

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Leandro de Freitas Teles

Correlação entre Citocinas da Medula Óssea, Carga Parasitária e Características  
Clínico-Laboratoriais na Leishmaniose Visceral Humana Grave

Montes Claros  
2018

Leandro de Freitas Teles

Análise da Correlação entre Citocinas da Medula Óssea, Carga Parasitária e Características Clínico-Laboratoriais na Leishmaniose Visceral Humana Grave

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças

Orientador: Prof. Dr. Silvio Fernando Guimarães de Carvalho

Montes Claros

2018

T269c Teles, Leandro de Freitas.  
Correlação entre citocinas da medula óssea, carga parasitária e características clínico-laboratoriais na Leishmaniose visceral humana grave [manuscrito] / Leandro de Freitas Teles. – 2018.  
75f. : il.

Inclui Bibliografia.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/PPGCS, 2018.

Orientador: Prof. Dr. Sílvio Fernando Guimarães de Carvalho.

1. Leishmaniose visceral. 2. Medula óssea. 3. Citocinas. 4. Fator de crescimento insulina símile I. 5. Carga parasitária. I. Carvalho, Sílvio Fernando Guimarães de. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.

Catálogo: Biblioteca Central Professor Antônio Jorge.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Reitor: João dos Reis Canela

Vice-reitor: Antônio Alvimar Souza

Pró-reitor de Pesquisa: Virgílio Mesquita Gomes

Coordenadoria de Acompanhamento de Projetos: Karen Torres Corrêa Lafetá de Almeida

Coordenadoria de Iniciação Científica: Sônia Ribeiro Arrudas

Coordenadoria de Inovação Tecnológica: Dario Alves Oliveira

Pró-reitor de Pós-graduação: Juliane Leite Ferreira

Coordenadoria de Pós-graduação Stricto-sensu: Maria de Fátima Rocha Maia

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador Prof. Alfredo Maurício Batista de Paula

Subcoordenadora: Profa. Marise Fagundes Silveira



CANDIDATO(A): LEANDRO DE FREITAS TELES

TÍTULO DO TRABALHO: "Correlação entre Citocinas da Medula Óssea, carga parasitária, características Clínico-Laboratoriais e Leishmaniose Visceral Humana Grave"

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças

LINHA DE PESQUISA: Diagnóstico e Aspectos Clínicos das Doenças

**BANCA (TITULARES)**

PROF. DR. SÍLVIO FERNANDO GUIMARÃES DE CARVALHO - ORIENTADOR


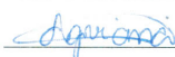


PROF.<sup>a</sup>. DR.<sup>a</sup>. ELAINE VELOSO ROCHA URIAS

PROF. DR. AGOSTINHO GONÇALVES VIANA

PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> MARIANA SANTOS CARDOSO

PROF.<sup>a</sup>. DR.<sup>a</sup>. JAMILLE FERNANDES LULA

**ASSINATURAS**

**BANCA (SUPLENTES)**

PROF. DR. MARCOS VINICIUS MACEDO DE OLIVEIRA

PROF. DR. WELLINGTON DANILO SOARES

**ASSINATURAS**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

APROVADO(A)

REPROVADO(A)

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que não pouparam esforços para me incentivar a trilhar o caminho dos estudos, muitas vezes abdicando de suas próprias vontades.

A Franci, minha esposa, e Francisco, meu filho, pelo amor e carinho e por entender os tempos de ausência; e ao futuro filho, Lucas, pelo estímulo indireto que me proporcionou.

Às minhas irmãs, tias e tios, primos e primas, cunhados, sogro e sogra e amigos por sempre estarem presentes e torcendo pelo meu sucesso.

Ao meu orientador Dr Sílvio, que com sua experiência, me transmite muito conhecimento de vida, além do saber científico; e, além de tudo, tornou-se um grande amigo. Dr Sílvio obrigado pela amizade.

Ao meu amigo Agostinho que não poupou esforços para que esse trabalho fosse realizado.

A Mariana e Guilherme, Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos/ICB/UFMG, por terem me auxiliado na execução dos experimentos e análise dos dados. Serei sempre grato.

A Jamille por estar sempre apta em tirar dúvidas e corrigir o trabalho.

A Rosa sempre solícita, com quem sempre podia contar para resolver problemas. Empenhada na busca de dados. E a Erivelton pela ajuda com o material de estudo.

A Dr<sup>a</sup> Tânia por trilhar juntos esse caminho do conhecimento, às vezes difícil. E pela qualidade de coleta e análise do material estudado.

A Dr<sup>a</sup> Elaine por transmitir incentivo nos momentos difíceis do trabalho e por estar sempre à disposição para tirar dúvidas e corrigir o trabalho.

Agradeço a Vinicius pela ajuda na análise dos dados.

Aos colegas do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário pelo incentivo e amizade e pela ajuda na realização das técnicas.

Aos colegas da Fundação Hemominas pela torcida na realização desse projeto.

Aos professores da Pós-Graduação em Ciências da Saúde pelos estímulos dados.

Agradeço a todos os colegas da Diretoria Acadêmica.

Agradeço a Do Carmo pela atenção na resolução das questões da Pós-Graduação. Sempre prestativa e empenhada em solucionar as dúvidas dos discentes.

Agradeço ao Hospital Universitário pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos/ICB/UFMG) e ao Prof. Ricardo Fujiwara (Departamento de Parasitologia/ICB/UFMG), pela solicitude em nos receber e em nos ensinar.



## RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistêmica, podendo ser fatal se não tratada. No Brasil ocupa importante papel epidemiológico e, atualmente, encontra-se urbanizada e em franca expansão. Apesar dos recursos de tratamento intensivo e das rotinas estabelecidas para o tratamento específico da LV, constatou-se aumento na letalidade da doença em diversas regiões do País. Como o seu desenvolvimento ou controle depende da eficácia das respostas imunes do hospedeiro e da habilidade do parasito em escapar dessa resposta, a compreensão dos mecanismos imunopatológicos poderá contribuir para a identificação precoce dos pacientes com maior risco de evolução desfavorável, e, conseqüentemente, reduzir a letalidade. Os fatores que determinam a evolução para a forma grave da doença ainda não foram completamente elucidados, mas uma resposta imune celular específica da leishmaniose parece desempenhar um papel fundamental. Na LV, o sistema imunológico é altamente ativado com produção de citocinas e fatores de crescimento, como por exemplo, fator de crescimento insulina símile I (IGF-1). Além disso, há uma linha tênue entre as respostas imunes que efetivamente controlam o crescimento do parasito e induzem a imunidade a longo prazo daquelas que permitem a persistência do parasito e a doença associada. O estudo verificou a resposta imunológica através de citocinas, IGF-I e carga parasitária na medula óssea de indivíduos com LV. Os resultados mostraram elevada produção não dicotomizada (Th1 e Th2) de citocinas e não houve diferença significativa na expressão gênica medular de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-12p40 e IGF-I entre os perfis de gravidade da LV; embora o grupo grave tenha apresentado piores médias nos parâmetros laboratoriais periféricos. Apesar do IFN- $\gamma$  estar envolvida no controle de parasitos e ser encontrada em níveis aumentados nos pacientes com a LV, sua capacidade de exercer essa função parece ser suprimida pela IL-10, o que pode ser observado pela correlação forte e negativa entre IFN- $\gamma$  e IL-10 observada no estudo. Também foi encontrada uma relação não significativa entre carga parasitária medular e gravidade dos indivíduos com LV e uma fraca correlação entre carga parasitária e expressão de IGF-I. Não houve diferença entre a expressão gênica medular de IGF-I entre os indivíduos com LV ativa e controle e baixa correlação desse fator de crescimento com as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-3 e CSF2. O entendimento da imunopatogênese da doença no ambiente da medula óssea através de mensurações de marcadores imunológicos (citocinas e fator de crescimento) que participam da progressão clínica da doença pode auxiliar na prevenção para um quadro desfavorável e subsidiar o desenvolvimento de novas terapias.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, medula óssea, citocinas, fator de crescimento insulina símile I, carga parasitária.

## ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) is a systemic disease, and can be fatal if left untreated. In Brazil, it occupies an important epidemiological role and, currently, it is urbanized and in rapid expansion. In spite of the intensive treatment resources and established routines for the specific treatment of VL, an increase in lethality of the disease has been observed in several regions of the country. Since its development or control depends on the efficacy of host immune responses and the ability of the parasite in order to escape this response, the understanding of immunopathological mechanisms may contribute to the early identification of patients with a higher risk of unfavorable outcome, and, consequently, reduce lethality. Factors that determine the progression to the severe form of the disease have not yet been fully identified, but a cellular immune response specific for leishmaniasis appears to play a key role. In VL, the immune system is highly activated with production of cytokines and growth factors, for example, insulin-like growth factor I (IGF-1). In addition, there is a fine line between immune responses that effectively control parasite growth and induce long-term immunity from those that allow parasite persistence and associated disease. The study verified the immune response through cytokines, IGF-I and parasite load in the bone marrow of individuals with VL. The results showed a high non-dichotomized production (Th1 and Th2) of cytokines and there was no significant difference in the expression of IFN- $\gamma$  TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-12p40 and IGF-I among the severity of VL; although the severe group presented worse mean in the peripheral laboratory parameters. Although IFN- $\gamma$  is involved in parasite control and is found at increased levels in patients with VL, its ability to exert this function appears to be suppressed by IL-10, which can be observed by the strong and negative correlation between IFN- $\gamma$  and IL-10 levels observed in the study. We also found a non-significant relationship between spinal cord load and the severity of individuals with VL and a weak correlation between parasite load and IGF-I expression. There was no difference between the IGF-I marrow gene expression between the active and control VL individuals and the low correlation of this growth factor with the IFN- $\gamma$  TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-03 and CSF2 cytokines. The understanding of the immunopathogenesis of the disease in the bone marrow environment through measurements of immunological markers (cytokines and growth factor) that participate in the clinical progression of the disease can help prevent an unfavorable situation and subsidize the development of new therapies.

Key-words: Visceral leishmaniasis, bone marrow, cytokines, insulin-like growth factor I, parasitic load.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	Células dendríticas
células NK	Células <i>natural killer</i>
CMI	Imunidade mediada por células
Dalys	Anos de vida ajustados por incapacidade
DTH	Teste cutâneo de hipersensibilidade tardia
ELISA	Ensaio imunoenzimático ( <i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i> )
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgG	Imunoglobulina G
IGF-I	Fator de crescimento insulina-símile I
IGF-IR	Receptor de fator de crescimento insulina-símile I
IL	Interleucina (citocina)
LV	Leishmaniose visceral
NOI	Intermediário reativo de nitrogênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RT-PCR	PCR em Tempo Real
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
ROI	Intermediário reativo de oxigênio
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> CD4 <sup>+</sup> da subclasse funcional 1
Th2	Linfócitos T <i>helper</i> CD4 <sup>+</sup> da subclasse funcional 2
Th3	Linfócitos T <i>helper</i> CD4 <sup>+</sup> da subclasse funcional 3
Th17	Linfócitos T <i>helper</i> CD4 <sup>+</sup> da subclasse funcional 17
Treg	Linfócitos T <i>helper</i> CD4 <sup>+</sup> da subclasse funcional reg
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa ( <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> )
TGF- $\beta$	Fator transformador de crescimento $\beta$

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 OBJETIVOS .....	32
2.1 Objetivo Geral.....	32
2.2 Objetivos Específicos .....	32
3 PRODUTOS .....	34
3.1 PRODUTO 01.....	35
3.2 PRODUTO 02.....	53
4 CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO.....	74

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é causada por um parasito do gênero *Leishmania* e é transmitida ao homem por pela picada dos flebótomos. Existem 3 formas principais de leishmaniose: visceral, cutânea e mucosa (1).

Um total de 98 países e 3 territórios em 5 continentes relataram transmissão endêmica das leishmanioses (2). Estima-se que 12 milhões de pessoas em todo o mundo tenham alguma forma de leishmaniose e que 350 milhões de pessoas estejam em risco. Com base em estimativas, ocorrem aproximadamente 200.000 a 400.000 casos de leishmaniose visceral (LV) e 700.000 a 1,2 milhões de casos de leishmaniose cutânea a cada ano; e uma estimativa de 20.000 a 40.000 mortes por leishmaniose visceral por ano e mais de 2 milhões de DALYs (anos de vida ajustados por incapacidade) perdidos (3). Mais de 90% dos novos casos de LV notificados à Organização Mundial de Saúde (OMS) ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (1, 2, 4).

Na América Latina, os casos de LV ocorrem do México à Argentina, mas cerca de 90% dos casos relatados vêm do Brasil. Entre 2010 e 2017, 29.813 casos foram confirmados, sendo o Estado de Minas Gerais responsável por 3.235 casos nesse período (5, 6).

A ocorrência da LV limitava-se a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, mas, atualmente, encontra-se urbanizada e em franca expansão. Vários fatores podem ter contribuído para essa mudança de distribuição geográfica, como o desmatamento, as condições precárias de saneamento decorrentes do crescimento desordenado das cidades que favoreceram a adaptação do vetor *Lutzomyia longipalpis* e propiciaram o contato direto entre os ciclos silvestre e urbano da LV. Além disso, a doença tem sido verificada como infecção oportunista em pacientes com Aids, semelhantemente ao que se observa no sul da Europa. Apesar dos esforços no controle de vetores e reservatórios, a LV encontra-se em rápida expansão, acometendo indivíduos de diferentes grupos de idades, com maior frequência em crianças até dez anos de idade (7-9).

A proporção de leishmaniose visceral assintomática para sintomática pode variar de 0,4:1 a 50:1 dependendo da zona endêmica, demonstrando que muitas pessoas infectadas desenvolvem uma resposta imune efetiva e não manifestam doença clínica. As características genéticas e imunológicas do hospedeiro, além da cepa do parasito e carga parasitária, influenciam o desenvolvimento da doença (10).

A infecção por *Leishmania* resulta em distintas situações clínicas e imunopatológicas. A LV se caracteriza por apresentar uma série de alterações clínico-laboratoriais, além de poder evoluir à forma grave, com apresentação de: sangramento, infecção bacteriana, intensa pancitopenia, icterícia e edema generalizado. Esses fatores têm sido identificados como os mais importantes preditores do mau prognóstico (9, 11).

Apesar dos recursos de tratamento intensivo e das rotinas estabelecidas para o tratamento específico da LV, constatou-se aumento na letalidade da doença em diversas regiões do país (8). Como na LV, o desenvolvimento da doença ou o controle da infecção dependem da eficácia das respostas imunes inatas e adaptativas, a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da LV poderá contribuir para a identificação precoce dos pacientes com maior risco de evolução desfavorável, e, conseqüentemente, reduzir a letalidade.

### 1.1 Apresentação Clínica da LV

As manifestações clínicas da LV podem variar desde a infecção assintomática até a doença progressiva e potencialmente fatal. O período de estado da doença apresenta amplo quadro clínico e tem como sinais mais comuns a febre, emagrecimento, hepatoesplenomegalia e caquexia, mas com grande variabilidade entre os indivíduos. A tríade clássica da LV (hepatoesplenomegalia, febre e pancitopenia) é observada em 75% dos casos (12-15). Alguns indivíduos apresentam sinais de hemorragia, sendo a epistaxe o mais comum, seguido de gengivorragia e petéquias. O período de incubação varia de três a oito meses, mas pode ser tão breve quanto 10 dias e tão longo quanto 24 meses (16-18).

Os sinais e sintomas irão depender da relação que se estabelece entre parasito-hospedeiro. Do ponto de vista clínico e laboratorial, a LV pode ser dividida didaticamente em três formas,

conforme as características apresentadas pelos pacientes: assintomática e a clássica. Somente uma pequena parcela de indivíduos infectados desenvolve a forma clássica da LV (19).

Por razões desconhecidas, alguns pacientes evoluem com apresentação de sinais clínicos de gravidade como icterícia, sangramento, co-infecções bacterianas, edema (anasarca) e ou vômitos que podem levar à morte, mesmo quando tratados com terapias (20-22).

Em um estudo realizado no Brasil, no qual se propôs um sistema de pontuação prognóstica para morte por LV, foi encontrado que no momento da suspeita clínica, a morte estava associada à presença de esplenomegalia, edema, fraqueza, sangramento, icterícia, idade (1 ano ou menos e mais de 19 anos), co-infecção por *Leishmania*-HIV e presença de infecção bacteriana (23). O desenvolvimento de um escore prognóstico utilizando parâmetros clínicos e laboratoriais são extremamente importantes, uma vez pode ajudar a reduzir as taxas de letalidade (23).

Em um outro estudo brasileiro, foram descritos quatro fatores clínicos (sangramento da mucosa, icterícia, dispneia, suspeita de coinfeção bacteriana) e duas variáveis laboratoriais (neutropenia grave e trombocitopenia grave) como preditores independentes do risco de morte em crianças e adolescentes menores de 15 anos de idade (6).

No Sudão do Sul, o estudo de prognóstico associou jovens e idosos, longa duração da doença, anemia, desnutrição, esplenomegalia, alta densidade parasitária e vômitos a um maior risco de morte (24).

É importante ressaltar que a maioria desses fatores de risco para morte pode ser facilmente observada por um médico ou outro profissional de saúde em unidades básicas, permitindo a detecção precoce de casos de LV potencialmente graves e o direcionamento para serviços de saúde especializados, com redução do número de óbitos (23).

## 1.2 Diagnóstico

O diagnóstico da LV baseia-se em três critérios: epidemiológico, clínico e laboratorial:

a) Epidemiológico:

Procedência ou viagem nos últimos meses para área endêmica. Se residente em área endêmica, investigar ocorrência de casos caninos, ou presença do vetor na residência, identificados como *Flebótomos* ou *Lutzomias* (22).

b) Clínicos

Febre, hepatoesplenomegalia, anemia e manifestações hemorrágicas são sintomas clássicos e bem sugestivos de LV. O diagnóstico se torna difícil nos casos oligossintomáticos onde o paciente apresenta histórico de febre associado à tosse persistente, diarreia intermitente por mais de três semanas, adinamia, aumento discreto de fígado ou baço podendo ser confundido com outros processos infecciosos comuns da região (25, 26).

c) Laboratoriais

Os achados laboratoriais incluem anemia, leucopenia, plaquetopenia, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia e múltiplos fatores envolvidos na sua gênese, como hiperesplenismo, resposta imune e deficiências nutricionais (27).

O diagnóstico laboratorial da LV é conduzido quando existem indicativos clínicos e/ou epidemiológicos e consiste, fundamentalmente, de três grupos de exames: os exames parasitológicos, os métodos imunológicos e os métodos moleculares.

Os exames parasitológicos são considerados classicamente como os métodos “padrão-ouro” no diagnóstico da LV e são baseados na demonstração do parasito e/ou no seu isolamento em cultivo. O material obtido pode ser empregado para confecção de esfregaços ou impressão em lâminas, histologia, isolamento em meios de cultura ou inoculação em animais de laboratório (12, 28).

Os testes imunológicos diferem em sua sensibilidade, especificidade e na sua aplicação prática. Uma vez que esses testes dependem dos níveis de globulinas circulantes, os testes podem permanecer positivos durante muito tempo após o tratamento (28, 29). Entretanto, os



anticorpos formados durante o curso da infecção poderão mostrar reações cruzadas com antígenos semelhantes encontrados em outras doenças como a doença de Chagas, malária, tuberculose, leishmaniose tegumentar, hanseníase, esquistossomose e outras (28).

