta inflamatória exacerbada e ausência de componentes que atuam na regulação de IL-1 β , como o IL-1Ra, podendo apresentar uma tendência para desenvolvimento de lesões ulceradas em infecções por *L. guyanensis* devido influência genética do hospedeiro.

Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, que destacam o envolvimento da citocina IL-1 β com o desenvolvimento de lesões e formas mais graves da LC. Considerando, a imunoterapia voltada para o bloqueio de IL-1 β da LC pode fornecer resultados satisfatórios, como identificado em estudo de Novais e colaboradores 2017, identificam que o medicamento *anakinra* ou anticorpo monoclonal para IL-1 β é uma importante medida terapêutica para o tratamento da Leishmaniose Cutânea.

A resposta inflamatória na LC apresenta dois lados, na eliminação do patógeno e também responsável em causar danos ao tecido devido resposta inflamatória exacerbada. Na LC, elevados níveis de IFN- γ são observados em formas graves da Leishmaniose Mucosa (Bittar et al., 2007; Faria et al., 2009). Pacientes com LC causada por *L. guyanensis* embora apresentem resposta inflamatória do tipo Th1, caracterizam-se por apresentar baixa produção de IFN- γ (Bourreaeu et al., 2001; Bourreaeu et al., 2007). O importante papel da IFN- γ nas infecções por *Leishmania* é evidente para eliminação do parasito (Sousa-Franco et al., 2006), elevada produção de IFN- γ está associada com redução da parasitemia. Neste estudo, pacientes com LC causada por *L.*

guyanensis apresentam elevados níveis de IFN- γ quando comparado a indivíduos controles, este em função a infecção, entretanto, alguns pacientes apresentam baixos níveis de IFN- γ . Aqui destacamos o envolvimento do bloco do gene *IFNG* como determinante para o desenvolvimento da Leishmaniose Cutânea.

A produção de IFN- γ é influenciada pela presença de diferentes polimorfismos genéticos no gene *IFNG*, exclusivamente os diferentes polimorfismos genéticos localizados em regiões não codificantes que atuam na regulação da expressão do gene (Schoenborn et al., 2007; Balasubramani et al., 2010; Collier et al., 2014). Os elementos regulatórios encontrados no gene *IFNG* são locais de ligação para fatores de transcrição, necessários para regulação da expressão do gene e pode favorecer ativação de linfócitos Th1 (Balasubramani et al., 2010). Polimorfismos genéticos, +874 A/T (rs2430561), +875 CA_(n) (rs35314021), +1987 A/G (rs1861494) e +3234 C/T (rs2069718) foram associados com secreção aumentada de IFN- γ (Pravica et al., 1999; Pravica et al., 2000; Peixe et al., 2014; Gonsky et al., 2014).

Estudos de associação genética apresentam resultados controversos quanto a polimorfismos genéticos de *IFNG* associados a doenças infecciosas e/ou autoimune. Estudos genéticos independentes destacam um mesmo genótipo associado à resistência ou com a suscetibilidade. O bloco de *IFNG* é constituído por diferentes polimorfismos genéticos que apresentam ligação genética ou desequilíbrio de ligação (LD), como demonstrado segundo dados HapMap e como destacado no presente estudo para os SNPs rs1861494, rs1861493 e rs2069733; entre rs2069718 com rs2069705 e rs2430561, e entre rs2430561 e rs2069727.

O SNP +874 A/T (rs2430561), constantemente investigado em diferentes doenças infecciosas, o polimorfismo é considerado como um local de ligação para fator de transcrição nuclear NF- κ B na presença do alelo T. A discordância entre os diferentes estudos de associação genética é influenciada por se tratarem de estudos com populações etnicamente diferentes, e também à existência de moderado desequilíbrio de ligação entre o rs2430561 com os demais SNPs localizados no gene. A associação do SNP rs2430561 pode ser

“mascarada” devido a influencia de um segundo SNP, considerando outro SNP funcional presente no gene e que reflete em mudanças na transcrição do gene e produção da citocina.

