



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**O papel da medula óssea no desenvolvimento da leishmaniose visceral grave:
desvendando os mecanismos inflamatórios e imunossupressores.**

Débora Cavalcante Braz

Teresina – PI
2016

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**O papel da medula óssea no desenvolvimento da leishmaniose visceral grave:
desvendando os mecanismos inflamatórios e imunossupressores.**

Débora Cavalcante Braz

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde da Rede Nordeste de Biotecnologia como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Carlos Henrique Nery Costa

Teresina – PI
2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

B827p Braz, Débora Cavalcante

O papel da medula óssea no desenvolvimento da leishmaniose visceral grave : desvendando os mecanismos inflamatórios e imunossupressores / Débora Cavalcante Braz - 2017.
148 f.: il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde da Rede Nordeste, Teresina, 2017.

Orientação: Prof.Dr. Carlos Henrique Nery Costa

1. Leishmaniose visceral grave 2. Inflamação sistêmica IL- 6
3. IL 10 I. Título

CDD 616. 936 4

Dedico este trabalho a todos os pacientes que foram diagnosticados com leishmaniose visceral.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me guiado para o melhor caminho que me permitiu concluir o doutorado.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa**, por me guiar pelo mundo da pesquisa científica e por ter acreditado em mim como pesquisadora.

À **Profa. Dra. Dorcas Lamounier Costa**, pelos dados clínicos dos pacientes e pelo fomento à minha pesquisa.

À **Dra. Elaine Costa**, que me recebeu e orientou em seu laboratório de pesquisa na Universidade Federal do Rio de Janeiro. Com ela conheci o programa de análise *Infinicity*®.

À **Dra. Adriana Cesar Bonomo**, pesquisadora exemplar que me inspirou no complexo mundo da imunologia. Ao **Dr. Rômulo Galvani** pelos ensinamentos.

À **Dra. Clarissa Romero Teixeira**, que me orientou na análise imunofenotípica em momentos decisivos e, igualmente, ao seu esposo, **Dr. Régis Teixeira**, que me apresentou o programa estatístico *GraphPad prisma*®.

Ao **Dr. Vladimir Costa** que me orientou nos experimentos de biologia molecular. Às **Mscs. Kátia Carvalho** e **Ingridi Sousa** que, pela sua experiência na área, foram decisivas no final da caminhada e me ajudaram a enfrentar as desventuras da biologia molecular.

Ao **Msc. Adeno Oliveira**, por ter me auxiliado nas etapas iniciais da análise estatística.

Aos colegas do Laboratório (IDTNP), **Dra. Valéria Simeão**, **Msc. Daniele Zacarias**, **Msc. Jahilton Silva**, **Alexandre Silva** e **Msc. Teresinha** pelo apoio na rotina do laboratório de pesquisa.

À **Universidade Federal do Piauí**, à **coordenação** e aos **professores do curso de Farmácia** por terem permitido a minha dedicação exclusiva à pesquisa no último ano do doutorado. Sem isso não teria concluído o doutorado.

Ao Instituto de **Doenças Tropicais Natan Portela** por ter autorizado a realização da pesquisa junto aos pacientes com Leishmaniose visceral.

À minha **família**, à **família** do meu esposo e aos meus **amigos**, pois muitas vezes tive que me ausentar do convívio para concretizar este sonho. Muito obrigada pelo incentivo, carinho e compreensão. Sem o apoio de vocês não teria conseguido.

Ao meu esposo e companheiro de vida, **Franz Beckenbauer**, pela compreensão, amor e amizade. Sem o seu apoio não teria conseguido concluir o doutorado.

RESUMO

Introdução: A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é uma protozoose causada pela *Leishmania infantum* nas Américas e pela *Leishmania donovani* no subcontinente indiano e no leste da África, regiões em que a doença é endêmica. Os pacientes com a doença grave além das manifestações clássicas como febre, anemia e hepatoesplenomegalia apresentam um quadro inflamatório intenso, sangramento e infecções. No Brasil, entre 5 a 10% dos pacientes com LV apresentam desfechos fatais. Entender a patogênese da doença em sua forma grave é importante para o desenvolvimento e a aplicação de novas terapias. **Objetivo geral:** Verificar o papel da medula óssea (MO) e do sangue periférico (SP) na patogênese da LV, em particular, da doença grave. **Metodologia:** O presente estudo envolveu 29 pacientes com LV sintomática (grupo LV), 12 pacientes com suspeita clínica inicial mas sem confirmação de LV (grupo sem LV/controlado não saudável) e 12 pacientes infectados com *Leishmania* e HIV (grupo *Leishmania*/HIV). Os pacientes foram avaliados quanto aos parâmetros clínicos, laboratoriais, imunofenotipagem e expressão de citocinas por leucócitos, além da dosagem de citocinas plasmáticas e do sobrenadante da MO. **Resultados.** Pacientes com LV apresentaram aumento dos linfócitos B e neutropenia no SP, aumento dos linfócitos T CD4 no SP e na MO quando comparados aos controles não saudáveis. Com relação às citocinas circulantes, pacientes com LV apresentaram níveis elevados de IL-6 e IL-10 no SP quando foram comparados ao grupo controle, enquanto que na MO foram registrados níveis elevados de IL-6, IL-10, INF γ , TNF α e IL-1 β . No que diz respeito à expressão de citocinas pelos leucócitos, os monócitos do SP de pacientes com LV produziram significativamente mais IL-10 quando comparados ao grupo controle. O aumento na expressão de IL-6 por linfócitos B, monócitos e linfócitos T CD8 foi observado apenas no SP de pacientes com LV quando comparados ao grupo controle. Células T CD4 apresentaram maior expressão de IL-6 no SP e na MO. Os dados desta pesquisa também permitem sugerir que pacientes com probabilidade de morte acima de 15% podem ser considerados mais graves porque apresentaram níveis mais elevados de IL-6. Linfócitos T CD8⁺IL6⁺ e T CD4⁺IL6⁺ apresentaram correlação positiva com os níveis plasmáticos de IL-6 e com a probabilidade de morte. Pacientes sem LV, com LV e coinfectados apresentaram níveis significativamente mais elevados de CXCL-8 na MO quando comparado ao SP. Os níveis de TNF α e IL-12 em pacientes coinfectados

foram elevados no sangue periférico e na medula óssea. Houve um aumento na %CD14⁺TNFα⁺ e %CD14⁺IL6⁺ no SP de pacientes coinfectados quando comparados aos pacientes com LV. Elevação da %CD14⁺IL-10⁺, %neutrófilos IL-6⁺ e %TCD8⁺IL-6⁺ no SP quando comparado a MO em pacientes coinfectados. **Conclusão:** Os resultados obtidos nesta pesquisa permitem sugerir que os leucócitos, principalmente os linfócitos T, quando presentes na MO exercem atividade regulatória porque apenas no SP foi registrado expressão significativa de IL-6 pelas células T, que tem atividade inflamatória e está correlacionada com gravidade da doença. Nos pacientes coinfectados, os níveis elevados de IL-12 e TNFα sugerem ativação dos linfócitos T. O estímulo para o aumento na síntese de IL-6 na corrente sanguínea, um importante parâmetro de gravidade, parece não ter origem na medula óssea em pacientes com LV e coinfectados. Assim, outros órgãos parasitados, como o baço, podem desempenhar papel decisivo na doença grave.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral grave, inflamação sistêmica, IL-6, IL-10.

ABSTRACT

Introduction. Visceral leishmaniasis (VL) or calazar is a protozoan disease caused by *Leishmania infantum* in Americas and *Leishmania donovani* in Indian subcontinent and in East Africa, regions where the disease is endemic. Patients with severe disease present classical manifestations as fever, anemia and hepatosplenomegaly associated with an intense inflammatory condition, presence of bleeding and infections. In Brazil, 5 to 10% of patients with VL presented fatal outcome. To understand the severe disease pathogenesis is important to the development and application of new therapies. **General Objective.** Verify the bone marrow (BM)'s and peripheral blood (PB)'s role in VL pathogenesis, in particular, of severe disease. **Methodology.** The present study was composed by 29 patients with symptomatic VL (VL group), 12 patients with initial clinical suspicion of VL but without VL infection confirmation (no VL group/non healthy group) and 12 patients infected with *Leishmania* and HIV (*Leishmania*/HIV group). Patients were evaluated for clinical and laboratorial parameters, immunophenotyping and cytokine expression by leukocytes, besides plasmatic cytokines and bone marrow supernatant dosage. **Results:** VL patients presented B lymphocytes increase and neutropenia in PB, T CD4 Lymphocytes increase in PB and BM when compared to non-healthy controls. With respect to circulating cytokines, VL patients presented higher levels of IL-6 and IL-10 in PB when compared to control group, while in BM higher levels of IL-6, IL-10, INF γ , TNF α and IL-1 β were recorded. Concerning to cytokine expression by leukocytes, VL patients PB monocytes produced significantly more IL-10 when compared to control group. The increase in IL-6 expression by B lymphocytes, monocytes and T CD8 Lymphocytes was observed only in VL patient's PB when compared to control group. T CD4 cells presented higher IL-6 expression in PB and BM. This research data also permit to suggest that patients with death probability above 15% can be considered more severe because they presented higher levels of IL-6. T CD8⁺IL6⁺ and T CD4⁺IL6⁺ Lymphocytes presented positive correlation with IL-6 plasmatic levels and death probability. No VL, VL and co-infected patients presented significantly higher levels of CXCL-8 in BM when compared to PB. TNF α and IL-12 levels in co-infected patients were high in peripheral blood and bone marrow. There was an increase of %CD14⁺TNF α ⁺ and %CD14⁺IL6⁺ in PB of co-infected patients when compared to VL patients. %CD14⁺IL-10⁺, %neutrophils IL-6⁺ and %TCD8⁺IL-6⁺ elevation in PB when compared to BM of co-infected patients.

Conclusion. The obtained results in this research allows to suggest that leucocytes, mainly T lymphocytes, when present in BM, they exercise regulatory activities because it was recorded, only in PB, significant IL-6 expression by T cells, that has inflammatory activity and it is related with disease severity. In co-infected patients, IL-12 and TNF α high levels suggest T lymphocytes activation. The stimulus to IL-6 syntheses increase in blood flow, an important severity parameter, it seems to have no origin in VL and co-infected patients' bone marrow. Thus, other parasitized organs, like spleen, they may play a decisive role in severe disease.

Key words: severe visceral Leishmaniasis, systemic inflammation, IL-6, IL-10.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

APC	fluorocromo alofocianina
APC-cy7	fluorocromo alofocianina cy7
ALEXA-FLUOR	fluorocromo
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CD4 ⁺	linfócitos T auxiliares CD4 ⁺
CD8	linfócitos T citotóxicos CD8 ⁺
CD14 ⁺	antígeno expresso em monócitos
CD19 ⁺	antígeno presente na maioria dos Linfócitos B
CD45 ⁺	antígeno comum dos leucócitos
CID	coagulação intravascular disseminada
CD34	antígeno expresso por células jovens
CD16	antígeno de superfície
Dímero D	um produto da degradação da fibrina
FITC	fluorocromo fluoresceína
FSC-A	<i>forward scatter</i> . Detecção do tamanho das células.
FMO	<i>fluorescence minus one</i>
IgG	imunoglobulina G
IgG1	subclasse 1 da imunoglobulina G
IgG3	subclasse 3 da imunoglobulina G
IL	Interleucina (citocina)
IL-1 β	Interleucina 1 beta
INF- γ	Interferon gama
LV	leishmaniose visceral
LPS	lipossacarídeo
NAFT	fator nuclear de ativação das células T
PE	fluorocromo ficoeritrina
PERCP	Fluorocromo – proteína piridina clorofila
PDF	produtos de degradação da fibrina
PS	fosfatidilserina
SSC-A	<i>side scatter</i> . Detecção da granulosidade das células.
STAT3	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TAP	tempo de ação da protrombina
TFPI	inibidor do fator tecidual
TGF- β	Fator de crescimento transformador β
TH1	linfócitos T Helper 1
TH2	linfócitos T helper 2
TH17	linfócitos T Helper 17
TLR1	receptor semelhante a Toll tipo 1 (<i>toll-like receptors 1</i>)
TLR4	receptor semelhante a Toll tipo 4 (<i>toll-like receptors 1</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factor alpha</i>)
VHS	velocidade de hemossedimentação do sangue

LISTA DE FIGURAS

		Pag
FIGURA 1	Visão geral da imunossupressão induzida por IL-10 e IL-6 na LV.	35
FIGURA 2	Esquema representativo da estratégia de análise utilizada para determinar o perfil intracelular de expressão de citocinas pelos leucócitos.....	50
FIGURA 3	Comparação entre leucócitos (células/mm ³) na (A) medula óssea e no (B) sangue periférico de pacientes com LV e sem LV (grupo controle) analisados por imunofenotipagem.....	55
FIGURA 4	Expressão de IL-6 pelos leucócitos no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com LV comparados com o controle (sem LV).....	57
FIGURA 5	Expressão de IL-10 pelos leucócitos no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com LV comparados com o controle (sem LV).....	58
FIGURA 6	Níveis de citocinas circulantes em pacientes com LV na medula óssea e no sangue periférico. (A1) IL-6. (A2) CXCL-8. (A3) IL-10, (A4) INF γ . (A5) TNF α . (A6) IL-1 β . (A7) IL-12.....	60
FIGURA 7	Correlação entre a expressão de IL-6 pelos leucócitos (células/mm ³) no sangue periférico e níveis de IL-6 plasmática (pg/mL).....	62
FIGURA 8	Correlação entre a expressão de IL-10 entre as células presentes no sangue periférico e na medula óssea.....	64
FIGURA 9	Correlação entre a expressão de INF γ entre as células presentes no sangue periférico e na medula óssea.....	65
FIGURA 10	Associação entre os níveis de citocinas circulantes no sangue periférico e na medula óssea e a gravidade de pacientes com LV.....	68
FIGURA 11	Correlação entre citocinas plasmáticas e a probabilidade de morte dos pacientes.....	70
FIGURA 12	Correlação entre citocinas livres na medula óssea e probabilidade de morte.....	71

FIGURA 13	Correlação entre porcentagem de expressão de IL-6 pelos leucócitos no sangue periférico e probabilidade de morte.....	73
FIGURA 14	Comparação entre leucócitos (células/mm ³) no (A) sangue periférico e (B) medula óssea de pacientes com LV e co-infectados (LV+HIV) analisados por imunofenotipagem.....	75
FIGURA 15	Níveis de citocinas circulantes na medula óssea e no sangue periférico em pacientes com LV e LVHIV.....	77
FIGURA 16	Expressão de IL-6 pelos leucócitos no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com LV e HIV comparados com pacientes com LV.....	79
FIGURA 17	Expressão de IL-10 pelos leucócitos no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com LV e HIV comparados com pacientes com LV.....	81
FIGURA 18	Expressão de TNF α pelos leucócitos no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com LV e HIV comparados com pacientes com LV.....	83
FIGURA 19	Expressão de INF γ pelos leucócitos no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com LV e HIV comparados com pacientes com LV.....	85
FIGURA 20A	Correlação entre a expressão de IL-10 pelos leucócitos (células/mm ³) no sangue periférico e níveis de IL-10 plasmática (pg/mL).....	119
FIGURA 21A	Correlação entre a expressão de INF γ pelos leucócitos (células/mm ³) no sangue periférico e níveis de INF γ plasmática (pg/mL).....	120
FIGURA 22A	Correlação entre a expressão de TNF α pelos leucócitos (células/mm ³) no sangue periférico e níveis de TNF α plasmática (pg/mL).....	121
FIGURA 23A	Correlação entre a expressão de CXCL8 pelos leucócitos (células/mm ³) no sangue periférico e níveis de CXCL8 plasmática (pg/mL).....	122
FIGURA 24A	Correlação entre a expressão de IL-6 pelos leucócitos (células/mm ³) na medula óssea e níveis de IL-6 no sobrenadante da medula óssea na LV (pg/mL).....	123

FIGURA 25A	Correlação entre a expressão de CXCL8 pelos leucócitos (células/mm ³) na medula óssea e os níveis de CXCL8 no sobrenadante da medula óssea na LV (pg/mL).....	124
FIGURA 26A	Correlação entre a expressão de IL-10 pelos leucócitos (células/mm ³) na medula óssea e os níveis de IL-10 no sobrenadante da medula óssea na LV (pg/mL).....	125
FIGURA 27A	Correlação entre a expressão de INF γ pelos leucócitos (células/mm ³) na medula óssea e os níveis de INF γ no sobrenadante da medula óssea na LV (pg/mL).....	126
FIGURA 28A	Correlação entre a expressão de TNF α pelos leucócitos (células/mm ³) na medula óssea e os níveis de TNF α no sobrenadante da medula óssea na LV (pg/mL).....	127
FIGURA 29A	Correlação entre a expressão de IL-6 entre as células presentes no sangue periférico e na medula óssea.....	128
FIGURA 30A	Correlação entre a expressão de TNF α entre as células presentes no sangue periférico e na medula óssea.....	129
FIGURA 31A	Associação entre a expressão de citocinas pelos leucócitos no sangue periférico de pacientes com gravidade.....	130
FIGURA 32A	Associação entre a expressão de citocinas pelos leucócitos na medula óssea de pacientes com gravidade.....	131
FIGURA 33A	Correlação entre porcentagem de expressão de CXCL8 pelos leucócitos no sangue periférico e probabilidade de morte.....	132
FIGURA 34A	Correlação entre porcentagem de expressão de IL-10 pelos leucócitos no sangue periférico e probabilidade de morte.....	133
FIGURA 35A	Correlação entre porcentagem de expressão de INF γ pelos leucócitos no sangue periférico e probabilidade de morte.....	134
FIGURA 36A	Correlação entre porcentagem de expressão de TNF α pelos leucócitos no sangue periférico e probabilidade de morte.....	135
FIGURA 37A	Correlação entre a porcentagem de expressão de IL-6 pelos leucócitos na medula óssea e a probabilidade de morte.....	136
FIGURA 38A	Correlação entre a porcentagem de expressão de CXCL8 pelos leucócitos na medula óssea e a probabilidade de morte.....	137
FIGURA 39A	Correlação entre a porcentagem de expressão de IL-10 pelos leucócitos na medula óssea e a probabilidade de morte.....	138

FIGURA 40A	Correlação entre a porcentagem de expressão de $INF\gamma$ pelos leucócitos na medula óssea e a probabilidade de morte.....	139
FIGURA 41A	Correlação entre a porcentagem de expressão de $TNF\alpha$ pelos leucócitos na medula óssea e a probabilidade de morte.....	140

LISTA DE TABELAS

		Pag
TABELA 1	Características demográficas e hematológicas dos pacientes incluídos na pesquisa.....	54
TABELA 2	Correlação entre a concentração de citocinas no sangue periférico e na medula óssea de pacientes LV e controles.....	61
TABELA 3	Probabilidade de morte dos pacientes com LV.....	66
TABELA 4	Características demográficas e hematológicas dos pacientes incluídos na pesquisa.....	74
TABELA 5A	Comparação entre leucócitos (células/mm ³) na medula óssea de pacientes com LV e sem LV (grupo controle) analisados por imunofenotipagem.....	112
TABELA 6A	Comparação entre leucócitos (células/mm ³) no sangue periférico de pacientes com LV e sem pacientes com LV (grupo controle) analisados por imunofenotipagem.....	113
TABELA 7A	Níveis de citocinas plasmáticas em pacientes com LV e controle (sem LV).....	114
TABELA 8A	Níveis de citocinas no sobrenadante da medula óssea de pacientes com LV e controle (sem LV).....	115
TABELA 9A	Expressão de INF γ , TNF α e CXCL8 pelos leucócitos no sangue periférico.....	116
TABELA 10A	Expressão de INF γ , TNF α e CXCL8 pelos leucócitos na medula óssea.....	117
TABELA 11A	Comparação entre a expressão de INF γ , TNF α e CXCL8 pelos leucócitos no sangue periférico e na medula óssea.....	118

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Quadro clínico e laboratorial na LV	19
2.1.1 LV	19
2.1.2 LV grave	19
2.1.3 LV HIV	21
2.2 Patogênese	21
2.2.1 Patologia	21
2.2.2 Fisiopatologia	22
2.3 Inflamação sistêmica/sepse	27
2.3.1 Citocinas	28
2.3.1.1 Citocinas no sangue periférico na LV	28
2.3.1.2 IL-10 na LV	29
2.3.1.3 IL-6 na LV	31
2.3.1.4 INF- γ e TNF- α na LV	36
2.3.1.5 IL-12 na LV	38
2.3.1.6 IL-1 β na LV	39
2.3.1.8 CXCL8 na LV	39
2.4 Medula óssea na LV	40
3 OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo Geral	45
3.2 Objetivos específicos	45
4 METODOLOGIA	46
4.1 Considerações sobre a amostra	46
4.2 Considerações éticas	46
4.3 Definição dos casos	47
4.3.1 Critérios de inclusão	47

4.3.2	Critérios de exclusão	47
4.4	Imunofenotipagem em sangue periférico e medula óssea	48
4.5	Estratégia de análise imunofenotípica	49
4.6	Dosagem de citocinas plasmáticas	51
4.7	Probabilidade de morte.....	51
4.8	Análise estatística.....	52
5	RESULTADOS	53
SEÇÃO I	SEÇÃO I	53
5.1	Caracterização da medula óssea e do sangue periférico de pacientes com LV	53
5.1.1	Características da população de estudo	53
5.1.2	Características hematológicas	53
5.1.3	Análise das subpopulações de leucócitos em pacientes com LV	54
5.1.4	Expressão intracelular de IL-6, CXCL-8, IL-10, INF γ e TNF α em subpopulações de leucócitos presentes na medula óssea e no sangue periférico de pacientes com LV e controles	56
5.1.5	Análise das citocinas circulantes no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com LV e controles não saudáveis	59
5.1.6	Correlação entre os níveis de citocinas circulantes nos compartimentos sangue periférico e medula óssea de pacientes com LV e controles não saudáveis.....	60
5.1.7	Correlação entre a expressão de citocinas pelos leucócitos e os níveis de citocinas circulantes de pacientes com LV	61
SEÇÃO II	SEÇÃO II	66
5.2	- Gravidade associada a LV	66
5.2.1	Probabilidade de morte dos pacientes com LV	66
5.2.2	Citocinas circulantes no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com LV com maior e menor gravidade	67
5.2.2.1	Medula óssea	67
5.2.2.2	Sangue periférico.....	67
5.2.2.3	Perfil de expressão de citocinas na medula óssea	69
5.2.2.4	Perfil de expressão de citocinas no sangue periférico	69
5.2.2.5	Correlação entre citocinas circulantes e probabilidade de morte	69
5.2.2.6	Correlação entre a porcentagem de expressão de citocinas pelos leucócitos na medula óssea e no sangue periférico de pacientes com LV e a probabilidade de morte.....	72
Seção III	Seção III	74
5.3	- Pacientes infectados com <i>Leishmania</i> e HIV	74
5.3.1	Características da população de estudo	74

5.3.2	Análise das subpopulações de leucócitos em pacientes infectados com <i>Leishmania</i> e HIV	75
5.3.3	Citocinas circulantes na medula óssea e no sangue periférico de pacientes infectados com <i>Leishmania</i> e HIV	75
5.3.4	Perfil de expressão intracelular de citocinas pelos leucócitos no sangue periférico de na medula óssea de pacientes infectados com <i>Leishmania</i> e HIV	78
5.3.4.1	Perfil de expressão de IL6	78
5.3.4.2	Perfil de expressão de IL10	80
5.3.4.3	Perfil de expressão intracelular de TNF α	82
5.3.4.4	Perfil de expressão intracelular de INF γ	84
5.3.4.5	Correlação entre as citocinas circulantes na medula óssea e no sangue periférico em pacientes coinfectados com a expressão de citocinas pelas células	86
5.3.4.5.1	Medula óssea	86
5.3.4.5.2	Sangue periférico	86
6	DISCUSSÃO	88
7	CONCLUSÕES	99
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	101
9	REFERÊNCIAS	102
10	APÊNDICE	112

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é uma protozoose causada pela *Leishmania infantum*, presente nas Américas, e pela *Leishmania donovani*, característica de Bangladesh, Índia, Nepal e leste da África. A transmissão acontece durante o repasto sanguíneo da fêmea infectada do flebotomíneo. A cada ano, são estimados entre 200 a 400 mil novos casos da doença. Dessa estimativa, 90% dos novos casos ocorrerão em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2016). No subcontinente indiano foram registradas taxas de letalidade variáveis de 1,5% em Bangladesh a 2,4% na Índia e a 6,2% no Nepal (ALVAR et al., 2012). Na América Latina, 90% dos casos de LV ocorrem no Brasil (BRASIL, 2014), com taxa de mortalidade entre 5 e 10% (WERNECK et al., 2003; COSTA, 2009; DE QUEIROZ SAMPAIO et al., 2010).