Diferentes técnicas sorológicas têm sido utilizadas no diagnóstico da LV. No Brasil, os testes imunológicos utilizados para a detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* são o ensaio imunoenzimático (ELISA), a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), os testes imunocromatográficos e a imunofluorescência baseada em citometria de fluxo (30).

Desde a sua introdução em 1971, os métodos imunoenzimáticos vêm sendo avaliados na detecção de anticorpos específicos na leishmaniose (30). É um teste que permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, de fácil execução e leitura objetiva dos resultados (31, 32).

Em razão ao alto custo, os métodos sofisticados não podem ser utilizados em ampla escala. Com isso, houve a necessidade de um teste simples, rápido, com boa sensibilidade e especificidade. Portanto, um promissor teste de tira imunocromatográfica “pronto para uso” baseado em antígeno rk39 foi desenvolvido para utilização em condições difíceis de campo (28).

Devido às dificuldades existentes no diagnóstico sorológico, antigênico e parasitológico de LV, nos últimos anos, têm-se buscado testes sensíveis e específicos, como aqueles baseados em métodos moleculares. Entre os exames moleculares, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é a mais usada e vem sendo avaliada nas últimas décadas para diagnóstico da LV, com diferentes objetivos, incluindo o diagnóstico da infecção, o diagnóstico da doença, identificação de espécie e o controle de cura (33-35).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta que tem sido utilizada para a detecção do DNA da *Leishmania* sp. em uma variedade de amostras clínicas. Devido ao custo elevado, necessidade de profissional capacitado e à ampla variedade de alvos e iniciadores disponíveis no diagnóstico molecular, ainda não há um procedimento padrão ouro, o que dificulta a inserção desse ensaio na rotina dos serviços de saúde (36).

A técnica de reação de cadeia de polimerase (PCR), realizada com amostras da medula óssea, baço, linfonodos e sangue periférico constitui avanço importante no diagnóstico da LV. A

detecção da presença do DNA do parasito em amostras biológicas, não necessariamente pode ser interpretada como infecção ativa. Dessa forma, questiona-se a importância do PCR como método diagnóstico, considerando a positividade observada em pacientes assintomáticos e indivíduos clinicamente curados após tratamento específico (28). As doenças causadas pelas várias espécies de *Leishmania* se caracterizam por promover alterações no número de parasitos durante o curso da infecção (37, 38).

Na LV, a carga parasitária pode variar com o tempo após a infecção no mesmo tecido e também entre diferentes tecidos em um mesmo momento após a infecção (39). Quantificar a carga parasitária, além de um método de diagnóstico preciso, pode ser uma boa maneira de acompanhar a evolução da infecção, identificar recidivas, verificar o efeito de um determinado esquema terapêutico e, conseqüentemente, como critério de cura da doença (14).

A determinação da densidade de parasitos em diferentes amostras biológicas pode ser conseguida através da microscopia, pela contagem de amastigotas em relação aos núcleos das células do hospedeiro em esfregaços do tecido (17). Devido à dificuldade que essa técnica de quantificação apresenta, métodos baseados na amplificação quantitativa em tempo real (qPCR) têm sido desenvolvidos para aperfeiçoar a detecção, esse método permite a quantificação e o monitoramento simultâneo do produto amplificado através do uso de corantes fluorescentes ou sondas de DNA marcadas com fluorocromos (40).

Na reação de amplificação quantitativa em tempo real (qPCR), é utilizado o SYBR Green I, corante, que se liga de forma inespecífica ao DNA dupla fita durante a amplificação. Outra maneira de gerar a fluorescência é usar uma sonda especificamente dirigida a uma região interna da sequência que será amplificada, e um exemplo deste sistema é a sonda TaqMan. Durante a amplificação, a sonda TaqMan é degradada e ocorre a emissão de luz. A análise da emissão de luz é feita através de um detector de sinal que cria um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo de PCR, e o sinal gerado reflete a quantidade de produto formado (41).

Por não possuir as várias etapas de manipulação pós-amplificação da PCR convencional, a qPCR minimiza os riscos de contaminação do material, além de permitir de forma simultânea a detecção, medida e comparação do número de parasitos em diferentes amostras (42). A qPCR ainda possui maior velocidade, reprodutibilidade e capacidade de quantificação.

Entretanto, existe a necessidade de laboratórios bem equipados e o custo ainda limita o seu uso em campo e em países em desenvolvimento (31).

### 1.3 Tratamento

No Brasil, o tratamento de primeira linha da LV é realizado com antimoniato de N - metilglucamina (Glucantime®), (20 mg Sb<sup>+5</sup>/kg/dia) durante 20 dias, reservando o uso de anfotericina B, (1mg/kg/dia) durante 14 dias, para pacientes gestantes e pacientes com sinais de gravidade, toxicidade ou refratariedade, relacionados ao uso dos antimoniais pentavalentes (43).

As formulações lipídicas da anfotericina B apresentam a vantagem de reduzir a toxicidade da droga e redução do tempo de tratamento em relação a formulação desoxicolato; e o seu uso (3 mg/kg/dia) durante 7 dias é reservada à pacientes com alto risco de mortalidade (idade inferior a um ou superior a 50 anos; escore de gravidade: clínico  $\geq 4$  ou clínico-laboratorial  $\geq 6$ ; insuficiências renal, hepática, cardíaca; transplantados cardíacos, renais ou hepáticos; intervalo QT corrigido no exame eletrocardiográfico maior que 450 milissegundos (ms); uso concomitante de medicamentos que alteram o intervalo QT; hipersensibilidade ao antimoniato de N-metil glucamina ou outros medicamentos utilizados para o tratamento da leishmaniose visceral; infecção pelo HIV; comorbidades ou medicação que compromete a imunidade; falha terapêutica ao N-metil glucamina ou a outros medicamentos utilizados para o tratamento da leishmaniose visceral; gestantes (44).

### 1.4 Resposta imune do hospedeiro

Os fatores que determinam o desenvolvimento ou não da LV e sua evolução para forma grave da doença ainda não foram completamente identificados, mas uma resposta imune celular específica da leishmaniose parece desempenhar um papel fundamental (45).

Anormalidades imunológicas precoces durante a infecção podem estar envolvidas na patogênese da LV. Na leishmaniose visceral, o sistema imunológico é altamente estimulado e produz as citocinas ativadoras de macrófagos, interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose

tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e as inibidoras de macrófagos, interleucina-10 (IL-10) e fator transformador de crescimento-beta (TGF- $\beta$ ). Estudos de processos de ativação e desativação imunológica, bem como mecanismos imunopatogênicos, podem contribuir para um melhor entendimento da doença e ao desenvolvimento de alternativas de tratamento (46, 47).

Foi descrita uma incapacidade transitória de montar uma imunidade mediada por células (CMI) efetiva em LV com base na ausência de resposta proliferativa de linfócitos e estimulação *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) pelo antígeno de *Leishmania* (47). Os pacientes com LV também apresentam testes cutâneos de hipersensibilidade do tipo retardado negativos (48).

A resposta imune em indivíduos após a infecção por *Leishmania infantum* pode ser eficaz no controle da infecção e gerar uma forte resposta de hipersensibilidade tardia. Nesses casos, o indivíduo infectado é tipicamente assintomático e o teste cutâneo de hipersensibilidade tardio (DTH) reativo está associado a altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  produzidos por células T CD4+ (49).

A LV é uma doença heterogênea complexa com vários mecanismos imunes inatos e adaptativos envolvidos na patologia da doença. Após a deposição de promastigotas metacíclicas infectantes na derme, o sistema imune inato da pele recruta células inflamatórias para locais de invasão em poucos minutos e promove a indução da imunidade adaptativa (50).

Na LV, existe uma linha tênue entre as respostas imunes que efetivamente controlam o crescimento do parasito e induzem a imunidade a longo prazo daquelas que permitem a persistência do parasito e a doença associada. Os indivíduos infectados podem progredir para respostas imunes apropriadas que limitam a patologia da infecção (ou seja, subclínica) ou para o não controle parasitário e, conseqüente, replicação e doença. Estudos tentam identificar quais fatores imunológicos, genéticos, nutricionais ou outros fatores epidemiológicos influenciam esses resultados (51).

Os achados progressivos no campo da imunologia da LV humana sugerem importantes papéis de diferentes citocinas na proteção de doenças e na patogênese. A resposta imune inata contra a infecção por *Leishmania* desempenha um papel fundamental na previsão do resultado da

doença. Não só ajuda na prevenção do crescimento precoce do parasito e na disseminação da infecção, mas também atua como uma fonte de diferentes citocinas imunorreguladoras (52).

À medida que o parasito se multiplica, há forte indução do sistema fagocitário mononuclear do paciente (53). Imunologicamente, a LV é acompanhada por uma ausência de hipersensibilidade tardia, CMI específicas de *Leishmania* prejudicada com base no fracasso das células mononucleares do sangue periférico em proliferar e produzir IFN- $\gamma$  em resposta ao antígeno *Leishmania*, ativação de células B policlonais e hipergamaglobulinemia (3, 19, 48).

Apesar dessa falta de resposta específica ao antígeno, há evidências de que células T reativas ao antígeno estão presentes em pacientes com leishmaniose (calazar), visto que após o sucesso da quimioterapia, há restauração da reatividade específica do antígeno, respostas proliferativas *in vitro* para antígeno parasito são restaurados e há desenvolvimento de imunidade contra reinfecção (54, 55).

Respostas celulares efetivas para combater a *Leishmania* dependem da formação de subconjuntos de células T CD4+ que são capazes de ativar as respostas leishmanicidas por macrófagos e monócitos do hospedeiro. A diferenciação de subconjuntos de células T CD4+, Th1, Th2, Treg e Th17, depende muito do microambiente da citocina durante a ativação inicial de células T CD4+ virgens. Dependendo do equilíbrio dessas citocinas, moléculas co-estimulatórias, genética do hospedeiro e estímulos antigênicos, uma determinada célula T se diferenciara em um dos subgrupos Th e produzirá as citocinas específicas. Essas citocinas, por sua vez, atuarão nos macrófagos e monócitos do hospedeiro para prepará-los para o controle eficaz ou ineficaz da *Leishmania* e subsequente controle ou não da imunopatologia (49).

Inicialmente, acreditava-se que, na LV, a susceptibilidade estava associada à incapacidade de produzir um perfil de citocina estimulante de macrófagos (perfil Th1), incluindo IFN- $\gamma$  e interleucina-12 (IL-12); em vez disso, havia produção de citocinas imunossupressoras, interleucina de perfil Th2, como interleucina-10 (IL-10). No entanto, tem-se observado que durante a infecção, as respostas do tipo de células Th2 altamente polarizadas parecem não se desenvolver; em vez disso, há uma resposta inicial da célula Th1-Th2 (45, 55).

Ao contrário dos modelos murinos, não há dicotomia clara nas citocinas Th1 e Th2 na LV humana e seus impactos na resistência e susceptibilidade não estão claramente definidos. No

entanto, os pacientes com LV ativa estão associados com aumento dos níveis de múltiplas citocinas plasmáticas, IL-10, IL-6, IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 (50). Como níveis elevados de RNAm de IFN- $\gamma$  foram encontrados no baço e na medula óssea durante a fase aguda da infecção, a evolução clínica desfavorável não está relacionada somente com a distorção para o perfil Th2, mas mecanismos subjacentes contribuem para a patogênese da LV (3).

O hospedeiro infectado pode falhar em controlar a infecção por *Leishmania* devido à resposta defeituosa dos mecanismos de sinalização intracelular induzidos por IFN- $\gamma$ . Apesar da presença de altos níveis de IFN- $\gamma$  durante a infecção, os hospedeiros podem não conseguir controlar a infecção e resolver sua doença, devido à falta de resposta ao IFN- $\gamma$  relacionada à falha na sinalização. A regulação negativa do receptor IFN- $\gamma$  contribui para a inativação da sinalização celular em células infectadas por *L. donovani* (50, 56).

Assim, pacientes com calazar não possuem déficit da resposta Th1, como se imaginava; em vez disso, há coexpressão de um perfil Th2 (principalmente IL-10), provavelmente produzida como um mecanismo homeostático para controlar a inflamação induzida por infecção forte e persistente (57).

Dados subsidiam a hipótese de que a IL-10 é um importante imunomodulador, atenuando os mecanismos de defesa do hospedeiro e favorecendo o controle da resposta imune após a depuração efetiva do parasito (58). Ensaio com bloqueio de IL-10 *in vivo*, utilizando amostras de pacientes com LV, mostraram um aumento da IFN- $\gamma$  e na produção de TNF- $\alpha$ , associado também com redução do crescimento parasitário, indicando que a IL-10 é um dos principais supressores de mecanismos imunes leishmanicidas em doentes LV humanos (3). A ação da IL-10 reduz a morte de *Leishmania* mediada por intermediários reativos de nitrogênio (IRN) e oxigênio (IRO) produzidos por macrófagos, favorecendo o início e progressão da doença. Portanto, a IL-10 pode proteger os tecidos dos danos colaterais causados pela inflamação excessiva, mas nas doenças infecciosas, onde uma resposta inflamatória é necessária para evitar a proliferação do parasito, a IL-10 pode prevenir uma resposta ideal (21, 45, 59).

Vários estudos associaram a presença de IL-10 com a gravidade da LV. Costa *et al.*, (2013) encontraram uma associação de IL-10 com alguns indicadores clínicos de gravidade da doença, como sangramento, contagem de neutrófilos e níveis de hemoglobina. Além disso, a

neutralização da IL-10 em células do aspirado esplênico de pacientes com LV aumenta a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e reduz a carga parasitária (21, 59).

A ausência de ações ou produtos parasitários que possam prejudicar as células ou tecidos do hospedeiro indica que a patogenicidade sistêmica da LV depende da resposta do hospedeiro. É razoável supor que as citocinas possam estar fortemente relacionadas, ou ser a própria causa, dos casos mais graves de calazar, ao gerar uma resposta inflamatória sistêmica prejudicial (60).

A inflamação sistêmica tem sido descrita como uma causa de manifestações clínicas em várias infecções intracelulares, incluindo malária e leishmaniose. Na LV, essa resposta inflamatória apresenta-se como uma liberação de múltiplas citocinas, bem descrita na literatura como tempestade de citocinas. A tempestade de citocinas pode ser considerada como causa direta de algumas manifestações clínicas da LV. De fato, a liberação de mediadores inflamatórios poderia ser responsável pelo dano tecidual, e sua influência na gravidade da LV foi previamente indicada por Costa *et al.*, (2010, 2013) (20, 60).

A evidência de que a liberação sistêmica de citocinas favorece a evolução/gravidade da doença é corroborada pela observação de que indivíduos assintomáticos não apresentam tal perfil (21). Embora uma resposta imune protetora contra a *Leishmania* possa estar sob a influência de uma resposta do tipo I e da produção de IFN- $\gamma$ , o papel preciso das citocinas TH2 em infecções não curadas exige uma exploração cuidadosa (27).

O resultado clínico da doença é uma consequência da interação complexa entre o patógeno e o hospedeiro, e a sobrevivência do patógeno depende em grande parte do tipo de citocina (Th1 ou Th2) produzida pelas células imunes do hospedeiro no momento do encontro e por fatores de crescimento, por exemplo, IGF-1. Os eventos que acontecem no início da infecção influenciam muito o curso da doença. Essa fase inicial é caracterizada por um processo inflamatório no qual vários mediadores e elementos teciduais participam, incluindo fatores de crescimento e citocinas. Estes podem ser benéficos para o hospedeiro, contribuindo para a eliminação do parasito ou favorecendo a sobrevivência e proliferação de *Leishmania*, direta ou indiretamente, em um ambiente hostil dentro dos macrófagos (61).

A via causal da evolução clínica no calazar envolve um processo dinâmico iniciado por imunossupressão, levando a uma maior carga parasitária e, subsequentemente, desencadeando inflamação sistêmica. É interessante avaliar a associação da carga parasitária com a resposta imune e fatores de crescimento na LV humana, uma vez que os imunomoduladores são considerados importantes na patogênese da doença. Portanto, o estudo das principais citocinas Th1/Th2 e fator de crescimento insulina-símile I (IGF-1) em pacientes com LV é necessário para entender a sua correlação com a carga parasitária e com a evolução clínica dos pacientes (62, 63).

#### 1.4.1 Citocinas

As citocinas são produzidas em resposta a diferentes antígenos e podem estimular diversas respostas celulares envolvidas na imunidade e na inflamação. A ação das citocinas frequentemente é pleiotrópica e redundante. As citocinas geralmente influenciam a síntese e a ação de outras citocinas, levando a uma cascata onde a segunda ou a terceira citocina pode mediar os efeitos biológicos da primeira (49).

Muito conhecimento foi adquirido sobre a imunopatogênese da LV; à medida que o parasito se multiplica dentro dos macrófagos esplênicos, fígado e medula óssea, os patógenos induzem forte ativação do sistema fagocitário mononuclear do paciente (48).

Níveis elevados de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são encontrados e essas citocinas podem controlar a proliferação do parasito durante os estágios iniciais (53). Entretanto, apesar de um sistema imunológico altamente ativado, os pacientes exibem imunossupressão antígeno-específica por *Leishmania*. A IL-10 e TGF- $\beta$  são citocinas que podem ser caracterizadas como as responsáveis pela regulação da resposta imune (48).

A LV está associada ao aumento da produção de múltiplas citocinas pró-inflamatórias, e a expressão de citocinas com a IF- $\gamma$  no baço e na medula óssea durante a fase aguda da infecção sugere que desfechos clínicos desfavoráveis não estão relacionados exclusivamente à distorção Th2, mas que outros mecanismos contribuem para a patogênese da LV (3, 64).

Além de poderem prejudicar diretamente o hospedeiro, os parasitos também podem indiretamente causar danos através da resposta produzida. Tem sido sugerido que os



principais fatores de risco para morte em LV estão relacionados ao fato de que uma produção elevada de citocinas pró-inflamatórias sistêmicas que compromete intensamente os órgãos e sistemas. Portanto, é observado a correlação dos níveis de citocinas (especialmente IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6, IL-27 e TNF- $\alpha$ ) com as manifestações clínicas de LV associadas à gravidade da doença. (27, 45, 53).

Além das citocinas, o parasito poderá encontrar fatores de crescimento, que podem ser benéficos para o hospedeiro, levando à eliminação dos parasitos, mas também é possível que eles favoreçam direta ou indiretamente a sobrevivência do parasito. Os IGFs, particularmente o IGF-I, podem pertencer a essa categoria de fatores, uma vez que o IGF-I, constitutivamente presente na pele, é conhecido por estar associado à inflamação, cicatrização de feridas e participação na evolução de leishmanioses (65).

#### 1.4.1.1 Interferon-gama

O IFN- $\gamma$  é a principal citocina produzida pelos linfócitos T e pelas células natural killer (NK), cuja função é ativar os macrófagos, tanto nas respostas imunes inatas como nas respostas imunes adquiridas mediadas pelas células. As principais fontes celulares envolvidas na produção de IFN- $\gamma$  envolvem a resposta imune inata e adaptativa (45).

O IFN- $\gamma$  tem sua produção induzida principalmente por IL-12, mas também pode ser estimulada por outras citocinas. Inicialmente, após a fagocitose das promastigotas, as células dendríticas e macrófagos liberam IL-12, que estimula as células NK a secretar grandes quantidades de IFN- $\gamma$ . A IL-12 induz a diferenciação e proliferação de populações de células CD4<sup>+</sup> Th1, que produzem mais IFN- $\gamma$  (50, 66).