Em nosso trabalho, as comparações dos níveis de IFN- γ com os SNPs associados à LC não evidenciam a influência de um SNP com a produção da citocina. No entanto, quando avaliado indivíduos com homozigose para o Haplótipo 1 (total de 161), este associado com a suscetibilidade a LC, quando comparado aos demais haplótipos (total de 342), é notável que o haplótipo 1 está relacionado aos baixos níveis de IFN- γ . Aqueles genótipos e/ou alelos associados com a suscetibilidade a LC encontram-se combinados na composição do haplótipo 1. Portanto, alelos rs2069705 T, rs2430561 T, rs1861494 A, rs1861493 T e rs2069718 C estão associados aos baixos níveis de IFN- γ .

O SNP -1616 C/T (rs2069705) “carrega” a associação dos demais SNPs do bloco de *IFNG*, podendo ser o principal associado aos baixos níveis de IFN- γ . Entre os SNPs de *IFNG* associados com a LC, as comparações e valores estatísticos indicam que apenas o SNP -1616 C/T (rs2069705) está associado com a LC, indivíduos com -1616 T/T apresentam risco aumentado de 70% para a doença, enquanto aqueles que apresentam o genótipo -1616 C/C apresentam 42% de resistência para desenvolvimento da LC. Este é novamente evidenciado na análise de haplótipo. Haplótipos 1 e 8 foram associados com a suscetibilidade e resistência à LC, contudo, os haplótipos diferem apenas no -1616 C/T (rs2069705). Em outras palavras, o +874 A/T (rs2430561), o alelo +874 T poderia ser relacionado com a resistência a LC em determinado estudo, aqui demonstramos associado com a suscetibilidade a LC, entretanto, esta associação é influenciada devida envolvimento de outro SNP como -1616 C/T (rs2069705). O SNP -1616 C/T (rs2069705) é determinante para o resultado da LC, considerando como um marcador molecular de resistência e suscetibilidade, podendo ser definido como um Tag SNP para estudos futuros de associação genética.

Os estudos realizados em verificar se polimorfismos genéticos de *IL1B*, *IL1RN* e *IFNG* com a Leishmaniose Cutânea causada por *L. guyanensis* estão

de acordo com as recomendações para estudos de associação genética (The Strengthening the Reporting of Genetic Association studies – STREGA) com algumas limitações. As recomendações atendidas: amplo tamanho de amostras (caso e controles), estratificação adequada – indivíduos com mesma etnia e vivem em área endêmica para Leishmaniose, estudo de diferentes SNPs e Tag SNPs, distribuição genotípica de acordo com as características da população e em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, relação entre genótipos e fenótipo (citocinas), confirmação dos resultados – repetição da genotipagem por técnicos independentes, realização dos procedimentos às cegas (genotipagem e dosagem de citocinas) e aplicação de critérios de não inclusão e de exclusão ao longo do estudo (indivíduos excluídos do estudo <2% da população).

Ao nosso conhecimento, estes estudos genéticos apresentam algumas limitações. Embora a população de indivíduos controles de mesma origem endêmica de pacientes com Leishmaniose, nosso estudo falha em identificar se estes indivíduos foram infectados pelo *L. guyanensis*; entretanto, buscamos incluir neste estudo indivíduos com maiores semelhanças possíveis com a população de pacientes, muitos são agricultores e residem há mais de 5 anos em região endêmica. A associação com a clínica seria possível, no entanto é inviável ao tipo de doença, muitos pacientes caracterizavam-se por 1 a 2 lesões cutâneas. Como diferentes estudos clínicos e experimentais realizados, neste estudo não foram possíveis relatar aspectos imunológicos no início da doença. Limitações encontradas para a genotipagem de algumas amostras, não sendo possível obter informação genética de todos SNPs em uma mesma amostra; falta de amplificação para PCR de *IFNG* foi determinante para o número de amostras genotipadas, devido à falta qualidade de algumas amostras de DNA, produtos de PCR com tamanho de 1,5 kb, superior aqueles amplificados para polimorfismos de *IL1B* e *IL1RN*.