Na LV, os parasitas íntegros estão presentes, quase que exclusivamente, no interior dos macrófagos localizados na medula óssea, baço, fígado (CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948), linfonodos (GHOSH et al., 1996) e intestino (MUIGAI et al., 1983). Nesses órgãos há formação e manutenção da resposta imunológica da LV e para tal, o fluxo de linfócitos T CD4 no sangue periférico segue em direção a esses órgãos, principalmente baço (DOS-SANTOS et al., 2014). O sangue periférico durante doença ativa seria, portanto, uma miscelânea de todos os eventos imunológicos que acontecem nos órgãos parasitados. É importante considerar que alguns órgãos podem contribuir em uma maior intensidade com a gravidade da doença.

O sistema imunológico participa da patogênese da LV através de mecanismos complexos em que há participação da resposta inata e adquirida. Pacientes com doença ativa apresentam níveis elevados de diversas citocinas com funções diferentes e contrárias, em alguns casos. A resposta imune adquirida do tipo Th1, que promove a ativação dos macrófagos por elevar INF- γ , prevalece em pacientes curados (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). A resposta Th2 na LV ativa pode ser evidenciada pela hipergamaglobulinemia evidente na maior parte dos pacientes (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2005). No entanto, outros mecanismos imunossupressores ou de

evasão imune podem contribuir com para a patogênese de LV (NYLÉN; SACKS, 2007).

A doença pode ser classificada de acordo com a gravidade em pacientes com LV grave e não grave. Na LV não grave estão presentes os sinais clássicos da doença como febre, anemia e hepatoesplenomegalia (LIMA, 2015), enquanto que na doença grave, além dos sinais clássicos, os pacientes apresentam edema, icterícia, sangramento e infecções. A presença desses sinais aumenta a probabilidade de morte em pacientes com LV (COSTA et al., 2010; COSTA et al., 2013). A letalidade em pessoas com calazar associa-se à coagulação intravascular disseminada e às manifestações graves da doença, como a presença de sangramento (COSTA et al., 2013). As infecções bacterianas adquiridas são consideradas secundárias à imunoparalisia coexistindo em pacientes com LV, portanto, um perfil inflamatório e imunossupressor (COSTA et al., 2010). A imunossupressão tem sido atribuída, principalmente aos altos níveis de IL-10 encontrados na LV (NYLÉN et al., 2007).

A medula óssea é um órgão imune regulatório, responsável pelo processo hematopoiético (ZHAO et al., 2012), no entanto, até o presente momento não existem relatos científicos que descrevam o papel desse órgão na LV grave. Existem parâmetros de gravidade descritos para o sangue periférico como, por exemplo, a concentração de IL-6 (COSTA et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2016). As citocinas IL-6, CXCL8, INF- γ , TNF- α e IL-1 β no sangue periférico apresentaram correlação com a gravidade da LV (COSTA et al., 2013) e níveis acima de 200 pg/mL de IL-6 estão mais fortemente associados à morte (DOS SANTOS et al., 2016). Pacientes com LV grave aparentemente apresentam quadro imune semelhante ao observado na sepse (COSTA et al., 2010), igualmente caracterizada por níveis mais elevados de IL-6, CXCL8 e IL-10 (MACDONALD et al., 2014). Os níveis dessas citocinas não foram analisados na medula óssea e tampouco ocorreu análise da expressão de citocinas pelos leucócitos na medula óssea e no sangue periférico de pacientes com LV. Entender a atividade das células na intimidade dos órgãos parasitados, bem como no sangue periférico, é importante para compreender a doença, tendo em vista que a atividade celular em humanos com leishmanioses muda em função do quadro clínico (CARDOSO et al., 2015) e do local do organismo em que a célula está localizada (GAUTAM et al., 2014). A presente pesquisa procurou esclarecer o grau de participação da medula óssea na modulação da resposta imune durante a infecção por *L. infantum*. Investigou ainda *se e como* a medula óssea estaria envolvida na imunossupressão específica, capaz de induzir

as respostas inibidoras da imunidade celular e, além disso, se ela comporia originalmente a resposta inflamatória sistêmica exagerada, a qual, em última instância, aparenta ser a responsável pelas principais manifestações clínicas da LV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Quadro clínico e laboratorial na LV

2.1.1 LV

Na LV, os pacientes apresentam grande variabilidade em seu quadro clínico, o que permite classificar a doença de acordo com a gravidade. A presença de febre e hepatoesplenomegalia são sinais clássicos da doença (COSTA et al., 2010; CHANDRA; CHANDRA; KAUSHIK, 2013). Em um estudo detalhado, foi possível caracterizar pacientes com LV, no qual não se observa a presença de icterícia, acometimento renal e sangramentos. Esses pacientes apresentaram palidez cutânea e de mucosas, fraqueza, adinamia, relato de perda ponderal, linfoadenomegalia e anorexia, além da febre e hepatoesplenomegalia. A maioria dos pacientes (69,4%) apresentou neutropenia leve, 88,9% apresentou um valor médio de 97.611 plaquetas/mm³ e 91,7% com valor médio de hemoglobina de 8,6 g/dL (LIMA, 2015). Esses parâmetros são condizentes com um quadro não grave de LV.

2.1.2 LV grave

A presença de sepse, falência respiratória, edema, tosse, vômito, infecções bacterianas, diarreia, convulsões, adinamia, inapetência, sonolência, são observados em pacientes com LV grave (COSTA, 2009; BELO et al. 2014). A faixa etária merece igualmente atenção, porque principalmente os lactentes com menos de 1 ano e os adultos entre 50 e 60 anos, assim como os co-infectados com HIV, apresentaram maior letalidade (COSTA, 2009; COURA-VITAL et al. 2014). A gravidade do quadro clínico da LV pode estar relacionada com o desenvolvimento de uma resposta inflamatória

sistêmica que contribui com anormalidades na hemostasia (COSTA, 2009). Os distúrbios da coagulação são relevantes porque quanto maior o número de sítios de sangramentos apresentados pelos pacientes, maior será a gravidade da LV (COSTA et al., 2013). Essa situação clínica associada a imunoparalisia é propícia para a instalação de infecções bacterianas (COSTA et al., 2010), complicação que aumenta a taxa de mortalidade (SARKARI et al., 2016).

Pacientes com LV apresentam anemia com níveis de hemoglobina variando de 7-10 g/dL (VARMA; NASEEM, 2010), embora níveis abaixo de 7g/dL possam ser observados, principalmente, em pacientes com doença grave e que foram a óbito, assim como plaquetopenia, com plaquetas abaixo de $50.000/\text{mm}^3$, insuficiência renal e leucopenia (< 1500 leucócitos/ mm^3) (COSTA, 2009). A neutropenia grave (< 500 neutrófilos/ mm^3) foi associada com carga parasitária elevada (CASTRO, 2011) e aumenta o risco de morte, porque os pacientes se tornam mais suscetíveis às infecções bacterianas (BELO et al., 2014). A principal causa do desenvolvimento da pancitopenia é atribuída ao hiperesplenismo (VARMA; NASEEM, 2010). A existência de correlação negativa da extensão do baço com os parâmetros hematimétricos reforça a hipótese segundo a qual a captação esplênica de glóbulos vermelhos, plaquetas e macrófagos opsonizados teria importante papel na definição da pancitopenia (COSTA, 2009). No entanto, a medula óssea pode contribuir com esse quadro (CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948).

Outras alterações laboratoriais indicam a presença de inflamação em pacientes com LV: os níveis elevados de proteína C reativa e do VHS. Pacientes com acometimento hepático apresentam níveis elevados de bilirrubina, das aminotransferases hepáticas, da fosfatase alcalina, prolongamento do TAP (tempo de ação da protrombina) e hipoalbuminemia. Em casos de acometimento renal, há presença de hematúria, diminuição da taxa de filtração glomerular (COSTA, 2009) e elevação da creatinina (CASTRO, 2011). Desta forma, é interessante ressaltar a relação entre o quadro clínico e laboratorial de um paciente com LV com a replicação do parasita e com os níveis das citocinas circulantes no plasma.

Além disso, a carga parasitária, a parasitemia e a concentração de citocinas no plasma como IL-1 β , IL-6, CXCL8, IL-10, INF γ , TNF α podem contribuir com alterações no quadro clínico e nos exames laboratoriais (SENE, 2013). Por exemplo, portadores de LV com menos de 20 anos e desnutridos apresentam níveis significativamente mais

elevados de IL-1 β , IL-12, TNF α , hepatoesplenomegalia mais expressiva (COSTA, 2009), carga parasitária mais elevada e maior gravidade da doença (SILVA et al., 2014).

2.1.3 LV HIV

Pacientes co-infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e *Leishmania* apresentam maior morbidade e letalidade, portanto a infecção desses pacientes pelo vírus pode ser considerado um parâmetro de gravidade (COSTA, 2009; COSTA et al., 2010). No entanto, pacientes com LV que tiveram sangramento apresentaram um *score* de gravidade maior do que dos pacientes co-infectados com HIV (COURA-VITAL et al., 2014). Além disso, a apresentação clínica da LV em pacientes com HIV pode ser atípica em virtude da ausência de febre e esplenomegalia, maior tempo decorrido entre a admissão e a confirmação diagnóstica de LV, assim como um maior tempo de hospitalização e frequência de infecções oportunistas (COSTA, 2009). Somado a isso, estudos *in vitro*, utilizando tecidos linfóides, demonstraram que *Leishmania* aumenta na produção de HIV-1 através do aumento da produção de TNF α e IL-1 α (ZHAO; PAPADOPOULOU; TREMBLAY, 2004).

2.2 Patogênese

2.2.1 Patologia

Na LV, estudos registraram a presença do parasita íntegro em órgãos como medula óssea, baço, fígado (SOONG, T.; LI, 1948), linfonodos (GHOSH et al., 1996) e intestino (MUIGAI et al., 1983). Esses órgãos apresentam respostas diferentes a *Leishmania* porque foram registradas diferenças quanto à carga parasitária e à velocidade de eliminação do parasita após o tratamento (CARTWRIGHT, HUI-LANCHUNG, NA CHANG, 1948). As análises histopatológicas registraram a presença de capilares sinusoides dilatados, além de um infiltrado de linfócitos, macrófagos parasitados e células plasmáticas (VERESS et al. 1977; GHOSH et al. 1996; SEIXAS DUARTE et al. 2008; DOS-SANTOS et al. 2014). O jejuno igualmente apresenta macrófagos parasitados e um moderado infiltrado inflamatório composto de linfócitos e células plasmáticas (MUIGAI et al., 1983). Entender a atividade de cada uma dessas

células na intimidade dos órgãos parasitados, bem como no sangue periférico, é importante para compreender a doença, tendo em vista que a atividade celular em humanos com leishmanioses muda em função do quadro clínico (CARDOSO et al., 2015) e do local do organismo em que a célula está localizada (GAUTAM et al., 2014).

2.2.2 Fisiopatologia

A infecção por *Leishmania sp* ocorre durante o repasto sanguíneo da fêmea de *Lutzomyia longipalpis* e inicia a resposta imunológica na pele. Nesse local, os neutrófilos, após fagocitar o parasita, tornam-se apoptóticos porque expressam fosfatidilserina (PS) em sua membrana. Em seguida, células dendríticas identificam os neutrófilos repletos de *Leishmania* apenas como células apoptóticas e promovem a fagocitose. Por isso esse modelo de infecção é conhecido como “cavalo de tróia” (RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012). O não reconhecimento inicial do parasita pelas células dendríticas previne a ativação de linfócitos T CD4 até resolução da resposta neutrofílica. Se CD4 fosse ativado iria produzir $INF\gamma$ que, por sua vez, estimularia a atividade leishmanicida dos macrófagos (RIBEIRO-GOMES et al., 2012). No local da infecção, promastigotas de *Leishmania* liberam fator quimiotático ativo, derivado do sobrenadante livre de parasita da cultura de *L.aethiopica*, que induz a migração de polimorfonucleares mas não de macrófagos, principal célula hospedeira, e células dendríticas. A CXCL8 produzida pelos neutrófilos recruta mais neutrófilos para o local da infecção (VAN ZANDBERGEN et al., 2002).

As células infectadas podem migrar da pele para órgãos como fígado, medula óssea, linfonodos e baço. Nesses órgãos, permanece a replicação do parasita. Estudos *in vitro* demonstraram que *Leishmania* pode expressar fosfatidilserina (PS), assim os macrófagos reconhecem esse parasita como células apoptóticas e realizam a fagocitose. Em seguida, passam a sintetizar IL-10. Desta forma, os macrófagos, modulados pela *Leishmania*, adquirem um perfil regulatório/anti-inflamatório (DE FREITAS BALANCO et al., 2001), como pode ser observado na Figura 01. A síntese de IL-10 é um mecanismo igualmente passível de ser usado para proteger o patógeno, evitando a sua eliminação (TRINCHIERI, 2007). Assim sendo, a expressão de PS pela *Leishmania* inicialmente na pele e, posteriormente nos órgãos, somada aos níveis elevados de imunoglobulinas, modulam a produção de IL-10 pelos macrófagos, contribuindo para a

persistência do parasita. Esse perfil regulatório dos macrófagos é acompanhado de uma inibição da síntese de óxido nítrico, de diminuição da expressão de $\text{INF}\gamma$ e da produção de peróxido de hidrogênio e superóxido (KUMAR et al., 2001), além de falha na sua função como célula apresentadora de antígenos em razão da baixa expressão de CD54 e HLA-DR (ROY et al., 2015). Nessa condição, os níveis plasmáticos de nitrato e nitrito permanecem inalterados (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006) ou são significativamente diminuídos (ROY et al., 2015) em comparação com o quadro de indivíduos não infectados. A intensidade dessa modulação na atividade dos macrófagos está correlacionada com uma maior expressão de PS pelas formas amastigotas de *Leishmania* (WANDERLEY et al., 2006) juntamente com o aumento da carga parasitária (VERMA et al., 2010). Essas modificações aparentemente compõem a imunidade apoptótica inata (UCKER, 2016). IL-10 é uma citocina importante na doença, sendo passível de modular esse cenário, principalmente pela sua atividade imunossupressora que dificulta a eliminação do parasita (ROY et al., 2015).

O trânsito de células entre os órgãos parasitados em pacientes com LV pode resultar em maior frequência de uma população específica, tal como, por exemplo, aumento do número de linfócitos T CD4 nos linfonodos, quando comparado ao sangue periférico durante a doença ativa (GHOSH et al., 1996) e aumento da taxa T CD4/CD8 no baço quando comparada aos controles (DOS-SANTOS et al., 2014), enquanto que em casos fatais foi relatada perda de linfócitos, permanecendo presentes macrófagos infectados e células plasmáticas (VERESS et al., 1977). Na medula óssea, em casos de LV aguda e crônica, há uma queda da taxa CD4/CD8 no sangue periférico, ao passo que se observa aumento na medula óssea (ROHTAGI et al., 1996).

O fluxo de linfócitos T CD4 talvez seja importante para manter macrófagos ativados nesses órgãos parasitados, porque nesses locais os macrófagos apresentam antígenos para os linfócitos T CD4 através da ligação HLA-TCR (KUMAR et al., 2014). Por sua vez, ao sintetizarem $\text{INF}\gamma$, esses linfócitos estimulariam a atividade leishmanicida dos macrófagos, que é caracterizada pela produção de $\text{TNF-}\alpha$ e de espécies reativas de oxigênio (KUMAR et al., 2001).

A presença de polimorfonucleares apoptóticos também contribui para o quadro de imunossupressão em pacientes com LV, porque induz um aumento na síntese de IL-10 pelos monócitos presentes no sangue periférico (MIKOŁAJCZYK et al., 2009). Em casos de *L. brasiliensis*, linfócitos T CD8⁺ induzem *in vitro* a expressão de

fosfatidilserina pelos monócitos no sangue periférico (CARDOSO et al., 2015). O bloqueio de outras proteínas relacionadas com o processo apoptótico, tais como por exemplo, a proteína de morte programada 1 (PD-1) ou B7.H1, diminui significativamente a concentração de IL-10 no sobrenadante de cultura de PBMC de cães infectados com *L. infantum* (JONES et al., 2013). E, além dos monócitos, os linfócitos T CD4 (POTESTIO et al., 2004) e TCD8 (GAUTAM et al., 2014) igualmente expressam de modo significativo mais fosfatidilserina durante a doença ativa (CLARÊNCIO et al., 2009). Após o tratamento, as células têm sua função restaurada (KUMAR et al., 2001). Desta forma, a fisiopatologia de pacientes sintomáticos para LV pode ser caracterizada pela presença de imunossupressão que, por sua vez, poderia ser definida como um quadro clínico que induz à inibição *in vivo* da atividade de algumas citocinas cuja função principal consiste em ativar macrófagos, células-alvo de *Leishmania infantum*. Além disso, a LV também caracteriza-se pela presença de inflamação sistêmica, que será descrita em tópicos posteriores.

2.2.2.1 Imunidade Inata

A imunidade inata pode ser definida como um conjunto de mecanismos intrínsecos de defesa contra as infecções. Os principais componentes da imunidade inata são o epitélio, os fagócitos (neutrófilos e monócitos/macrófagos), as células dendríticas, as células NK, citocinas e proteínas plasmáticas, incluindo as proteínas do sistema complemento (ABBAS, 2012).

Com relação a célula-alvo de parasitas do gênero *Leishmania*, os macrófagos adquirem um papel regulatório ou imunossupressor na LV (DE FREITAS BALANCO et al., 2001). A maioria dos monócitos no sangue periférico consiste de células fortemente CD14⁺ e CD16⁻, comumente denominadas “monócitos clássicos”. Os monócitos remanescentes expressam CD16, mas tem diferentes níveis de expressão de CD14, menor tamanho, abundante citoplasma e múltiplos grânulos citoplasmáticos. As células CD14⁺CD16⁺ estão envolvidas em várias condições clínicas (PASSLICK; FLIEGER; ZIEGLER-HEITBROCK, 1989). Os monócitos do sangue periférico humano CD16⁺, após estímulo com LPS, são heterogêneos na função e consistem em duas subpopulações: CD14^{dim}CD16⁺, com atividade pró-inflamatória porque produzem TNF- α após estímulo, e CD14^{high}CD16⁺ apresentando atividade anti-inflamatória,

porque sintetizam IL-10 (SKRZECZYŃSKA-MONCZNIK et al., 2008). Os monócitos CD14^{high}CD16⁺, ao serem cultivados com polimorfonucleares apoptóticos, passaram a sintetizar mais IL-10, enquanto CD14^{dim}CD16⁺ reduziram a síntese de TNF- α (MIKOŁAJCZYK et al., 2009). Em pacientes com LV, não foi possível registrar diferença na frequência de monócitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios quando comparado aos controles saudáveis (ROY et al., 2015), por isso é importante avaliar outros parâmetros como o status redox e o perfil intracelular de TNF α e IL-10 desses monócitos, respectivamente.

Os monócitos de pacientes com LV ativa produziram menos TNF α quando comparado aos não infectados e assintomáticos (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006), fato que reforça a imunossupressão dessas células na LV. Antes do tratamento, monócitos de pacientes com LV sintetizam significativamente menos INF- γ , peróxido de hidrogênio e superóxido quando comparados aos controles saudáveis. Com 20 dias de tratamento, há aumento significativo em todos esses parâmetros analisados. E, ao final do tratamento, retorna-se aos valores próximos normais. Em pacientes curados, os monócitos têm a sua atividade funcional restaurada (KUMAR et al., 2001).

Os monócitos presentes no sangue periférico de pacientes com LV ativa parecem apresentar um perfil regulatório porque expressaram significativamente mais IL-10 quando comparado aos índices identificados em voluntários saudáveis. Essas células também apresentaram uma queda significativa na expressão dos receptores *toll like 2* (TLR2) e 4 (TLR4) durante doença ativa. Simultaneamente, TLR4 parecem contribuir com a síntese de óxido nítrico (ROY et al., 2015). TLR3 e TLR9 parecem contribuir com a imunossupressão na LV, após ligação de *Leishmania* a esses receptores foi registrado um aumento na síntese de IL-27, uma citocina regulatória capaz de inibir a síntese de IL-17 (QUIRINO et al., 2016).

2.2.2.2 Imunidade Adquirida

A imunidade adquirida utiliza três estratégias principais para combater a maioria dos micro-organismos: (1) secreção de anticorpos que se ligam aos patógenos extracelulares e promovem a sua fagocitose/internalização e subsequente destruição

pelos fagócitos, (2) aumento da capacidade microbicida dos macrófagos por células T *helper* e (3) destruição das células infectadas por linfócitos T citotóxicos (ABBAS, 2009).

Na LV, há uma produção intensa de anticorpos, a presença de hipergamaglobulinemia nos pacientes é uma característica padrão. A hipergamaglobulinemia pode ser uma consequência do aumento no número de linfócitos B que, por sua vez, na presença de IL-6 se diferenciam em plasmócitos (SUEMATSU et al., 1989). A presença de plasmocitose e células de Mott foram descritas em aspirado de medula óssea. As células de Mott são plasmócitos repletos de vacúolos citoplasmáticos contendo imunoglobulinas (CHANDRA; CHANDRA; KAUSHIK, 2013), sugerindo que na medula óssea também se observe hipergamaglobulinemia. Em análises histopatológicas do baço de pacientes que foram a óbito, os linfócitos foram substituídos pelas células plasmáticas (VERESS et al., 1977), indicando a persistência dessas células no sítio da infecção.

Os altos títulos de anticorpos em pacientes com LV permitem a formação de complexos imunes com amastigotas (MILES et al., 2005), ocorre a opsonização de amastigotas por anticorpos formando complexos imunológicos, que se ligam a receptores Fc γ nos macrófagos, induzindo a síntese de IL-10. Desta forma, as próprias amastigotas opsonizadas por imunoglobulinas IgG1 e/ou IgG3 (CALDAS et al., 2005), principalmente, podem induzir a síntese de IL-10 por macrófagos (Figura 01). Em experimentos *in vitro*, macrófagos provenientes da medula óssea de camundongos infectados produziram níveis crescentes de IL-10 no sobrenadante da cultura quando foram expostas a imunoglobulina G (KANE; MOSSER, 2001). Tais achados sugerem que a opsonização da *Leishmania* por imunoglobulinas pode contribuir para a imunossupressão dos macrófagos.

Linfócitos T CD4 (DIENZ et al., 2009) e a IL-6 (SUEMATSU et al., 1989) podem contribuir para a produção de anticorpos pelos linfócitos B favorecendo a hipergamaglobulinemia, característica da LV ativa (CALDAS et al., 2005). Na presença de IL-6, linfócitos T CD4 sintetizam IL-21 que, por sua vez, irá estimular a produção de anticorpos por linfócitos B (DIENZ et al., 2009). Em pacientes com LV ativa, não foi observada produção de INF γ pelos leucócitos no sangue periférico, após estímulo *in vitro* com antígeno de *Leishmania* (CALDAS et al., 2005). Como esses pacientes apresentam níveis elevados de IL-6 no sangue periférico (COSTA et al., 2013) é

possível que IL-6 atue na inibição da diferenciação de Th1, com isso, linfócitos T CD4 não produziram $\text{INF}\gamma$ (DIEHL et al., 2000), contribuindo assim para a imunossupressão.

Estudos em cães com LV demonstraram um número significativamente maior de linfócitos T CD8, fato que sugere um papel de proteção ou resistência dessas células no início da infecção (REIS et al., 2006). Linfócitos T CD8 passariam a desempenhar maior atividade citotóxica no sangue periférico em pacientes com LV ativa em razão da maior produção de perforina e granulolisina quando comparado às mesmas células presentes no baço (GAUTAM et al., 2014). Com isso, linfócitos T CD8 podem atuar na resistência à infecção por *L. donovani* pela via perforina-granzima B, e seu papel poderia ser explorado no desenvolvimento de vacinas porque essas células estão significativamente mais ativadas em indivíduos curados (KAUSHAL et al., 2014).

Desta forma, a imunidade adquirida em pacientes com LV parece responder ao parasita através da hipergamaglobulinemia, da atividade citotóxica dos linfócitos T CD8 e da inibição da diferenciação Th1 dos linfócitos T CD4.