Na LV, o desenvolvimento da doença e o controle da infecção dependem da eficácia de uma resposta imune celular inata e adaptativa induzida por IFN- $\gamma$ . O envolvimento de IFN- $\gamma$  é fundamental para o mecanismo de defesa do hospedeiro contra a LV. O IFN- $\gamma$  ativa macrófagos, levando à ativação da enzima óxido nítrico sintase induzida e à produção concomitante de óxido nítrico e metabólito de nitrogênio, o que promove a morte do parasito. Entre as várias citocinas anti-*Leishmania*, o IFN- $\gamma$  desempenha um papel particularmente proeminente de ativação de macrófagos. Além disso, a atividade leishmanicida de

macrófagos, induzida por IFN- $\gamma$ , mostrou ser aumentada por outras citocinas, como TNF- $\alpha$  e fator inibidor de migração (MIF) (27, 45, 49, 50, 53, 59, 64, 66, 67).

Embora o IFN- $\gamma$  seja considerado envolvido no controle de parasitos e estar em níveis aumentados nos pacientes com a LV ativa, sua capacidade de exercer essa função parece ser suprimida por citocinas também liberadas, como a IL-10. Ainda não está claro por que o IFN- $\gamma$  não supera o efeito modulador da IL-10, mas é possível que uma ativação mediada pela sinalização das células T é necessária para ativar mais eficientemente os mecanismos microbicidas dos macrófagos. Vários estudos descreveram outras citocinas séricas como moduladoras da resposta imune em pacientes com LV, incluindo IL-6, IL-21 e IL-27 (45, 59, 68)

Definida a função do IFN- $\gamma$  no controle da carga parasitária na LV, é necessária que haja um equilíbrio entre a necessidade de uma resposta antiparasitária eficaz para controlar a infecção primária e o potencial para causar danos irreversíveis a longo prazo (69).

#### 1.4.1.2 Interleucina-12

A IL-12 é uma citocina heterodimérica de 70 kDa composta por duas subunidades ligadas por ligação dissulfeto designadas p35 (35 kDa) e p40 (40 kDa), ambas codificadas por genes separados. A molécula heterodimérica IL-12p70, equivale à atividade biológica da IL-12, enquanto a IL-12p40, quando sozinha, pode antagonizar a IL-12 e inibir a geração de linfócitos T citotóxicos *in vitro*. Existem vários tipos de células que podem produzir IL-12p35, mas apenas células dendríticas e macrófagos produzem IL-12p40; e, no final, a IL-12 ativa (59, 70).

A IL-12 é uma importante citocina reguladora que promove a ligação entre as respostas imunes inata e adaptativa. Originalmente descrito como um fator que promove tanto a atividade natural killer quanto a atividade de linfócitos T citotóxicos estimulando a produção de IFN- $\gamma$ . Atualmente se sabe que a IL-12 é uma citocina chave envolvida no desenvolvimento de imunidade específica mediada por células T do tipo 1, ao direcionar as células Th0 a uma resposta Th1 (70).

Foi demonstrado em experimentos que a adição *in vitro* de IL-12 a culturas de linfócitos de pacientes com LV restaura a produção de IFN- $\gamma$  e aumenta a atividade citotóxica das células NK. Além disso, outro experimento mostrou que a adição de IL-12 ou de anti-IL-10 restaurou a proliferação de linfócitos e a produção de IFN- $\gamma$  por PBMC de pacientes com LV ativo. Esses experimentos constataam a importância da IL-12 para a manutenção de uma resposta imune do tipo Th1(47).

#### 1.4.1.3 Interleucina-10

A IL-10 é uma citocina reguladora e pleiotrópica que pode ser produzida por células T, células B, macrófagos, células dendríticas (CDs), células NK, células epiteliais, mastócitos, bem como granulócitos neutrofílicos e eosinofílicos. (11, 52, 71).

A citocina IL-10 foi inicialmente caracterizada como um fator secretado por clones Th2 que inibem a síntese de citocinas por células Th1 (19, 20). Sua ação suprime três importantes funções dos macrófagos: a liberação de mediadores imunológicos, a apresentação do antígeno e a fagocitose. Os altos níveis de IL-10 em concomitância com os altos níveis de IFN- $\gamma$  nos pacientes com calazar promove consistência à hipótese de que IL-10 inibe a ativação de macrófagos induzida por IFN- $\gamma$  em pacientes com a LV (45, 46, 54, 59, 71-74).

O mecanismo da atividade supressora da IL-10 na LV humana foi atribuído principalmente à redução no acúmulo do fator inibidor da migração (MIF) regulado de macrófagos derivados de monócitos e à inibição da geração de intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio a partir de macrófagos, resultando na regulação negativa da atividade leishmanicida. Essa natureza supressiva da resposta imune durante a LV ativa foi principalmente específica para antígenos de *Leishmania*, já que os testes para hipersensibilidade de tipo retardado (testes de *Leishmanina* ou Montenegro) a esses antígenos foram negativos (52).

A IL-10 também promove à sobrevivência de células B e a diferenciação de células plasmáticas, assim, a superprodução de IL-10, a ativação de células B policlonais e a hipergamaglobulinemia aparecem simultaneamente em muitas doenças sistêmicas humanas, incluindo LV. A IL-10 também promove a mudança do isotipo IgG para IgG1 e IgG3, uma característica que foi observada em pacientes com LV humana. Apesar de útil no diagnóstico, a hipergamaglobulinemia não parece ser benéfica para o paciente (11, 53, 58).

A evidência direta do papel da IL-10 como um fator imunossupressor chave na LV é demonstrado por experimentos que utilizaram antagonista do receptor de IL-10 ou anticorpos monoclonais anti-IL-10; os resultados desses experimentos mostraram que a resposta imune e a produção de IFN- $\gamma$  poderiam ser restauradas, levando à ativação de macrófagos e consequentemente à morte do parasito (11).

Assim, embora os altos níveis de IL-10 observados em pacientes com LV possam ajudar a limitar as patologias mediadas pelo sistema imunológico, as atividades imunossupressoras da citocina podem promover a replicação do parasito e a progressão da doença, ao prevenir uma resposta antiparasitária ideal (3, 11, 21, 27, 49, 52, 55, 64, 75).

Isso demonstra a importante associação de IL-10 com a carga parasitária, sugerindo que os níveis de IL-10 podem estar correlacionados com a gravidade da doença na LV humana. Esse processo é caracterizado por um ciclo vicioso no qual uma alta secreção de IL-10 regulatória permite a replicação parasitária progressiva, o que pode levar a citocinas inflamatórias excessivas, inflamação sistêmica e mortalidade (62, 63, 76).

#### 1.4.1.4 Interleucina-6

A IL-6, uma citocina pleiotrópica, é sintetizada por células mononucleares, fibroblastos e outras células em respostas a uma ampla variedade de estímulos inflamatórios, incluindo infecção intracelular. As principais atividades biológicas da IL-6 incluem a indução da síntese proteica de fase aguda nos hepatócitos, a indução da diferenciação terminal das células B e a ativação das células T. Em alguns modelos, a IL-6 também parece atuar diminuindo os mecanismos inflamatórios e prejudicando a ativação e atividade antimicrobiana dos macrófagos, necessária para o desenvolvimento e sustento de ambas as respostas Th1 e Th2 (19, 56, 66).

A IL-6 é expressa em todas as formas de leishmaniose humana (cutânea, mucosa e visceral). Resultados *in vitro* e *in vivo* indicam que a IL-6 pode promover, suprimir ou permanecer inalterada na defesa anti-*leishmania* do hospedeiro. Apesar de não estar claro, o papel da IL-6 na fisiopatologia da LV parece estar envolvida na exacerbação da doença, uma vez que participa na indução de várias outras citocinas causadoras de doenças. Além disso, ao regular

negativamente o TNF-alfa, influencia a secreção de IL-10, estabelecendo, portanto, uma ligação da resposta inata com a imunidade adquirida em pacientes com calazar, via resposta regulatória-T (66).

A *Leishmania* desencadeia uma resposta inflamatória ao estimular a produção de IL-27, IL-10 e IL-6. Essas citocinas regulam negativamente a atividade microbicida dos macrófagos, facilitando a proliferação de leishmanioses. A IL-6 desempenha também um papel na ativação policlonal de células B resultando em uma hipergamaglobulinemia em pacientes com LV, uma vez que a IL-6 é essencial para a diferenciação terminal de células B e produção de imunoglobulinas. A liberação de IL-6 nos estágios iniciais da infecção pode interferir na indução de uma resposta Th1 específica, predispondo os parasitos a proliferar e causar doença. Altos níveis de IL-6 estão associados aos casos mais graves e à morte (19-21, 56, 66).

No entanto, parece que há efeitos diferentes da IL-6 entre os órgãos. Resultados sugerem que, na infecção do fígado, a IL-6 exerce um efeito supressor precoce na defesa do hospedeiro e provavelmente realiza essa ação restringindo as respostas anti-*Leishmania* tipo Th1, incluindo aquelas dependentes de IFN- $\gamma$ ; já sob condições diferentes (testando a transferência de células dendríticas na infecção do baço por *L. donovani*), a IL-6 não parece ser supressora, mas sim leishmanistática. (40). Portanto, a IL-6 apresenta uma complexidade de ações, inclusive na proteção contra infecção por *L. donovani* induzida por terapia com células dendríticas (66, 72, 77).

Há nos pacientes com calazar interações entre as citocinas, no qual a IL-6 parece desempenhar um papel importante no desencadeamento de sintomas e no controle de outras citocinas (20, 60, 73).

#### 1.4.1.5 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )

O TNF- $\alpha$  é secretada por uma variedade de células como macrófagos, monócitos, neutrófilos, células natural killer e células T e é conhecida por afetar o crescimento, diferenciação, sobrevivência e função fisiológica de uma variedade de células diferentes, incluindo a citotoxicidade mediada por macrófagos. Estudos sugerem que os monócitos ativados sintetizam rapidamente TNF- $\alpha$  no local da inflamação e matam os alvos por contato célula-a-

célula, através de sua liberação local no microambiente da interação do efector e alvo (20, 52, 78).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel crítico no desenvolvimento da imunidade inata e adquirida contra *Leishmania*. Possui ação pleiotrópica e parece ser um componente proeminente de um espectro diversificado de respostas inflamatórias benéficas e deletérias. Níveis elevados de TNF- $\alpha$  sérico foram encontrados na LV humana. Os efeitos benéficos do TNF- $\alpha$  endógeno incluem a indução da ativação de macrófagos e o aprimoramento da defesa antimicrobiana do hospedeiro. Isso foi demonstrado em vários estudos utilizando camundongos deficientes em TNF- $\alpha$  e seus receptores. No entanto o TNF- $\alpha$  liberado no soro pode ser responsável pela manifestação clínica da doença, como demonstrado pela correlação direta com vários marcadores clínicos de gravidade da doença (11, 21, 56, 78).

Vários modelos de estudo relataram que a capacidade de camundongos para resistir à infecção está diretamente correlacionada com a capacidade de produzir TNF- $\alpha$  em resposta ao desafio do parasito *in vitro*. O bloqueio do TNF- $\alpha$  *in vivo* através da administração passiva de anticorpos anti-TNF- $\alpha$  exacerba o curso da doença, resultando em aumento constante da carga parasitária hepática na leishmaniose visceral experimental. A ausência de sinalização de TNF- $\alpha$  intrínseco de células T CD4+ impediu sua expansão na medula óssea de camundongos infectados e limitou seu potencial de produzir IFN- $\gamma$ , indicando que o TNF- $\alpha$  desempenha um papel central na regulação do compartimento de células T da medula óssea durante a infecção (79).

Tanto TNF- $\alpha$  como IL-6 regulam positivamente a expressão de IFN- $\gamma$ R aumentando a transcrição e a estabilização do receptor, favorecendo assim a resolução do calazar. E o tratamento com anti-TNF- $\alpha$  resultou no desenvolvimento de LV como um processo de reativação em pacientes em tratamento para artrite. Entretanto, quando produzido em níveis muito altos, o TNF- $\alpha$  pode ter efeito de aumento de doença. Um estudo genético identificou uma ligação entre LV e um polimorfismo em um alelo associado a níveis séricos elevados de TNF- $\alpha$  (11).

A hipótese de que a citocina TNF- $\alpha$  está associada a intenso processo inflamatório e dano tecidual é consistente e deve ser considerada para futuras investigações de terapias anti-TNF, por exemplo, na forma grave da LV e em outras doenças inflamatórias (60).

#### 1.4.1.6 Interleucina-3

A medula óssea é o principal órgão hematopoiético acometido pela infecção por *L. infantum* (80). A regulação da atividade hematopoiética é um importante processo homeostático de mamíferos com participação crucial de um grupo de fatores de crescimento e citocinas para a proliferação e diferenciação dos precursores celulares hematopoiéticos, entre elas se encontra a IL-3 (81).

A IL-3 é uma citocina estimuladora de colônias hematopoiéticas multilinhagem, e tem um papel importante na hematopoiese por estimular a proliferação e/ou diferenciação de diferentes linhagens de precursores hematopoiéticos como granulócitos, macrófagos, eritrócitos e megacariócitos (Ihle, 1992). Produzida por linfócitos T CD4+ e por células B atua em progenitores hematopoiéticos multipotentes através da via Jak/STAT, levando a sobrevivência e crescimento de tais células e consequente diferenciação celular (82).

São escassos os estudos focando a participação desse fator na gênese das lesões observadas na medula óssea de pacientes com LV. Apenas trabalhos realizados em modelo animais infectados por *L. major* demonstram uma correlação entre a susceptibilidade à infecção e a capacidade das células esplênicas produzirem elevados níveis de IL-3, mas o papel dessa citocina na imunoregulação ainda não está clara (83).

#### 1.4.1.7 Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF)

O fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) é o principal fator responsável pela proliferação e/ou diferenciação de granulócitos e monócitos, foi originalmente descoberto como capaz de gerar colônias de granulócitos e macrófagos a partir de células precursoras na medula óssea de camundongos (84). No entanto, posteriormente, foi demonstrado que funções decorrentes principalmente de sua capacidade de afetar propriedades de células mielóides mais maduras, como granulócitos, macrófagos e eosinófilos (85).

Na LV experimental, o GM-CSF mostrou promover três efeitos potencialmente benéficos: mobilização de monócitos sanguíneos, ativação de macrófagos e melhora da granulocitopenia (86). Estudos em modelos murinos com *L. (L.) donovani* mostram que a atividade hematopoiética está aumentada no baço e medula óssea devido à regulação desse processo por fatores de crescimento e/ou citocinas, com um aumento na produção de GM-CSF, dependente de células T (81). Outros estudos demonstraram que macrófagos estromais medulares infectados por *Leishmania* aumentam seletivamente a mielopoiese por uma produção excessiva de GM-CSF e TNF- $\alpha$  (87).

#### 1.4.1.8 Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) são polipeptídios evolutivos bem conservados com uma massa molecular aproximada de 7,5 kDa. As formas mais abundantes são IGF-I e II. São detectáveis tanto na circulação como nos tecidos, principalmente associados às proteínas de ligação ao IGF. A maioria dos tipos de células tem a capacidade de produzir IGFs, embora o principal local de produção seja o fígado. IGF-I e II interagem com receptores de superfície (IGF-IR e IGF-IIR), presentes nas células da maioria dos tecidos. O IGF-IR é o que apresenta funções mais definidas e importantes no processo biológico. Há evidências que sugerem que o IGF-I afeta a homeostasia do sistema imune por aumentar linfopoiese, granulopoiese, proliferação celular e sobrevivência celular (65).

Trabalhos vêm demonstrando a participação do IGF-I em doenças infecciosas. Estudos recentes têm demonstrado a sua diversidade de ação e pleiotropismo em *Leishmania* spp. e como atribui-se ao IGF-I papel promotor de crescimento de células hematopoiéticas, esses níveis baixos de IGF-I na LV ativa poderia ter um papel na pancitopenia. O fator de crescimento semelhante à insulina I, presente na circulação e nos macrófagos, é um dos fatores iniciais que interagem com promastigotas de *Leishmania* na pele do hospedeiro e possivelmente com amastigotas após internalização por macrófagos (58, 63).

Os resultados têm demonstrado que o IGF-I, mas não o IGF-II, induz uma resposta de crescimento de promastigotas de várias espécies de *Leishmania*. Foi observado *in vivo* um aumento significativo no tamanho da lesão e no número de parasitos viáveis na pele de camundongos infectados com promastigotas de *Leishmania amazonensis*. O modo exato de



ação do IGF-I induz os mecanismos operacionais para seu efeito intracelular são ainda desconhecidos (61, 65, 88).

No entanto, em estudos que avaliam a participação do IGF-I na leishmaniose visceral tem se observado resultados diferentes. Em 2007, Gomes *et al.*, por exemplo, encontrou concentrações médias de IGF-I (total e livre) e proteína de ligação a IGF 3 reduzidas em crianças com LV ativa (78). Em outro trabalho, no qual cães naturalmente infectados com LV foram avaliados, também se observou níveis séricos reduzidos de IGF-I e alta expressão hepática de mRNA de IGF-I, sugerindo inibição pós-transcricional; mostrando a similaridade entre leishmaniose visceral humana e canina (78).

Portanto, como relatado em estudos, o IGF-I é importante para a progressão da infecção por *Leishmania amazonensis* em camundongos, mas os baixos níveis séricos de IGF-I na LV e seu papel na infecção por *Leishmania infantum* pode ser distinta e requer mais estudos (88).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a relação entre citocinas da medula óssea, carga parasitária, características clínico-laboratoriais e gravidade da leishmaniose visceral humana.

### 2.2 Objetivos específicos

Identificar o perfil de resposta imune (Th1 ou Th2) predominante na medula óssea de indivíduos com LV.

Comparar a expressão gênica das citocinas medulares entre indivíduos com LV grave e não grave.

Comparar as características clínico-laboratoriais de indivíduos com LV grave e não grave.

Comparar a carga parasitária da medula óssea entre indivíduos com LV grave e não grave.

Comparar a expressão gênica de IGF-I entre indivíduos com LV e controle.

Correlacionar a carga parasitária medular com a expressão gênica do IGF-I

### 3 PRODUTOS

3.1 Produto 01: *Relação entre resposta imune da medula óssea, características clinico-laboratoriais, carga parasitária e a leishmaniose visceral humana grave*, formatado segundo as normas para publicação do periódico *Parasite Immunology*.

3.2 Produto 02: Avaliação da expressão do fator de crescimento insulina símile I na medula óssea e sua correlação com a carga parasitária e resposta imunológica na leishmaniose visceral humana, formatado segundo as normas para publicação do periódico *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.

### 3.1 PRODUTO 1

Título: Avaliação da expressão de citocinas na medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral grave.

Título curto: Imunopatogênese da leishmaniose visceral

Leandro de Freitas Teles<sup>1</sup>, Agostinho Gonçalves Viana<sup>2</sup>, Mariana Santos Cardoso<sup>2</sup>, Guilherme Rafael Gomide Pinheiro<sup>2</sup>, Gabrielle Ariadine Bento<sup>2</sup>, Jamille Fernandes Lula<sup>1</sup>, Tânia de Cássia Moreira Soares<sup>1</sup>, Ricardo Toshio Fujiwara<sup>2</sup>, Silvio Fernando Guimarães de Carvalho<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Pesquisa em doenças Infecciosas. Hospital Universitário Clemente de Faria. Universidade Estadual de Montes Claros.