CONCLUSÃO

Variações genéticas presentes em genes de *IL1B* e *IFNG* podem marcar a resistência e suscetibilidade para desenvolvimento da LC causada por *L. guyanensis*. O resultado da LC pode ser influenciado por polimorfismos genéticos de *IL1B* e *IFNG* que potencialmente influenciam em diferentes concentrações de citocinas ou baixos níveis de IFN- γ , afetando o equilíbrio e ação da resposta imune frente a infecções por *L. guyanensis*. Estudos futuros poderiam investigar o envolvimento do haplótipo 1 com o resultado do tratamento para LC, com acompanhamento dos pacientes quanto ao tempo de tratamento e/ou sucesso ao tratamento.

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

Ajdary S, Ghamilouie MM, Alimohammadian MH, Riazi-Rad F, Pakzad SR. Toll-like receptor 4 polymorphism predispose to cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect* 2011; 13:226-31.

Akuffo H, Maasho K, Howe R. Natural and acquired resistance to *Leishmania*: cellular activation by *Leishmania aethiops* of mononuclear cells from unexposed individuals is through the stimulation of natural killer (NK) cells. *Clin. Exp. Immunol.* 1993; 94:516-21.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012; 7:e35671.

Ameen M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin Exp Dermatol* 2010; 35:699-705.

Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Gollob KJ. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol* 2004; 136:341-8.

Antonelli LR, Dutra WO, Oliveira RR, Torres KC, Guimarães LH, Bacellar O, Gollob KJ. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4-CD8-) alpha beta and gamma delta T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 2006; 74:6317-23.

Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Gollob KJ. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol* 2004; 136:341-8.

Asirvatham AJ, Magner WJ, Tomasi TB. miRNA regulation of cytokine genes. *Cytokine* 2009; 45:58-69.

Assis RR, Ibrahim IC, Nogueira PM, Soares RP, Turco SJ. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and

glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1820:1354-65.

Araujo FJ, Mesquita TG, Silva LD, Almeida SA, Vital W, Chrusciak-Talhari A, Guerra JA, Talhari S, Ramasawmy R. Functional variations in MBL2 gene are associated with cutaneous leishmaniasis in the Amazonas state of Brazil. *Genes Immun* 2015^a; 16:284-8.

Araujo FJ, Silva LD, Mesquita TG, Pinheiro SK, Vital WS, Chrusciak-Talhari A, et al. Polymorphisms in the TOLLIP gene influence susceptibility to cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania guyanensis* in the Amazonas State of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2015^b; 9:e0003875.

Balasubramani A, Shibata Y, Crawford GE, Baldwin AS, Hatton RD, Weaver CT. Modular utilization of distal cis-regulatory elements controls ifng gene expression in T cells activated by distinct stimuli. *Immunity* 2010; 33:35-47.

Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD. microRNAs: regulators of immune cell development and function. *Nat. Immunol.* 2008; 9:839-45.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-97.

Bayley JP, Ottenhoff THM, Verweij CI. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Gen Immun* 2004; 5:315-329.

Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102:625-30.

Blackwell JM, Fakiola M, Ibrahim ME, Jamieson SE, Jeronimo SB, Miller EN, Mishra A, Mohamed HS, Peacock CS, Raju M, Sundar S, Wilson ME. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. *Parasite Immunol* 2009; 31:254-66.

Blank C, Fuchs H, Rappersberger K, Rollinghoff M, Moll H. Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *J. Infect. Dis.* 1993; 167:418-25.

BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília. Editora Ministério da Saúde, 2007.

Bohlsso SS, O'Conner SD, Hulsebus HJ, Ho MM, Fraser DA. Complement, c1q, and c1q-related molecules regulate macrophage polarization. *Front Immunol* 2014; 5:402.

Bottrel RL, Dutra WO, Martins FA, Gontijo B, Carvalho E, Barral-Netto M, Barral A, Almeida RP, Mayrink W, Locksley R, Gollob KJ. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble leishmania antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 2001; 69:3232-9.