2.3 Inflamação sistêmica/sepse

A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) pode acontecer na sepse e em outras situações como trauma, queimadura, doenças auto-imunes e caracteriza-se por uma resposta inflamatória extrema do hospedeiro aos patógenos invasores. Sepse, por sua vez, é a associação da SRIS com uma infecção. A SRIS compreende a ativação da resposta pro-inflamatória através de múltiplas vias, incluindo citocinas, leucócitos, células endoteliais, coagulação do plasma, proteínas do complemento e liberação de proteínas de fase aguda (DE JONG; VAN DER POLL; WIERSINGA, 2010). Hiperinflamação e imunoparalisia podem estar associados em pacientes com sepse grave. A imunoparalisia pode ser caracterizada pela redução na expressão de HLA-DR pelos monócitos ou redução na produção *ex vivo* de $\text{TNF}\alpha$, condição que aumenta o risco para a instalação de infecções e morte (FRAZIER; HALL, 2008). Anteriormente, foi sugerido que a imunossupressão ou imunoparalisia pode ser observada em pacientes com LV (COSTA et al., 2010), assim como após trauma grave, doença séptica e pancreatite (FRAZIER; HALL, 2008). Em pacientes com LV, o próprio parasita parece

contribuir com a imunossupressão através da queda nos níveis de TNF α , de espécies reativas de oxigênio e na expressão de HLA-DR pelos monócitos (ROY et al., 2015).

2.3.1 Citocinas

2.3.1.1 Citocinas no sangue periférico na LV

A resposta imune inata e adquirida na LV ativa caracteriza-se, antes de uma intervenção terapêutica, pela elevação de citocinas com diferentes atividades pro-inflamatória (INF- γ , TNF α , IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, e MIF), anti-inflamatória (IL-4, IL-5 e IL-13), regulatória (IL-10) e as quimiocinas (CXCL8, MCP e MIP-1 β) (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2011). Pesquisas reforçam a importância da resposta imunológica do hospedeiro a *Leishmania*, porque não observaram resistência da cepa da *Leishmania* de um paciente com LV crônica às drogas antiparasitárias glucantine, anfotecirina e pentamidina (DOS-SANTOS et al., 2014). No entanto, estudos *in vitro* demonstraram que cepas resistentes podem modular o sistema imunológico porque estimulam a síntese de citocinas inflamatórias (DE MOURA et al., 2016).

Diversas pesquisas têm demonstrado elevação no plasma de IL-10, TNF- α , INF- γ (SILVA et al., 2012; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006; NYLÉN et al., 2007; ANSARI; SALUJA; SALOTRA, 2006; LIMA, 2015), CXCL8 (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006; LIMA, 2015), IL-6 (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006; NYLÉN et al., 2007; ANSARI; SALUJA; SALOTRA, 2006; LIMA, 2015), IL-12 (NYLÉN et al., 2007; SILVA et al., 2012) durante doença ativa. Alguns autores não observaram diferença nos níveis de TGF- β total no plasma ao comparar pacientes com LV e indivíduos saudáveis (NYLÉN et al., 2007). Os níveis elevados de citocinas no plasma tornam difícil determinar quem predomina (CALDAS et al., 2005). No entanto, algumas pesquisas determinaram a relação de algumas citocinas com a gravidade e morte em pacientes com LV (COSTA et al., 2013; SENE, 2013; DOS SANTOS et al., 2016). E a concentração dessas citocinas é aparentemente mais elevada em pacientes com LV grave (COSTA, 2009; DOS SANTOS et al., 2016), em comparação com a LV não grave (LIMA, 2015).

A doença parece ser caracterizada pela produção de citocinas com atividades contrárias citocinas que estimulam e/ou inibem o sistema imunológico (KARP et al.,

1993). Estas informações nos levam a crer que a LV caracteriza-se por um desequilíbrio na resposta imunológica do hospedeiro que poderá ser fatal. Desta forma, parte da expressão de uma resposta terapêutica favorável pode incluir redução da produção de citocinas tanto inflamatórias quanto supressoras (MEDEIROS; CASTELO; SALOMÃO, 1998), além da administração de profilaxia antimicrobiana para prevenir infecções (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2011; BELO et al., 2014), as quais podem ser fatais (DOS SANTOS et al., 2016).

2.3.1.2 IL-10 na LV

IL-10 é uma citocina diretamente envolvida na disfunção da atividade leishmanicida dos macrófagos, facilitando a persistência do parasita (ROY et al., 2015). Apesar de IL-10 suprimir a geração e a manutenção da resposta Th1, a principal atividade promotora da doença desempenhada por IL-10 talvez seja exatamente condicionar macrófagos para aumentar a sobrevivência e o crescimento do parasita (NYLÉN et al., 2007). Quando a ação de IL-10 é neutralizada, através de anti-IL-10, ela promove a morte de *L. donovani* por diminuir o número de parasitas viáveis. Observa-se um aumento da secreção de INF- γ e TNF α por células do aspirado esplênico de pacientes com LV (GAUTAM et al., 2011). Níveis de IL-10 elevados no início da LV estão envolvidos no estabelecimento, na progressão da infecção (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2005), na resistência ao fármaco antimoniatado de metilglumina, portanto, pode ter correlação com falhas na terapêutica (RAI et al., 2012).

IL-10 é uma citocina com possíveis efeitos sistêmicos e a sua origem celular tem mostrado afetar profundamente o resultado da regulação imune (TRINCHIERI, 2007). É secretada por vários tipos celulares, incluindo macrófagos, células dendríticas, células natural killer, linfócitos B, e várias subpopulações de células T (GAUTAM et al., 2011). No entanto, para determinar o papel de IL-10 na LV, é importante identificar se há um tipo celular específico que seja responsável pela sua síntese e, com isso, module o sistema imunológico de tal forma a permitir a persistência da doença. Talvez essas células sejam os próprios monócitos no sangue e os macrófagos nos tecidos. No aspirado esplênico, os macrófagos são considerados a principal origem de IL-10, promovendo nesse órgão a sobrevivência de amastigotas (GAUTAM et al., 2011). O baço

de pacientes com LV expressa mais IL-10 quando comparado aos controles (DOS-SANTOS et al., 2014). Outro fator que contribui com o aumento dos níveis de IL-10 pelos macrófagos são os altos títulos de anticorpos descritos em pacientes com LV (YARALI et al., 2002; CALDAS et al., 2005).

O estímulo *in vitro*, com o antígeno de *Leishmania*, de monócitos e leucócitos de pacientes com doença ativa, aumenta significativamente os níveis de IL-10. (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2005; CLARÊNCIO et al., 2009). Quando leucócitos de indivíduos nunca expostos ao antígeno, de pacientes com LV e curados, são estimulados, não foi registrada diferença significativa nos níveis de IL-10 (KAUSHAL et al., 2014). Ao longo de 30, 120 e 210 dias de tratamento de pacientes com LV ativa, não há diferença significativa na produção de IL-10 pelos leucócitos do sangue periférico, após estímulos *in vitro* com antígeno de *Leishmania*. É registrada uma queda nos níveis séricos de IL-10 com 30 dias de tratamento (CALDAS et al., 2005) e até mesmo antes desse intervalo de tempo. Concentrações mais elevadas de IL-10 não foram observadas em casos de fatais, mas sim em casos de neutrófilos abaixo de 2500 células/mm³, linfócitos abaixo de 3500 células/mm³ e hemoglobina abaixo de 10g/dL (COSTA, 2009). O controle da infecção e a resposta imune a vacinas também estão relacionados com diminuição dos níveis de IL-10. Leucócitos derivados do sangue periférico de cães com um, seis e doze meses após administração de uma vacina inativada e de subunidade produzida através de uma extrato inativado de promastigotas de *Leishmania donovani*, receberam estímulo *in vitro* de antígeno de *Leishmania infantum* e foi registrado uma queda significativa nos níveis de IL-10 nos cães imunizados em comparação com os não imunizados (COSTA-PEREIRA et al., 2015).

A IL-10 é uma citocina correlacionada positivamente com parasitemia e com carga parasitária em pacientes portadores de LV, sendo apontada como um marcador de gravidade (VERMA et al., 2010). No entanto, como não apresenta correlação com óbito em pacientes com LV (DOS SANTOS et al., 2016), ela pode ser considerada um marcador de progressão da doença, doença crônica, caso o paciente não apresente complicações capazes de agravar o quadro clínico como a presença de infecções e sangramentos. Condições de má nutrição em pacientes com LV e fatores de virulência da cepa de *Leishmania* contribuem para um prognóstico ruim, e nesse quadro níveis elevados de IL-10 favorecem a replicação do parasita. Isto, por sua vez, levaria à produção excessiva de citocinas inflamatórias, inflamação sistêmica e morte (SILVA et

al., 2014). Em pacientes com LV ativa e na ausência de tratamento farmacológico, aparentemente existe um ciclo contínuo que induz a síntese de IL-10, mantendo os macrófagos inativados ou imunossuprimidos. Nessas condições, caracterizam-se por ausência de resposta a estímulos de ativação como $\text{INF}\gamma$, baixa produção de $\text{TNF}\alpha$ e espécies reativas de oxigênio e incapacidade de apresentar antígenos aos linfócitos (figura 01).

2.3.1.3 IL-6 na LV

A IL-6 é uma citocina produzida por diversos tipos celulares, tais como fibroblastos, células T, queratinócitos, células endoteliais, células epiteliais e monócitos ativadas (AKUFFO; BRITTON, 1992). Ela tem sido implicada na produção de anticorpos, hematopoiese e reações de fase aguda que, por sua vez, são as três principais respostas contra infecção, inflamação e dano ao tecido, o que pode sugerir um papel central para IL-6 nos mecanismos de defesa do hospedeiro. A IL-6 em inflamações agudas, contribui para a resolução do infiltrado neutrofílico, ao passo que em inflamações crônicas, ela talvez aumente o infiltrado de células mononucleares e participe da patogênese da doença (KAPLANSKI et al., 2003).

A IL-6 desempenha atividades pró-inflamatória e anti-inflamatória (HUNTER; JONES, 2015) e tem como células-alvo os linfócitos B e timócitos (DIEHL et al., 2000; DIEHL et al., 2002; LEE et al., 2016). Mesmo nos estágios iniciais da LV, IL-6 apresenta correlação positiva com IL-10, fato que reforça que IL-6 também pode desempenhar uma atividade anti-inflamatória (RAMOS et al., 2016).

Em experimentos com camundongos $\text{IL-6}^{-/-}$, após a primeira semana da infecção, foi registrado um maior controle da replicação de *L. donovani*, maior atividade leishmanicida e, no geral, resolução acelerada da infecção hepática, além da diminuição da carga parasitária e níveis mais elevados de $\text{INF}\gamma$. Assim sendo, foi sugerido que IL-6 provavelmente realiza sua ação por restringir a resposta anti-leishmania, incluindo aquela dependente da redução da síntese de $\text{INF}\gamma$. O mesmo pode ocorrer no baço ou medula óssea, órgãos igualmente parasitados por *L. donovani* (MURRAY, 2008). IL-6 exerce sua atividade anti-inflamatória ao inibir a diferenciação de linfócitos T CD4 no perfil Th1, não produzindo $\text{INF}\gamma$. Isso acontece porque IL-6 liga-se a seu receptor nos

linfócitos, ativa a via de sinalização STAT3, aumentando a expressão do gene SOCS1. Por fim, SOCS1 inibe a sinalização e a expressão do gene $INF\gamma$ (DIEHL et al., 2000). Desta forma, ao diminuir a síntese de $INF\gamma$ pelos linfócitos T CD4, IL-6 contribui para a replicação de *Leishmania* nos macrófagos (figura 01).

A atividade anti-inflamatória de IL-6 em pacientes com LV pode igualmente contribuir com a imunossupressão dos macrófagos, porque aumenta a imunidade humoral. Estudos *in vitro* demonstraram que IL-6 induz a produção de anticorpos por células B, indiretamente, por aumentar a expressão de IL-21 em T CD4⁺. A seu turno, IL-21 estimula a síntese de anticorpos em linfócitos B através da ligação ao seu receptor (IL-21R) (DIENZ et al., 2009). Outro mecanismo que contribui com a diferenciação TH2 está relacionado com a expressão, na presença de IL-6, do RNA mensageiro e da proteína NAFTc2, membro da família NAFT (fator nuclear de ativação das células T). NAFTc2 é necessário para a expressão do gene da IL-4 que induz a uma resposta humoral (DIEHL et al., 2002) (figura 01). IL-6 permite uma interação entre as células T e B (HUNTER; JONES, 2015), contribuindo para a hipergamaglobulinemia observada em pacientes com LV (CALDAS et al., 2005). Com o aumento dos níveis de anticorpos, mais amastigotas são opsonizadas (MILES et al., 2005) e esse complexo liga-se a receptores $Fc\gamma$ nos macrófagos, induzindo a síntese de IL-10 (KANE; MOSSER, 2001).

A IL-6 é uma citocina que contribui para níveis elevados de proteínas plasmáticas de fase aguda presente em processos inflamatórios (KOPF et al., 1994). Podendo interferir no processo de coagulação através de fatores pró-coagulantes, aumentando os níveis de trombina e conseqüentemente de fibrina que, por sua vez, formará o coágulo. Experimentos *in vitro* demonstraram que a adição de anti-IL-6 em cultura de monócitos aumenta significativamente os níveis de protrombina e anti-trombina-trombina (VAN DER POLL et al., 1994). IL-6 pode igualmente interferir nos fatores anti-coagulantes como inibidor do fator tecidual (TFPI) porque foi registrada uma redução significativa nos níveis de IL-6 com administração *in vivo* desse inibidor (CREASEY et al., 1993). Estudos sugerem a interação entre a resposta inflamatória e a cascata de coagulação em diversas patologias (CREASEY et al., 1993), inclusive em pacientes com LV (COSTA et al., 2013). O processo inflamatório na LV é caracterizado por elevação do VHS, enzimas hepáticas, proteína C reativa, hipoalbuminemia, presença de edema, icterícia, pancitopenia, elevação de citocinas IL-6, CXCL8, $INF\gamma$,

IL-10, IL1 β , TNF α no plasma. Essas alterações podem anteceder o desequilíbrio da coagulação sanguínea (COSTA et al., 2013).

Nos casos de LV ativa, sangramento e infecção bacteriana são considerados parâmetros de gravidade (BELO et al., 2014). Nesses pacientes, os níveis de IL-6 estão significativamente elevados (COSTA et al., 2013; SANTOS-OLIVEIRA et al., 2011) e, por isso seu papel na patogênese da doença precisa ser investigado. Essa interleucina age de forma direta nos fatores anticoagulantes porque parece aumentar a dissolução do coágulo. Concentrações mais elevadas de IL-6 foram registradas em pacientes com níveis elevados dos produtos de degradação da fibrina (PDF), dímero D e com plaquetopenia. Em pacientes com LV, IL-6 também apresenta correlação positiva com proteína C reativa (COSTA et al., 2013) que, por sua vez, pode estimular a produção do fator tissular em monócitos e contribuir para o desenvolvimento da coagulação intravascular disseminada e trombose em estados de inflamação (CERMAK et al., 1993). Desta forma, a presença de um processo inflamatório em pacientes com LV pode predispor distúrbios na coagulação sanguínea, que são intensificados em casos de infecções bacterianas, aumentando o risco de morte. Um quadro clínico semelhante pode ser observado em casos de cirrose hepática, pacientes com sangramento de varizes, cultura bacteriana positiva e desfecho fatal apresentaram níveis mais elevados de IL-6, que apresentou correlação positiva com a via de sinalização STAT3. E, a presença de infecção bacteriana pode ser uma consequência da maior permeabilidade vascular observada nos casos de hipertensão portal (KAO et al., 2015).

Em situações de choque séptico em humanos causado por *Neisseria meningitidis*, níveis séricos elevados de IL-6 estão correlacionados com desfechos fatais e, IL-1, TNF α e LPS também estão elevados (WAAGE et al., 1989). A expressão de IL-6 e IL-10 no soro foi mais elevada em todos os casos de sepse quando comparado aos controles saudáveis (MACDONALD et al., 2014). Em modelo animal da síndrome do choque séptico causada por *Streptococcus pyogenes*, IL-6 suprime a produção de TNF α , favorecendo a imunossupressão (DIAO; KOHANAWA, 2005). Os monócitos de pacientes que foram a óbito por sepse apresentam um quadro de imunossupressão permanente porque não sintetizam IL-6 e TNF α após estímulo com LPS. Enquanto que os pacientes que sobreviveram recuperaram sua capacidade de sintetizar essas citocinas (MUNOZ et al., 1991). A presença de correlação negativa entre IL-6 e TNF α no plasma permite sugerir que IL-6 pode igualmente inibir a resposta imune inata ao suprimir a

síntese de TNF α em pacientes com LV. Essa menor atividade leishmanicida pode contribuir com uma elevação da carga parasitária que (COSTA et al., 2013), por sua vez, está correlacionada ao sangramento fatal, à anemia severa (COSTA et al., 2010) e à morte (SILVA et al., 2014). Pacientes com LV podem desenvolver um quadro semelhante àquele observado em pacientes com sepse, caracterizado por inflamação e imunossupressão (COSTA et al., 2010) (BARRERA et al., 2011).

Com a progressão e o agravamento da doença, há um aumento dos níveis de IL-6 (RAMOS et al., 2016). Concentrações de IL-6 acima de 200 pg/mL associam-se significativamente à probabilidade de morte (DOS SANTOS et al., 2016). Enquanto indivíduos saudáveis não apresentam IL-6 em níveis detectáveis e aqueles com LV apresentaram variação de 2 a 103 pg/mL (VAN DER POLL; ZIJLSTRA; MEVISSSEN, 1995). Considerando a relevância de IL-6 na LV grave, a origem celular de IL6 durante LV precisa ser estabelecida (VAN DER POLL; ZIJLSTRA; MEVISSSEN, 1995), assim como o seu mecanismo de ação. Na literatura não existem até o momento estudos que expliquem a existência de níveis tão elevados de IL-6 em pacientes com LV. Talvez linfócitos T CD8 e neutrófilos possam contribuir com os níveis dessas citocinas livres. Em pacientes com LV, a contagem de neutrófilos obtida do hemograma apresentou correlação positiva com os níveis de IL-6 (COSTA et al., 2013), em outra pesquisa IL-6 apresentou correlação negativa com a contagem de neutrófilos (DOS SANTOS et al., 2016). De qualquer forma, apenas a análise imunofenotípica poderá determinar se os leucócitos de pacientes com LV podem contribuir com os níveis de IL-6 e IL-10 livres no sangue.

A figura 01 apresenta a atividade desempenhada por IL-6 em pacientes com LV, contribuindo com a imunossupressão ou imunoparalisia.

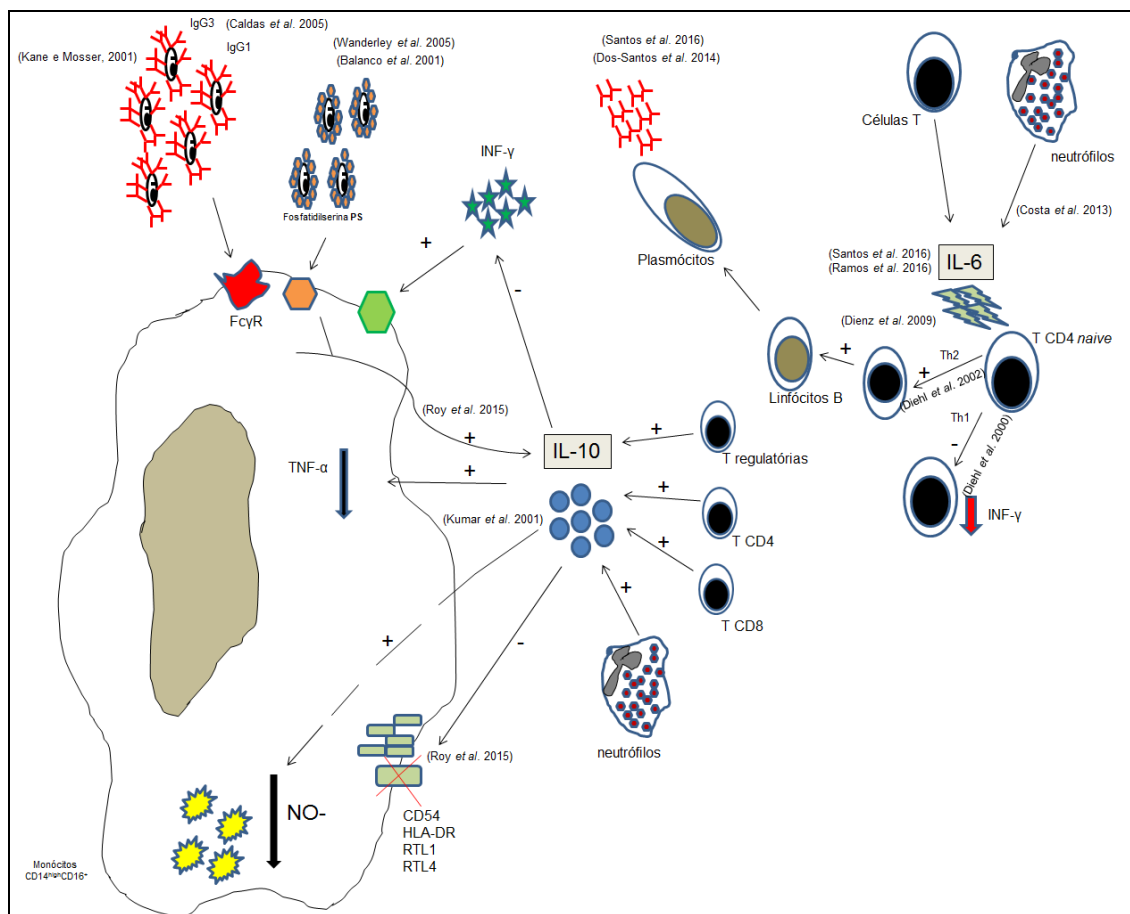


Figura 1 Visão geral da imunossupressão induzida por IL-10 e IL-6 na LV. *Leishmania* é capaz de modular a resposta imune das suas células-alvo, os macrófagos, através dos seguintes mecanismos: (1) o patógeno opsonizado por IgG1 e/ou IgG3 pode estabelecer ligação com receptores Fc γ nos macrófagos; (2) *Leishmania* pode expressar PS em sua membrana e se ligar a receptores específicos nos macrófagos. Esses métodos induzem ou aumentam a síntese de IL-10 pelos monócitos que, por sua vez, adquirem um perfil regulatório. Nessas condições os monócitos diminuem a síntese de ROS e TNF α , apresentam falhas na sua função como célula apresentadora de antígeno em virtude da baixa expressão de CD54/HLA-DR e, tornam-se não responsivos ao INF γ . IL-6, por sua vez, também contribui com a imunossupressão na LV porque inibe a diferenciação Th1 e estimula Th2.

FONTE: Próprio autor.

2.3.1.4 INF- γ e TNF- α na LV

A expressão do RNA mensageiro de INF- γ contribui com a eliminação de *Leishmania*, no entanto a elevada expressão de RNAm de IL-10 inibe a ativação de macrófagos, a qual seria induzida por INF- γ (KARP et al., 1993). O mesmo foi registrado em células do aspirado esplênico de pacientes com LV, apresentando significativamente maior expressão de RNA mensageiro de IL-10, INF- γ e TGF- β em pacientes do pré-tratamento, em comparação com aqueles do período pós-tratamento (NYLÉN et al., 2007). Quando leucócitos de pacientes com LV são expostos *in vitro* ao antígeno de *Leishmania*, apresentam comportamentos diferentes. Antes do tratamento, os leucócitos produzem significativamente mais IL-10, ao passo que após o tratamento produzem significativamente mais INF- γ . Os níveis de TNF- α foram mais elevados após estímulo nas duas condições, mas não houve diferença estatística (CLARÊNCIO et al., 2009).

INF- γ é uma citocina elevada em pacientes com desfechos fatais. A concentração plasmática de INF- γ é maior em pacientes com LV grave. Pacientes com sangramento e infecções bacterianas apresentam uma concentração mediana de 8,10 pg/mL (COSTA, 2009), enquanto casos não graves apresentam uma concentração mediana de 1,1 pg/mL (LIMA, 2015). Tais dados indicam que, mesmo em casos graves, o organismo continua tentando eliminar o parasita, aumentando a produção de INF- γ . Independentemente da gravidade, INF- γ apresenta correlação positiva significativa com IL-6 (Lima, 2015), mas apenas em casos graves há igual correlação com IL-1 β , CXCL-8, IL-10, IL-12 e TNF α . Em casos graves, com quadro inflamatório instalado e com falhas da hemostasia, INF- γ está elevado e apresenta correlação positiva com proteína C reativa e marcadores de CID como dímero D, PDF e fibrinogênio. Sua correlação foi negativa com a contagem de plaquetas. (COSTA, 2009).