<sup>2</sup> Departamento de Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais.

\* Autor correspondente: e-mail: [guimaraescarvalho@yahoo.com.br](mailto:guimaraescarvalho@yahoo.com.br), Tel: (55) 3832248378. Av. Cula Mangabeira, 562 - Cândida Câmara, Montes Claros - MG, 39401-696. Pós Graduação. Gabinete 05.

**Agradecimentos:** Ao Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – Instituto de Ciências Biológicas-ICB, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Prof. Ricardo Toshio Fujiwara,. Agradeço o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes.

#### **Declaração de conflito de interesse**

Não declarado.

## RESUMO

**Objetivos:** A leishmaniose visceral (LV) é um sério problema de saúde pública. Os fatores que determinam o desenvolvimento ou não da LV e sua evolução para a forma grave não foram completamente identificados, mas uma resposta imune celular específica parece desempenhar um papel fundamental. Portanto, compreender imunopatogênese da LV humana pode ser útil na prevenção de um desfecho clínico grave. **Métodos e Resultados:** Foram avaliados indivíduos com LV grave e não grave. Amostras de medula óssea foram utilizadas na realização das dosagens de citocinas e carga parasitária por real time PCR. Os pacientes com perfil grave da LV tiveram piores médias dos parâmetros laboratoriais periféricos avaliados. Elevados níveis de transcritos das citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-10 IL-6 e TNF- $\alpha$ ) estavam presentes em todos os grupos de indivíduos com LV, mas não foram estatisticamente associadas à gravidade. Também não foi observada diferença entre pacientes graves e não grave em relação à carga parasitária medular. **Conclusão:** Embora não tenham sido observadas diferenças significativas nas expressões gênicas das citocinas entre os perfis de gravidade, nossos dados demonstram que a LV estimula uma intensa resposta inflamatória não dicotomizada entre Th1/Th2 e que a medula óssea é um importante tecido de regulação imunológica.

**Palavras-chave:** Leishmaniose visceral, citocinas, carga parasitária, medula óssea

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença tropical negligenciada e se não for tratada, é fatal em mais de 95% dos casos (1). Causada pelo protozoário intracelular *Leishmania donovani* no Velho Mundo e *Leishmania infantum* no novo mundo, incluindo o Brasil. É caracterizada por crises irregulares de febre, hepatoesplenomegalia e anemia (2, 3). Estima-se que 200.000 a 400.000 novos casos de LV com uma incidência de 50.000 óbitos ocorrem a cada ano, porém esses números são amplamente reconhecidos como sendo uma subestimativa grosseira do ônus real (2, 4). A maioria dos casos ocorre no Brasil, na África Oriental e no Sudeste Asiático. Mais de 90% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (1, 3, 4).

Clinicamente, a LV pode se apresentar como uma infecção assintomática, com poucos sintomas (forma oligossintomática) ou com manifestações exuberantes (forma clássica ou aguda). A maioria das infecções por *Leishmania* são assintomáticas, não manifestam a doença, e isso pode ser atribuído ao desenvolvimento de respostas imunes antiparasitárias efetivas, e apenas uma pequena proporção de indivíduos infectados é sintomática. No entanto, outros indivíduos por motivos desconhecidos progridem à forma grave da doença (5-8).

Estudos prévios associaram vários fatores ao mau prognóstico da doença: idade jovem, desnutrição prévia, tempo de doença antes do diagnóstico, anemia grave, febre por mais de 60 dias, diarreia, icterícia, complicações infecciosas e hemorragias. O conhecimento precoce dos pacientes que poderão evoluir com gravidade é de fundamental importância para reduzir a letalidade por meio da instituição de medidas profiláticas e terapêuticas oportunas. Embora diretrizes mais específicas para o manejo de pacientes com LV grave tenham sido desenvolvidas no Brasil, a taxa de casos fatais continua elevada (9-11). Em 1994, a incidência de letalidade foi de 3,4%; em 2003, a letalidade atingiu 8,5%; em 2009, a letalidade foi de 5,8%; e em 2017, 7,2% (12, 13).

Anormalidades imunológicas precoces durante a infecção podem estar envolvidas na patogênese da doença e evolução para as formas graves da LV (5, 14). Estudos indicavam que a suscetibilidade à doença estava associada à incapacidade de produzir um perfil de citocinas estimulantes de macrófagos (perfil Th1) incluindo interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucinas IL-2 e IL-12, enquanto, por outro lado, havia produção elevada de citocinas imunossupressoras, como a IL-10 e IL-4 (perfil Th2) (6, 8, 15). No entanto, estudos atuais indicam que durante a infecção da LV humana as respostas celulares tipo Th2, altamente polarizadas, parecem não se desenvolver; em vez disso, há uma resposta celular inicial mista Th1-Th2 (8, 14, 16).

Uma vez que níveis elevados de IL-10 se correlaciona com a LV ativa, a ausência de resposta imune mediada por células (CMI) anti-*Leishmania* efetiva pode ser devida aos efeitos inibitórios potentes no qual citocinas supressoras de perfil Th2 inibem a atividade de citocinas pró-inflamatórias antiparasitárias, tornando clara uma importante característica da LV (calazar) que é a associação da imunossupressão com a inflamação sistêmica (5, 16-19). Então, apesar de um sistema imunológico ativado, os pacientes exibem imunossupressão antígeno-específica de *Leishmania* e os tornam negativos para os testes cutâneos de hipersensibilidade do tipo retardado (19).

Vários fatores influenciam na resposta imunológica do hospedeiro à leishmaniose, incluindo cepas, genética do hospedeiro e carga parasitária (20, 21). A observação de que pacientes com sintomas e sinais de doença mais grave apresentam maior concentração de citocinas inflamatórias séricas sugere que a morte por calazar envolve um processo dinâmico iniciado por imunossupressão, levando a uma maior carga parasitária e, subsequentemente, desencadeando inflamação sistêmica (17). Estudos tem sugerido que os principais fatores de risco para a morte na LV estão relacionados ao fato de que essa alta produção sistêmica de citocinas pró-inflamatórias compromete muito os órgãos e sistemas (18).

A permanência de altas taxas de letalidade da LV no Brasil pode ser explicada não apenas pelas limitações da terapia aplicada e pelo atraso no diagnóstico, mas também pela falta de manejo adequado aos indivíduos com maior risco de evolução desfavorável da doença (22).

Nesse contexto, a identificação de fatores associados à LV grave pode ser uma ferramenta valiosa para a prática clínica. Considerando a relevância dos preditores de evolução clínica na redução do número de mortes induzidas por LV, o presente estudo teve como objetivo investigar a relação entre os perfis de citocinas da medula óssea, características clínico-laboratoriais e carga parasitária com a apresentação da forma grave da LV.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Desenho e População do Estudo**

Um estudo transversal foi realizado entre agosto de 2015 e janeiro de 2016 no Hospital Universitário Clemente de Faria da Universidade Estadual de Montes Claros, Estado de Minas Gerais, que é referência na região no tratamento das leishmanioses. Os pacientes incluídos neste estudo foram divididos em três grupos. O primeiro grupo (n=16) foi formado por pacientes com sinais e sintomas da LV ativa, isto é, apresentavam febre, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia, considerado leishmaniose visceral não grave (LVNG). O segundo grupo, leishmaniose visceral grave (LVG), (n=09), foi composto por pacientes que possuíam os mesmos critérios clínicos do grupo anterior, além disso, apresentavam sinais clínicos de gravidade (icterícia e/ou hemorragia). Já o terceiro grupo, controle (n=2), foi composto por pacientes que possuíam hepatoesplenomegalia febril, mas não tiveram confirmação diagnóstica para LV. O diagnóstico da LV foi confirmado pela observação direta de amastigotas em aspirado de medula óssea ou teste sorológico imunocromatográfico rK 39 positivo (IT-LEISH<sup>®</sup> Bio-Rad). Todos os pacientes avaliados nesse estudo foram tratados para LV. Informações relativas às características clínicas e laboratoriais foram coletadas dos prontuários dos pacientes.

### **Coleta de Amostra**

A aspiração da medula óssea foi realizada nos pacientes por razões diagnósticas e utilizada nas dosagens de citocinas e fator de crescimento. A coleta e análise da medula coletada foram realizadas por profissional médico hematologista do Hospital Universitário

Clemente de Faria da Universidade Estadual de Montes Claros, Estado de Minas Gerais. O volume de 1 a 2 mL de medula óssea foi aspirado e as amostras foram distribuídas no preparo do esfregaço por aposição de lâminas e dividida em dois tubos de criopreservação, com e sem trizol. No tubo com trizol, o volume foi armazenado na proporção 1:3 de trizol para medula óssea. Todos os tubos de criopreservação com e sem trizol foram armazenados em freezers -80° C até a análise. Após a coloração panóptica, as lâminas foram checadas por pelo menos 1000 células antes de serem classificadas como negativas.

### **Determinação das Citocinas da Medula Óssea por PCR em Tempo Real**

As extrações de RNAm foram realizadas utilizando o kit comercial NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel). O RNAm foi transcrito em cDNA com o kit de transcrição reversa (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. A RT-PCR foi preparada em um volume final de 10µL, sendo 1µL dos primers a 0,2 µM (Forward + Reverse), 5µL de SYBR Green PCR Mastermix 1X (Thermo Fisher Scientific) e 4µL de cDNA das amostras testadas (5ng/µL). Os iniciadores para identificação dos genes analisados (IFN-γ, IL-12p40, IL-10, TNF-α, IL-6, IL-10) estão descritos na Tabela 01. As reações foram realizadas no ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, EUA) e foi iniciada após desnaturação do DNA a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 15 segundos, seguidos de anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Para a quantificação relativa dos genes específicos, foi utilizado gene endógeno beta 2 microglobulina, como normalizador usando o método do  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

### **Determinação da carga parasitária em medula óssea**

A determinação da carga parasitária em medula óssea foi realizada pela técnica de PCR tempo real quantitativo com base em curvas padrão. As extrações de DNA foram realizadas utilizando o kit comercial NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel). A qPCR foi preparada em um volume final de 10µL, sendo 1µL dos primers a 0,2 µM (Forward + Reverse), 5µL de SYBR Green PCR Mastermix 1X (Thermo Fisher Scientific) e 4µL de cDNA das amostras testadas (5ng/µL). Os iniciadores para identificação dos genes analisados foram: (DNA de mini-círculo (kDNA) de *L. infantum*: 5'-CTTTTCTGGTCCCGCG GGTAGG-3' (Forward); 5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3' (Reverse). As reações foram realizadas no ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, EUA) e foi iniciada após desnaturação do DNA a 95°C por



10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 15 segundos, seguidos de anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto.

### **Análise Estatística**

Todos os testes e gráficos foram realizados utilizando Graph Pad Prism, versão 7.0 e SPSS, versão 18.0. O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de T de Student, teste de Mann-Whitney e Anova. O teste de correlação de Pearson e Spearman foi usado para correlacionar dados clínicos e laboratoriais com os níveis séricos de moléculas da resposta imune e carga parasitária. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p \leq 0,05$ .

### **Declaração de Ética**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Montes Claros, número: 677.061/2014. O estudo está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

## **RESULTADOS**

### **Dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos indivíduos em estudo**

Todos os pacientes do estudo tiveram exame direto da medula óssea positivo e apenas um paciente apresentou o teste sorológico rK39 negativo. Dos pacientes com dados disponíveis, todos tiveram esplenomegalia e apenas em um não foi constatado hepatomegalia. Exceto dois pacientes do grupo LVG que evoluíram à óbito, todos os outros obtiveram cura clínica após tratamento com antimoniatto de N - metilglucamina e anfotericina lipossomal em diferentes posologias, conforme protocolo clínico do Ministério da Saúde. As características demográficas (gênero e idade), clínicas (tamanho de baço e fígado) e laboratoriais de função renal e hepática estão demonstradas na Tabela 02. A população de indivíduos doentes teve média de  $15,09 \pm 19,34$  anos e 68,0% possuíam idade inferior a 10 anos. A idade média do grupo LVNG foi menor, mas isso não foi significativamente diferente do grupo LVG (9,38 vs 25,25, respectivamente;  $p = 0,076$ ). Houve um predomínio do gênero masculino em todos os grupos avaliados. O grupo LVG apresentou maior redução dos parâmetros laboratoriais

hematológicos (hemoglobina, hematócrito, plaquetas e leucócitos) em relação ao LVNG, mas não houve diferença significativa. Quando se compara esses mesmos parâmetros entre os grupos de doentes (LVG e LVNG) em relação aos pacientes controle, há uma diferença estatística no parâmetro leucócito ( $p = 0,006$  e  $p=0,014$ , respectivamente). Os testes de função hepática e função renal dos indivíduos LVG foram numericamente piores em relação à LVNG, com os marcadores uréia, ALT e albumina tendo diferença significativa ( $p = 0,036$  e  $p=0,039$  e  $p=0,017$ , respectivamente).

### **Análise da expressão de citocinas e da carga parasitária**

As concentrações de citocinas circulantes durante os processos inflamatórios observados na leishmaniose podem ser um determinante, ou surgir como consequência, da gravidade da doença. Maiores expressões de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-12p40 foram observadas nas amostras de indivíduos LVNG comparados com amostras de LVG e controles; no entanto, não houve diferença estatística entre os dois grupos de leishmaniose (Fig 1A, 1D e 1E). Os pacientes com leishmaniose visceral apresentaram entre si médias de expressões próximas para TNF- $\alpha$  e IL-6 e superior ao controle para TNF- $\alpha$ , sem diferença estatística (Fig 1B e 1C). A similaridade entre os grupos de leishmaniose também ocorreu quando avaliado a carga parasitária da medula óssea (Fig 01F).

### **Correlações de citocinas com achados clínicos e laboratoriais**

Foram realizadas correlações dos parâmetros laboratoriais hematológicos periféricos (hemoglobina, leucócitos e plaquetas) com as expressões medulares da citocinas IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-6 (Figura 2); esses parâmetros são comumente afetados na evolução para forma grave da leishmaniose. Todos os parâmetros hematológicos se correlacionaram negativamente com as citocinas avaliadas, no entanto, apenas o leucócito com a IL-10 teve uma relação significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Foram avaliadas também correlações entre os parâmetros clínicos (tamanho de baço e fígado) e laboratoriais não hematológicos (função hepática e renal) com as citocinas (Tabela 3). O tamanho de baço e albumina sérica teve uma relação moderada e significativa com IFN- $\gamma$ . A albumina também teve uma correlação significativa com a IL-6. Os parâmetros de função hepática (AST, ALT e proteínas totais) e os de função renal (creatinina e uréia) não apresentaram correlação significativa com as citocinas avaliadas.

### **Correlação entre as citocinas da medula óssea de pacientes com LV**

Nos pacientes com leishmaniose visceral é observado uma intensificação na produção de citocinas. A figura 03 mostra a correlação das citocinas presentes no ambiente medular de pacientes com a leishmaniose visceral ativa. Todas as citocinas avaliadas apresentaram correlação positiva entre si; e foi observada uma correlação forte e significativa entre IFN- $\gamma$  e IL-10 ( $\rho=0,788$  e  $p=0,00$ ), TNF- $\alpha$  e IL-10 ( $\rho=0,768$  e  $p=0,00$ ), IL-6 e IL-10 ( $\rho=0,809$  e  $p=0,00$ ).

### **DISCUSSÃO**

A medula óssea é o principal órgão hematopoiético parasitado pela *Leishmania*, no entanto há poucos trabalhos que abordam a expressão de citocinas medulares em indivíduos com leishmaniose visceral e sua correlação com a forma grave da doença, portanto nesse estudo o objetivo foi avaliar a relação entre a resposta imune medular e a evolução para a forma clínica grave da leishmaniose visceral.

A população do estudo foi composta principalmente por indivíduos do gênero masculino e crianças com idade inferior a 10 anos; semelhante ao encontrado por outros trabalhos, que demonstraram que na LV clássica há predomínio de população infantil e homens (23, 24). Os achados clínico-laboratoriais marcadores hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e trombocitopenia encontrados nos indivíduos do estudo concordam com os resultados relatados por trabalhos prévios (12, 25).

Os sinais e sintomas apresentados por pacientes com calazar são consequência de uma inflamação sistêmica, caracterizada por liberação de grande quantidade de inúmeras citocinas (12,17, 25-27). A ação dessas citocinas pode ser considerada como causa de algumas manifestações clínicas da LV e dano tecidual, participando, inclusive, na origem dos sintomas, sinais e exames laboratoriais do calazar grave, como manifestações hemorrágicas, edema, icterícia, infecções bacterianas e contagem de células sanguíneas (23, 25, 28).

Apesar de não termos encontrado diferença significativa na expressão gênica medular das citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-12p40) entre as formas grave e não grave dos pacientes com LV, nossos resultados laboratoriais, numericamente diferentes, ainda que nem sempre estatisticamente significativo, entre os diferentes perfis de gravidade, inferiu uma

correlação entre os níveis de citocinas e origem das alterações; especialmente os laboratoriais hematológicos (hemoglobina, leucócitos e plaquetas) e os bioquímicos (albumina sérica, AST e uréia) (24, 25, 28). Nossas avaliações de expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 concordam com os resultados de expressão gênica realizado por Karp *et al.*, 1993 e de dosagens séricas de citocinas do Gama *et al.*, 2013 (12) e contrasta com as dosagens plasmáticas dos trabalhos Costa *et al.*, 2013 (28) e dos Santos *et al.*, 2016 (24).

Vários estudos demonstram que as formas clínicas de LV são influenciadas pela resposta imune do hospedeiro. As associações entre concentrações de citocinas com as apresentações clínicas e gravidade do calazar fornecem conhecimentos sobre o envolvimento dessas substâncias na patogênese do calazar grave (20, 24).

Nós confirmamos níveis elevados de expressão de RNAm das citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-12p40) na medula óssea de pacientes com LV ativa. Nossos resultados confirmam relatos anteriores de que, durante a LV humana ativa, há uma produção abundante de várias citocinas (19, 28, 29). Esses resultados confirmam uma dicotomia Th1/Th2 de resposta imune menos nítida em pacientes humanos com calazar, diferentemente da LV experimental e leishmaniose tegumentar, no qual a apresentação de um perfil Th1 de resposta confere uma proteção contra a progressão da doença (7, 12, 15).

À medida que os parasitos se multiplicam nos macrófagos da medula óssea, os patógenos induzem forte ativação do sistema fagocitário mononuclear do paciente e níveis elevados de citocinas são então detectados, podendo controlar a proliferação de parasitos durante os estágios iniciais (12). Embora haja aumento na expressão de IFN- $\gamma$ , responsável por atividade leishmanicida de fagócitos, sua falta de atividade efetiva pode estar relacionada à presença simultânea de níveis elevados de IL-10, uma vez que a IL-10 parece ser a principal citocina que inibe a atividade de macrófagos em seres humano com leishmaniose (8, 29).

No entanto, a IL-10 protege indivíduos contra os efeitos colaterais de uma resposta inflamatória exagerada, desempenhando um papel importante na regulação da resposta inflamatória, o que se justifica pelos altos níveis dessa citocina nos pacientes não graves (23, 25). A secreção inespecífica de IFN- $\gamma$  tem sido associada a complicações em outras doenças inflamatórias (24).