Bourreaeu E, Prevot G, Pradinaud R, Launois P. Interleukin (IL)-13 is the predominant Th2 cytokine in localized cutaneous *Leishmania* lesions and renders specific CD4+ T cells unresponsive to IL-12. *J Infect Dis* 2001; 183:953-9.

Bourreaeu E, Prevot G, Pradinaud R, Launois P. Unresponsiveness of specific T cells to IL-12 is associated with active cutaneous leishmaniasis owing to *Leishmania guyanensis*. *Scand J Immunol* 2001^a; 54:335-9.

Bourreau E, Ronet C, Couppie P, Sainte-Marie D, Tacchini-Cottier F, Launois P. IL-10 producing CD8+ T cells in human infection with *Leishmania guyanensis*. *Microbes Infect* 2007; 9:1034-41.

Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 1995; 182:1259-64.

Carvalho IMS, Meneghini ERS, Oliveira C. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana

no Distrito Federal, Brasil, 2006 a 2008. *Epidemiol. Serv. Saúde Brasília* 2010; 22:19.

Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessen H, Prata A, Dessen A, Rodrigues V. Th1/Th2 immune response are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum Immunol* 2009; 70:383-390.

Castellucci L, Menezes E, Oliveira J, Magalhaes A, Guimaraes LH, Lessa M, Ribeiro S, Reale J, Noronha EF, Wilson ME, Duggal P, Beaty TH, Jeronimo S, Jamieson SE, Bales A, Blackwell JM, de Jesus AR, Carvalho EM. IL-6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J Infect Dis* 2006; 194:519-27.

Cezar-de-Mello PF, Toledo-Pinto TG, Marques CS, Arnez IE, Cardoso CC, pré-miR-146a (rs2910164 G>C) single nucleotide polymorphism is genetically and functionally associated with leprosy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8:e3099.

Chan MM, Adapala N, Chen C. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ -mediated polarization of macrophages in leishmania infection. *PPAR Res* 2012; 2012:796235.

Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004; 303:83–6.

Collier SP, Henderson MA, Tossberg JT, Aune TM. Regulation of the Th1 genomic locus ifng through Tmevpg1 by T-bet. *J Immunol* 2014; 193:3959-3965.

Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104:1604-9.

Convit J, Ulrich M, Fernandez CT, Tapia FJ, Caceres-Dittmar G, Castes M, Rondon AJ. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1993; 87:444-8.

Cortez M, Huynh C, Fernandes MC, Kennedy KA, Aderem A, Andrews NW. Leishmania promotes its own virulence by inducing expression of the host immune inhibitory ligand CD200. *Cell Host Microbiol* 2011; 9:463-71.

Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM, Luca PM, Mendença SC, Bertho AL, Soong L, McMahon-Pratt D. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified leishmania pifanoi amastigote antigens and leishmania braziliensis promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Exp Parasitol* 1996; 84:144-155.

DaMata JP, Mendes BP, Maciel-Lima K, Menezes CAS, Dutra WO, Sousa LP, Horta MF. Distinct macrophage fates after in vitro infection with different species of leishmania: induction of apoptosis by Leishmania (Leishmania) amazonensis, but not by Leishmania (Viannia) guyanensis. *PLoS One* 2015; 10:e0141196.

Dorhoi A, Iannaccone M, Farinacci M, Faé KC, Schreiber J, Moura-Alves P, et al. MicroRNA-223 controls susceptibility to tuberculosis by regulating lung neutrophil recruitment. *J. Clin. Invest.* 2013; 123:4836-48.

Dutra WO, Faria DR, Lima-Machado PR, Guimarães LH, Schriefer A, Carvalho E, Gollob KJ. Immunoregulatory and effector activities in human understanding mechanisms of pathology. *Drug Dev Res* 2011; 72:430-436.