TNF α é uma citocina que em pacientes com LV apresenta correlação positiva com sangramentos gengival e digestivo, mas não com marcadores de CID. Sua concentração é mais elevada em pacientes ictericos, mas não se eleva significativamente em pessoas com desfechos letais (COSTA, 2009). Em outro grupo com LV, os níveis de

TNF α foram mais elevados em pacientes com diarreia e oligúria (SENE, 2013). Níveis de TNF α são mais elevados em pacientes com LV quando comparados aos controles (MEDEIROS; CASTELO; SALOMÃO, 1998). Em casos de LV não grave, TNF α apresenta correlação positiva com proteína C reativa e correlação negativa com ALT e AST. Com a terapia, pacientes que persistiram com hepatomegalia no sétimo dia de terapia e com esplenomegalia no 21º dia apresentaram níveis admissionais significativamente mais elevados de TNF α (LIMA, 2015). Análises imunohistoquímicas demonstraram que no fígado de humanos com LV predominam um perfil Th1 (TNF α , IL-1 β e INF- γ) e baixos níveis de IL-4 e IL-10 (DUARTE; CORBETT, 1987). Em pacientes com LV, TNF α aparentemente desempenha um papel protetor na defesa do hospedeiro (MEDEIROS; CASTELO; SALOMÃO, 1998).

As vacinas acionam um padrão imunológico protetor quando estimulam os leucócitos de cães vacinados a produzirem significativamente mais CXCL8 e INF- γ e menos IL-10 após estímulo *in vitro* com antígeno. A análise de células T CD4⁺ demonstrou um pico de TNF- α e INF- γ , um e seis meses após a administração da vacina, em comparação com o quadro de cães não vacinados. Os níveis de TNF- α expressos por CD8⁺ foram mais elevados um mês após a administração da vacina, mas não apresentaram diferença estatística. Esses achados mostraram que células T, ambas CD4⁺ e CD8⁺, são relevantes origens de citocinas pró-inflamatórias quando as células são novamente estimuladas com antígeno (COSTA-PEREIRA et al., 2015). Nos testes para desenvolver vacinas em humanos, o grupo de indivíduos saudáveis que recebeu antígenos produziu mais INF- γ e TNF α , mas não IL-10, assim como observado em indivíduos curados há 6 meses de LV (SINGH et al., 2012a). INF- γ e IL-10 são as citocinas que melhor refletem a resposta imune, permitindo distinguir indivíduos com doença ativa dos curados ou assintomáticos, por isso não haveria uma falha grave na produção de citocinas Th1 em pacientes com LV (SINGH et al., 2012b).

Pacientes com LV após a cura apresentam um perfil imunológico diferente daqueles com doença ativa. As pesquisas indicam que pacientes curados respondem com a síntese de citocinas Th1, rapidamente, após estímulo com antígeno. Após a cura, os leucócitos passam a expressar mais TNF- α , INF- γ e granzima B caso recebam um novo estímulo *in vitro* com antígeno de *Leishmania*. O índice de proliferação dos linfócitos foi correlacionado positivamente com INF- γ e TNF- α , no entanto, os níveis de IL-10 permanecem inalterados em pacientes curados (KAUSHAL et al., 2014).

2.3.1.5 IL-12 na LV

IL-12 desempenha importante papel na regulação da resposta imunológica celular *in vitro* em pacientes com LV, por atuar diretamente na ativação de células T e induzir a proliferação de linfócitos e a produção de INF- γ , que tem sua atividade anulada pela adição de IL-10 à cultura. Em experimentos *in vitro*, IL-12 induziu a proliferação de linfócitos apenas na presença de antígeno de *L. chagasi*. E a quantidade de INF- γ produzido em cultura contendo o antígeno de *Leishmania* e IL-12 foi similar àquela produzida por linfócitos de sujeitos curados de LV. Foram adicionados à cultura os anticorpos monoclonais anti-IL-10 e IL-12, registrando um efeito sinérgico na proliferação de linfócitos e na produção de INF- γ , entretanto, quando adicionados separadamente à cultura, IL-12 têm uma ação 2 vezes mais potente que o anti-IL-10 no restabelecimento das funções das células T. A presença de IL-12 em cultura estimulada com antígeno de *Leishmania* aumenta a atividade citotóxica de PBMC através da lise celular (BACELLAR et al., 1996). Macrófagos infectados *in vitro* com *Leishmania* produzem IL-10 que, por sua vez, inibe a síntese de IL-12 e TNF- α em macrófagos estimulados com INF- γ /LPS (KANE; MOSSER, 2001).

IL-12 exerce a sua influência através do aumento na síntese de INF- γ , da atividade citolítica e da diferenciação de células Th1 (KURKJIAN et al., 2006). IL-12 juntamente com INF- γ desempenha importante papel na resposta imune e contribui para morte do parasita, sendo constatados níveis mais elevados de IL-12 em pacientes assintomáticos e curados do que aqueles em doença ativa, mas não quando há comparação com os controles saudáveis (SILVA et al., 2012). No entanto, em outras pesquisas não foi registrada diferença significativa nos níveis dessa citocinas em diferentes quadros clínicos de LV (KURKJIAN et al., 2006) e nem houve constatação de correlação com contagem de neutrófilos, plaquetas, linfócitos, concentração de hemoglobina e sinais clínicos de gravidade, embora tenha se identificado correlação positiva com o marcador de CID fibrinopeptídeo A (COSTA, 2009). Em um grupo que incluía casos fatais, níveis mais elevados de IL-12 foram registrados em pacientes que apresentaram diarreia e oligúria, no entanto, em pacientes esplênicos os níveis foram significativamente diminuídos (SENE, 2013). Os níveis de IL-12 são aparentemente alterados apenas em casos graves, porque em pacientes com LV não grave não foi

registrada diferença estatística nos seus níveis plasmáticos, mesmo após 180 dias de tratamento (LIMA, 2015).

2.3.1.6 IL-1 β na LV

IL-1 β não se eleva em desfechos fatais e na presença de infecções bacterianas, os seus níveis aumentam significativamente na presença de sangramento. Também estão mais elevados em pacientes que apresentam menos de 3.500 linfócitos/mm³, hemoglobina abaixo de 7 g/dL e menos de 50.000 plaquetas/mm³ (COSTA, 2009). Em outro grupo com LV, IL-1 β apresentou níveis mais elevados no plasma de pacientes que apresentaram hemorragia, diarreia, oligúria e sepse, ressaltando um papel relevante em casos graves (SENE, 2013). Em pacientes com LV não grave, há correlação negativa com o relato da perda de peso pelo paciente. E, a concentração dessa citotina no plasma começa a reduzir somente após 30 dias de tratamento. Apresenta correlação positiva com CXCL8 e TNF α (LIMA, 2015). IL-1 β continua apresentando correlação positiva com TNF α mesmo em um grupo que incluía casos fatais (SENE, 2013).

2.3.1.8 CXCL8 na LV

CXCL8 é uma quimiocina que participa da defesa do hospedeiro, por promover o recrutamento e ativação de neutrófilos para o local da inflamação (REMICK, 2005). Trata-se de uma citocina que apresenta os seus níveis elevados em casos de sepse, em casos fatais, em pacientes com edema, icterícia e sangramentos. São igualmente mais elevados em pacientes que apresentam sangramento com infecção bacteriana, hepatomegalia, anemia grave, plaquetopenia, neutropenia, linfopenia. Não apresentou correlação com proteína C reativa, marcador de inflamação, mas apresentou com o fibrinogênio, um marcador da CID (COSTA, 2009). Em outro grupo de pacientes, CXCL8 também apresentou níveis mais elevados nos casos com sangramento, hemorragia, edema e diarreia (SENE, 2013). Em pacientes com LV não grave, ocorre queda significativa nos níveis de CXCL8 nos primeiros 7 dias após o início do tratamento. Nesses pacientes, CXCL8 apresenta correlação positiva com níveis de bilirrubina total, neutropenia, plaquetopenia e hipoalbuminemia (LIMA, 2015).

2.4 Medula óssea na LV

A medula óssea é um tecido flexível que contém principalmente sangue, células hematopoiéticas e gordura. Após o nascimento, ela é responsável pelo processo de formação das células sanguíneas, definido como hematopoiese. Em termos de tamanho, ela equivale grosseiramente ao fígado e tem volume corpóreo de aproximadamente dois litros, sendo que um litro corresponde às células hematopoiéticas (ALKIRE; COLLINGWOOD, 1990). Para a hematopoiese ocorrer, deve haver um microambiente apropriado e capaz de manter o processo através do fornecimento de fatores de crescimento e citocinas passíveis de auxiliarem na proliferação, na diferenciação e na maturação das células-tronco. Alguns desses fatores são específicos para determinadas células e/ou linhagens de células, por exemplo, IL-6 estimula células pluripotentes, enquanto $INF\gamma$ e $TNF\alpha$ contribuem para a diferenciação dos granulócitos, ressaltando que, alterações na concentração dessas citocinas podem interferir nesse processo (TRAVLOS, 2006).

Tem sido aceito que as alterações observadas no sangue periférico de pacientes com LV são igualmente uma consequência de falhas na função hematopoiética, achado que tem início com a replicação do parasita nos macrófagos (CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948). Os macrófagos são suscetíveis à infecção por *Leishmania*, anteriormente pensava-se que células progenitoras $CD34^+$ de camundongos eram resistentes a *Leishmania* (COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000), no entanto foi demonstrado que células tronco mesenquimais podem ser consideradas o santuário da *Leishmania* porque são resistentes aos fármacos (LOPES et al. 2016, no prelo). As alterações na hematopoiese podem ser, inicialmente, uma consequência das modificações na produção de fatores de crescimento derivados de macrófagos e citocinas como $TNF\alpha$ (COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000), modificando o microambiente da medula óssea. Em humanos, é igualmente um achado incomum a presença de *Leishmania* em outras células que não os macrófagos (CHANDRA; CHANDRA; KAUSHIK, 2013). As alterações nos histiócitos são tão intensas que em órgãos como baço, fígado e nódulos linfáticos foi registrada a presença de alterações compatíveis com malignidade, tais como aumento do tamanho da célula, aumento do volume nuclear e hipercromasia (MATZNER et al., 1979).

A primeira alteração na medula óssea é aparentemente uma redução dos neutrófilos adultos que coincide com a neutropenia observada no sangue periférico no início da doença. Há uma redução do número de mielócitos eosinofílicos e eosinófilos adultos, enquanto os monócitos e linfócitos estão em número normal. Os precursores das séries granulocíticas, tais como mieloblastos, promielócitos, mielócitos, neutrófilos e metamielócitos, podem não apresentar alteração em números absolutos (CARTWRIGHT, HUI-LANCHUNG, NA CHANG, 1948). No entanto, eles apresentam indícios e algumas alterações morfológicas associadas a LV que podem ajudar o patologista e o hematologista no diagnóstico durante análise de lâmina do aspirado da medula óssea. Dentre estes sinais, eles apresentam por exemplo projeções citoplasmáticas e grânulos pontilhados. Alguns macrófagos podem apresentar vesículas grandes e densas no seu citoplasma, tornando essas células semelhantes a basófilos. Essas alterações são mais intensas quando o diagnóstico clínico e laboratorial é confirmado (SHAHRIAR et al., 1999), provavelmente quando a carga parasitária é mais elevada (SILVA et al., 2014) e quando há a presença de granulomas, necrose e fibrose descritos em biópsia (KUMAR et al., 2007).

A medula óssea pode contribuir com a anemia, em razão da eritropoiese ineficaz (TEMIZ et al., 2014). Níveis de hemoglobina abaixo de 7g/dL foram associados à presença de diseritropoiese (CERQUEIRA, 2014) e com o maior risco de morte (COSTA, 2009). A anemia pode igualmente ser uma consequência da inflamação induzida pela *Leishmania* na medula óssea. Em casos de níveis elevados de IL-6, há maior expressão de hepcidina, maior retenção de ferro nas células e, conseqüentemente, redução da oferta do ferro necessário para a eritropoiese (NEMETH et al., 2004). A medula óssea igualmente contribui para a plaquetopenia, porque a produção de plaquetas pelos megacariócitos está marcadamente reduzida (CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948). Com a progressão da doença, a anemia e a plaquetopenia seriam intensificadas pelo hiperesplenismo (VARMA; NASEEM, 2010). Pacientes com LV também podem apresentar anemia megaloblástica, em virtude da desnutrição prévia do paciente e do consumo de fatores pelo parasita (AGRAWAL et al., 2013).

Mudanças no microambiente da medula óssea, tais como a presença de níveis elevados de TNF- α que contribui para o aumento dos radicais livres e a diminuição do antioxidante glutatona, têm sido associadas à síndrome mielodisplásica, caracterizada por defeitos na proliferação e na diferenciação de células das linhagens hematopoiéticas

(PEDDIE et al., 1997; YARALI et al., 2002). A LV gera alterações displásticas compatíveis com essa síndrome e, em casos de baixa carga parasitária, pode dificultar o diagnóstico (TEMIZ et al., 2014). Essas alterações morfológicas correspondem a diseritropoiese, disgranulopoeise, dismegacariopoeise; (YARALI et al., 2002; CERQUEIRA, 2014; TEMIZ et al., 2014). Além de hemofagocitose, a qual esteve presente em 70% dos casos, macrófagos parasitados, parasitas extracelulares, figuras de mitose e plasmocitose em 96,2%, histiócitos aumentados em 100% dos casos (CHANDRA; CHANDRA; KAUSHIK, 2013). A presença de hemofagocitose é variável entre os grupos de pacientes com LV, pois estudos descreveram a sua presença em apenas 6% dos pacientes (CERQUEIRA, 2014), enquanto em outra pesquisa esteve presente em 30% dos pacientes, além de apresentar associação positiva com a carga parasitária (CASTRO, 2011).

A hemofagocitose observada em aspirado de medula óssea de LV pode estar associada à síndrome hemofagocítica, induzida pela própria *Leishmania*, podendo contribuir para aumentar a inflamação em pacientes com LV. Isto porque, nessa síndrome, há ativação de linfócitos e macrófagos que infiltram os tecidos e produzem grandes quantidades de citocinas inflamatórias (LEHMBERG; EHL, 2013). Existem relatos dessa síndrome em pacientes com LV que apresentavam baixa carga parasitária, dificultando o diagnóstico (SINEIDI et al., 2002). Existem igualmente relatos de pacientes LV que adquirem infecções bacterianas capazes de acionar o desenvolvimento dessa síndrome (MARTIN et al., 2009).

Em pacientes com LV, a celularidade global é bastante variável, pacientes podem apresentar uma medula normocelular, hipocelular ou hipercelular. No entanto, há significativa porcentagem de pacientes com LV que apresentam normocelularidade da medula óssea e apenas uma pequena porcentagem é hipercelular (CERQUEIRA, 2014; CASTRO, 2011; CHANDRA; CHANDRA; KAUSHIK, 2013; AGRAWAL et al., 2013). Apesar de estudos anteriores relatarem que a medula em pacientes com LV é hipercelular (CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948). E, quanto à celularidade setorial, há uma hipercelularidade eritróide (WICKRAMASINGHE; ABDALLA; KASILI, 1987; CHANDRA; CHANDRA; KAUSHIK, 2013), este padrão não foi observado nas linhagens mieloide e megacariocítica (CERQUEIRA, 2014). Essas alterações podem não ter grande impacto na patogênese da doença, porque a celularidade global e setorial não foram relacionadas ao desfecho clínico ou ao risco de

morte (CASTRO, 2011; CERQUEIRA, 2014) e carga parasitária (AGRAWAL et al., 2013).

Na medula óssea há elevada expressão de RNA mensageiro de IL-10 e INF- γ (KARP et al., 1993). E a exposição prévia das células a IL-10 impede uma ativação ótima dos macrófagos (KANE; MOSSER, 2001;RAI et al., 2012). Assim, os macrófagos não conseguem destruir *Leishmania* na medula porque IL-10 tem ação imunossupressora e promove uma baixa produção de TNF- α e espécies reativas de oxigênio, contribuindo para a replicação do parasita (KANE; MOSSER, 2001). Em algumas pesquisas, a medula óssea de pacientes com LV aparentemente responde de forma diferente quando comparada ao sangue periférico. Após o tratamento, há uma queda significativa nos níveis de IL-10 no sangue, fato não observado na medula. Nesse mesmo grupo de pacientes, analisando amostras pareadas, existem níveis mais elevados de INF- γ no sobrenadante do aspirado da medula óssea, quando comparado ao soro anterior e posterior à terapia (RAI et al., 2012). Os níveis elevados de INF- γ no plasma de pacientes com LV ativa, no dia zero da doença, podem ter origem em órgãos parasitados como a medula óssea. Isto porque, quando os leucócitos no sangue periférico são estimulados com antígeno de *Leishmania*, eles não produzem INF- γ e, portanto, não seriam responsáveis pela síntese de INF- γ presente no plasma (CALDAS et al., 2005). Assim sendo, a imunossupressão não seria generalizada, podendo permanecer restrita a alguns tipos celulares (CARVALHO et al., 1985), já que existe elevada expressão de RNAm e níveis plasmáticos de INF- γ . Alguns autores estariam de acordo, porque não apoiam falhas graves na resposta Th1 em pacientes com LV (SINGH et al., 2012b), tendo em vista a existência de níveis séricos consideráveis de INF- γ .

A plasmocitose é um relato comum em lâmina de aspirado da medula óssea de pacientes com LV (AGRAWAL et al., 2013;CHANDRA; CHANDRA; KAUSHIK, 2013), sendo igualmente descrita a presença de células de Mott, correspondentes aos plasmócitos e apresentando múltiplos vacúolos ricos em imunoglobulinas (CASTRO, 2011; CERQUEIRA, 2014), um indicativo da existência de níveis elevados de anticorpos na medula óssea, tal como registrado no sangue periférico (CALDAS et al., 2005). Por sua vez, essas imunoglobulinas podem opsonizar *Leishmania* e induzir uma resposta anti-inflamatória do hospedeiro, ao estimularem a produção de IL-10, impedindo a ativação dos macrófagos após estímulo com INF- γ (KANE; MOSSER,

2001). A atividade leishmanicida dos macrófagos poderia ser induzida pelos linfócitos T CD4⁺, os quais estabelecem contato com macrófagos infectados com *Leishmania* nos órgãos parasitados através da interação HLA-TCR e, em seguida, linfócitos T CD4⁺ produzem INF- γ para ativar macrófagos (KUMAR et al., 2014). Durante doença ativa, os linfócitos T expressam mais HLA-DR em comparação com o quadro de sujeitos saudáveis (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2011).

A medula óssea em pacientes com LV aparentemente retém ou compartimentaliza linfócitos T CD8, por haver maior porcentagem de células expressando CD18 na medula em comparação com a concentração no sangue periférico. CD18 é uma molécula responsável pela adesão das células aos componentes da matriz extracelular nos órgãos ou tecidos, ao passo que as células T CD4 apresentaram significativa expressão de CD18 no sangue periférico, em comparação com a presença na medula óssea. Da mesma forma, há maior compartimentalização desses linfócitos expressando CD45RO na medula óssea (CLARÊNCIO et al., 2009). Em números absolutos, durante doença ativa aparentemente há uma taxa CD4/CD8 maior na medula óssea em comparação com a presença no sangue periférico. Após o tratamento, essa taxa aumenta no sangue e diminui na medula (ROHTAGI et al., 1996). O deslocamento de T CD4 para o sangue periférico após o tratamento é apoiado também pelo fato de as pessoas saudáveis apresentarem uma taxa TCD4/CD8 mais elevada no sangue periférico em comparação aquela da medula óssea (CLARK et al, 1986). A taxa de linfócitos T CD4/CD8 em pessoas saudáveis encontrada no baço, medula óssea e nódulos linfáticos é em média de 1,2:1, ligeiramente menor àquela encontrada no sangue periférico (COLOVAI et al., 2004). Esses dados refletem o trânsito de células entre os órgãos parasitados, facilitado pela presença de capilares sinusóides dilatados em sua arquitetura (MEBIUS; KRAAL, 2005).

A literatura científica apresentada anteriormente reforça o fato de que é preciso delinear o papel da medula óssea no desenvolvimento da LV em pacientes com a doença grave e não grave. Portanto, é importante caracterizar se as células produzidas na medula óssea apresentam a mesma atividade quando estão presentes na corrente sanguínea em pacientes com a doença grave.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar o papel da medula óssea e do sangue periférico na patogênese da LV, em particular, da doença grave.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a produção das citocinas plasmáticas IL-6, IL-12, IL1 β , INF- γ , IL-10, TNF- α e da quimiocina CXCL8 no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com LV, infectados com LV e HIV comparado ao grupo controle.

Verificar se neutrófilos, monócitos (CD14⁺), linfócitos B (CD19⁺), T CD8⁺ e T CD4⁺ são responsáveis pela expressão das citocinas supracitadas na medula óssea e no sangue periférico de pacientes com LV, infectados com LV e HIV comparado ao grupo controle.

Correlacionar o padrão de resposta imune na medula óssea e no sangue periférico com a gravidade da doença de pacientes com LV, infectados com LV e HIV comparado ao grupo controle.

4 METODOLOGIA

4.1 Considerações sobre a amostra

Os pacientes participantes deste estudo foram atendidos no Instituto de Doenças Tropicais “Natan Portella” (IDTNP) no período de janeiro a agosto de 2015, localizado em Teresina-Piauí.

Foram considerados como amostra da pesquisa 29 pacientes portadores de LV (**grupo LV**), 12 pacientes com suspeita clínica de LV, mas que não apresentaram confirmação diagnóstica (**grupo sem LV/controle não saudável**) e 12 pacientes infectados com *Leishmania* e HIV (**grupo coinfectado: *Leishmania*/HIV**).

As amostras de sangue periférico e da medula óssea foram coletadas no primeiro dia de internação no IDTNP, antes do início do tratamento rotina do hospital (IDTNP) para o diagnóstico de LV. As informações clínicas foram colhidas no prontuário médico, conforme questionário em anexo (anexo 1).

4.2 Considerações éticas

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí com número 0392214.0.0000.5214. O estudo foi conduzido em conformidade com os preceitos fundamentais da Resolução do Conselho Nacional de Saúde – CNS 466/2012, que trata das Diretrizes e Normas de Pesquisas envolvendo seres humanos.

4.3 Definição dos casos

4.3.1 Critérios de inclusão

4.3.1.1 Grupo LV

No grupo LV foram incluídas pessoas com sintomas sugestivos de LV (febre e esplenomegalia) e diagnóstico confirmado por pelos menos um dos testes utilizados na rotina do hospital: pesquisa direta de amastigotas de *Leishmania* em lâmina do aspirado de medula óssea, utilizando microscopia óptica; visualização de promastigotas em meio de cultura e teste rápido IT-Leish® (antígeno rk-39). Pacientes sem confirmação laboratorial mas que receberam tratamento farmacológico para LV seguido de uma melhora do quadro clínico também foram incluídos nesse grupo.

4.3.1.2 Grupo sem LV

No grupo sem LV foram incluídos pacientes com sintomas sugestivos, sem confirmação parasitológica ou sorológica e que receberam outro diagnóstico clínico ou laboratorial. Somado a isso, não receberam tratamento com drogas leishmanicidas.

4.3.1.3 Grupo coinfectado

No grupo coinfectado foram incluídos os pacientes previamente diagnosticados com HIV e que receberam diagnóstico laboratorial de LV.

4.3.2 Critérios de exclusão

Pacientes com LV e outras morbidades associadas como neoplasias, insuficiência renal crônica e transplantados.

4.4 Imunofenotipagem em sangue periférico e medula óssea

O sangue periférico e aspirado da medula óssea de paciente com LV foram coletados em tubos contendo EDTA, armazenados em geladeira até o momento do processamento. A imunofenotipagem foi realizada antes do resultado da pesquisa direta e da cultura de *Leishmania*. O primeiro procedimento realizado foi a contagem das células da medula óssea e do sangue periférico em câmara de Neubauer. Todas as amostras foram marcadas com anticorpos e adquiridas no citômetro de fluxo no mesmo dia da coleta. Inicialmente, as amostras de sangue periférico e de medula óssea foram incubadas em CO₂ 5% a 37°C por 4 horas em 500µL de meio RPMI com *BD GolgiStop*® contendo monensina. Em seguida, os tubos foram centrifugados para retirar o sobrenadante e 50 µL da amostra foram adicionados aos tubos para a imunofenotipagem.

Os tubos foram identificados como não marcados (NM), tubos com controle isotópico (ISO), tubos FMO (*fluorescence minus one*) e os tubos das amostras. Os controles isotópicos utilizados foram PE mouse IgG1κ (clone MOPC-21), APC-H7 mouse IgG2bκ (clone 27-35), Alexa Fluor® 700 mouse IgG1 κ (clone MOPC-21), APC rat IgG2a κ (clone R35-95), PE-CyTM7 mouse IgG1 κ (clone MOPC-21), FITC Rat IgG2a κ (clone R35-95), PE-CF594 Mouse IgG2b κ (clone 27-35) e PerCP mouse IgG1 κ (clone MOPC-21). Os anticorpos anti-TNFα PE-Cy7, anti-INFγ Alexa Fluor® 700, anti-IL-10 APC e anti-CXCL-8 PE-CF594 foram diluídos em *Wash buffer* na proporção de 1:30, com exceção de anti-IL-6 FITC e anti-INFγ Alexa Fluor® 700 que foram diluídos na proporção de 1:2.