A IL-10 pode proteger os tecidos dos danos colaterais causados pela inflamação excessiva, mas nas doenças infecciosas, onde uma resposta inflamatória é necessária para evitar a proliferação do parasito, a IL-10 pode prevenir uma resposta ideal (16, 24). Achados recentes associaram a presença de IL-10 no soro, células mononucleares do sangue periférico (PBMC), baço, fígado ou linfonodos de pacientes com LV com gravidade da doença (12, 24). Nossos

resultados mostram que, independentemente da gravidade da doença LV, a IL-10 estava expressa em níveis elevados na medula óssea.

Em contraste, estudos mostram que a IL-12p40 e TNF- $\alpha$  parecem estar ligada à proteção na LV e normalmente apresentam em altas concentrações nos indivíduos com a doença ativa (28, 30, 31). Em estudos experimentais, o tratamento com IL-12 reduziu significativamente a carga parasitária dos animais infectados (27, 28, 32). O TNF- $\alpha$  é o principal fator envolvido nas alterações sistêmicas e, conseqüentemente, na sintomatologia observada na LV, como febre, anorexia, perda de peso, aumento do gasto de energia e palidez cutânea e mucosa (8, 23). A IL-12, que é produzida por células do sistema fagocitário mononuclear, é importante para a indução da produção de IFN- $\gamma$  e interação entre resposta inata e adaptativa (23).

A citocina IL-6 está aumentada na LV ativa como parte de uma resposta inata ampla e sustentada (25, 26). Estudos têm demonstrado que a IL-6 participa na evolução desfavorável da LV, seja na promoção direta de manifestações patológicas ou na interferência na produção de outras citocinas; atuam, por exemplo, inibindo a produção de TNF- $\alpha$  e a ação da resposta de perfil Th1 (24, 28). Nossos resultados confirmam essa participação da IL-6, uma vez que a média de expressão de dessa citocina foi maior nos pacientes LV graves.

A correlação bivariada entre as expressões gênicas das citocinas estudadas demonstrou forte relação positiva entre IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10, o que demonstra produção de ambos perfis citocinas, Th1 e Th2, na LV.

Apesar de estudos associarem a carga parasitária com gravidade do calazar e morte, nós não encontramos diferenças entre a carga parasitária da medula óssea de indivíduos graves e não graves (17, 25). O que presume que fatores relacionados à virulência dos parasitos e resposta imune do hospedeiro estejam associadas à evolução desfavorável e não apenas o aspecto quantitativo de protozoários no tecido.

Por se tratar de um material obtido por meio invasivo, os estudos com medula óssea podem não apresentar uma grande amostragem e nem equidade entre os grupos avaliados, como Karp *et al.*, 1993. Além disso, por impedimento ético, os indivíduos controles não eram isentos de patologia, uma vez que é proibida a coleta desse tipo de material em indivíduos saudáveis exclusivamente para fins de estudos, o que caracterizou como limitação do estudo.

Dessa forma, conclui-se que a medula óssea não é apenas um tecido hematopoiético, mas um importante local de regulação imunológica. Portanto, novos estudos com maiores amostragens são necessários para melhor caracterizar a relação entre a gravidade da LV e os níveis de citocinas para esclarecer a imunopatogênese das manifestações clínicas e anormalidades laboratoriais.

## REFERÊNCIAS

1. Leishmaniasis [Internet]. 2018. Available from: <http://www.who.int/news-room/factsheets/detail/leishmaniasis>.
2. Emebet, A, Tajebe F, Getahun M, Kiflie A, Diro E, Hailu A, *et al.* Successful Treatment of Human Visceral Leishmaniasis Restores Antigen-Specific IFN-gamma, but not IL-10 Production. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(3):e0004468.
3. Goto H & Prianti MDG. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2009;51:241-6.
4. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*. 2012;7(5):e35671.
5. Faleiro RJ, Kumar R, Hafner LM, Engwerda CR. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(7):e2914.
6. McCall LI, Zhang WW, Matlashewski G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. *PLoS Pathog*. 2013;9(1):e1003053.
7. Kurkjian KM, Mahmutovic AJ, Kellar KL, Haque R, Bern C, Secor WE. Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. *Cytometry A*. 2006;69(5):353-8.
8. Gama MEA, Costa JML, Pereira JCR, Gomes CMC, Corbett CEP. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004;37:129-36.
9. de Araujo VE, Morais MH, Reis IA, Rabello A, Carneiro M. Early clinical manifestations associated with death from visceral leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(2):e1511.
10. Braga AS, Toledo Junior AC, Rabello A. Factors of poor prognosis of visceral leishmaniasis among children under 12 years of age. A retrospective monocentric study in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil, 2001-2005. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(1):55-9.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose: Recomendações clínicas para redução da letalidade. 2011. 82 p.
12. Gama MEA, Gomes CMdC, Silveira FT, Laurenti MD, Goncalves EdG, Silva ARd, *et al.* Severe visceral leishmaniasis in children: the relationship between cytokine patterns and clinical features. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2013;46:741-5.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação-Sinan. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/leishvbr.def>>. Acesso em: 29 de Mai de 2018.
14. Bacellar O, D'Oliveira A, Jr., Jeronimo S, Carvalho EM. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine*. 2000;12(8):1228-31.
15. Mansueto P, Vitale G, Di Lorenzo G, Rini GB, Mansueto S, Cillari E. Immunopathology of leishmaniasis: an update. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2007;20(3):435-45.
16. Murphy ML, Wille U, Villegas EN, Hunter CA, Farrell JP. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol*. 2001;31(10):2848-56.
17. Silva JM, Zacarias DA, de Figueiredo LC, Soares MR, Ishikawa EA, Costa DL, *et al.* Bone marrow parasite burden among patients with New World kala-azar is associated with disease severity. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2014;90(4):621-6.

18. Karp CL, el-Safi SH, Wynn TA, Satti MM, Kordofani AM, Hashim FA, *et al.* In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *J Clin Invest.* 1993;91(4):1644-8.
19. Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, van Weyenbergh J, Brodskyn C, *et al.* Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis.* 2005;5:113.
20. Verma S, Kumar R, Katara GK, Singh LC, Negi NS, Ramesh V, *et al.* Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. *PloS one.* 2010;5(4):e10107.
21. Khadem F & Uzonna JE. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. *Future Microbiol.* 2014;9(7):901-15.
22. Belo VS, Struchiner CJ, Barbosa DS, Nascimento BW, Horta MA, da Silva ES, *et al.* Risk factors for adverse prognosis and death in American visceral leishmaniasis: a meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases.* 2014;8(7):e2982.
23. Costa AS, Costa GC, Aquino DM, Mendonca VR, Barral A, Barral-Netto M, *et al.* Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2012;107(6):735-9.
24. Dos Santos PL, de Oliveira FA, Santos ML, Cunha LC, Lino MT, de Oliveira MF, *et al.* The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. *PLoS neglected tropical diseases.* 2016;10(1):e0004375.
25. Costa CHN, Werneck GL, Costa DL, Holanda TA, Aguiar GB, Carvalho AS, *et al.* Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2010;43:386-92.
26. Peruhype-Magalhaes V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva Lde A, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, *et al.* Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol.* 2006;146(1):124-32.
27. Goto H, Lindoso JA. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas.* 2004;37(4):615-23.
28. Costa DL, Rocha RL, Carvalho RM, Lima-Neto AS, Harhay MO, Costa CH, *et al.* Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathog Glob Health.* 2013;107(2):78-87.
29. Khoshdel A, Alborzi A, Rosouli M, Taheri E, Kiany S, Javadian MH. Increased levels of IL-10, IL-12, and IFN- in patients with visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2009;13:44-6.
30. Peruhype-Magalhaes V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva Lde A, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, *et al.* Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. *Scand J Immunol.* 2005;62(5):487-95.
31. Quirino GFS, Nascimento MSL, Davoli-Ferreira M, Sacramento LA, Lima MHF, Almeida RP, *et al.* Interleukin-27 (IL-27) Mediates Susceptibility to Visceral Leishmaniasis by Suppressing the IL-17-Neutrophil Response. *Infect Immun.* 2016;84(8):2289-98.
32. Hailu A, van der Poll T, Berhe N, Kager PA. Elevated plasma levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-gamma inducing cytokines, and IFN-gamma inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2004;71(5):561-7.

33. Boeuf P, Vigan-Womas I, Jublot D, Loizon S, Barale JC, Akanmori BD, *et al.* CyProQuant-PCR: a real time RT-PCR technique for profiling human cytokines, based on external RNA standards, readily automatable for clinical use. *BMC immunology*. 2005;6:5.
34. Banda R, Yambayamba V, Lalusha BD, Sinkala E, Kapulu MC, Kelly P. Safety of live, attenuated oral vaccines in HIV-infected Zambian adults: oral vaccines in HIV. *Vaccine*. 2012;30(38):5656-60.
35. Joo JH, Jetten AM. NF-kappaB-dependent transcriptional activation in lung carcinoma cells by farnesol involves p65/RelA(Ser276) phosphorylation via the MEK-MSK1 signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(24):16391-9.

Tabela 1 Sequência dos primers utilizados na quantificação das citocinas e fator de crescimento.

Alvos	Sequência do <i>Primer</i>	Fonte
IFN- $\gamma$	5'GTTTTGGGTTCTCTGGCTGTTA3' 5'AAAAGAGTTCCATTATCCGCTACATC3' 5'CATGGTGGATGCCGTTCA3'	Boeuf, P, <i>et al.</i> ,2005 (33).
IL-12p40	5'ACCTCCACCTGCCGAGAAT3' 5'CCCAGGCAGTCAGATCATCTTC3'	Boeuf, P, <i>et al.</i> ,2005 (33).
TNF- $\alpha$	5 GCTTGAGGGTTTGCTACAACATG 3' 5'GCT GGA GGA CTT TAA GGG TTA CCT3'	Banda, R, <i>et al.</i> ,2012 (34).
IL-10	5'CTT GAT GTC TGG GTC TTG GTT CT 3' 5'CCTGAGAAAGGAGACATGTAACAAGA3'	Boeuf, P, <i>et al.</i> ,2005 (33).
IL-6	5'GGCAAGTCTCCTCATTGAATCC3'	Joo, J.H. and Jetten, A. M., 2008 (35).



Tabela 02 Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos indivíduos do estudo.

	<b>Controle (n=2)</b>	<b>Leishmaniose visceral grave (n=09)</b>	<b>Leishmaniose visceral não grave (n=16)</b>
Gênero (M/F)%	(100/0)	(63,6/36,4)	(56,3/44,7)
Média da idade (min/max)	14,25(0,75/27,75)	25,25(1,2/59,90)	9,38(0,92/59,80)
<b>Dados Clínicos (média±SD)</b>			
Tamanho de Baço (cm)	-	4,44±1,99	6,87±3,31
Tamanho de Fígado (cm)	-	4,05±3,08	5,33±2,74
<b>Dados Laboratoriais Hematológicos (média±SD)</b>			
Hemoglobina (g/dL)	8,20±1,97	7,22±1,85	7,76±1,38
Hematócrito (%)	25,10±3,95	22,13±5,79	24,73±3,90
Plaquetas (mm <sup>3</sup> )	190500±75660	89888±87808	114250±90076
Leucócitos (mm <sup>3</sup> )	8510±4426	2735±1596	3513±2151
<b>Função Hepática (média±SD)</b>			
AST (U/L)	-	272,20±361,70	188,8±445,60
ALT (U/L)	-	120,5±86,30	47,6±40,10
Proteínas Totais (g/dL)	-	7,48±1,92	7,49±1,13
Albumina (g/dL)	-	2,77±0,62	3,45±0,30
Globulina (g/dL)	-	4,71±1,75	4,03±1,22
<b>Função Renal (média±SD)</b>			
Creatinina (mg/dL)	-	0,98±0,94	0,55±0,22
Uréia (mg/dL)	-	35,18±20,41	21,06±6,54

Tabela 3 Correlação entre citocinas da medula óssea, parâmetros clínicos e laboratoriais não hematológicos de pacientes com leishmaniose.

<b>Dados clínicos e laboratoriais</b>	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>IL-12p40</b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-10</b>
Tamanho de Baço (cm)	0,143	0,248	0,039	-0,190	0,389
Tamanho de Fígado (cm)	0,604	0,223	-0,041	-0,047	0,324
<b>Função Hepática</b>					
ALT (U/L)	0,043	-0,096	-0,287	0,023	-0,047
AST (U/L)	0,329	0,313	-0,240	0,204	0,259
Proteínas Totais (g/dL)	-0,331	-0,120	0,313	-0,083	0,037
Albumina (g/dL)	-0,486	-0,346	0,220	0,522	-0,149
<b>Função Renal</b>					
Creatinina (mg/dL)	-0,135	-0,181	-0,170	0,182	-0,209
Uréia (mg/dL)	0,114	-0,086	-0,158	0,229	0,145

Classificação dos valores de correlação: rho fraco: 0,1 a 0,3; rho moderado: 0,4 a 0,6; rho forte: 0,7 a 1.

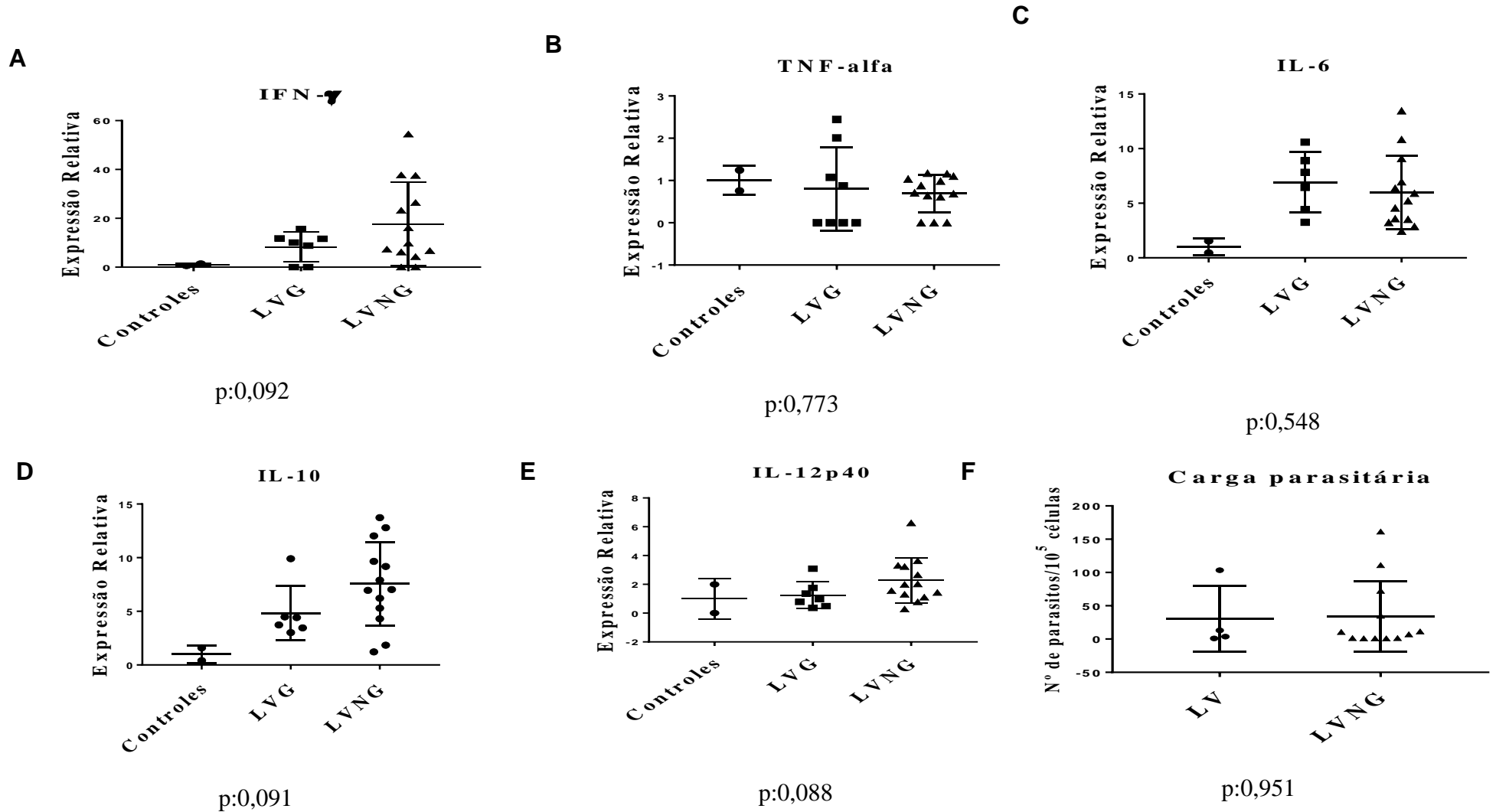


Figura 1 Expressão de RNAm de citocinas na medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral grave (LVG), leishmaniose visceral não grave (LVNG) e controles (A, B, C, D e E). (F) Carga parasitária em amostras de medula óssea (parasitos/100000 células). A expressão de RNAm das citocinas foi analisada através de normalização para o gene endógeno beta 2 microglobulina usando a fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . p valor para a comparação entre os grupos LVG e LVNG.