El-On J, Bradley DJ, Freeman JC. Leishmania donovani: action of excreted factor on hydrolytic enzyme activity of macrophages from mice with genetically different resistance to infection. *Exp. Parasitol.* 1980; 49:167-74.

Faria DR, Souza PE, Durães FV, Carvalho EM, Gollob KJ, Machado PR, Dutra WO. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2009; 31:432-9.

Feijó D, Tibúrcio R, Ampuero M, Brodskyn C, Tavares N. Dendritic cells and Leishmania infection: Adding layers of complexity to a complex disease. *J Immunol Res* 2016; 2016:3967436.

Fernández-Figueroa EA, Rangel-Escareño C, Espinosa-Mateos V, Carrillo-Sánchez K, Salaiza-Suazo N, et al., Disease severity in patients infected with *Leishmaniamexicana* relates to IL-1 β , PLoS Negl. Trop Dis 2012; 6:e1533.

Filipowicz W, Jaskiewicz I, Kolb FA, Pillai RS. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. Curr Opin Struct Biol 2005; 15:331–341.

FMT-HVD. Sistema de Informações Operacionais e Epidemiológicas: Casos Novos, Confirmados de Doenças de Notificação Compulsória e Outros Agravos registrados no ano 2012. 2013.

Follador I, Araujo C, Orge G, Cheng LH, Carvalho LP, Bacellar O, Almeida RP, Carvalho EM. Immune responses to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Vaccine 2002^a; 20:1365-8.

Follador I, Araujo C, Bacellar O, Araujo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. Clin Infect Dis 2002^b; 34:E54-8.

Glennie ND, Volk SW, Scott P. Skin-resident CD4⁺T cells protect against *Leishmania major* by recruiting and activating inflammatory monocytes. PLoS Pathogens 2017; 13(4):e1006349.

Gomes-Silva A, Bittar RC, Nogueira RS, Amato VS, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection?. Clin Exp Immunol 2007; 149:440-4.

Gollob KJ, Viana AG, Dutra WO. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. Parasite Immunol 2014; 36:367-76.

Gonçalves-Albuquerque SDC, Pessoa-Silva R, Trajano-Silva LAM, Goes TC, Moraes RCS, Oliveira CN, Lorena VMB, Paiva-Cavalcanti M. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of Leishmaniasis. Front Immunol 2017; 8:1437.

Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8:419- 33.

Goncalves R, Zhang X, Cohen H, Debrabant A, Mosser DM. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *J Exp Med* 2011; 208:1253-65.

Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar Americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36:71-80.

Gonsky R, Deem RL, Landers CJ, Haritunians T, Yang S, Targan SR. IFNG rs1861494 polymorphism is associated with IBD disease severity and functional changes in both IFNG methylation and protein secretion. *Inflamm Bowel Dis* 2014; 20:1794-801.

Gonzalez-Lombana C, Gimblet C, Bacellar O, Oliveira WW, Passos S, Carvalho LP, Goldschmidt M, Carvalho EM, Scott P. IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. *Plos Pathog* 2013; 9:e1003243.

Griffiths-Jones S, Saini HK, Dongen S, Enright AJ. miRBase tools for miRNA genomics. *Nucleic. Acids. Res.* 2008; 36:D154–8.

Grimaldi G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.* 1993; 6:230-250.

Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceição-Silva F, Saraiva EM. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:6748-53.

Henri S, Curtis J, Hochrein H, Vremec D, Shortman K, Handman E. Hierarchy of susceptibility of dendritic cell subsets to infection by *Leishmania major*: inverse relationship to interleukin-12 production. *Infect Immun* 2002; 70:3874-80.

Hudson TJ. Wanted: regulatory SNPs. *Nat. Genet* 2003; 33:439-440.

Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamura M, Miyamura T, Nakamoto S, et al. Regulation of microRNA by hepatitis B virus infection and their possible

association with control of innate immunity. *World J. Gastroenterol.* 2014^a; 20:7197-206.