Para marcação das amostras do sangue periférico, o experimento foi organizado em dois tubos. No tubo 01 foi adicionado anti-CD4 PERCPTM5.5 (clone SK3), anti-CD8 PE (clone HIT8a) e anti-CD14 APC-cy⁷ (clone MφP9) e, no tubo 02 foram adicionados anti-CD19 APC-cy⁷ (clone SJ25C1) e anti-CD45 PE (clone HI30). Para marcação das amostras de medula óssea, o experimento foi dividido em três tubos para cada amostra. Ao tubo 01 foi adicionado anti-CD4 PERCPTM5.5 (clone SK3) e anti-CD8 PE (clone HIT8a), ao tubo 02 foi adicionado anti-CD14 APC-cy⁷ (clone MφP9) e anti-CD45 PE (clone HI30). Por fim, ao tubo 03 foi adicionado anti-CD19 APC-cy⁷ (clone SJ25C1) e anti-CD45 PE (clone HI30). Em seguida, os tubos foram homogeneizados em vortex e colocados por 30 minutos em câmara escura a temperatura ambiente (20° a 25° C). Em seguida, foi adicionado aos tubos 1 mL de solução de

fixação e permeabilização *BD Cytotfix/Cytoperm*® e os anticorpos intracelulares anti-IL-6 FITC (clone MQ2-6A3), anti-CXCL-8 PE-CF594 (clone G265-8), anti-IL-10 APC (clone JES3-19F1), anti-TNF α PE-Cy7 (clone MAb11), anti-INF γ Alexa Fluor® 700 (clone B27). Esses tubos foram armazenados por 1 hora a 4°C protegidos da luz. Após esse período, foi adicionado 1 mL de solução FACS *Lysing Solution*® 1x, homogeneizados em vortex e colocados em câmara escura por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados a 500g por 5 minutos, em seguida o sobrenadante foi desprezado e adicionado 2 a 3 mL de *Wash Buffer*, homogeneizados em vortex e centrifugados a temperatura ambiente por 5 minutos a 500g. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e adicionado 500 μ L de PBS 1x. As amostras foram homogeneizadas antes da aquisição em citômetro. Todos os reagentes utilizados foram da empresa *Becton Dickinson Biosciences Pharmingen*.

4.5 Estratégia de análise imunofenotípica

Foram adquiridos 30.000 eventos por amostra no programa FACSDiva®, presente no citômetro de fluxo FacsCantoII, mas os dados foram analisados no programa *Infinicity*® (citognos). No *dot plot* SSCxFSC foram excluídos os debris celulares e todos aqueles eventos alheios aos padrões de distribuição normal dos leucócitos. Os tubos do controle isotópico foram avaliados para excluir ligações inespecíficas. Os tubos FMO foram utilizados para definir o ponto de corte para cada anticorpo em histograma e sempre foi acompanhada da observação no gráfico *dotplot*. A seleção de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ no sangue periférico e na medula óssea foi realizada através do *dotplot* CD4 PERCPTM5.5 x CD8 PE, a confirmação foi realizada em SSCxCD8 PE e SSCxCD4 PERCP. A seleção de linfócitos B nos dois compartimentos foi realizada através do *dotplot* CD45 PE x CD19 APC-cy⁷. Os monócitos no sangue periférico foram identificados através do *dotplot* SSC x CD14 APC-cy⁷ e na medula óssea através de CD45 PE x CD14 APC-cy⁷. A seleção de neutrófilos foi realizada no sangue periférico e na medula óssea através do *dotplot* SSC x CD45 PE. Após seleção da população de leucócitos, a identificação da expressão de citocinas pelas células foi determinada em histograma, após definir ponto de corte em tubo FMO específico para cada citocina. Todos os resultados foram expressos em células/mm³ e porcentagem de expressão de citocinas conforme fórmula descrita

segundo literatura científica (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006). A estratégia de análise foi exemplificada na Figura 02.

$$\text{Valor \%} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células citocinas positivos}}{\text{n}^{\circ} \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

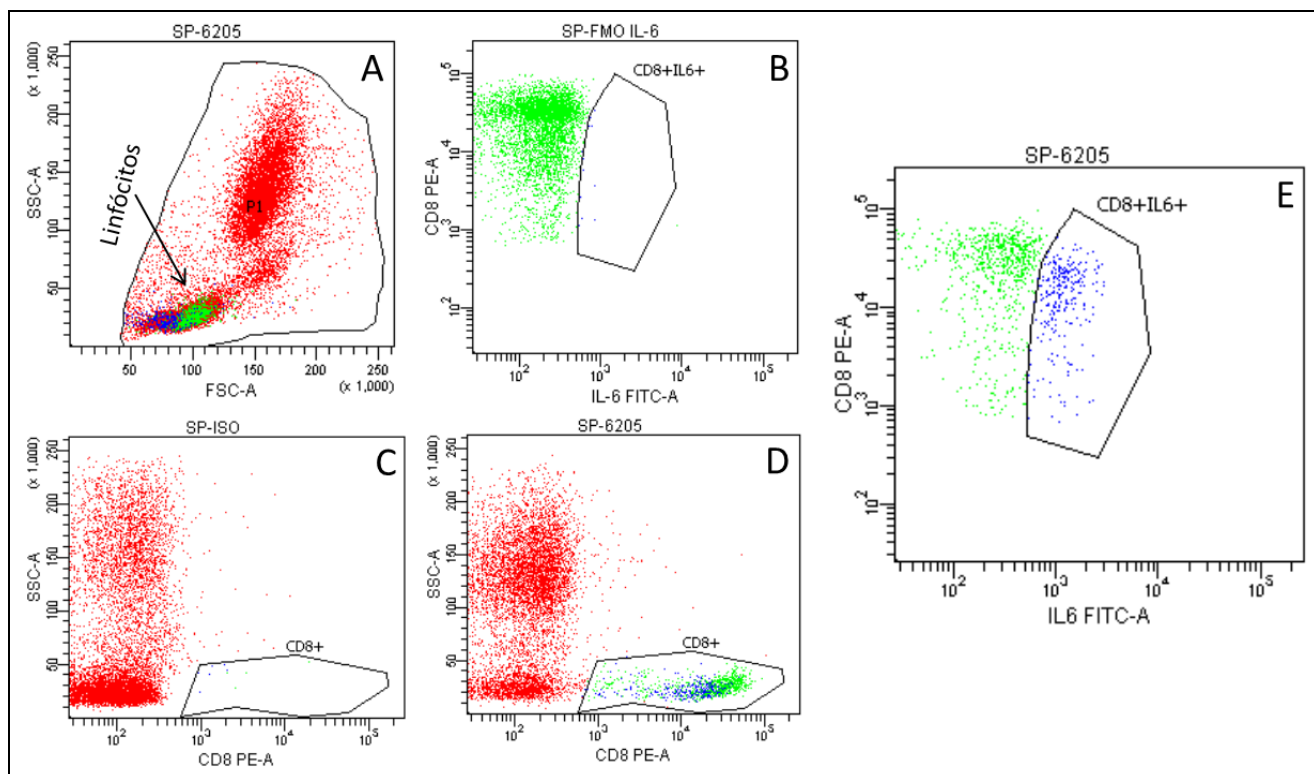


Figura 2 Esquema representativo da estratégia de análise utilizada para determinar o perfil intracelular de expressão de citocinas pelos leucócitos. A figura apresenta análise da porcentagem de linfócitos T CD8 que expressam IL-6, protocolo semelhante foi utilizado para as outras células, considerando os seus controles específicos. (A) No plot SSC-A x FSC-A a população de leucócitos foi selecionada e os debris foram excluídos. (D) Em SSC-A x CD8 PE, a população CD8⁺ foi selecionada utilizando-se o controle isotópico (C) como referência para comprovar especificidade. Em seguida, a porcentagem de células T CD8 expressando IL-6 (E) foi determinada utilizando-se o ponto de corte determinado em (B) que corresponde à análise FMO.

4.6 Dosagem de citocinas plasmáticas

O plasma e o sobrenadante da medula óssea dos pacientes incluídos na pesquisa foram armazenados em freezer a -20°C até o momento da análise em citometria de fluxo, utilizando kit CBA® citocinas inflamatórias (IL-6, CXCL-8, IL-10, TNF α , IL-1 β e IL-12p) e Kit CBA® flex para dosagem de INF- γ . A mensuração das citocinas utilizando ensaio com *beads* seguiu as orientações do fabricante (*Becton Dickinson Biosciences Pharmingen*).

4.7 Probabilidade de morte

Os dados clínicos dos pacientes com LV, coletados em questionário padrão (anexo 01) do laboratório de pesquisa em Leishmanioses (Lableish), foram adicionados ao programa online *Kala-Cal*®, desenvolvido a partir das pesquisas realizadas pelo laboratório de pesquisas em Leishmanioses IDTNP/UFPI. O programa permite calcular a probabilidade de morte dos pacientes com LV (<http://sbmt.org.br/kalacal/>).

Na presente pesquisa, o ponto de corte para o cálculo da probabilidade de morte de 15% foi definido utilizando como parâmetro os níveis plasmáticos de IL-6 dos pacientes, o teste estatístico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os grupos (-grave e +grave) quanto aos níveis plasmáticos de IL-6 porque é definido como um parâmetro de gravidade (COSTA et al., 2013)(DOS SANTOS et al., 2016). O aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 está associado com a gravidade do quadro clínico. A mediana dos valores da P(morte) inicialmente foi utilizada como ponto de corte para distribuir os pacientes nos grupos -grave e +grave. Na ausência de diferença significativa, o valor do ponto de corte foi aumento e as populações novamente classificadas nos grupos até o ponto em que existisse diferença significativa quanto aos níveis de IL-6. Na presente pesquisa foram considerados com maior gravidade os pacientes com probabilidade de morte acima de 15% (n=4) conforme tabela.

4.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram organizados e armazenados em planilhas do programa Microsoft Windows Excell®. Os dados quantitativos foram apresentados em valores absolutos, medianas, médias e desvio-padrão.

A Análise estatística foi realizada através dos testes Man-Whitney, Wilcoxon, Regressão linear simples e correlação de Spearman em software *GraphPad Prism*® versão 6.01.

O teste Wilcoxon foi empregado para comparar medianas das variáveis não paramétricas, amostras pareadas de sangue periférico e medula óssea dentro de um mesmo grupo foram comparadas. O teste de Man-Whitney foi utilizado para comparar as medianas entre os grupos.

Para esta pesquisa, foi aceito um nível de significância $\alpha = 0,05$.

5 RESULTADOS

SEÇÃO I

5.1 Caracterização da medula óssea e do sangue periférico de pacientes com LV

5.1.1 Características da população de estudo

As características demográficas da população estão descritas na tabela 01. Não houve diferença estatística entre os grupos com LV e sem LV no que diz respeito a idade ($p=0,1281$) e gênero ($p=0,7231$).

O diagnóstico final dos pacientes do grupo **sem LV** foram febre tifoide, insuficiência hepática aguda e subaguda, doença ocasionada pelo HIV, anemia nutricional. A presença de sangramento foi identificada em dois pacientes do grupo **sem LV**, um em consequência de parasitose intestinal e o outro devido a infecção urinária. No grupo LV, quatro pacientes apresentaram quadro clínico com maior gravidade, dos quais três com sangramento e dois com infecções bacterianas. Um desses pacientes foi a óbito por sepse provocada por *Pseudomonas aeruginosa*.

5.1.2 Características hematológicas

Os pacientes do grupo com LV apresentam níveis mais baixos de hemácias ($p=0,0084$), hemoglobina ($p<0,0001$), hematócrito ($p<0,0001$), neutrófilos ($p=0,0029$) e plaquetas ($p=0,035$) quando comparado aos pacientes sem LV (tabela 01).

TABELA 1 Características demográficas e hematológicas de pacientes com LV e controles não saudáveis

Características	Sem L.V. (n=12)	Com L.V. (n=29)	Valor p [#]
Idade			0,1281
n (%)			
< 1	1 (8,33)	7 (24,14)	
1 < 20	2 (16,67)	12 (41,38)	
20 < 40	5 (41,67)	5 (17,24)	
> 40	4 (33,33)	5 (17,24)	
Gênero			0,7231
n (%)			
Male	8 (73,73)	20 (64,51)	
Dados hematológicos			
(Média ±SD)			
RBC (milhões/mm ³)	4,06 (0,24)	3,25 (0,14)	0,0058
Hemoglobina (g/dL)	11,08 (0,76)	7,69 (0,34)	< 0,0001
Hematócrito (%)	31,33 (1,08)	23,70 (1,11)	0,0005
Neutrófilos (cells/mm ³)	2332 (512)	968 (173,2)	0,0029
Monócitos (cells/mm ³)	365,4 (68,55)	295,0 (59,75)	0,5325
Linfócitos (cells/mm ³)	1769 (583,3)	2464 (450,4)	0,4287
Plaquetas (/mm ³)	268733 (68056)	131152 (28238)	0,0340

[#]teste qui-quadrado

5.1.3 Análise das subpopulações de leucócitos na LV em pacientes com LV

Após análise por imunofenotipagem, não foi possível registrar diferença significativa quanto ao número de neutrófilos ($p=0,45$), T CD8 ($p=0,53$), monócitos ($p=0,26$) e linfócitos B ($p=0,29$) na medula óssea entre os grupos com LV e o controle (sem LV). No entanto, pacientes com LV apresentaram um número maior de linfócitos T CD4⁺ na medula óssea ($p=0,05$) (figura 3-A).

No sangue periférico, pacientes com LV apresentaram número significativamente maior de linfócitos B ($p=0,002$), T CD4 ($p=0,05$) e um número significativamente menor de neutrófilos ($p=0,016$) em comparação ao grupo controle. Com relação aos monócitos ($p=0,515$) e linfócitos T CD8 ($p=0,811$), não foi registrada diferença significativa quando comparado ao controle (figura 3-B).

Os valores mínimo e máximo dos leucócitos (células/mm³) de pacientes com LV, a média±DP e a mediana na medula óssea e no sangue periférico estão apresentados no apêndice desta tese nas tabelas 5-A e 6-A.

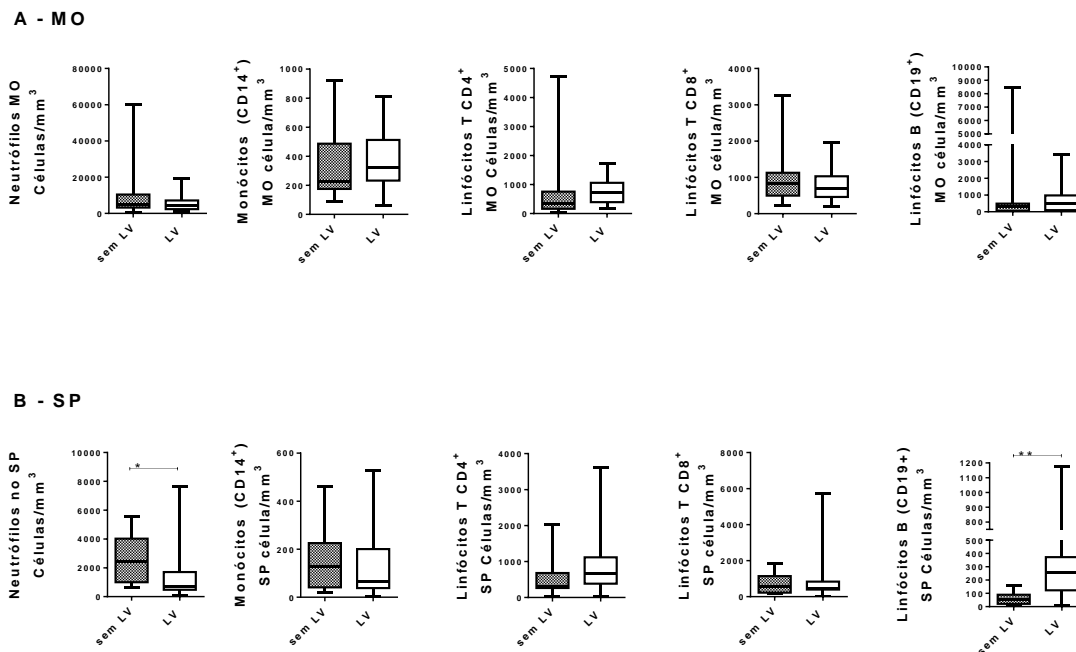


FIGURA 3 Leucócitos (células/mm³) na (A) medula óssea e no (B) sangue periférico de pacientes com LV e sem LV (grupo controle). As amostras foram analisadas por citometria de fluxo para fenotipagem das subpopulações de leucócitos. O número de pacientes incluídos em cada análise está representado da seguinte maneira: tipo celular (sem pacientes com LV/LV). (A) Neutrófilos MO (10/26), monócitos MO (11/27), linfócitos T CD4⁺ MO (12/25), linfócitos T CD8⁺ MO (12/25) e linfócitos B MO (10/26). (B) Neutrófilos SP (10/28), monócitos SP (10/29), linfócitos T CD4⁺ SP (10/29), linfócitos T CD8⁺ SP (10/29) e linfócitos B SP (10/29). O teste estatístico utilizado para comparar os grupos foi Mann-whitney.

*p<0,05

**p<0,01

5.1.4 Expressão intracelular de IL-6, CXCL-8, IL-10, INF γ e TNF α em subpopulações de leucócitos presentes na medula óssea e no sangue periférico de pacientes com LV e controles

Pacientes com LV apresentaram uma maior expressão de IL-6 pelos linfócitos B ($p=0,006$) (figura 4-A5), T CD8⁺ ($p=0,004$) (figura 4-A4), T CD4⁺ ($p=0,002$) (figura 4-A3) e monócitos ($p=0,01$) (figura 4-A2) no sangue periférico quando comparado ao controle. Os neutrófilos ($p=0,22$) no sangue periférico de pacientes com LV não apresentaram um aumento na expressão de IL-6 quando comparado aos pacientes sem LV.

Na medula óssea, linfócitos T CD4⁺ ($p=0,0074$) (figura 4-A3) de pacientes com LV apresentaram uma expressão significativa de IL-6 quando comparado ao grupo controle. Linfócitos B ($p=0,57$) (figura 4-A5) e neutrófilos ($p=0,33$) (figura 4-A1) não apresentaram aumento significativo na expressão de IL-6 quando comparado ao grupo controle. No entanto, os dados sugerem que possivelmente há um aumento da expressão de IL-6 por T CD8⁺ ($p=0,09$) (figura 4-A4) e uma diminuição da expressão de IL-6 em monócitos ($p=0,08$) (figura 4-A2) quando comparado aos controles.

Ao comparar sangue periférico e medula óssea, pacientes com LV apresentaram uma maior expressão de IL-6 por neutrófilos ($p<0,0001$), monócitos ($p=0,01$), linfócitos T CD4 ($p=0,02$), T CD8 ($p<0,0001$) no sangue periférico. Para linfócitos B foi registrado um aumento na expressão de IL-6 na medula óssea ($p=0,05$). Pacientes sem LV apresentaram uma maior expressão de IL-6 apenas pelos neutrófilos no sangue periférico ($p=0,008$), assim como T CD8 ($p=0,08$). Não foi registrada diferença significativa para linfócitos T CD4 e monócitos. Os linfócitos B ($p=0,06$) tendem a aumentar a expressão de IL-6 na medula óssea.

~~A análise intracelular por imunofenotipagem permitiu registrar que~~ pacientes com LV apresentam um aumento significativo na expressão de IL-10 apenas pelos monócitos no sangue periférico ($p=0,02$) (figura 5-B2) quando comparado ao controle. Linfócitos B ($p=0,95$) (figura 5-B5), T CD8 ($p=0,50$) (figura 5-B4), T CD4 ($p=0,34$) (figura 5-B3) não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle. Os neutrófilos provavelmente ($p=0,08$) (figura 5-B1) expressam mais IL-10 no sangue periférico quando comparados aos controles. Na medula óssea, os linfócitos B ($p=0,014$) (figura 5-B5) de pacientes com LV apresentaram maior expressão de IL-10

quando comparado ao controle. Linfócitos T CD8 ($p=0,18$) (figura 5-B4), T CD4 ($p=0,12$) (figura 5-B2), monócitos ($p=0,17$) (figura 5-B2) e neutrófilos ($p=0,46$) (figura 5-B5) não apresentaram diferença significativa.

Os pacientes com LV apresentaram baixa expressão de CXCL-8, $\text{INF}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$ no sangue periférico e na medula óssea, como pode ser observado no apêndice, tabelas 9A e 10A, respectivamente.

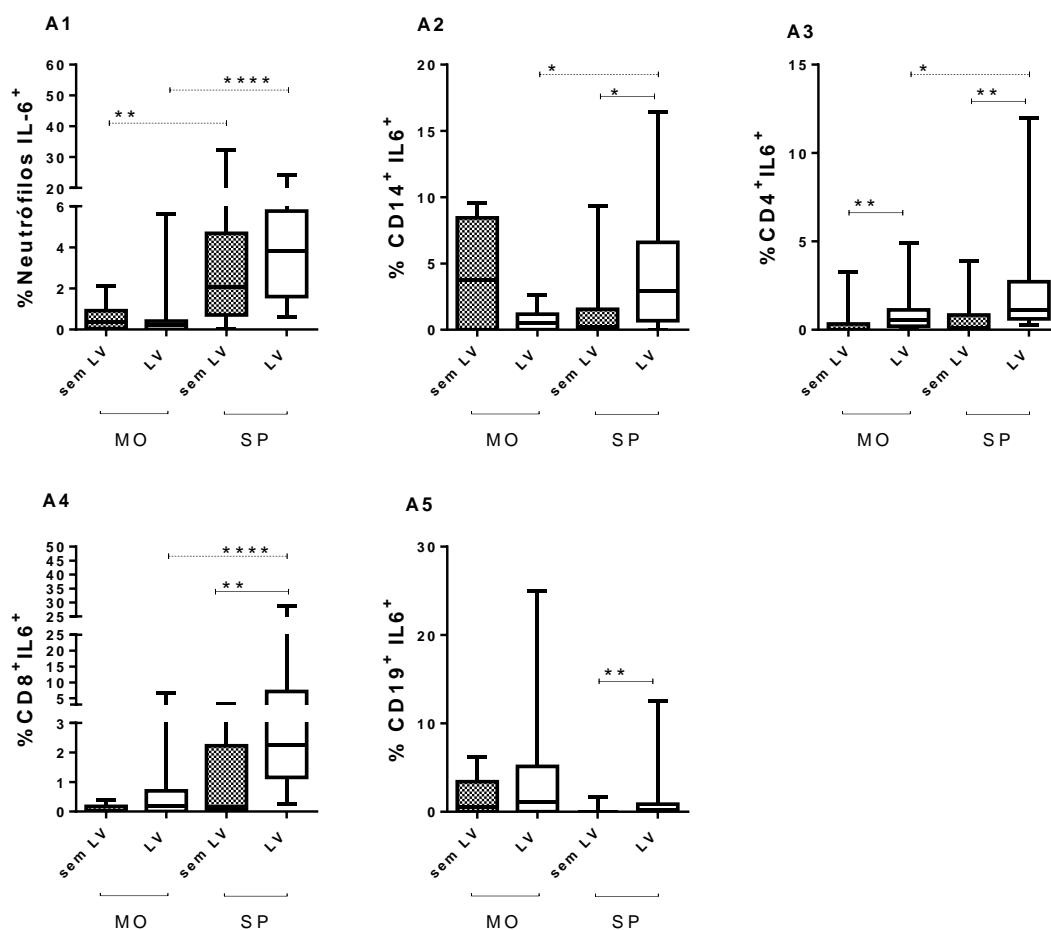


FIGURA 4 Expressão de IL-6 pelos leucócitos no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com LV comparados com o controle (sem LV). O número de pacientes incluídos em cada análise está representada da seguinte maneira: tipo celular (sem LV/LV). (A1) %neutrófilos IL6^+ SP (10/28) e %neutrófilos IL6^+ MO (10/23). (A2) % $\text{CD14}^+\text{IL6}^+$ SP (10/26) e % $\text{CD14}^+\text{IL6}^+$ MO (11/22). (A3) % $\text{CD4}^+\text{IL6}^+$ SP (10/29) e % $\text{CD4}^+\text{IL6}^+$ MO (12/25). (A4) % $\text{CD8}^+\text{IL6}^+$ SP (10/29) e % $\text{CD8}^+\text{IL6}^+$ MO (12/24). (A5) % $\text{CD19}^+\text{IL6}^+$ SP (10/29) e % $\text{CD19}^+\text{IL6}^+$ MO (10/23) (*). O teste estatístico utilizado para comparar os grupos foi Mann-Whitney e o teste Wilcoxon foi utilizado para comparar sangue periférico e medula óssea.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