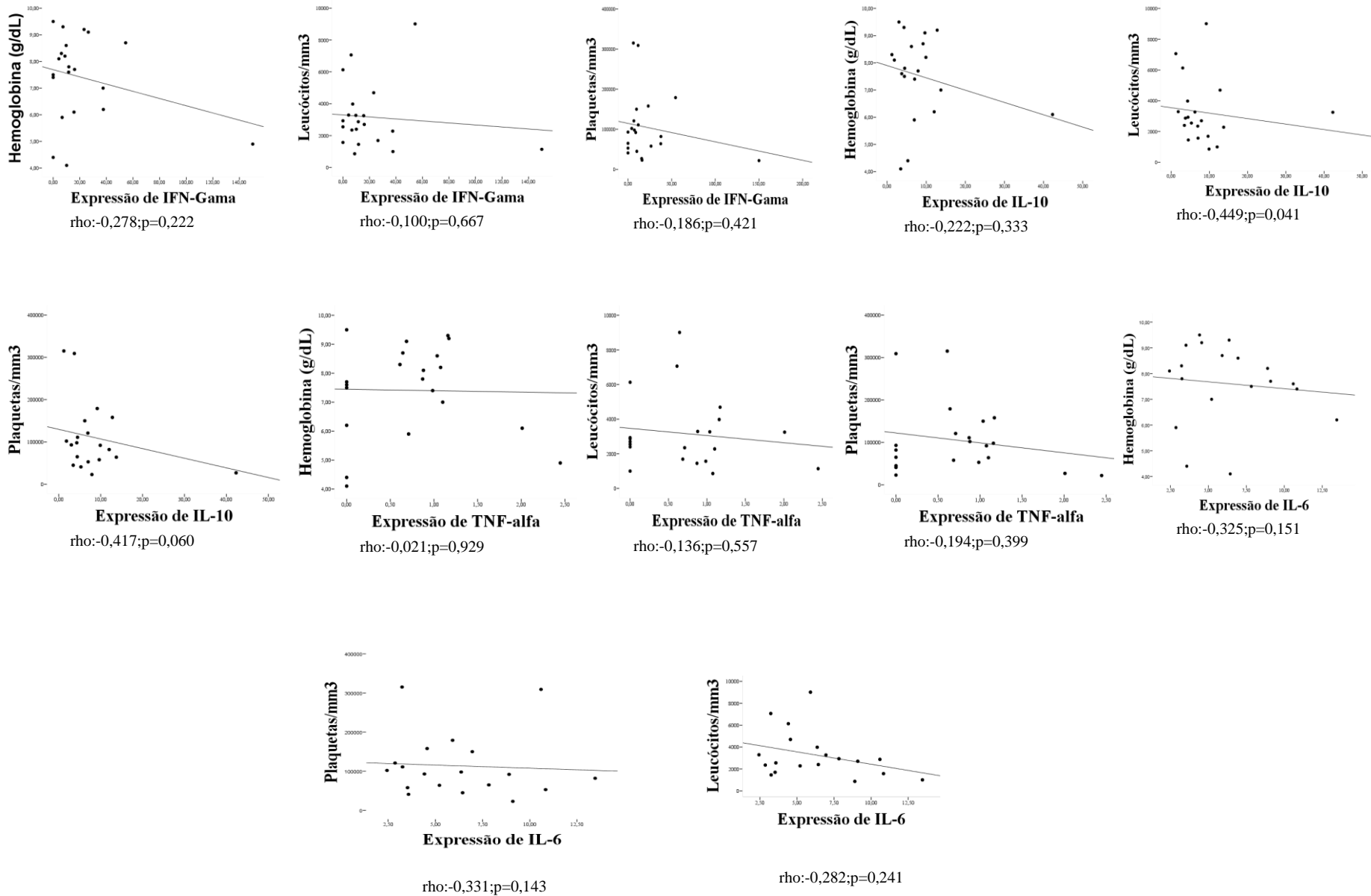
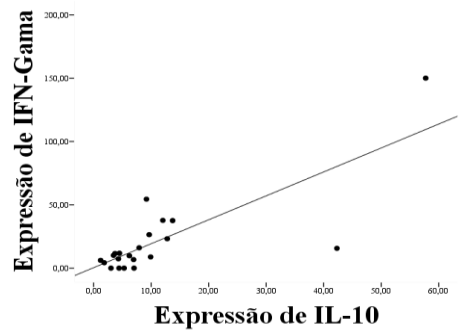
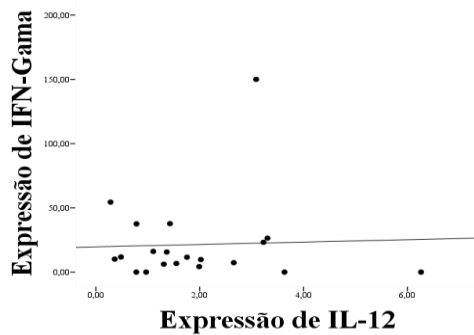


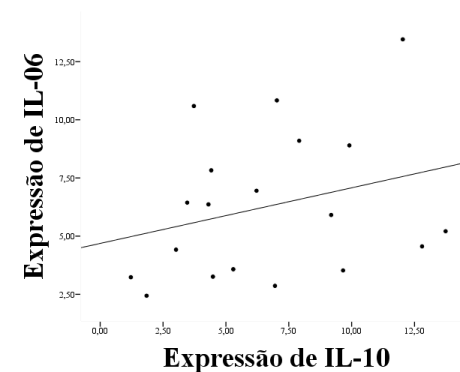
Figura 2 Correlação de Pearson entre citocinas da medula óssea e parâmetros laboratoriais hematológicos de pacientes com leishmaniose.



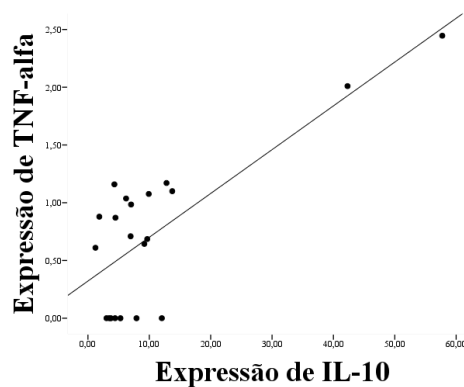
rho: 0,788;p=0,00



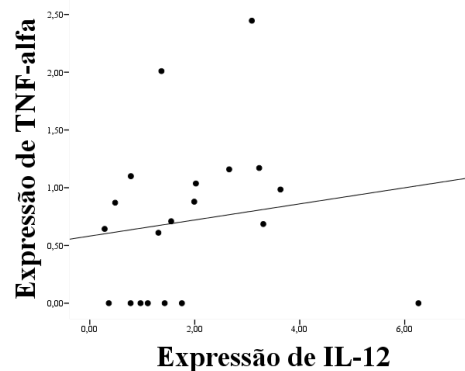
rho:0,040;p=0,868



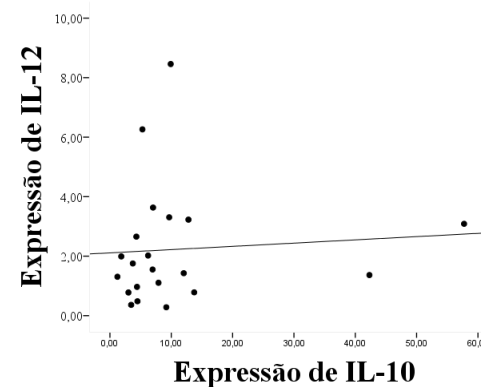
rho:0,809;p=0,00



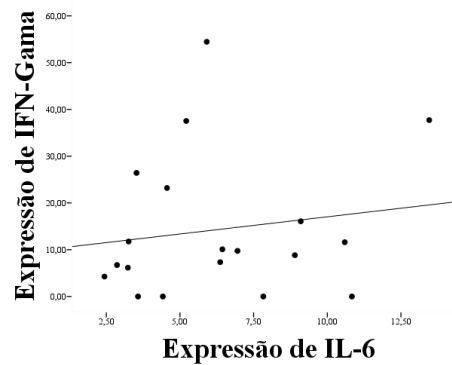
rho:0,768;p=0,00



rho:0,255;p=0,265



rho:0,146;p=0,539



rho:0,174;p=0,477

Figura 3 Correlação das citocinas da medula óssea nos pacientes com leishmaniose ativa.

### 3.1 PRODUTO 2

Avaliação da expressão do fator de crescimento insulina símile I na medula óssea e sua correlação com a carga parasitária e resposta imunológica na leishmaniose visceral humana

Leandro F. Teles<sup>a</sup>, Agostinho G. Viana<sup>b</sup>, Mariana S. Cardoso<sup>b</sup>, Guilherme R.G. Pinheiro<sup>b</sup>, Jamille F. Lula<sup>a</sup>, Tânia C.M. Soares<sup>a</sup>, Vinicius D. Rodrigues<sup>c</sup>, Jaime S.R. Sobrinho<sup>d</sup>, Ricardo Toshio Fujwara<sup>b</sup>, Silvio F.G. Carvalho<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Pesquisa em Doenças Infecciosas. Hospital Universitário Clemente de Faria. Universidade Estadual de Montes Claros.

<sup>b</sup> Departamento de Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais.

<sup>c</sup> Departamento de Educação Física e do desporto da Universidade Estadual de Montes Claros.

<sup>d</sup> FASI-Faculdade de Saúde Ibituruna. Montes Claros/MG

\* Autor correspondente: e-mail: [guimaraescarvalho@yahoo.com.br](mailto:guimaraescarvalho@yahoo.com.br), Tel: (55) 3832248378. Av. Cula Mangabeira, 562 - Cândida Câmara, Montes Claros - MG, 39401-696. Pós Graduação. Gabinte 05.

## RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é um grave problema de saúde pública. O controle ou progressão da infecção depende da resposta imune do hospedeiro e da capacidade do parasito em escapar dessa resposta. Nesse contexto, um dos elementos que podem ter papel na patogênese é o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I). Portanto, o objetivo do estudo foi verificar a expressão de IGF-I na medula óssea dos indivíduos com LV ativa e correlacioná-la com a carga parasitária e resposta imunológica. Foram analisadas amostras de medula óssea de pacientes com LV para avaliação imune (IGF-I, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-3 e CSF2) e da carga parasitária por PCR em tempo real. Não foi encontrada diferença na expressão gênica de IGF-I na medula óssea entre indivíduos com LV e controle e nem entre indivíduos LV grave e não grave. Houve correlações fracas e não significativas do IGF-I com IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-3 e CSF-2 e com os parâmetros laboratoriais hemoglobina, leucócito e plaquetas. Esse estudo não confirma o efeito indutor do IGF-I sobre parasito na medula óssea de indivíduos com LV e demonstra, apesar de fracas, correlações negativas com IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, fator de crescimento insulina símile I, medula óssea, citocinas, carga parasitária

## Introdução

A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é um grave problema de saúde pública com distribuição mundial (1). É uma doença sistêmica causada por *Leishmania infantum* no continente americano que se prolifera dentro das células do sistema mononuclear fagocitário (2).

A interação do hospedeiro com o parasito começa quando os protozoários *Leishmania* são depositados na pele do hospedeiro. Nesse caso, a evolução da infecção dependerá das respostas imunes inatas e específicas do hospedeiro e da habilidade do parasito em escapar dessa resposta (2, 3). Além disso, anormalidades imunológicas precoces durante a infecção podem estar envolvidas na patogênese da LV (4, 6).

Os eventos que acontecem no início da infecção influenciam o curso da doença, uma vez que essa fase inicial é caracterizada por um processo inflamatório no qual vários mediadores e elementos teciduais participam, incluindo fatores de crescimento e citocinas (7, 8). Várias citocinas derivadas do hospedeiro e fatores humorais têm sido sugeridos como envolvidos na patogênese atuando tanto no hospedeiro como o TGF- $\beta$  e o TNF- $\alpha$  ou diretamente no parasito, como no caso do CSF2, que é capaz de proteger promastigotas da morte induzida pelo calor e consequentemente aumentar sua infecciosidade (7, 9).

A ação desses mediadores podem ser benéficas para o hospedeiro, contribuindo para a eliminação do parasito ou favorecendo a sobrevivência e proliferação da *Leishmania*, direta ou indiretamente, em um ambiente hostil dentro dos macrófagos (7, 8).

Nesse contexto, um dos elementos que podem ter papel na patogênese é o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), uma vez que é provável que o IGF-I seja um dos primeiros fatores de crescimento que as promastigotas de *Leishmania* encontram na pele logo após sua transmissão (10-12).

O IGF-I estimula a proliferação e a diferenciação de uma ampla variedade de tipos de células. Funcionalmente, os IGFs afetam o metabolismo celular e é um importante fator de crescimento e diferenciação endócrina na inflamação, ativação imunológica e cicatrização de feridas. A maioria dos tipos de células tem a capacidade de produzir IGF, embora o principal local de produção seja o fígado e é detectável tanto na circulação como nos tecidos (8, 10, 12, 13).

A importância biológica do IGF-I para *Leishmania* foi demonstrada por estudos recentes que mostram a sua diversificada ação e pleiotropismo em *Leishmania* spp (8, 10). Nesses



trabalhos, observou-se que o IGF-I induz uma rápida resposta de crescimento em promastigotas de *Leishmania* e em amastigotas livres de células *in vitro* (10, 12).

Estudos prévios demonstraram que o IGF-I induz, *in vitro*, um aumento na proliferação de promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania* (10). Além disso, também foi observado, *in vivo*, um aumento significativo no tamanho da lesão e no número de parasitos viáveis na pele de camundongos infectados com promastigotas de *Leishmania amazonensis* pré-incubadas com IGF-I (2).

Na leishmaniose cutânea experimental, ele demonstrou atuar modulando as respostas imunes inflamatórias, aumentando TGF- $\beta$  e diminuindo a produção de IFN- $\gamma$  em macrófagos (11). Em estudo na leishmaniose mucosa, foi demonstrado que o aumento da produção de citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  pode estar relacionado a um menor nível de IGF-I (11).

Uma das ações do IGF-I sobre *Leishmania* e células hospedeiras é através da indução da arginase, interferindo na expressão da óxido nítrico sintase indutível e atividade macrófágica, contribuindo para proliferação parasitária (11, 14, 15).

Como há ainda um pequeno número de trabalhos avaliando o papel do IGF-I na leishmaniose visceral humana e como ele tem expressão aumentada em macrófagos medulares, o objetivo do estudo foi verificar a expressão de IGF-I na medula óssea dos indivíduos com LV ativa e correlacioná-la com a carga parasitária e resposta imunológica.

## **Materiais e métodos**

### **Desenho e População do Estudo**

Um estudo transversal foi realizado entre agosto de 2015 e janeiro de 2016 no Hospital Universitário Clemente de Faria da Universidade Estadual de Montes Claros, Estado de Minas Gerais, que é referência na região no tratamento das leishmanioses. Foram incluídos nesse estudo 25 pacientes com sinais e sintomas da LV ativa, isto é, apresentavam febre, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia. O diagnóstico da LV foi confirmado pela observação direta de amastigotas em aspirado de medula óssea e/ou teste sorológico imunocromatográfico rK 39 positivo (IT-LEISH<sup>®</sup>-Bio Rad). Para comparação, foi utilizado um grupo controle (n=2) composto por pacientes que possuíam hepatoesplenomeglia febril, mas não tiveram confirmação diagnóstica para LV. Todos os pacientes avaliados nesse estudo foram tratados para LV. Informações relativas às características clínicas e laboratoriais foram coletadas dos prontuários dos pacientes.

## **Coleta de Amostra**

A coleta e análise da medula foram realizadas por profissional médico hematologista do Hospital Universitário Clemente de Faria da Universidade Estadual de Montes Claros. Foi aspirado um volume de 1 a 2 mL de medula óssea. As amostras foram distribuídas no preparo do esfregaço por aposição de lâminas e dividida em dois tubos de criopreservação, com e sem trizol. No tubo com trizol, o volume foi armazenado na proporção de 02 partes de trizol para 01 parte de medula óssea. Todos os tubos de criopreservação com e sem trizol foram armazenados em freezers -80° C até a análise. Após a coloração panóptica, as lâminas foram checadas por pelo menos 1000 células antes de serem classificadas como negativas.

## **Análise da Expressão de RNAm de IGF-I e Citocinas**

As extrações de RNAm foram realizadas utilizando o kit comercial NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel). O RNAm foi transcrito em cDNA com o kit de transcrição reversa (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. A RT-PCR foi preparada em um volume final de 10µL, sendo 1µL dos primers 0,2µM (Forward + Reverse), 5µL de SYBR Green PCR Mastermix 1x (Thermo Fisher Scientific) e 4µL de cDNA das amostras testadas (5ng/µL). Os iniciadores para identificação dos genes analisados (IGF-I, IFN-γ, IL-12p40, IL-10, TNF-α, IL-6, IL-10, IL-3 e CSF2) estão descritos abaixo Tabela 01. As reações foram realizadas no ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, EUA) e foi iniciada após desnaturação do DNA a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 15 segundos, seguidos de anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Para a quantificação relativa dos genes específicos, foi utilizado gene endógeno beta 2 microglobulina, como normalizador usando o método do  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

## **Determinação da carga parasitária em medula óssea**

A determinação da carga parasitária em medula óssea foi realizada pela técnica de PCR em tempo real quantitativo com base em curvas padrão. As extrações de DNA foram realizadas utilizando o kit comercial NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel). A q-PCR foi preparada em um volume final de 10µL, sendo 1µL dos primers (Forward + Reverse), 5µL de SYBR Green PCR Mastermix 1x (Thermo Fisher Scientific) e 4µL de cDNA das amostras testadas (5ng/µL). Os iniciadores para identificação dos genes analisados foram: (DNA de mini-

círculo (kDNA) de *L. infantum*: 5'-CTTTTCTGGTCCCGCG GGTAGG-3' (forward); 5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3' (reverse). As reações foram realizadas no ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, EUA) e foi iniciada após desnaturação do DNA a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 15 segundos, seguidos de anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto.

### **Análise Estatística**

Os testes foram realizados utilizando Graph Pad Prism, versão 7.0 e SPSS, versão 18.0. O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste T e Mann-Whitney. O teste de correlação de Pearson foi usado para correlacionar a expressão gênica de IGF-1 com os dados clínico-laboratoriais, carga parasitária e citocinas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p \leq 0,05$ .

### **Resultados**

A população de indivíduos com LV do estudo foi composta por 60,0% masculina e 40,0% feminina e tinha média de idade de 15,09 anos e todos tiveram exame direto da medula óssea positivo. Todos os pacientes apresentaram hepatoesplenomegalia (baço com  $\bar{x}$ :5,96±3,08 cm e fígado com  $\bar{x}$ :4,85±2,87). Laboratorialmente, apresentaram anemia ( $\bar{x}$ :7,56±1,55), trombocitopenia ( $\bar{x}$ :105480±88225), além de redução nos níveis de leucócitos ( $\bar{x}$ :3233±1971), albumina sérica ( $\bar{x}$ :3,22±0,53) e aumento de AST ( $\bar{x}$ :411,58±82,31) e ALT ( $\bar{x}$ :73,84±69,24). A média da expressão gênica de IGF-I foi maior nos indivíduos com LV em relação ao controle, mas não apresentou diferença estatística (Figura 01). Na comparação entre os pacientes com LV clássica e os que tiveram os sinais de gravidade icterícia e/ou sangramento (Figura 01), também não foi observada diferença estatística. Não houve forte correlação entre a expressão medular do IGF-1 e os testes laboratoriais periféricos hematológicos relacionados (hemoglobina, leucócitos e plaquetas) (Figura 02). Enquanto as relações da expressão do IGF-1 com hemoglobina e leucócitos foram negativas (rho: -0,152 p=0,510 e rho: -0,263;p=0,816; respectivamente), a relação com as plaquetas se mostrou positiva e com maior intensidade (rho: 0,350;p=0,120).

A figura 03 mostra a correlação de IGF-1 com a carga parasitária e citocinas presentes no ambiente medular de pacientes com a leishmaniose visceral ativa, uma vez que é conhecido a

importante função imunológica da medula óssea na LV, além de ser importante local de abrigo e proliferação do parasito. Não houve correlações fortes e nem significativas entre a expressão de IGF-1 com a carga parasitária e citocinas avaliadas (Figura 02); no entanto é de destacar a relação praticamente nula entre IGF-1 e carga parasitária ( $\rho=0,076$  e  $p=0,816$ ) e uma relação negativa entre o IGF-1 e IFN- $\gamma$  ( $\rho: -0,226$ ;  $p=0,339$ ), TNF- $\alpha$  ( $\rho: -0,108$ ;  $p=0,640$ ) e IL-10 ( $\rho: -0,162$ ;  $p=0,508$ ).

## Discussão

O controle ou progressão da infecção por *Leishmania* depende da resposta imune específica e não específica do hospedeiro e da capacidade do parasito de escapar dessa resposta (2, 16). Esta fase inicial é caracterizada por um processo inflamatório no qual vários mediadores e elementos teciduais participam, incluindo fatores de crescimento e citocinas (8). O IGF-I, presente na circulação e abundante nos macrófagos é um dos fatores iniciais que interagem com promastigotas de *Leishmania* (2). Estudos, *in vitro*, prévios demonstraram que o IGF-I induziu proliferação de *Leishmania* (10) e promoveu, *in vivo*, aumento nas lesões de pele em experimentos com camundongos infectados por *Leishmania amazonensis* (12, 17).