Jiang M, Broering R, Trippler M, Wu J, Zhang E, Zhang X, et al. MicroRNA-155 controls Toll-like receptor 3- and hepatitis C virus-induced immune responses in the liver. *J. Viral. Hepat.* 2014^b; 21:99-110.

Jogas DR. The tropics, science, and leishmaniasis: an analysis of circulation of knowledge and asymmetries. *Hist, Ciências, Saúde – Manguinhos* 2017; 4:1051-1070.

Jones TC, Johnson WD, Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, et al. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J. Infect. Dis.* 1987; 156:73-83.

Kautz-Neu K, Noordegraaf M, Dinges S, Bennett CL, John D, Clausen BE, Stebut E. Langerhans cells are negative regulators of the anti-*Leishmania* response. *J Exp Med* 2011; 208:885-91.

Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New World and Old World *Leishmania* infections: A practical review. *Dermatol Clin* 2015; 33:579-93.

Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 1999, 17:279–28.

Kleinstauber K, Heesch K, Schattling S, Kohns M, Sander-Jülch C, Walzl G, et al. Decreased expression of miR-21, miR-26a, miR-29a, and miR-142-3p in CD4⁺ T cells and peripheral blood from tuberculosis patients. *PLoS One.* 2013; 8:e61609.

Laskay T, Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes-Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?. *Trends Microbiol* 2003; 11:210-4.

Lemaire J, Mkannez G, Guerfali FZ, Gustin C, Attia H, Sghaier RM, et al. microRNA expression profile in human macrophages in response to *Leishmania major* infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7:e2478.

Li S, Yue Y, Xu W, Xiong S. MicroRNA-146a represses mycobacteria-induced inflammatory response and facilitates bacterial replication via targeting IRAK-1 and TRAF-6. *PLoS One*. 2013; 8:e81438.

Liu D, Uzzona JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2:83.

Llanos-Cuentas EA, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC, Campos AM. Possible risk factors in development of mucosal lesions in leishmaniasis. *Lancet* 1984; 2:295e.

Lukes J, Skalicky T, Tyc J, Votypka J, Yurchenko V. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. *Mol Biochem Parasitol* 2014; 195:115-122.

Ma F, Xu S, Liu X, Zhang Q, Xu X, Liu M, et al. The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- γ . *Nat. Immunol.* 2011;12:861-9.

Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad. Saude Publica* 1994; 10:359-75.

Matta NE, Nogueira RS, Franco AM, De-Souza ESI, Mattos MS, Oliveira-Neto MP et al. *Leishmania (Viannia) guyanensis* induces low immunologic responsiveness in leishmaniasis patients from an endemic area of the Brazilian Amazon Highland. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009; 80:339-44.

Mendonça SC, Cysne-Finkelstein L, Matos DC. Kinetoplastid membrane protein-11 as a vaccine candidate and a virulence factor in *Leishmania*. *Front Immunol* 2015; 6:524.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil-DF 2ª ED. 2007.

Moll H. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Today* 1993; 14:383-7.

Moon HG, Yang J, Zheng Y, Jin Y. miR-15a/16 regulates macrophage phagocytosis after bacterial infection. *J Immunol.* 2014; 193:4558-67.

Moraes MAP, Silveira FT. Histopatologia da forma localizada de Leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Inst Med Trop* 1994; 36:459-463.

Morgado FN, Nascimento MT, Saraiva EM, Oliveira-Ribeiro C, Madeira F, Costa-Santos M, et al. Are neutrophil extracellular traps playing a role in the parasite control in active American Tegumentary Leishmaniasis lesions?. *PLoS One* 2015; 10:e0133063.

Mosser DM, Wedgwood JF, Edelson PJ. *Leishmania* amastigotes: resistance to complement-mediated lysis is not due to a failure to fix C3. *J. Immunol.* 1985; 134:4128-31.

Murray HW. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J. Immunol.* 1982;129:351-7.

Naderer T, Mcconville MJ. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol.* 2008; 10:301-8.