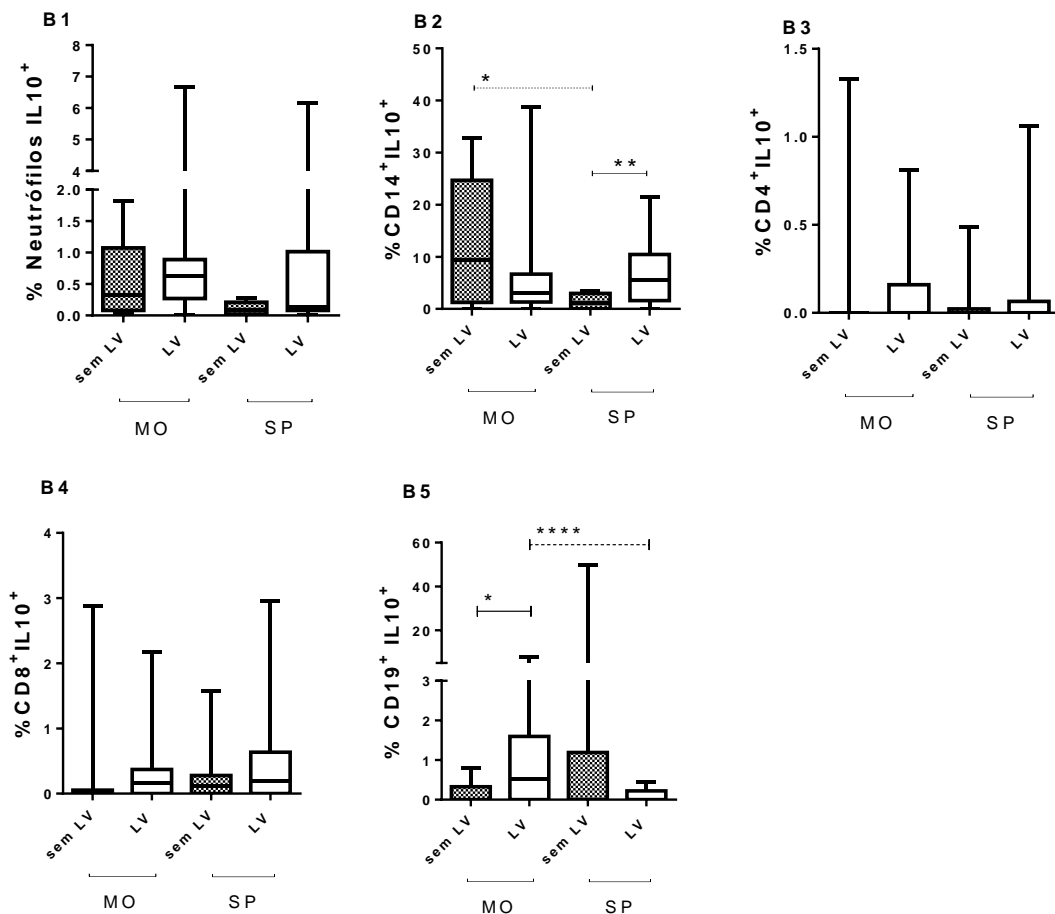


FIGURA 5 Expressão de IL-10 pelos leucócitos no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com LV comparados com o controle (sem LV).. A O número de pacientes incluídos em cada análise está representado da seguinte maneira: tipo celular (sem LV/LV). (B1) %neutrófilos IL10⁺SP (10/29) e %neutrófilos IL10⁺MO (10/27). (B2) %CD14⁺IL10⁺SP (10/29) e %CD14⁺IL10⁺ MO (11/26). (B3) %CD4⁺IL10⁺SP (10/29) e %CD4⁺IL10⁺MO (12/26). (B4) %CD8⁺IL10⁺SP (10/29) e %CD8⁺IL10⁺MO (12/26). (B5) %CD19⁺IL10⁺SP (10/29) e %CD19⁺IL10⁺MO (10/25). O teste estatístico utilizado para comparar os grupos foi Mann-Whitney e o teste Wilcoxon foi utilizado para comparar sangue periférico e medula óssea

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

**** $p < 0,0001$

5.1.5 Análise das citocinas circulantes no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com LV e controles não saudáveis

O sangue periférico pacientes com LV apresentam níveis significativamente mais elevados de IL-6 ($p=0,025$) (figura 6-A1) e IL-10 ($p=0,0006$) quando comparado com o grupo controle (figura 6-A3). Não foram registrados valores significativos para CXCL8 ($p=0,30$) (figura 6-A2), TNF α ($p=0,11$) (figura 6-A5), IL-1 β ($p=0,11$) (figura 6-A6) e IL-12 ($p=0,63$) (figura 6-A7) no sangue periférico de pacientes com LV quando comparado ao controle. Provavelmente INF γ ($p=0,06$) (figura 6-A4) apresenta níveis mais elevados no sangue periférico de pacientes com LV quando comparado aos controles não saudáveis.

Os níveis de IL-6 ($p=0,0026$) (figura 6-A1), IL-10 ($p=0,0003$) (figura 6-A3), INF γ ($p=0,0017$) (figura 6-A4), TNF α ($p=0,014$) (figura 6-A5) e IL-1 β ($p=0,0084$) (figura 6-A6) na medula óssea estão significativamente mais elevados em pacientes com LV quando comparados aos controles. Não foi registrada diferença significativa para CXCL-8 ($p=0,76$) (figura 6-A2) e IL-12 ($p=0,26$) (figura 6-A7) quando comparado ao controle. As células analisadas apresentaram uma baixa expressão de INF γ , CXCL-8 e TNF α no sangue periférico e na medula óssea (dados não apresentados).

A comparação estabelecida, em um mesmo grupo, entre o sangue periférico e a medula óssea permitiu registrar que a concentração de CXCL8 é significativamente maior na medula óssea de pacientes dos grupos controle ($p=0,032$) e LV ($p=0,0006$) (Figura 6-A2). Em pacientes com LV observou-se também níveis mais elevados de IL-1 β ($p=0,004$) (figura 6-A6), IL-12 ($p=0,007$) (figura 6-A7) na medula óssea quando comparado ao sangue periférico. No entanto IL-6 ($p=0,89$) (figura 6-A1), IL-10 ($p=0,35$) (figura 6-A3) e INF γ ($p=0,303$) (figura 6-A4) não apresentaram diferença significativa. Na medula óssea de pacientes sem LV, os níveis de IL-6 ($p=0,563$), IL-10 ($p=0,844$), INF γ ($p=0,688$), TNF α ($p=0,625$), IL-1 β ($p=0,219$) e IL-12 ($p=0,875$) não apresentaram diferença significativa quando comparado ao sangue periférico.

Os valores mínimo e máximo, média \pm DP e mediana da concentração das citocinas circulantes de pacientes com LV e controles não saudáveis, registrados na medula óssea (tabela 8A) e no sangue periférico (tabela 7A) estão apresentados no apêndice desta tese.

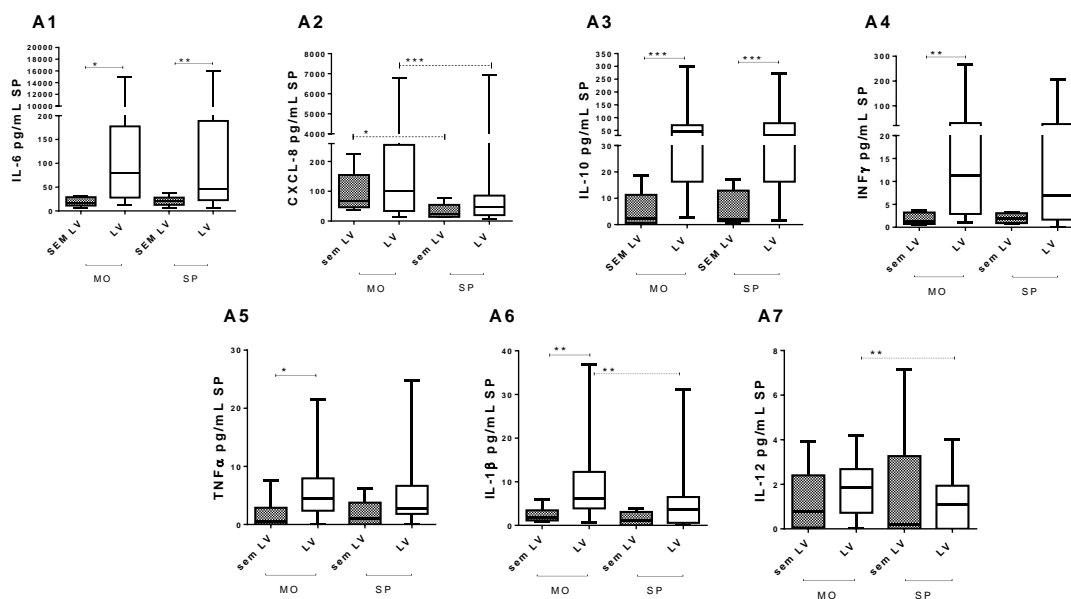


FIGURA 6 (A) Níveis de citocinas circulantes em pacientes com LV na medula óssea e no sangue periférico. (A1) IL-6. (A2) CXCL-8. (A3) IL-10, (A4) $\text{INF}\gamma$. (A5) $\text{TNF}\alpha$. (A6) $\text{IL-1}\beta$. (A7) IL-12. Pacientes sem LV foram utilizados como controle. A amostra do grupo controle apresenta 6 pacientes. O grupo LV apresenta 25 pacientes para todas citocinas, com exceção da $\text{INF}\gamma$ com 24 pacientes. Para a comparação dos níveis de citocinas livres entre o sangue periférico e a medula óssea foi utilizado o teste estatístico Wilcoxon, valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. Para o grupo LV foram incluídos 25 pacientes, com exceção de $\text{INF}\gamma$ e IL-12 com 24 pacientes. Para o grupo controle (sem LV) $n=6$. O teste estatístico utilizado foi Mann-Whitney para comparação entre os grupos.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

5.1.6 Correlação entre os níveis de citocinas circulantes nos compartimentos sangue periférico e medula óssea de pacientes com LV e controles não saudáveis

Na tentativa de determinar se órgãos parasitados, tais como a medula óssea, podem contribuir com os níveis elevados das citocinas plasmáticas em pacientes com LV, foi possível registrar que IL-12 foi a única citocina que não apresentou correlação entre o sangue periférico e a medula óssea (tabela 2). Com relação aos pacientes do grupo controle, provavelmente CXCL8 ($p=0,058$) apresenta correlação entre os dois compartimentos (tabela 2), no entanto em razão do pequeno numero de pacientes no

grupo sem LV não é possível excluir que as outras citocinas apresentem correlação significativa.

TABELA 2 Correlação entre a concentração de citocinas no sangue periférico e na medula óssea de pacientes LV e controles.

Sem LV (n=6)	C. de Spearman [#]	Valor de <i>p</i>	LV (n=24)	C. de Spearman	Valor de <i>p</i>
IL-6	0,37	0,50	IL-6	0,61	0,001**
CXCL8	0,83	0,058	CXCL8	0,63	0,001**
IL-10	0,77	0,10	IL-10	0,62	0,001**
INFγ	-0,26	0,66	INFγ	0,93	6.8x10 ¹¹ ****
TNFα	0,72	0,12	TNFα	0,43	0,03*
IL-1β	0,64	0,20	IL-1β	0,47	0,02*
IL-12	0,75	0,11	IL-12	0,30	0,15

[#]Coefficiente de correlação de Spearman. Valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5.1.7 Correlação entre a expressão de citocinas pelos leucócitos e os níveis de citocinas circulantes de pacientes com LV

Em pacientes com LV, apenas os linfócitos T CD4 ($p=0,002$; $R_s=0,39$) (figura 7B) e T CD8 ($p \leq 0,0001$; $R_s=0,55$) (figura 7-A) contribuíram com os níveis de IL-6 circulantes no sangue periférico, porque foi possível observar correlação significativa entre expressão de citocinas por essas células e IL-6 circulante. Não houve correlação significativa entre expressão de IL-10, INF γ , TNF α e CXCL8 pelos leucócitos e as respectivas citocinas circulantes (dados estão apresentados nas figuras 20A, 21A, 22A e 23A no apêndice desta tese).

Na medula óssea de pacientes com LV não foi possível registrar correlação entre a expressão de IL-6, CXCL8, IL-10, INF γ e TNF α pelos leucócitos e os níveis das respectivas citocinas circulantes no sobrenadante da medula óssea (dados estão apresentados nas figuras 24A, 25A, 26A, 27A e 28A no apêndice desta tese).

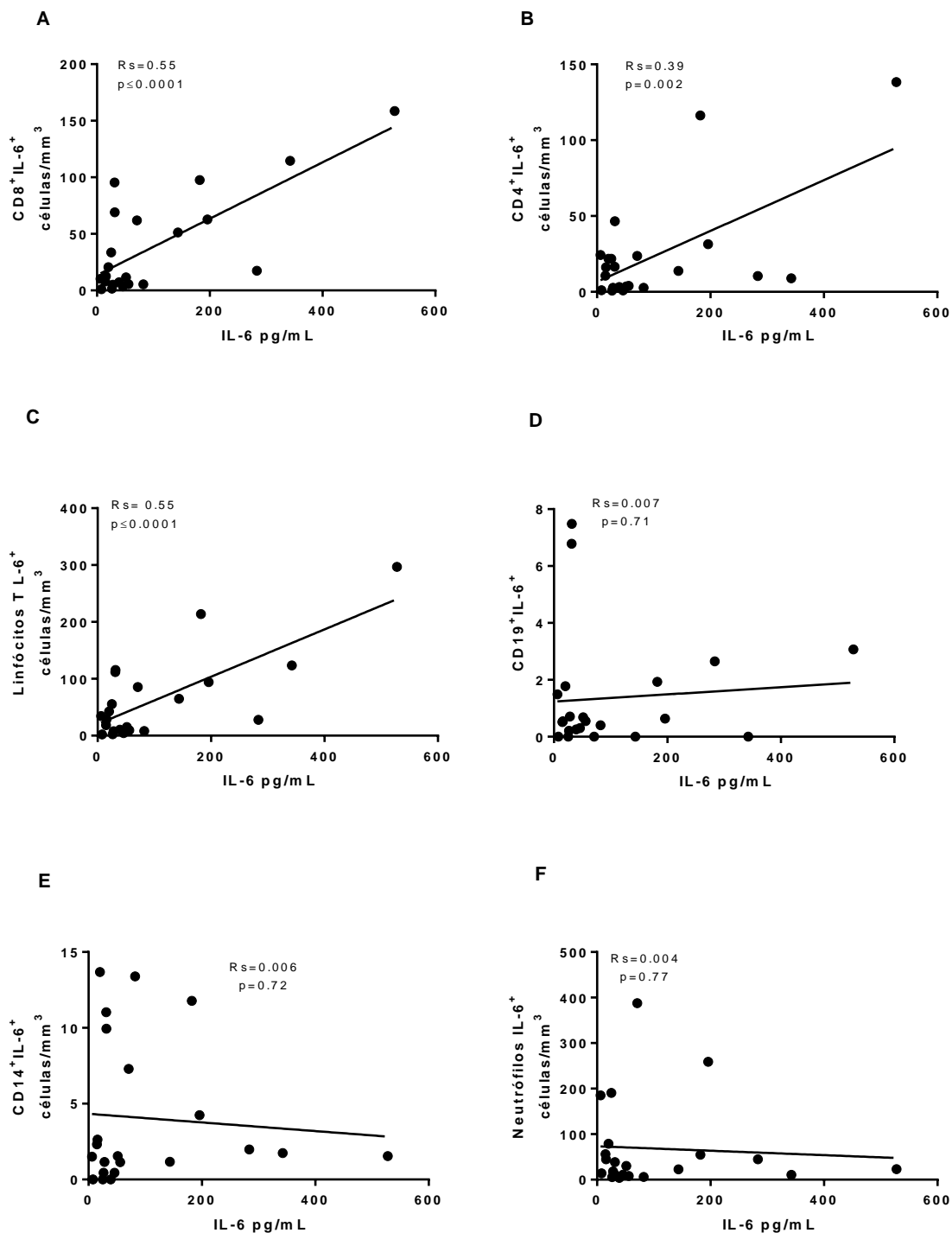


FIGURA 7 Correlação entre a expressão de IL-6 pelos leucócitos (células/mm³) no sangue periférico e níveis de IL-6 plasmática (pg/mL). (A) CD8⁺IL6⁺ X IL6. (B) CD4⁺IL6⁺ X IL6. (C) soma dos linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺ expressando IL-6) x IL6. (D) CD19⁺IL6⁺ X IL6. (E) CD14⁺IL6⁺ X IL6. (F) neutrófilos IL6⁺ X IL6. O teste estatístico utilizado foi regressão linear simples e n=22.

5.1.7.1 Correlação da expressão de citocinas por leucócitos no sangue periférico e na medula óssea.

Visando estimar se as células apresentam comportamento semelhante no sangue periférico e na medula óssea no que diz respeito a expressão das citocinas IL-6, IL-10, TNF α e INF γ , os dois compartimentos foram correlacionados quanto a porcentagem de expressão dessas citocinas pelas células. Não foi registrada correlação significativa entre as células T CD8⁺IL6⁺ (Rs=0,02; $p=0,55$), T CD4⁺IL6⁺ (Rs=0,004; $p=0,78$), neutrófilos IL6⁺ (Rs=0,18; $p=0,06$), CD19⁺IL6⁺ (Rs=0,03; $p=0,47$), CD14⁺IL6⁺ (Rs=0,015; $p=0,59$) (figura 29A do apêndice).

Com relação a IL-10, foi possível registrar correlação apenas entre a expressão de IL-10 pelos neutrófilos ($p=0,0003$; Rs=0,48) no sangue periférico e na medula óssea (Figura 8). A correlação entre a porcentagem de expressão de INF γ por linfócitos B ($p=0,002$; Rs=0,39) e T CD4 ($p=0,0002$; Rs=0,49) nos dois compartimentos foi significativa (Figura 9). Não foi possível registrar correlação entre a expressão de TNF α no sangue periférico e na medula óssea (figura 30A do apêndice).

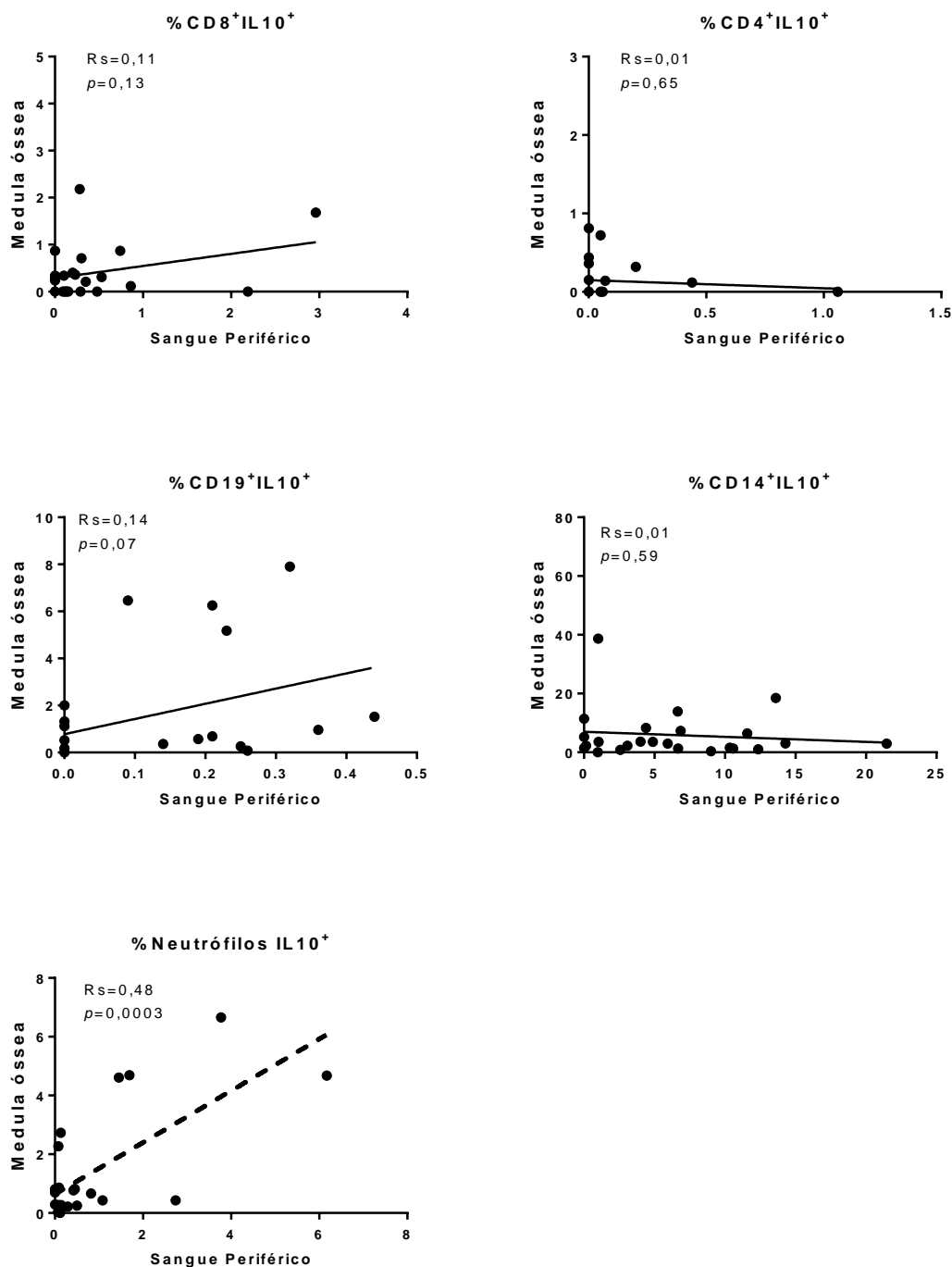


FIGURA 8 Correlação entre a expressão de IL-10 entre as células presentes no sangue periférico e na medula óssea. %CD8⁺IL10⁺ (n=22), %CD4⁺IL10⁺ (n=22), %CD19⁺IL10⁺ (n=23), %CD14⁺IL10⁺ (n=24) e %Neutrófilos IL10⁺ (n=23). O teste estatístico utilizado foi regressão linear simples.

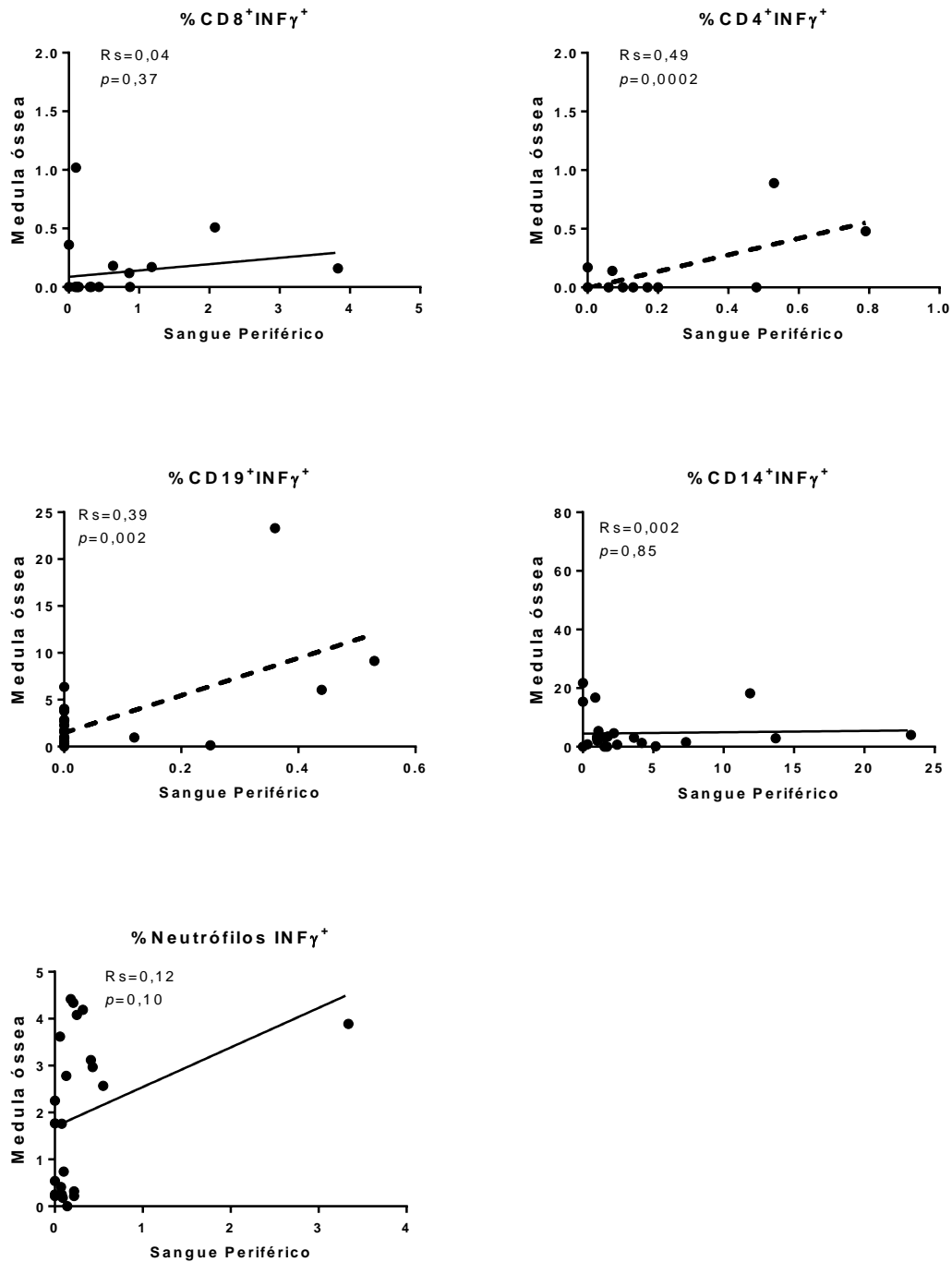


FIGURA 9 Correlação entre a expressão de INF γ entre as células presentes no sangue periférico e na medula óssea. %CD8+INF γ + (n=22), %CD4+ INF γ + (n=22), %CD19+ INF γ + (n=23), %CD14+ INF γ + (n=24) e %Neutrófilos INF γ + (n=23). O teste estatístico utilizado foi regressão linear simples.