Nossos resultados não mostraram diferença entre a análise da expressão gênica de IGF-1 da medula óssea entre os pacientes com LV ativa e controle e nem entre os grupos de pacientes que apresentavam ou não algum sinal de gravidade. Esses dados contrastam com a avaliação da expressão gênica de IGF-1 em fígado de cachorros com leishmaniose visceral observado por Pinho *et al.*, 2013 (2). No entanto, nesse mesmo estudo, os autores também não encontraram diferença na expressão de IGF-I no baço, gânglios linfáticos, orelha e região ungueal em relação ao grupo controle (2). Outros estudos, que avaliaram concentrações séricas de IGF-I, verificaram redução nos níveis do fator de crescimento tanto na leishmaniose visceral humana quanto na canina (2, 8).

A LV se caracteriza por ser uma doença inflamatória com intensa produção de citocinas, substâncias necessárias para proteger o hospedeiro contra *Leishmania*, mas também podendo causar danos (11, 18).

Trabalhos demonstraram que em processo inflamatório as concentrações de IGF-I em animais experimentais e humanos são reduzidas (19, 20). Essa redução pode ser resultado do efeito de mediadores inflamatórios IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$  e especialmente IFN- $\gamma$ , que inibem a biossíntese do IGF-I no fígado e em outros tecidos (2, 11,20). Semelhantemente ao anteriormente descrito, nossos resultados demonstraram uma correlação negativa entre a expressão de IGF-I

com a IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , mas, contrariamente, por razões desconhecidas, mostrou uma correlação positiva com a IL-6.

Estudos, *in vitro*, mostraram que o IGF-I favorece o crescimento de parasitos através de um aumento na expressão e atividade da enzima arginase dos próprios parasitos e dos macrófagos, produzindo, assim, uma redução na produção de óxido nítrico, substância danosa ao protozoário e aumento de poliaminas, que promovem o crescimento de *Leishmania* intracelular (14, 17, 21). A indução da expressão de arginase é classicamente um processo dirigido por citocina de perfil Th2, IL-4 e IL-10 (14, 21). O nosso estudo mostrou uma fraca e negativa correlação entre a expressão gênica dos indutores da arginase IL-10 e IGF-I, mostrando que a indução da expressão de arginase por IL-10 pode não passar por estímulos a fatores de crescimento, ou mesmo, o processo de indução de arginase e aumento de IL-10 pode não ser processos interdependentes como observado por Osorio *et al.*, 2014 (21).

Além disso, também avaliamos a correlação da expressão gênica de IGF-I e carga parasitária da medula óssea e não observamos relação significativa, semelhante ao encontrado por Pinho *et al.*, 2013 (2). Sabendo que macrófagos de medula óssea expressam abundantes transcritos de IGF-I e que o CSF2 possui ação protetora sobre a *Leishmania* (22), verificamos também a correlação do fator de crescimento com as citocinas hematopoiéticas, CSF2 e IL-3; onde foram observadas fracas relações.

Apesar de resultados de correlações superiores, comparados a relação entre IGF-1 e citocinas hematopoiéticas, a concordância entre IGF-1 e parâmetros laboratoriais periféricos (hemoglobina, leucócito e plaquetas) também se mostraram fracas, assim as alterações observadas nesses marcadores podem ser consequência da ação de outros marcadores imunopatológicos da LV.

## **Conclusão**

Ao contrário dos estudos prévios de leishmaniose cutânea, não se pode concluir, através desse trabalho, que o IGF-I possua efeito indutor de crescimento sobre parasitos na medula óssea de indivíduos com leishmaniose visceral humana. No entanto, a constatação da relevância da interação do IGF-I com carga parasitária e com marcadores imunológicos na leishmaniose visceral humana dependerá de um número maior de estudos.

## **Contribuição dos autores**

LFT e SFGC desenvolveram e projetaram o estudo. TCMS realizou coleta de material. MSC, AGV e GRGP realizaram experimentos. VDR tabulação e estatística dos dados. LFT, MSC, AGV e GRGP interpretaram dados. JFL e JSRS revisaram o texto. LFT e SFGC são desenvolvedores do artigo. Todos leram e aprovaram o texto.

### **Agradecimentos**

Ao Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – ICB. Prof. Ricardo Toshio Fujiwara. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes.

### **Conflito de interesse**

Não declarado.

### **Aprovação Ética**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Montes Claros com o parecer 677.061/2014.

## Referências

1. Costa AS, Costa GC, Aquino DM, Mendonca VR, Barral A, Barral-Netto M, *et al.* Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2012;107(6):735-9.
2. Pinho FA, Magalhaes NA, Silva KR, Carvalho AA, Oliveira FL, Ramos-Sanchez EM, *et al.* Divergence between hepatic insulin-like growth factor (IGF)-I mRNA expression and IGF-I serum levels in *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi-infected dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013;151(1-2):163-7.
3. Khadem F, Uzonna JE. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. *Future Microbiol.* 2014;9(7):901-15.
4. McCall LI, Zhang WW, Matlashewski G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. *PLoS pathogens.* 2013;9(1):e1003053.
5. Khoshdel A, Alborzi A, Rosouli M, Taheri E, Kiany S, Javadian MH. Increased levels of IL-10, IL-12, and IFN- in patients with visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2009;13:44-6.
6. Bacellar O, D'Oliveira A, Jr., Jeronimo S, Carvalho EM. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine.* 2000;12(8):1228-31.
7. Lonardon MV, Russo M, Jancar S. Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infection and immunity.* 2000;68(11):6355-61.
8. Gomes CM, Giannella-Neto D, Gama ME, Pereira JC, Campos MB, Corbett CE. Correlation between the components of the insulin-like growth factor I system, nutritional status and visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101(7):660-7.
9. Barcinski MA, Schechtman D, Quintao LG, Costa Dde A, Soares LR, Moreira ME, *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases the infectivity of *Leishmania amazonensis* by protecting promastigotes from heat-induced death. *Infection and immunity.* 1992;60(9):3523-7.
10. Goto H, Gomes CM, Corbett CE, Monteiro HP, Gidlund M. Insulin-like growth factor I is a growth-promoting factor for *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(22):13211-6.
11. de Souza LD, Vendrame CM, de Jesus AR, Carvalho MD, Magalhaes AS, Schriefer A, *et al.* Insulin-like growth factor-I serum levels and their biological effects on *Leishmania* isolates from different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. *Parasites & vectors.* 2016;9(1):335.
12. Gomes CM, Goto H, Ribeiro Da Matta VL, Laurenti MD, Gidlund M, Corbett CE. Insulin-like growth factor (IGF)-I affects parasite growth and host cell migration in experimental cutaneous leishmaniasis. *International journal of experimental pathology.* 2000;81(4):249-55.
13. Gomes CM, Goto H, Magnanelli AC, Monteiro HP, Soares RP, Corbett CE, *et al.* Characterization of the receptor for insulin-like growth factor on *Leishmania* promastigotes. *Experimental parasitology.* 2001;99(4):190-7.
14. Vendrame CM, Carvalho MD, Rios FJ, Manuli ER, Petitto-Assis F, Goto H. Effect of insulin-like growth factor-I on *Leishmania amazonensis* promastigote arginase activation and reciprocal inhibition of NOS2 pathway in macrophage in vitro. *Scandinavian journal of immunology.* 2007;66(2-3):287-96.

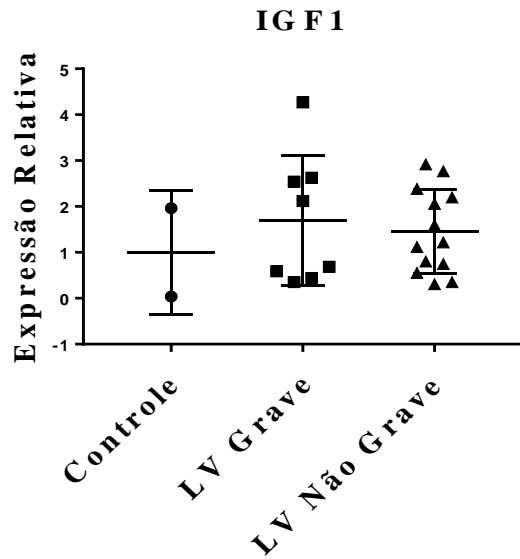
15. Vendrame CM, Carvalho MD, Tempone AG, Goto H. Insulin-like growth factor-I induces arginase activity in *Leishmania amazonensis* amastigote-infected macrophages through a cytokine-independent mechanism. *Mediators of inflammation*. 2014;2014:475919.
16. Mougneau E, Bihl F, Glaichenhaus N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunological reviews*. 2011;240(1):286-96.
17. Reis LC, Ramos-Sanchez EM, Goto H. The interactions and essential effects of intrinsic insulin-like growth factor-I on *Leishmania* (*Leishmania*) major growth within macrophages. *Parasite immunology*. 2013;35(7-8):239-44.
18. Lang CH, Fan J, Wojnar MM, Vary TC, Cooney R. Role of central IL-1 in regulating peripheral IGF-I during endotoxemia and sepsis. *The American journal of physiology*. 1998;274(4 Pt 2):R956-62.
19. Lang CH, Pollard V, Fan J, Traber LD, Traber DL, Frost RA, *et al.* Acute alterations in growth hormone-insulin-like growth factor axis in humans injected with endotoxin. *The American journal of physiology*. 1997;273(1 Pt 2):R371-8.
20. Lelbach A, Scharf JG, Ramadori G. Regulation of insulin-like growth factor-I and of insulin-like growth factor binding protein-1, -3 and -4 in cocultures of rat hepatocytes and Kupffer cells by interleukin-6. *Journal of hepatology*. 2001;35(5):558-67.
21. Osorio EY, Travi BL, da Cruz AM, Saldarriaga OA, Medina AA, Melby PC. Growth factor and Th2 cytokine signaling pathways converge at STAT6 to promote arginase expression in progressive experimental visceral leishmaniasis. *PLoS pathogens*. 2014;10(6):e1004165.
22. Boeuf P, Vigan-Womas I, Jublot D, Loizon S, Barale JC, Akanmori BD, *et al.* CyProQuant-PCR: a real time RT-PCR technique for profiling human cytokines, based on external RNA standards, readily automatable for clinical use. *BMC immunology*. 2005;6:5.
23. Banda R, Yambayamba V, Lalusha BD, Sinkala E, Kapulu MC, Kelly P. Safety of live, attenuated oral vaccines in HIV-infected Zambian adults: oral vaccines in HIV. *Vaccine*. 2012;30(38):5656-60.
24. Joo JH, Jetten AM. NF-kappaB-dependent transcriptional activation in lung carcinoma cells by farnesol involves p65/RelA(Ser276) phosphorylation via the MEK-MSK1 signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(24):16391-9.
25. Cao Q, Liang C, Xue J, Li P, Li J, Wang M, *et al.* Genetic variation in IGF1 predicts renal cell carcinoma susceptibility and prognosis in Chinese population. *Scientific reports*. 2016;6:39014.
26. Baxter EW, Mirabella F, Bowers SR, James SR, Bonavita AM, Bertrand E, *et al.* The inducible tissue-specific expression of the human IL-3/GM-CSF locus is controlled by a complex array of developmentally regulated enhancers. *Journal of immunology*. 2012;189(9):4459-69.
27. Valera FC, Queiroz R, Scrideli C, Tone LG, Anselmo-Lima WT. Evaluating budesonide efficacy in nasal polyposis and predicting the resistance to treatment. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009;39(1):81-8.



Tabela 1 – Sequência dos primers utilizados na quantificação das citocinas e fator de crescimento.

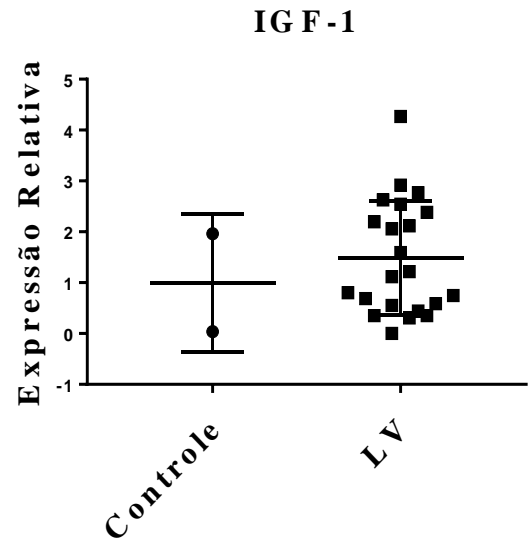
Alvos	Sequência do <i>Primer</i>	Fonte
IFN- $\gamma$	5'GTTTTGGGTTCTCTTGGCTGTTA3'	Boeuf <i>et al.</i> , 2005 (22).
	5'AAAAGAGTTCCATTATCCGCTACATC3'	
TNF- $\alpha$	5'CCCAGGCAGTCAGATCATCTTC3'	Banda <i>et al.</i> , 2012 (23).
	5'GTACAACATCGTTTGGGAGTTTCG3'	
IL-10	5'GCT GGA GGA CTT TAA GGG TTA CCT3'	Boeuf <i>et al.</i> , 2005 (22).
	5'CTT GAT GTC TGG GTC TTG GTT GT 3'	
IL-6	5'CCTGAGAAAGGAGACATGTAACAAGA3'	Joo and Jetten, 2008 (24).
	5'GGCAAGTCTCCTCATTGAATCC3'	
IGF-I	5'GCTCTTCAGTTCGTGTGTGGA3'	Cao <i>et al.</i> , 2016 (25).
	5'GCCTCCTTAGATCACAGCTCC3'	
IL-3	5'GGACTTCAACAACCTCAATGGG3'	Baxter <i>et al.</i> , 2012 (26).
	5'TTGAATGCCTCCAGGTTTGG3'	
CSF-2	5'CACTGCTGCTGAGATGAATGAAA3'	Valera <i>et al.</i> , 2009 (27).
	5'GTCTGTAGGCAGGTCGGCTC3'	

A



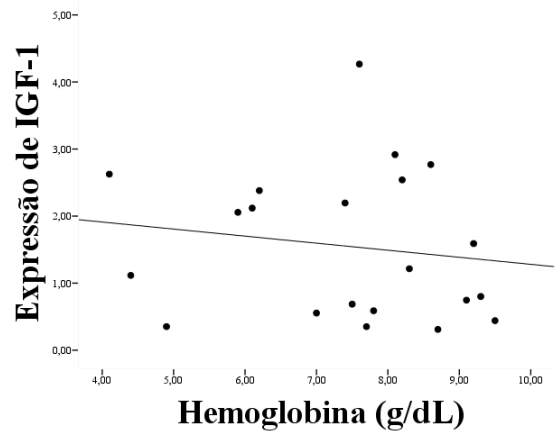
\*p: 0,676

B

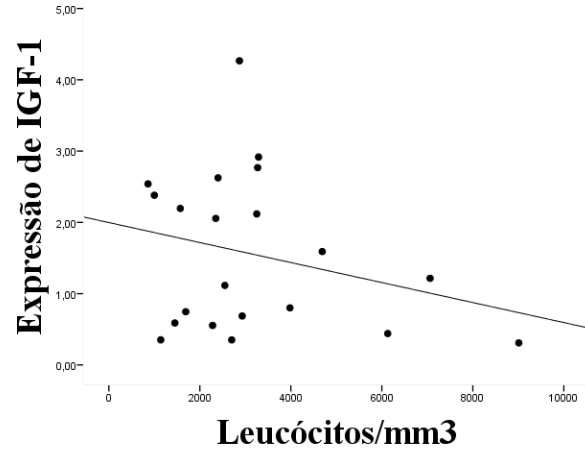


p: 0,387

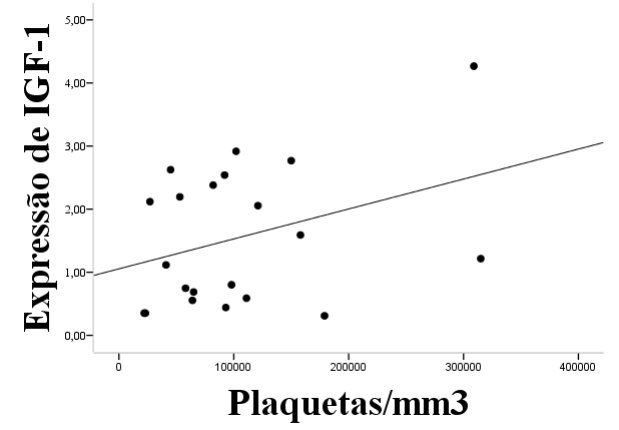
Figura 01 Análise da expressão de RNAm de IGF-I na medula óssea de indivíduos com com LV ativa. Os dados são apresentados como a quantificação relativa usando a fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  contra a expressão do gene da. Beta 2 microglobulina. p valor para a comparação entre os grupos LVG e LVNG (Gráfico A); p valor para a comparação entre os grupos LV e controle (Gráfico B).



rho: -0,152;p=0,510

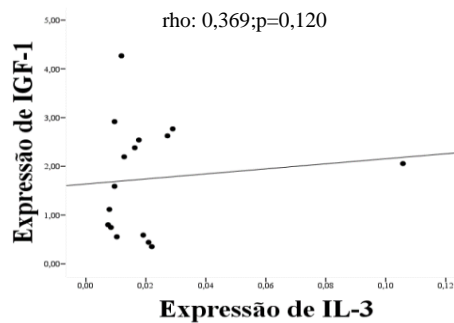
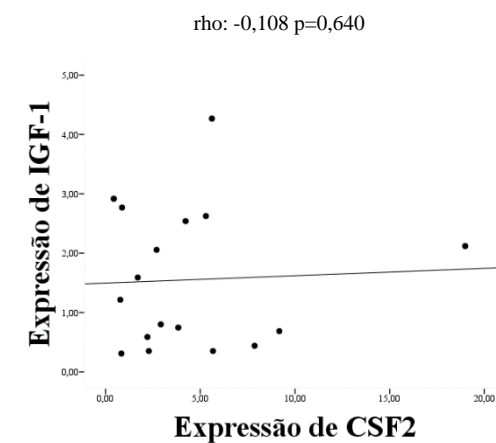
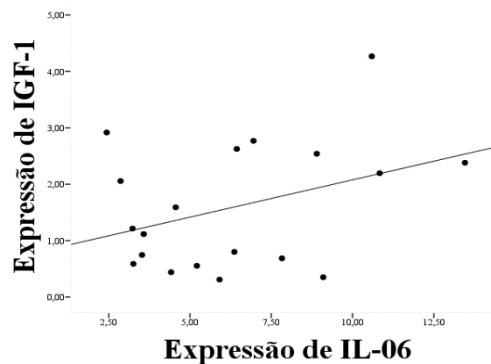
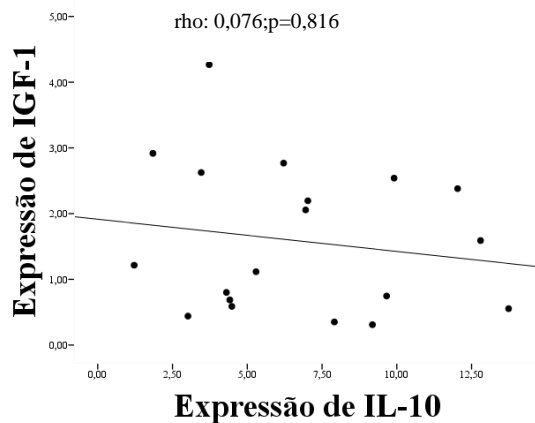
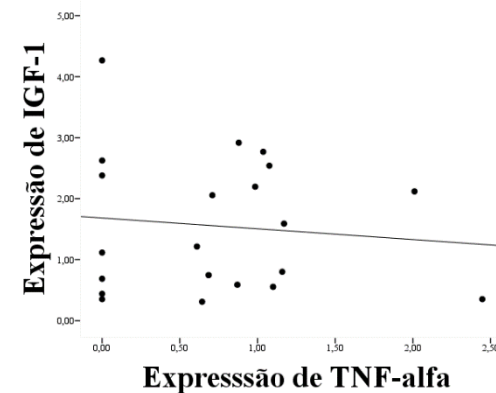
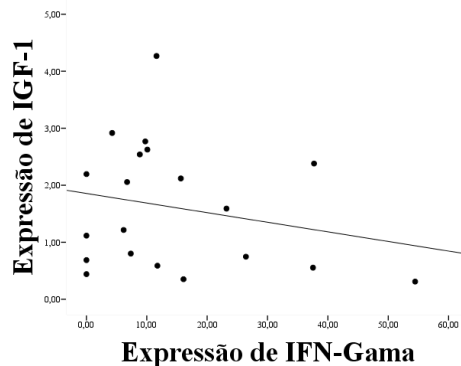
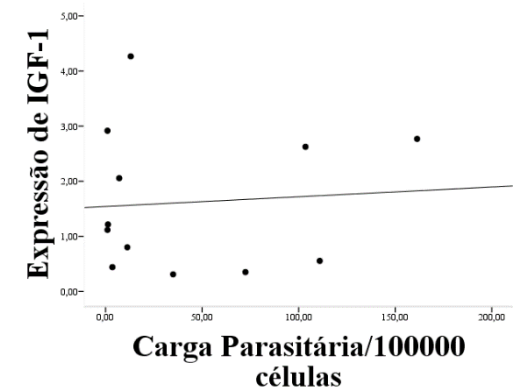


rho: -0,263;p=0,816



rho: 0,350;p=0,120

Figura 2 Correlação da expressão do IGF-1 na medula óssea com os parâmetros laboratoriais hematológicos periféricos.