Naderer T, Vince JE, Mcconville MJ. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Curr. Mol. Med.* 2004; 4:649-65

Naderer T, Mcconville MJ. Intracellular growth and pathogenesis of *Leishmania* parasites. *Essays Biochem.* 2011; 51:81-95.

Nandan D, Lo R, Reiner NE. Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-FOS and nitric oxide synthase expression. In macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 1999; 67:4055-63.

Naik S, Bouladoux N, Wilhelm C, Molloy MJ, Salcedo R, Kastenmuller W, et al. Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science* 2012; 337:1115-9.

Novais FO, Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM, Brodskyn C, Baral-Netto M, Barral A, Oliveira CI. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J Immunol* 2009; 183:8088-98.

Novais FO, Carvalho LP, Passos S, Roos DS, Carvalho EM, Scott P, et al. Genomic profiling of human *Leishmaniabrasiliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. *J Invest Dermatol* 2015; 135:94-101.

Novais FO, Carvalho AM, Clark ML, Carvalho LP, Beiting DP, Brodsky IE, Carvalho EM, Scott P. CD8⁺ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 β production. *PLoS Pathog* 2017; 13:e1006196.

Oliveira WN, Ribeiro LE, Schrieffer A, Machado P, Carvalho EM, Bacellar O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine* 2014; 66:127-132.

Oliveira PR, Dessein H, Romano A, Cabantous S, Brito ME, Santoro et al. IL2RA genetic variants reduce IL-2-dependent responses and aggravate human cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 2015; 194:2664-72.

Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:293-305.

Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. In vitro production of IFN- γ correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN- γ gene. *Euro J Immunogenet* 1999; 26:1-3.

Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson I. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- γ gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- γ production. *Hum Immun* 2000; 61:863-866.

Peixe RG, Boechat MS, Rangel AL, Rosa RF, Petzl-Erler ML, Bahia-Oliveira LM. Single nucleotide polymorphisms in the interferon gamma gene are

associated with distinct types of retinochoroidal scar lesions presumably caused by *Toxoplasma gondii* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014; 109:99-107.

Pigott DM, Bhatt S, Golding N, Duda KA, Battle KE, Brady OJ, et al. Global distribution maps of the leishmaniasis. *Elife* 2014; 3:e02851.

Puentes SM, Da-Silva RP, Sacks DI, Hammer CH, Joiner KA. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J. Immunol.* 1990; 145:4311-6.

Ramasawmy R, Menezes E, Magalhães A, Oliveira J, Castellucci L, Almeida R, Rosa ME, Guimarães LH, Lessa M, Noronha E, Wilson ME, Jamieson SE, Kalil J, Blackwell JM, Carvalho EM, de Jesus AR. The -2518bp promoter polymorphism at CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol* 2010; 10:607-13.

Ribeiro-Gomes FL, Peters NC, Debrabant A, Sacks DL. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-*Leishmania* response. *PLoS Pathogens* 2012; 8(2):e1002536.

Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 2007; 316:608–11.

Russel DG, Talamas-Rohama P. *Leishmania* and macrophage: a marriage of inconvenience. *Immun. Today* 1989; 10:328-333.

Rossato M, Curtale G, Tamassia N, Castellucci M, Mori I, Gasperini S, et al. IL-10-induced microRNA-187 negatively regulates TNF- α , IL-6, and IL-12p40 production in TLR4-stimulated monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012; 109:e3101-10.

Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001; 55:453-83.

Salhi A, Rodrigues V, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, et al. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous

lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol* 2008; 180:6139-48.

Santos D, Campos TM, Saldanha M, Oliveira SC, Nascimento M, Zamboni DS, et al. IL-1 β production by intermediate monocytes is associated with immunopathology in cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* 2018; 138:1107-1115.

Santos CS, Brodskyn CI. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. *Front Public Health* 2014; 2:165.

Schoenborn JR, Dorschner MO, Sekimata M, Santer DM, Shnyreva M, Fitzpatrick DR, et al. Comprehensive epigenetic profiling identifies multiple distal regulatory elements directing transcription of the gene encoding interferon-gamma. *Nat Immunol* 2007; 8:732-742.