SEÇÃO II

5.2 - Gravidade associada a LV

5.2.1 Probabilidade de morte dos pacientes com LV

O quadro clínico dos pacientes e o cálculo da probabilidade de morte foram descritos na tabela 3. +

TABELA 3 Probabilidade de morte dos pacientes com LV.

Pacientes LV	P (morte)[#] (%)
6200	0,3
6159	0,3
6160	0,3
6277	0,3
6150	0,1
6174	0,1
6209	0,1
6138	7,8
6194	0,7
6233	0,3
6173	1,1
6162	1,6
6182	1,6
6278	1,6
6213	6,5
6144	3,6
6148	3,6
6157	3,6
6193	3,6
6176	7,6
6210	1,6
6245	1,1
6170	15,4
6178	7,6
6166	24,0
6169	45,2
6205	48,8

[#]Probabilidade de morte foi calculada utilizando o programa *Kala-cal*® (<http://sbmt.org.br/kalacal/>).

5.2.2 Citocinas circulantes no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com LV com maior e menor gravidade

5.2.2.1 Medula óssea

Na presente pesquisa foram considerados com maior gravidade os pacientes com probabilidade de morte acima de 15% (n=4). Desta forma, ao comparar pacientes com maior e menor gravidade na medula óssea foi possível registrar que pacientes menos graves apresentam níveis significativamente mais elevados de IL-10 ($p=0,01$) (figura 10-A3). Provavelmente, pacientes com maior gravidade apresentem níveis mais elevados de IL-6 ($p=0,19$) e CXCL-8 ($p=0,08$) (figura 10 A1-A2), e níveis mais baixos de IL-12 ($p=0,17$) (figura 10A7). Não foi registrada diferença significativa para $\text{INF}\gamma$ ($p=0,62$), $\text{TNF}\alpha$ ($p=0,83$) e IL-1 β ($p=0,89$) (figura 10 A4-A6).

5.2.2.2 Sangue periférico

No sangue periférico, pacientes com PM acima de 15% (n=4) considerados com maior gravidade, apresentaram níveis significativamente mais elevados de IL-6 ($p=0,03$) e CXCL8 ($p=0,04$) (figura 10 A1-A2). Não foi registrada diferença significativa para IL-10 ($p=0,91$), $\text{INF}\gamma$ ($p>0,99$), $\text{TNF}\alpha$ ($p=0,37$), IL-1 β ($p=0,83$) e IL-12 ($p=0,19$) (figura 10 A3-A7).

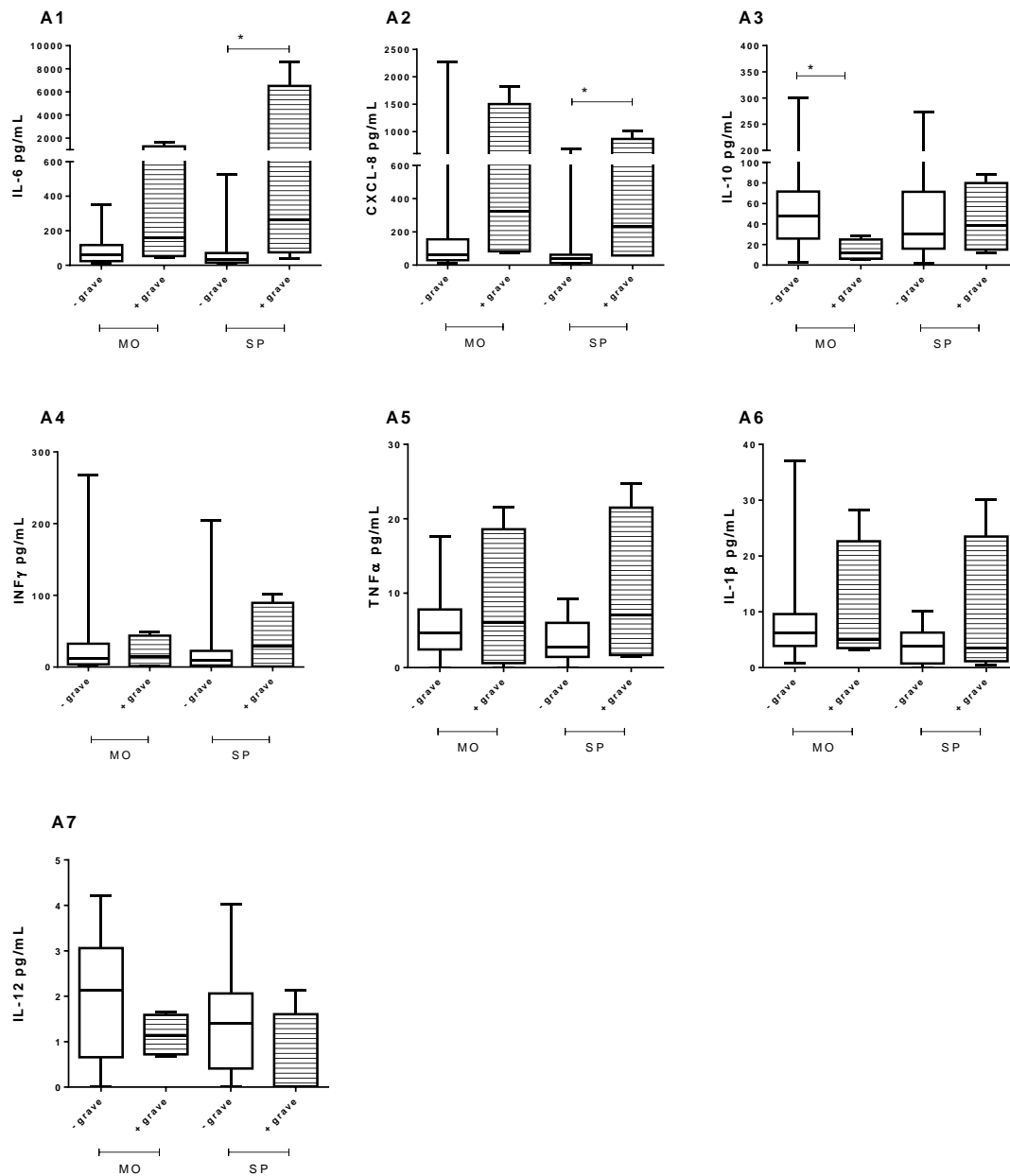


FIGURA 10 Associação entre os níveis de citocinas circulantes no sangue periférico e na medula óssea e a gravidade de pacientes com LV. Grupos +grave, com probabilidade de morte $\ge 15\%$, (n=4) e -grave, com probabilidade de morte $\le 15\%$, (n=23). O teste estatístico utilizado foi Mann-Whitney.

* $p < 0,05$

5.2.2.3 Perfil de expressão de citocinas na medula óssea

Pacientes com menor gravidade apresentaram significativamente um maior número de células CD14⁺IL6⁺ ($p=0,02$), neutrófilos IL10⁺ ($p=0,03$) e neutrófilos INF γ ⁺ ($p=0,04$). Não foi registrada associação entre CD8⁺IL6⁺ ($p=0,39$), CD4⁺IL6⁺ ($p=0,78$), CD19⁺IL6⁺ ($p=0,78$), neutrófilos IL6⁺ ($p=0,30$), CD14⁺IL8⁺ ($p=0,26$), CD19⁺IL8⁺ ($p=0,57$), CD8⁺IL10⁺ ($p=0,87$), CD4⁺IL10⁺ ($p=0,64$), CD14⁺IL10⁺ ($p=0,29$), CD19⁺IL10⁺ ($p=0,71$), CD8⁺INF γ ⁺ ($p=0,79$), CD4⁺INF γ ⁺ ($p=0,79$), CD14⁺INF γ ⁺ ($p=0,41$), CD19⁺INF γ ⁺ ($p>0,99$), CD8⁺TNF α ⁺ ($p>0,99$), CD4⁺TNF α ⁺ ($p>0,99$), CD14⁺TNF α ⁺ ($p=0,12$), CD19⁺TNF α ⁺ ($p=0,82$), neutrófilos TNF α ⁺ ($p=0,73$) e gravidade. Os dados estão apresentados na 32A no apêndice.

5.2.2.4 Perfil de expressão de citocinas no sangue periférico

No sangue periférico, pacientes com maior gravidade apresentaram um número significativamente maior de células CD8⁺IL6⁺ ($p=0,049$). Não foi registrada associação entre CD4⁺IL6⁺ ($p=0,30$), CD14⁺IL6⁺ ($p=0,44$), CD19⁺IL6⁺ ($p=0,63$), neutrófilos IL6⁺ ($p=0,77$), CD8⁺IL8⁺ ($p=0,08$), CD4⁺IL8⁺ ($p=0,26$), CD14⁺IL8⁺ ($p=0,74$), CD19⁺IL8⁺ ($p>0,99$), neutrófilos IL8⁺ ($p=0,61$), CD8⁺IL10⁺ ($p=0,72$), CD4⁺IL10⁺ ($p=0,41$), CD14⁺IL10⁺ ($p=0,92$), CD19⁺IL10⁺ ($p=0,59$), neutrófilos IL10⁺ ($p=0,46$), CD8⁺INF γ ⁺ ($p=0,91$), CD4⁺INF γ ⁺ ($p=0,75$), CD14⁺INF γ ⁺ ($p=0,30$), CD19⁺INF γ ⁺ ($p=0,92$), neutrófilos INF γ ⁺ ($p=0,76$), CD8⁺TNF α ⁺ ($p=0,70$), CD4⁺TNF α ⁺ ($p=0,95$), CD14⁺TNF α ⁺ ($p=0,22$), CD19⁺TNF α ⁺ ($p>0,99$), neutrófilos TNF α ⁺ ($p=0,75$) e gravidade. Os dados estão apresentados na 31A no apêndice.

5.2.2.5 Correlação entre citocinas circulantes e probabilidade de morte

Na tentativa de determinar se as citocinas plasmáticas estão correlacionadas com a probabilidade de morte foi possível observar que apenas os níveis de IL-6 no plasma ($R_s=0,45$; $p=0,0005$) (figura 11) e no sobrenadante da medula óssea ($R_s=0,44$; $p<0,0005$) (figura 12) apresentaram correlação positiva com a probabilidade de morte dos pacientes.

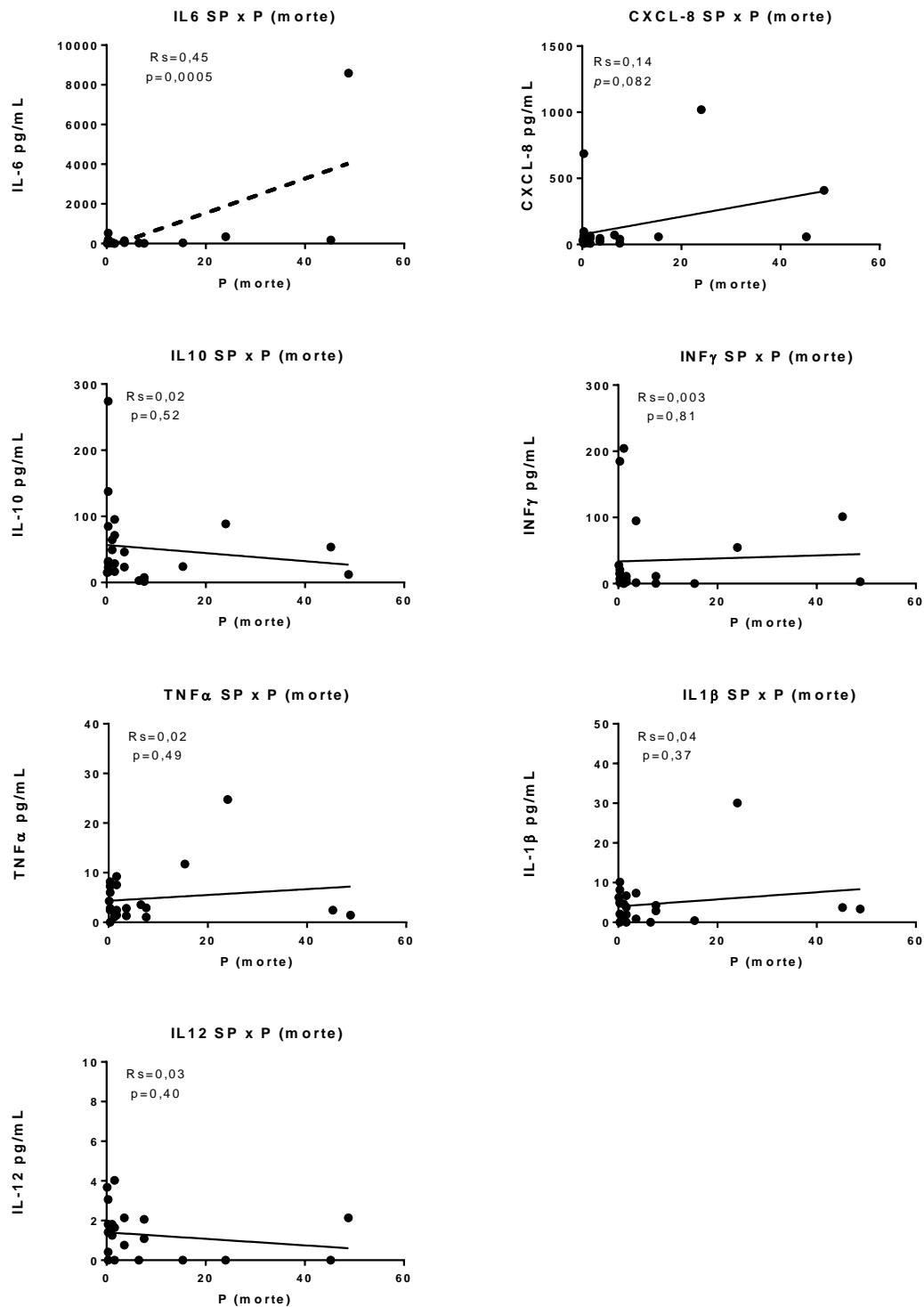


FIGURA 11 Correlação entre citocinas plasmáticas e a probabilidade de morte dos pacientes. IL-6 (n=23), CXCL-8 (n=23), IL-10 (n=23), INF γ (n=22), TNF α (n=23), IL1 β (n=23) e IL-12 (n=23). O teste estatístico utilizado foi regressão linear simples.

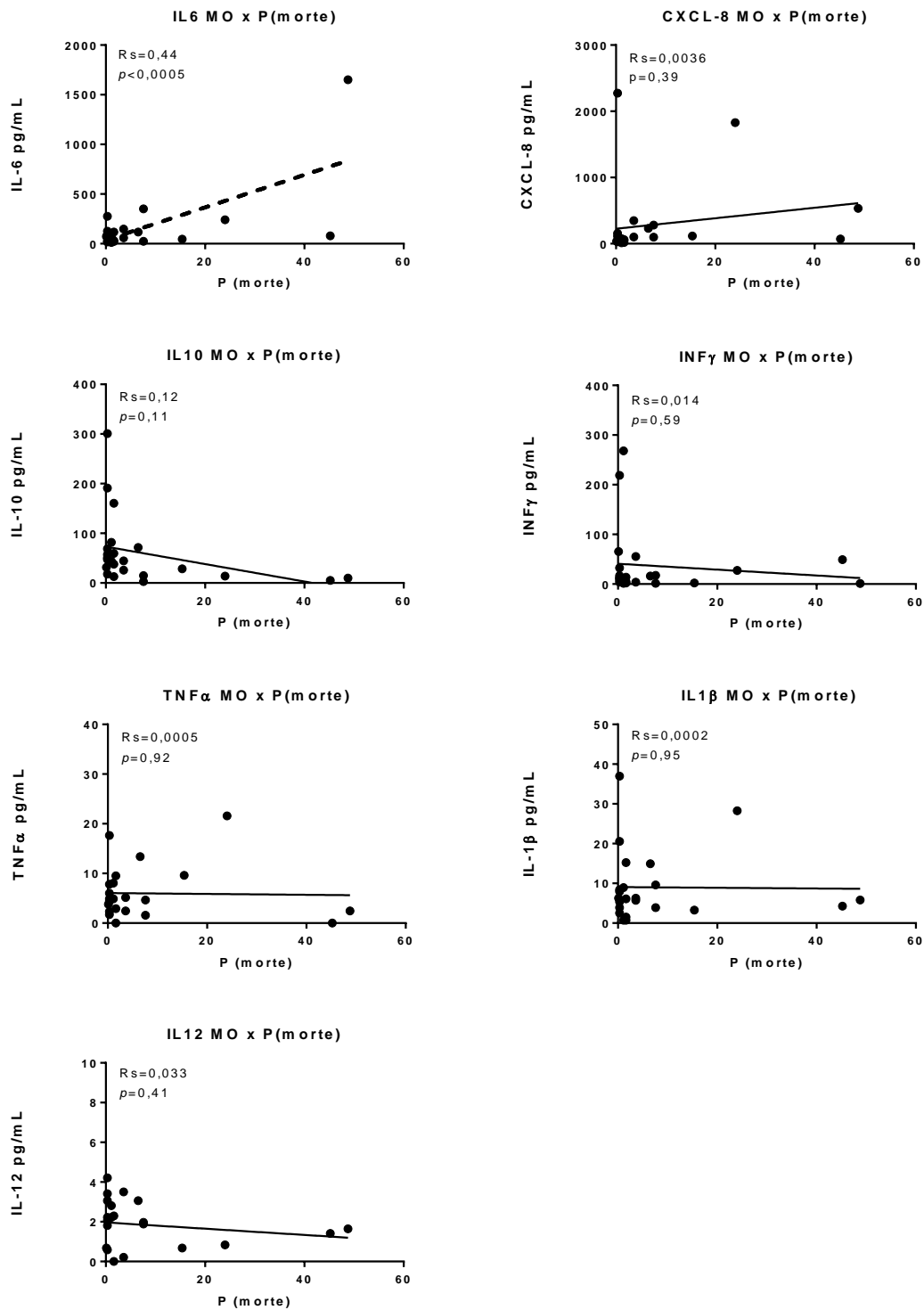


FIGURA 12 Correlação entre citocinas livres na medula óssea e probabilidade de morte. IL-6 (n=23), CXCL-8 (n=23), IL-10 (n=23), INF γ (n=23), TNF α (n=23), IL1 β (n=23) e IL-12 (n=22). O teste estatístico utilizado foi regressão linear simples.

5.2.2.6 Correlação entre a porcentagem de expressão de citocinas pelos leucócitos na medula óssea e no sangue periférico de pacientes com LV e a probabilidade de morte

Com a finalidade de tentar identificar se a expressão de citocinas pelos leucócitos pode ser um indicador de gravidade, foi realizada a correlação entre expressão de IL-6, CXCL8, IL-10, INF γ , TNF α pelos leucócitos no sangue periférico com a probabilidade de morte. Apenas a porcentagem de expressão de IL-6 por linfócitos T CD4 ($R_s = 0.29$; $p = 0.0036$) e T CD8 ($R_s = 0.68$; $p < 0.0001$) no sangue periférico (figura 13) apresentou correlação com a probabilidade de morte.

A correlação entre a expressão de CXCL-8 (figura 33A e 38A), IL-10 (figura 33A e 39A), INF γ (figura 35A e 40A), TNF α (figura 36A e 41A) pelos leucócitos e as citocinas circulantes no sangue periférico e medula óssea estão apresentados no apêndice.

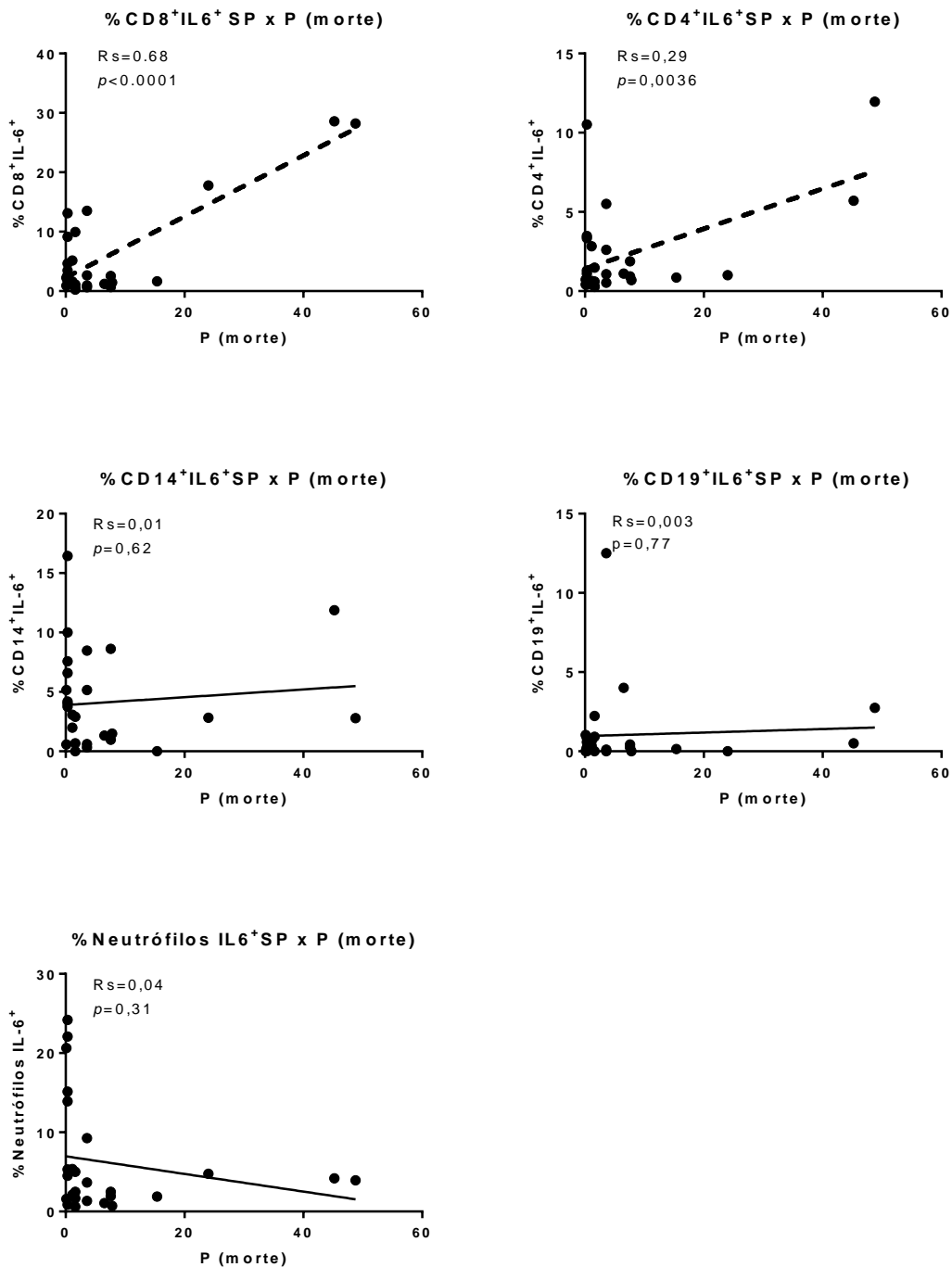


FIGURA 13 Correlação entre porcentagem de expressão de IL-6 pelos leucócitos no sangue periférico e probabilidade de morte. Para todas as análises foram incluídos 27 pacientes, com exceção de %neutrófilos IL6⁺ com n=26. O teste estatístico utilizado foi regressão linear simples.