rho: -0,226;p=0,339

rho: -0,108 p=0,640

rho: 0,076;p=0,816

rho: -0,162;p=0,508

rho: 0,369;p=0,120

rho: 0,048;p=0,856

rho: 0,094;p=0,724

Figura 3 Correlação da expressão do IGF-1 com a carga parasitária e citocinas da medula óssea nos pacientes com leishmaniose ativa

#### 4 CONCLUSÕES

- O estudo demonstrou que a leishmaniose visceral é uma doença inflamatória caracterizada por intensa expressão de citocinas e a medula óssea é um importante tecido de regulação imunológica.
- A expressão gênica das citocinas na medula óssea dos pacientes com leishmaniose visceral ativa foi caracterizada por não ser dicotomizada entre o perfil Th1 e Th2, isto é, os pacientes com calazar não possuem déficit da resposta Th1, mas coexpressão Th1 e Th2.
- Embora os parâmetros laboratoriais periféricos tenham tido pior desempenho nos indivíduos graves, não houve diferença significativa dos indivíduos com LV que não manifestaram sinais de gravidade.
- Não houve diferença na expressão gênica medular das citocinas e do IGF-I entre os indivíduos LV grave e não grave, e nem na expressão de IGF-I dos indivíduos com LV em relação ao controle.
- A carga parasitária da medula óssea não se mostrou associada à gravidade da LV e nem à expressão medular de IGF-I.
- A correlação forte e significativa entre a expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10 demonstra que a IL-10 pode atuar imunomodulando a resposta induzida por IFN- $\gamma$  nos indivíduos com LV ativa; prejudicando a resposta celular, mas evitando uma resposta inflamatória exacerbada.

## REFERÊNCIAS

1. Leishmaniasis [Internet]. 2018. Available from: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
2. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*. 2012;7(5):e35671.
3. Faleiro RJ, Kumar R, Hafner LM, Engwerda CR. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(7):e2914.
4. Stanley AC, Engwerda CR. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol*. 2007;85(2):138-47.
5. Saúde Md. Sistema de Informação de Agravos de Notificação—Sinan
6. Sampaio MJ, Cavalcanti NV, Alves JG, Filho MJ, Correia JB. Risk factors for death in children with visceral leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(11):e877.
7. Roberts MT. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Med Bull*. 2005;75-76:115-30.
8. Saúde Md. Leishmaniose Recomendações clínicas para redução da letalidade. 2011.
9. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(11):873-82.
10. McCall LI, Zhang WW, Matlashewski G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. *PLoS pathogens*. 2013;9(1):e1003053.
11. Nylen S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol*. 2007;28(9):378-84.
12. Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, et al. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1992;86(5):505-7.
13. Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1997;24(4):684-703.
14. Bourgeois N, Lachaud L, Reynes J, Rouanet I, Mahamat A, Bastien P. Long-term monitoring of visceral leishmaniasis in patients with AIDS: relapse risk factors, value of polymerase chain reaction, and potential impact on secondary prophylaxis. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2008;48(1):13-9.
15. Bhattacharya SK, Sur D, Karbwang J. Childhood visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res*. 2006;123(3):353-6.
16. Piscopo TV, Mallia Azzopardi C. Leishmaniasis. *Postgrad Med J*. 2007;83(976):649-57.
17. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, Franca-Silva JC, et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in veterinary science*. 2006;81(1):68-75.
18. Piarroux R, Bardonnnet K. [Visceral leishmaniasis]. *Rev Prat*. 2001;51(19):2104-7.
19. van der Poll T, Zijlstra EE, Mevissen M. Interleukin 6 during active visceral leishmaniasis and after treatment. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995;77(1):111-4.
20. Costa DL, Rocha RL, Carvalho RM, Lima-Neto AS, Harhay MO, Costa CH, et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathog Glob Health*. 2013;107(2):78-87.

21. Dos Santos PL, de Oliveira FA, Santos ML, Cunha LC, Lino MT, de Oliveira MF, et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(1):e0004375.
22. Werneck GL, Batista MS, Gomes JR, Costa DL, Costa CH. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Infection*. 2003;31(3):174-7.
23. Coura-Vital W, Araujo VE, Reis IA, Amancio FF, Reis AB, Carneiro M. Prognostic factors and scoring system for death from visceral leishmaniasis: an historical cohort study in Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(12):e3374.
24. Collin S, Davidson R, Ritmeijer K, Keus K, Melaku Y, Kipngetich S, et al. Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2004;38(5):612-9.
25. Pastorino AC, Jacob CMA, Oselka GW, Carneiro-Sampaio MMS. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *Jornal de Pediatria*. 2002;78:120-7.
26. Pedrosa CMS, Rocha EMMd. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos procedentes de Alagoas, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2004;37:300-4.
27. Mansueto P, Vitale G, Di Lorenzo G, Rini GB, Mansueto S, Cillari E. Immunopathology of leishmaniasis: an update. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2007;20(3):435-45.
28. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(5):951-8.
29. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2004;7:338-49.
30. Ho JL, Badaro R, Schwartz A, Dinarello CA, Gelfand JA, Sobel J, et al. Diminished in vitro production of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha during acute visceral leishmaniasis and recovery after therapy. *J Infect Dis*. 1992;165(6):1094-102.
31. Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol Res*. 2012;110(3):1065-78.
32. Carvalho SF, Lemos EM, Corey R, Dietze R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2003;68(3):321-4.
33. Adhya S, Chatterjee M, Hassan MQ, Mukherjee S, Sen S. Detection of *Leishmania* in the blood of early kala-azar patients with the aid of the polymerase chain reaction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1995;89(6):622-4.
34. Maurya R, Singh RK, Kumar B, Salotra P, Rai M, Sundar S. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. *J Clin Microbiol*. 2005;43(7):3038-41.
35. Disch J, Oliveira MC, Orsini M, Rabello A. Rapid clearance of circulating *Leishmania* kinetoplast DNA after treatment of visceral leishmaniasis. *Acta Trop*. 2004;92(3):279-83.
36. Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE, Kroon NC, Schoone GJ, Khalil ET, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 1997;35(10):2454-7.
37. Leclercq V, Lebastard M, Belkaid Y, Louis J, Milon G. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. *Journal of immunology*. 1996;157(10):4537-45.
38. Mattner F, Di Padova K, Alber G. Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against *Leishmania major*. *Infection and immunity*. 1997;65(11):4378-83.
39. Rica-Capela MJ, Cortes S, Leandro C, Peleteiro MC, Santos-Gomes G, Campino L. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitol Res*. 2003;89(3):163-9.

40. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol.* 2004;42(11):5249-55.
41. Paiva-Cavalcanti M, Regis-da-Silva C, Gomes Y. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.* 2010;16:537-42.
42. Nicolas L, Milon G, Prina E. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *J Microbiol Methods.* 2002;51(3):295-9.
43. Saúde Md. Normas e manuais técnicos. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. In: de SdVeSD, Epidemiológica V, editors. 2003.
44. Gallis HA, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis.* 1990;12(2):308-29.
45. Khoshdel A, Alborzi A, Rosouli M, Taheri E, Kiany S, Javadian MH. Increased levels of IL-10, IL-12, and IFN- in patients with visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2009;13:44-6.
46. Goto H, Prianti MdG. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 2009;51:241-6.
47. Bacellar O, D'Oliveira A, Jr., Jeronimo S, Carvalho EM. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine.* 2000;12(8):1228-31.
48. Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, van Weyenbergh J, Brodskyn C, et al. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis.* 2005;5:113.
49. Gollob KJ, Viana AG, Dutra WO. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite immunology.* 2014;36(8):367-76.
50. Khadem F, Uzonna JE. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. *Future Microbiol.* 2014;9(7):901-15.
51. Kurkjian KM, Mahmutovic AJ, Kellar KL, Haque R, Bern C, Secor WE. Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. *Cytometry A.* 2006;69(5):353-8.
52. Bhattacharya P, Ali N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2013;46:128-34.
53. Gama MEA, Gomes CMdC, Silveira FT, Laurenti MD, Goncalves EdG, Silva ARd, et al. Severe visceral leishmaniasis in children: the relationship between cytokine patterns and clinical features. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2013;46:741-5.
54. Karp CL, el-Safi SH, Wynn TA, Satti MM, Kordofani AM, Hashim FA, et al. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *J Clin Invest.* 1993;91(4):1644-8.
55. Murphy ML, Wille U, Villegas EN, Hunter CA, Farrell JP. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol.* 2001;31(10):2848-56.
56. Ansari NA, Saluja S, Salotra P. Elevated levels of interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. *Clin Immunol.* 2006;119(3):339-45.
57. Singh OP, Gidwani K, Kumar R, Nysten S, Jones SL, Boelaert M, et al. Reassessment of immune correlates in human visceral leishmaniasis as defined by cytokine release in whole blood. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19(6):961-6.
58. Peruhype-Magalhaes V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva Lde A, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, et al. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the



- correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. *Scandinavian journal of immunology*. 2005;62(5):487-95.
59. Peruhype-Magalhaes V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva Lde A, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol*. 2006;146(1):124-32.
60. Costa CHN, Werneck GL, Costa DL, Holanda TA, Aguiar GB, Carvalho AS, et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010;43:386-92.
61. Gomes CM, Giannella-Neto D, Gama ME, Pereira JC, Campos MB, Corbett CE. Correlation between the components of the insulin-like growth factor I system, nutritional status and visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007;101(7):660-7.
62. Verma S, Kumar R, Katara GK, Singh LC, Negi NS, Ramesh V, et al. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. *PloS one*. 2010;5(4):e10107.
63. Silva JM, Zacarias DA, de Figueiredo LC, Soares MR, Ishikawa EA, Costa DL, et al. Bone marrow parasite burden among patients with New World kala-azar is associated with disease severity. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2014;90(4):621-6.
64. Hailu A, van der Poll T, Berhe N, Kager PA. Elevated plasma levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-gamma inducing cytokines, and IFN-gamma inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2004;71(5):561-7.
65. Goto H, Gomes CM, Corbett CE, Monteiro HP, Gidlund M. Insulin-like growth factor I is a growth-promoting factor for *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(22):13211-6.
66. Murray HW. Accelerated control of visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin-6-deficient mice. *Infection and immunity*. 2008;76(9):4088-91.
67. Murray HW, Delph-Etienne S. Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Infection and immunity*. 2000;68(1):288-93.
68. Quirino GFS, Nascimento MSL, Davoli-Ferreira M, Sacramento LA, Lima MHF, Almeida RP, et al. Interleukin-27 (IL-27) Mediates Susceptibility to Visceral Leishmaniasis by Suppressing the IL-17-Neutrophil Response. *Infection and immunity*. 2016;84(8):2289-98.
69. Pinto AI, Brown N, Preham O, Doehl JSP, Ashwin H, Kaye PM. TNF signalling drives expansion of bone marrow CD4+ T cells responsible for HSC exhaustion in experimental visceral leishmaniasis. *PLoS pathogens*. 2017;13(7):e1006465.
70. Rea IM, McNerlan SE, Alexander HD. Total serum IL-12 and IL-12p40, but not IL-12p70, are increased in the serum of older subjects; relationship to CD3(+) and NK subsets. *Cytokine*. 2000;12(2):156-9.
71. Sabat R, Grutz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(5):331-44.
72. Stager S, Maroof A, Zubairi S, Sanos SL, Kopf M, Kaye PM. Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against *Leishmania donovani* and the expansion of IL-10+ CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 2006;36(7):1764-71.
73. Ramos PK, Carvalho KI, Rosa DS, Rodrigues AP, Lima LV, Campos MB, et al. Serum Cytokine Responses over the Entire Clinical-Immunological Spectrum of Human *Leishmania (L.) infantum chagasi* Infection. *BioMed research international*. 2016;2016:6937980.

74. Holaday BJ, Pompeu MM, Jeronimo S, Texeira MJ, Sousa Ade A, Vasconcelos AW, et al. Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala azar. *J Clin Invest.* 1993;92(6):2626-32.
75. Bodas M, Jain N, Awasthi A, Martin S, Penke Loka RK, Dandekar D, et al. Inhibition of IL-2 induced IL-10 production as a principle of phase-specific immunotherapy. *Journal of immunology.* 2006;177(7):4636-43.
76. Ansari NA, Kumar R, Gautam S, Nysten S, Singh OP, Sundar S, et al. IL-27 and IL-21 are associated with T cell IL-10 responses in human visceral leishmaniasis. *Journal of immunology.* 2011;186(7):3977-85.
77. Pitta MG, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest.* 2009;119(8):2379-87.
78. Manna PP, Chakrabarti G, Bandyopadhyay S. Innate immune defense in visceral leishmaniasis: cytokine mediated protective role by allogeneic effector cell. *Vaccine.* 2010;28(3):803-10.
79. Cezario GA, de Oliveira LR, Peresi E, Nicolette VC, Poletini J, de Lima CR, et al. Analysis of the expression of toll-like receptors 2 and 4 and cytokine production during experimental *Leishmania chagasi* infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2011;106(5):573-83.
80. Tropa de Abreu R, Carvalho M, Carneiro CM, Giunchetti RC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, et al. Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with leishmania (*Leishmania*) *chagasi*. *PloS one.* 2011;6(5):e18873.
81. Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM. Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with *Leishmania donovani*. *Infection and immunity.* 2000;68(4):1840-8.
82. Yang YC, Ciarletta AB, Temple PA, Chung MP, Kovacic S, Witek-Giannotti JS, et al. Human IL-3 (multi-CSF): identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3. *Cell.* 1986;47(1):3-10.
83. Mirkovich AM, Galelli A, Allison AC, Modabber FZ. Increased myelopoiesis during *Leishmania major* infection in mice: generation of 'safe targets', a possible way to evade the effector immune mechanism. *Clin Exp Immunol.* 1986;64(1):1-7.
84. Burgess AW, Metcalf D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood.* 1980;56(6):947-58.
85. Hamilton JA, Anderson GP. GM-CSF Biology. *Growth Factors.* 2004;22(4):225-31.
86. Murray HW, Cervia JS, Hariprasad J, Taylor AP, Stoeckle MY, Hockman H. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental visceral leishmaniasis. *J Clin Invest.* 1995;95(3):1183-92.
87. Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM. *Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha. *Blood.* 2000;95(5):1642-51.
88. Pinho FA, Magalhaes NA, Silva KR, Carvalho AA, Oliveira FL, Ramos-Sanchez EM, et al. Divergence between hepatic insulin-like growth factor (IGF)-I mRNA expression and IGF-I serum levels in *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*-infected dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013;151(1-2):163-7.

## ANEXO

## ANEXO – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
MONTES CLAROS -  
UNIMONTES



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Leishmaniose Visceral: Correlação entre os achados clínico - laboratoriais e as características imuno - morfológicas do micro ambiente da medula óssea.

**Pesquisador:** Tânia de Cassia Moreira Soares

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 30869314.9.0000.5146

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual de Montes Claros - UNIMONTES

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 677.061

**Data da Relatoria:** 05/06/2014

**Apresentação do Projeto:**

A Leishmaniose é uma enfermidade provocada por mais de 20 espécies do gênero Leishmânia e é transmitida aos seres humanos por 30 diferentes espécies de flebotomíneos. No Brasil, o principal vetor é o *Lutzomyia longipalpis*. Esta zoonose é endêmica em 98 países sendo que, 90% dos casos novos estão concentrados na Índia, Nepal, Sudão, Bangladesh, Etiópia e Brasil. O Brasil detém 90% dos casos humanos de Leishmaniose das Américas.

**Objetivo da Pesquisa:**

Correlacionar os achados clínico - laboratoriais e as características imuno - morfológicas do micro ambiente da medula óssea em portadores de Leishmaniose Visceral.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos e desconfortos:** O procedimento da coleta de medula óssea pode ocasionar dor local suportável e de curta duração, extravasamento sanguíneo e excepcionalmente hematoma, que às vezes pode ser evitado comprimindo o local da punção por alguns minutos. Em pacientes com doenças debilitantes raramente pode ocorrer infecções locais e generalizadas, e na literatura são citados raríssimos casos de hemorragias internas.

**Benefícios:**

A compreensão dos fatores que podem predispor alguns indivíduos a desenvolverem a LV e dos

**Endereço:** Av. Dr Rui Braga s/n-Camp Univers Profº Darcy Rib  
**Bairro:** Vila Mauricéia **CEP:** 39.401-089  
**UF:** MG **Município:** MONTES CLAROS  
**Telefone:** (38)3229-8180 **Fax:** (38)3229-8103 **E-mail:** smelocosta@gmail.com

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
MONTES CLAROS -  
UNIMONTES



Continuação do Parecer: 677.061

fatores que podem controlar a infecção é de extrema importância para o controle da doença e de sua letalidade e para o desenvolvimento de imunoprofilaxia.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante acerca de zoonose endêmica no Brasil. O estudo poderá contribuir para o maior conhecimento de correlação entre os achados clínicos, laboratoriais e características imunomorfológicas da medula óssea de pessoas com Leishmaniose Visceral.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados.

**Recomendações:**

Apresentação de relatório final por meio da plataforma Brasil, em "enviar notificação".

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O projeto respeita os preceitos éticos da pesquisa em seres humanos, sendo assim somos favoráveis à aprovação do mesmo.

MONTES CLAROS, 06 de Junho de 2014

---

**Assinado por:**  
**SIMONE DE MELO COSTA**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. Dr Rui Braga s/n-Camp Univers Profº Darcy Rib  
**Bairro:** Vila Mauricéia **CEP:** 39.401-089  
**UF:** MG **Município:** MONTES CLAROS  
**Telefone:** (38)3229-8180 **Fax:** (38)3229-8103 **E-mail:** smelocosta@gmail.com