Scott O, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 2016; 16:581-92.

Saldanha MG, Queiroz A, Machado PRL, Carvalho LP, Scott P, Carvalho-Filho EM, Arruda S. Characterization of the histopathologic features in patients in the early and late phases of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2017; 96:645-652.

Sampaio RNR, Pires JÁ, Sampaio JHD, Magalhães AV. Visceralização da leishmaniose cutaneomucosa disseminada causada pela *Leishmania braziliensis* em paciente imunocompetente. *An Bras Dermatol* 1997; 72:579-582.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2004; 99:239-251.

Silveira FT, Muller SR, Souza AA, Lainson RL, Gomes CMC, Laurenti MD, et al. Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. *Revista Paraense de Medicina* 2008^a; 22:9-20.

Silveira FT, Lainson RL, Gomes CMC, Laurenti MD, Corbett CEP. Reviewing the role of the dendritic langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008^b; 102:1075-1080.

Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* 1987; 41:363-382.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação, Leishmaniose (<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/>), Boletim Epidemiológico de 2015.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Boletim Epidemiológico de 2016.

Soong L. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *J Immunol* 2008; 180:4355-60.

Sousa-Franco J, Araújo-Mendes E, Silva-Jardim I, L-Santos J, Faria DR, Dutra WO, Horta MF. Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect* 2006; 2:390-400.

Sullivan RP, Leong JW, Schneider SE, Keppel CR, Germino E, French AR, Fehniger TA. MicroRNA-deficient NK cells exhibit decreased survival but enhanced function. *J Immunol.* 2012; 188:3019-30.

Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 2008; 223:87-113.

Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 2007; 316:604–8.

Tomiotto-Pellissier F, Bortoleti BTDS, Assolini JP, Gonçalves MD, Carloto ACM, Miranda-Sapla MM, Conchon-Costa I, Bordignon J, Pavanelli WR. Macrophage polarization in Leishmaniasis: broadening horizons. *Front Immunol* 2018; 9:2529.

Velozo D, Cabral A, Ribeiro MCM, Motta JOC, Costa IMC, Sampaio RNR. Leishmaniose mucosa fatal em criança. *An. Bras. Dermatol.* 2006; 81:255-259.

Wang CY, Zhang F, Hou M, Chen I, Yang BY, Ji MJ. Expression characteristics of microRNA in mice with schistosomiasis and praziquantel treatment. *Zhon. X. Chon. Bing Zhi Za Zhi.* 2014^a; 26:165-8.

Wang Q, Zhao C, Cai Q, Zhu H. Expression of microRNA-155 and regulative T cell in sepsis patients and their relationship. *Zhong. Wei Zhong Bing Ji. Jiu. Yi Xue.* 2014^b; 26:179-83.

Wang C, Yang S, Sun G, Tang X, Lu S, Neyrolles O, Gao Q. Comparative miRNA expression profiles in individuals with latent and active tuberculosis. *PLoS One.* 2011; 6:e25832.

Wang S, Zhang X, Ju Y, Zhao B, Yan X, Hu J, et al. MicroRNA-146a feedback suppresses T cell immune function by targeting Stat1 in patients with chronic hepatitis B. *J Immunol.* 2013; 191:293-301.

Weirather JL, Duggal P, Nascimento EL, Monteiro GR, Martins DR, Lacerda HG et al. Comprehensive candidate gene analysis for symptomatic or asymptomatic outcomes of *Leishmania infantum* infection in Brazil. *Ann Hum Genet* 2017; 81:41-48.

World Health Organization W. Cutaneous Leishmaniasis. World Health Organization, (WHO). 2013.

WHO, Global Leishmania situation, 2018. <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>

Xu D, Liu H, Koma M. Direct and indirect role of toll-like receptors in T cell mediated immunity. *Cell. Mol. Immun.* 2004; 1:239-246.

Zhang Y, Li Y. Regulation of innate receptor pathways by microRNAs. *Sci. Chin.* 2013; 1:13-18.