Seção III

5.3 - Pacientes infectados com *Leishmania* e HIV

5.3.1 Características da população de estudo

Nesse estudo 12 pacientes com LV, maiores de 20 anos, foram incluídos como controle para descrever as diferenças existentes com os pacientes com LV/HIV.

O hemograma de pacientes coinfectados sugere que apresentam uma neutropenia mais intensa e um aumento na contagem de monócitos e uma redução linfócitos (tabela 4).

TABELA 4 Características demográficas e hematológicas dos pacientes com LV e coinfectados por *Leishmania*/HIV.

Características [#]	L.V.+H.I.V (n=12)	L.V. (n=12)	Valor p
Idade n (%)			0,3226
20 < 40	9 (75)	4 (33,33)	
> 40	3 (25)	7 (58,33)	
Genero n (%)			0,5901
Masculino	9 (81,81)	11 (91,66)	
Dados hematológicos (Média ±SD)			
RBC (milhões/mm ³)	2,76 (0,26)	2,997 (0,28)	0,5380
Hemoglobina (g/dL)	7,28 (0,54)	7,86 (0,76)	0,5313
Hematócrito (%)	22,27 (1,84)	24,4 (2,64)	0,5101
Neutrófilos (cells/mm ³)	1358 (483,7)	3944 (1603)	0,0980
Monócitos (cells/mm ³)	113,8 (27,7)	247,1 (108,5)	0,1919
Linfócitos (cells/mm ³)	990,1 (208,4)	2297 (952,8)	0,1988
Plaquetas (/mm ³)	121800 (29760)	133789 (46126)	0,8262

Teste qui-quadrado.

5.3.2 Análise das subpopulações de leucócitos em pacientes infectados com *Leishmania* e HIV

Após análise por imunofenotipagem, foi possível registrar uma redução significativa dos linfócitos T CD4 na medula óssea ($p=0,02$) e no sangue periférico ($p=0,0003$) de pacientes com LV coinfectados com HIV (figura 14 A3, A4).

Na medula óssea, não foi possível registrar nesse estudo diferença significativa para neutrófilos ($p=0,33$), linfócitos T CD8 ($p=0,22$), monócitos ($p=0,94$), linfócitos B ($p=0,71$) entre pacientes com LV e coinfectados (figura 14 A1, A2, A4 e A5).

No sangue periférico, não foi registrada diferença significativa para monócitos ($p=0,64$), neutrófilos ($p=0,17$), linfócitos T CD8 ($p=0,64$) e linfócitos B ($p=0,93$) entre pacientes com LV e coinfectados (figura 14 B2, B4 e B5).

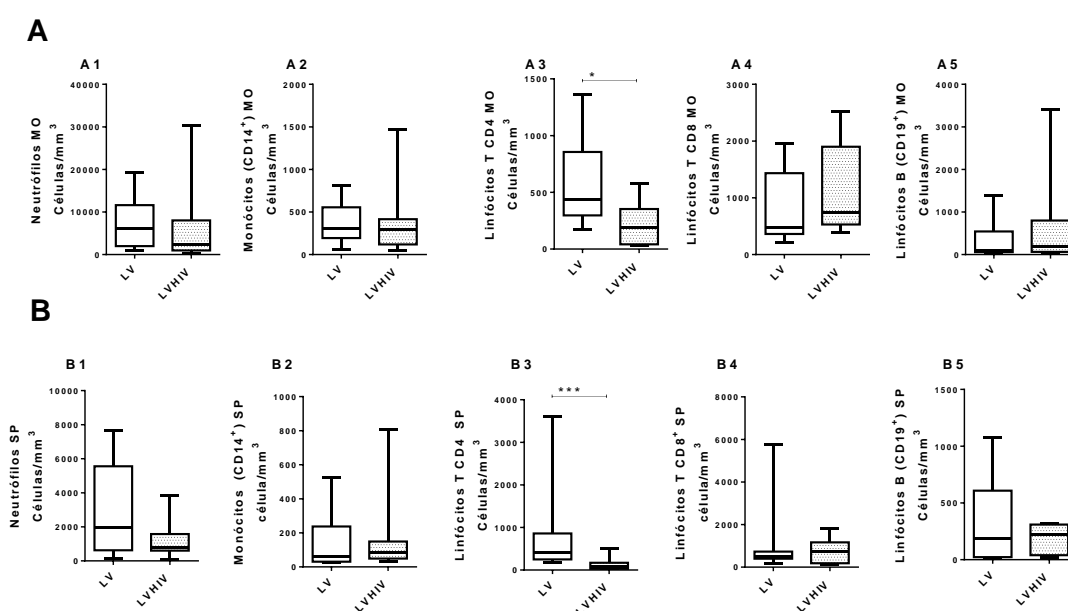


Figura 14 Comparação entre leucócitos (células/mm³) no (A) sangue periférico e na (B) medula óssea de pacientes com LV e co-infectados (LV+HIV) analisados por imunofenotipagem. O número de pacientes incluídos em cada análise está representado da seguinte maneira: tipo celular (LV/LV+HIV). (A) Neutrófilos SP (10/11), monócitos SP (11/11), linfócitos T CD4⁺ SP (11/11), linfócitos T CD8⁺ SP (11/11) e linfócitos B SP (11/11). (B) Neutrófilos MO (9/9) (B1), monócitos MO (10/9) (B2), linfócitos T CD4⁺ MO (9/9) (B3), linfócitos T CD8⁺ MO (9/9) (B4) e linfócitos B MO (11/9) (B5). O teste estatístico utilizado para comparar os grupos foi Mann-whitney.

* $p<0,05$

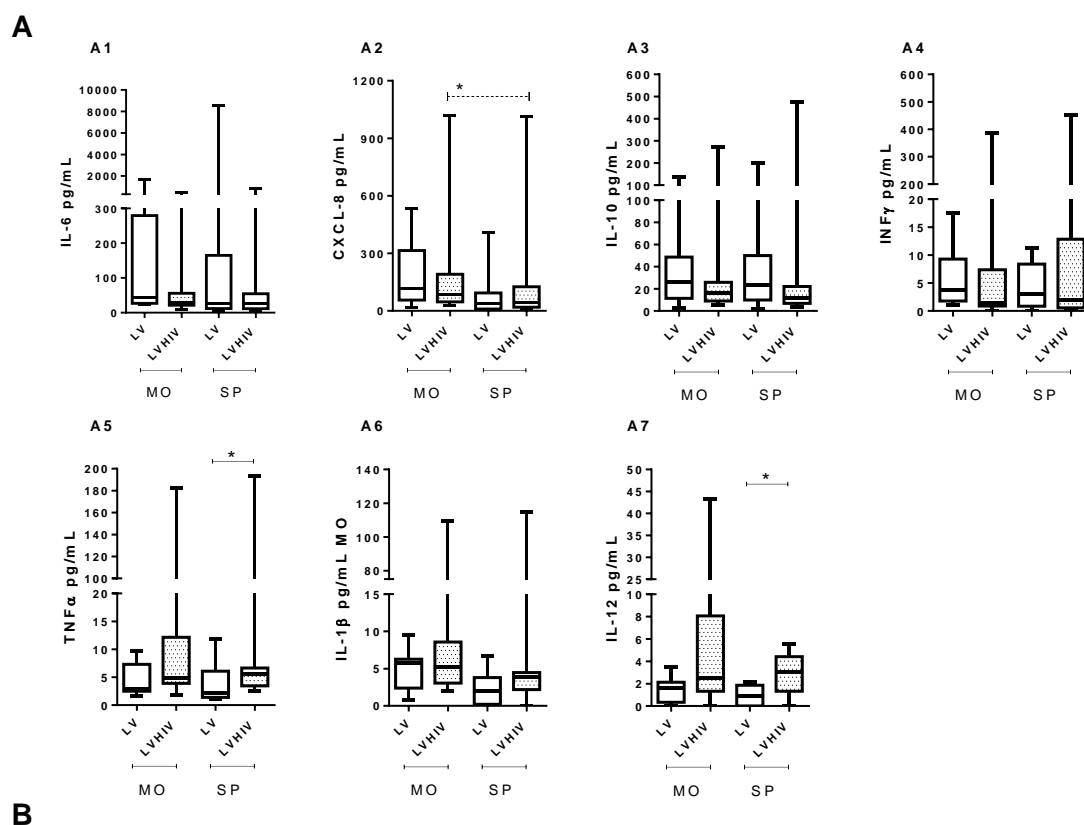
5.3.3 Citocinas circulantes na medula óssea e no sangue periférico de pacientes infectados com *Leishmania* e HIV.

Na medula óssea de pacientes com *Leishmania* e HIV não foi registrada diferença significativa entre os níveis de CXCL8 ($p=0,67$), IL-6 ($p=0,26$), INF γ ($p=0,21$), TNF α ($p=0,11$), IL-10 ($p=0,52$), IL-12 ($p=0,15$) e IL-1 β ($p=0,78$) (figura 15 A1 – A7) quando comparado aos pacientes com LV.

No sangue periférico de pacientes com *Leishmania* e HIV foi possível registrar um aumento significativo dos níveis de TNF α ($p=0,03$) e IL-12 ($p=0,02$) (figura 15 A5 e A7). Não foi registrada diferença significativa para IL-6 ($p=0,88$), IL-10 ($p=0,25$), IL-1 β ($p=0,14$), CXCL-8 ($p=0,54$) e INF γ ($p=0,51$) (figura 15 A1 - A4 e A6).

Ao comparar sangue periférico e medula óssea de pacientes com *Leishmania* e HIV foi possível registrar níveis significativamente mais elevados de CXCL-8 ($p=0,05$) (figura 15 A2) na medula óssea. Nesse estudo não foi possível registrar diferença significativa entre os níveis de IL-6 ($p=0,28$), IL-10 ($p>0,99$), INF γ ($p=0,56$), TNF α ($p=0,89$), IL-1 β ($p=0,37$) e IL-12 ($p=0,36$) no sangue periférico e na medula óssea (figura 15 A1 e A3- A7).

Existe correlação significativa entre os níveis de IL-6 ($p=0,03$) e INF γ ($p=0,01$) presentes no sangue periférico e na medula óssea. No entanto, não foi registrada correlação entre os níveis de TNF α ($p=0,71$), IL-12 ($p=0,73$), IL-1 β ($p=0,32$), CXCL-8 ($p=0,13$) e IL-10 ($p=0,21$).



Citocinas LVHIV	Coefficiente Spearman	Valor de <i>p</i>
IL-6	0,65	0,03
CXCL-8	0,49	0,13
IL-10	0,41	0,21
INF γ	0,78	0,01
TNF α	0,13	0,71
IL-1 β	0,33	0,32
IL-12	-0,11	0,73

FIGURA 15 Níveis de citocinas circulantes na medula óssea e no sangue periférico em pacientes com LV e LVHIV. (A) Os testes estatísticos utilizados foram Mann-Whitney e Wilcoxon. O número de pacientes incluídos nas análises no sangue periférico está representado da seguinte maneira: tipo celular (LV/*Leishmania*+HIV). IL-6 (9/12), CXCL-8 (9/12), IL-10 (9/12), INF γ (9/10), TNF α (9/12), IL-1 β (9/12), IL-12 (9/12). Na medula óssea as amostras foram IL-6 (9/11), CXCL-8 (9/11), IL-10 (9/11), INF γ (9/10), TNF α (9/11), IL-1 β (9/11), IL-12 (9/11). (B) Correlação entre as citocinas presentes no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com LVHIV. Teste estatístico utilizado foi a correlação de Spearman.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

5.3.4 Perfil de expressão intracelular de citocinas pelos leucócitos no sangue periférico de na medula óssea de pacientes infectados com *Leishmania* e HIV

5.3.4.1 Perfil de expressão de IL6

Na medula óssea de pacientes co-infectados, quando comparado ao de pacientes com LV, é possível registrar um aumento na porcentagem de expressão de IL-6 por linfócitos T CD4 ($p=0,10$) (figura 16 A3). Nesta pesquisa, não foi possível registrar diferença significativa na expressão de IL-6 em neutrófilos ($p=0,28$), monócitos ($p=0,76$), T CD8 ($p=0,89$) e linfócitos B ($p=0,61$) (figura 16 A1, A2, A4 e A5).

Os monócitos ($p=0,05$) presentes no sangue periférico de pacientes coinfectados expressam mais IL-6 e, possivelmente, os linfócitos T CD4 ($p=0,09$), quando comparado a de pacientes com LV (figura 16 A2 e A3). Nesta pesquisa, não foi possível registrar diferença significativa na expressão de IL-6 em neutrófilos ($p=0,34$), T CD8 ($p=0,64$) e linfócitos B ($p=0,79$) (figura 16 A2, A4 e A5).

Ao comparar sangue periférico e medula óssea de pacientes com LV e HIV foi possível registrar que neutrófilos ($p=0,003$) e linfócitos T CD8 ($p=0,008$) (figura 16 A1 e A4) expressam mais IL-6 no sangue periférico, provavelmente os linfócitos B expressam mais IL-6 na medula óssea ($p=0,06$) (figura 16 A5). Nessa pesquisa não foi registrada diferença significativa para monócitos ($p=0,74$) e linfócitos T CD4 ($p=0,20$) (figura 16 A2 e A3).

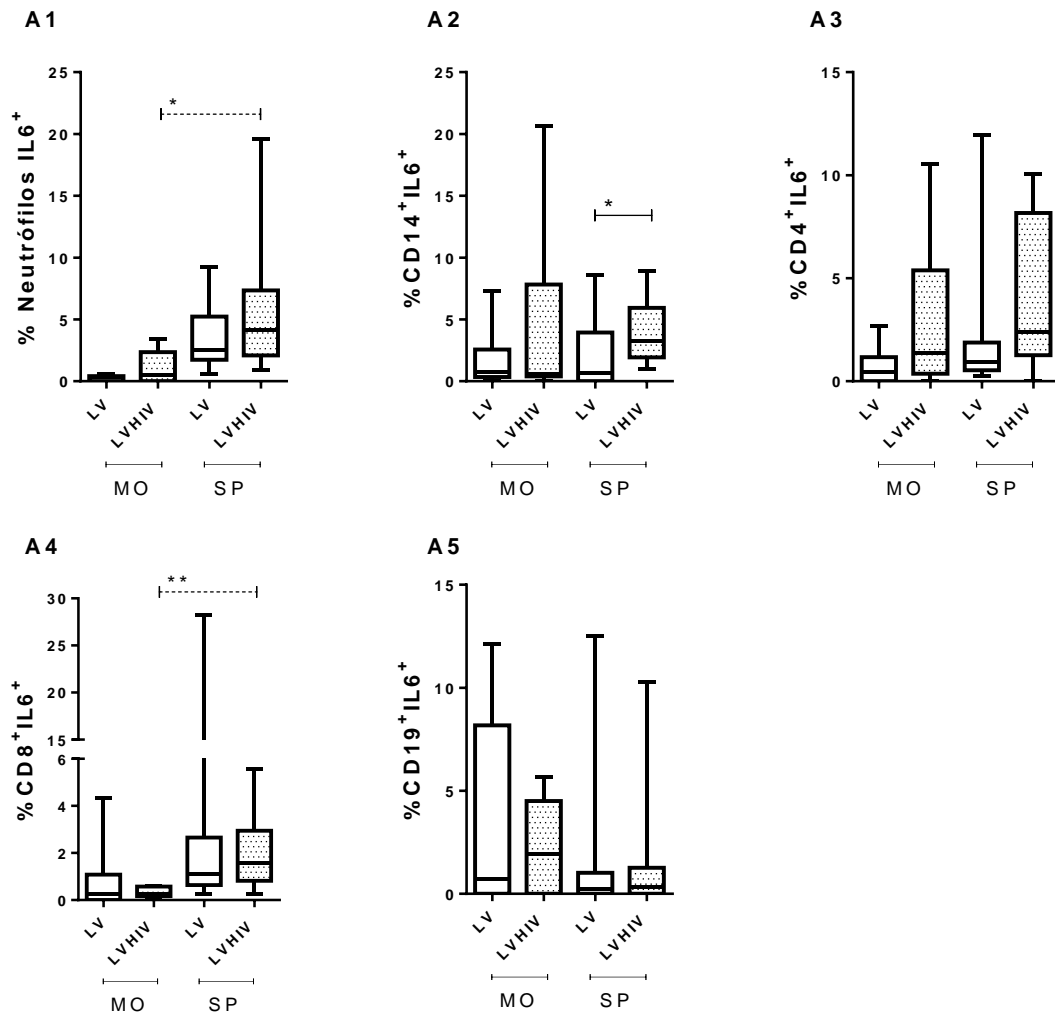


FIGURA 16 Expressão de IL-6 pelos leucócitos no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com LV e HIV comparados com pacientes com LV. O número de pacientes incluídos em cada análise está representada da seguinte maneira: tipo celular (LV+HIV/LV). (A1) %neutrófilosIL6⁺SP (10/12) e %neutrófilos IL6⁺MO (8/9). (A2) %CD14⁺IL6⁺ SP (12/11) e %CD14⁺IL6⁺ MO (8/10). (A3) %CD4⁺IL6⁺SP (12/11) e %CD4⁺IL6⁺ MO (9/9). (A4) %CD8⁺IL6⁺SP (12/11) e %CD8⁺IL6⁺ MO (9/8). (A5) %CD19⁺IL6⁺SP (12/11) e %CD19⁺IL6⁺ MO (8/9). Os testes estatísticos utilizados fora Mann-Whitney e Wilcoxon.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

5.3.4.2 Perfil de expressão de IL10

Na presente pesquisa, não foi possível registrar diferença significativa na expressão de IL-10 entre monócitos ($p=0,90$), linfócitos T CD4 ($p>0,99$), T CD8 ($p=0,71$) e linfócitos B ($p=0,79$) (figura 17 A2-A5) na medula óssea de pacientes coinfectados quando comparado ao de pacientes com LV. Provavelmente os neutrófilos de pacientes com LV e HIV expressam significativamente mais IL-10 ($p=0,10$) (figura 17 A1).

Não foi possível registrar diferença significativa na expressão de IL-10 entre neutrófilos ($p=0,42$), monócitos ($p=0,28$), linfócitos T CD4 ($p=0,81$), T CD8 ($p=0,46$) e linfócitos B ($p=0,16$) (figura 17 A1-A5) no sangue periférico de pacientes com LV e HIV, quando comparado ao de pacientes com LV.

Ao comparar sangue periférico e medula óssea foi possível observar que neutrófilos ($p=0,008$) e linfócitos B ($p=0,03$) (figura 17 A1 e A5) expressam mais IL-10 na medula óssea. Monócitos ($p=0,01$) expressam significativamente mais IL-10 no sangue periférico (figura 17 A2), provavelmente o mesmo seja observado para linfócitos T CD4 ($p=0,13$) e T CD8 ($p=0,07$) (figura 17 A3 e A4).

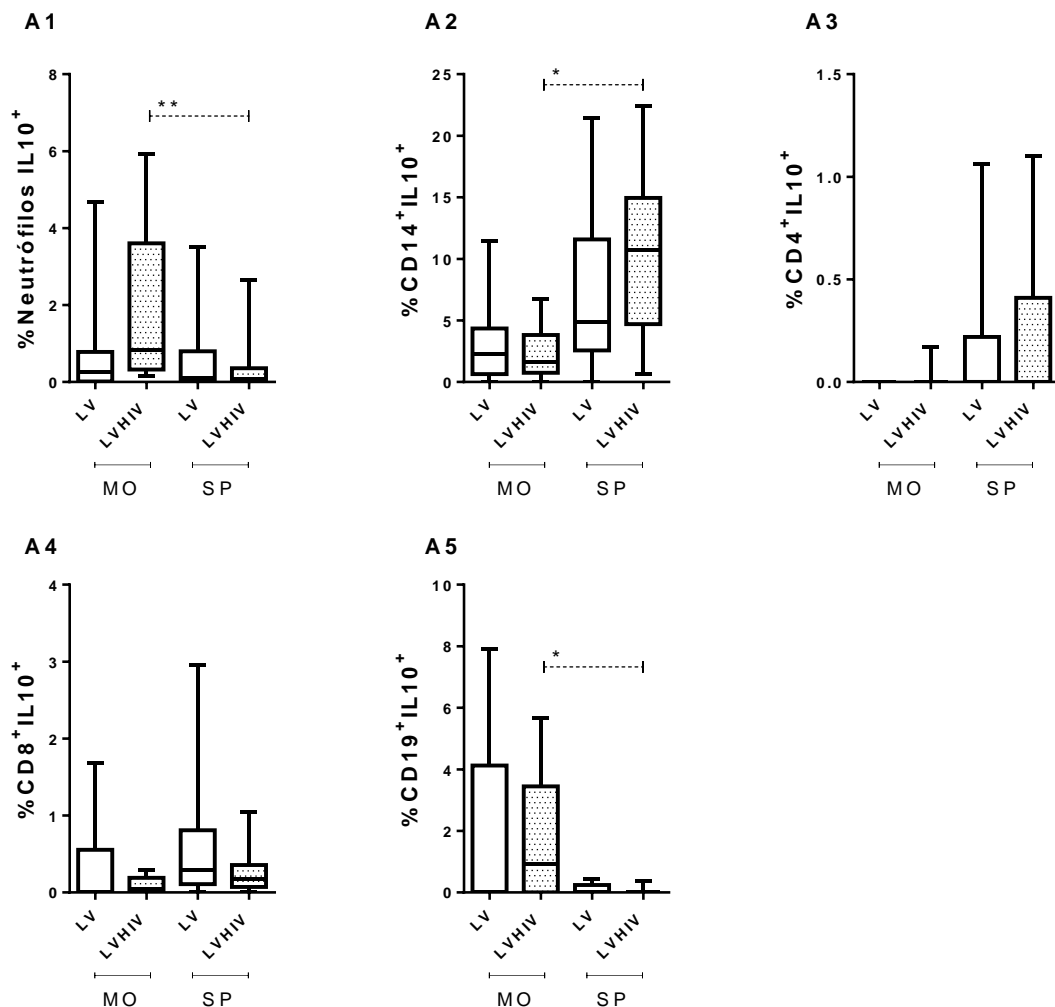


FIGURA 17 Expressão de IL-10 pelos leucócitos no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com LV e HIV comparados com pacientes com LV. O número de pacientes incluídos em cada análise está representada da seguinte maneira: tipo celular (LV+HIV/LV). (A1) %neutrófilosIL10⁺SP (12/10) e %neutrófilos IL10⁺MO (9/9). (A2) %CD14⁺IL10⁺ SP (12/11) e %CD14⁺IL10⁺ MO (9/10). (A3) %CD4⁺IL10⁺SP (12/11) e %CD4⁺IL10⁺ MO (11/9). (A4) %CD8⁺IL10⁺SP (12/11) e %CD8⁺IL10⁺ MO (11/9). (A5) %CD19⁺IL10⁺SP (12/11) e %CD19⁺IL10⁺ MO (9/9). Os testes estatísticos utilizados foram Mann-Whitney e Wilcoxon.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

5.3.4.3 Perfil de expressão intracelular de TNF α

O sangue periférico de pacientes coinfectados apresenta uma porcentagem significativa de células CD14⁺TNF α ⁺ ($p=0,007$) (figura 18 A2) quando comparado a de pacientes com LV. Nessa pesquisa, não foi possível registrar diferença significativa na expressão de TNF α entre neutrófilos ($p=0,71$), linfócitos T CD4 ($p=0,19$), T CD8 ($p>0,99$) e linfócitos B ($p>0,99$).

Na medula óssea de pacientes coinfectados não foi possível registrar diferença significativa na expressão de TNF α entre neutrófilos ($p=0,55$), monócitos ($p=0,89$), linfócitos T CD4 ($p>0,99$), T CD8 ($p=0,45$) e linfócitos B ($p=0,47$) (figura 18 A1-A5) quando comparado a de pacientes com LV.

Ao comparar sangue periférico e medula óssea foi possível registrar que neutrófilos ($p=0,008$) expressam mais TNF α no sangue periférico (figura 18 A1). Não foi possível observar diferença significativa para monócitos ($p=0,25$), T CD4 ($p=0,50$), T CD8 ($p=0,25$) e linfócitos B ($p>0,99$) (figura 18 A2-A5).

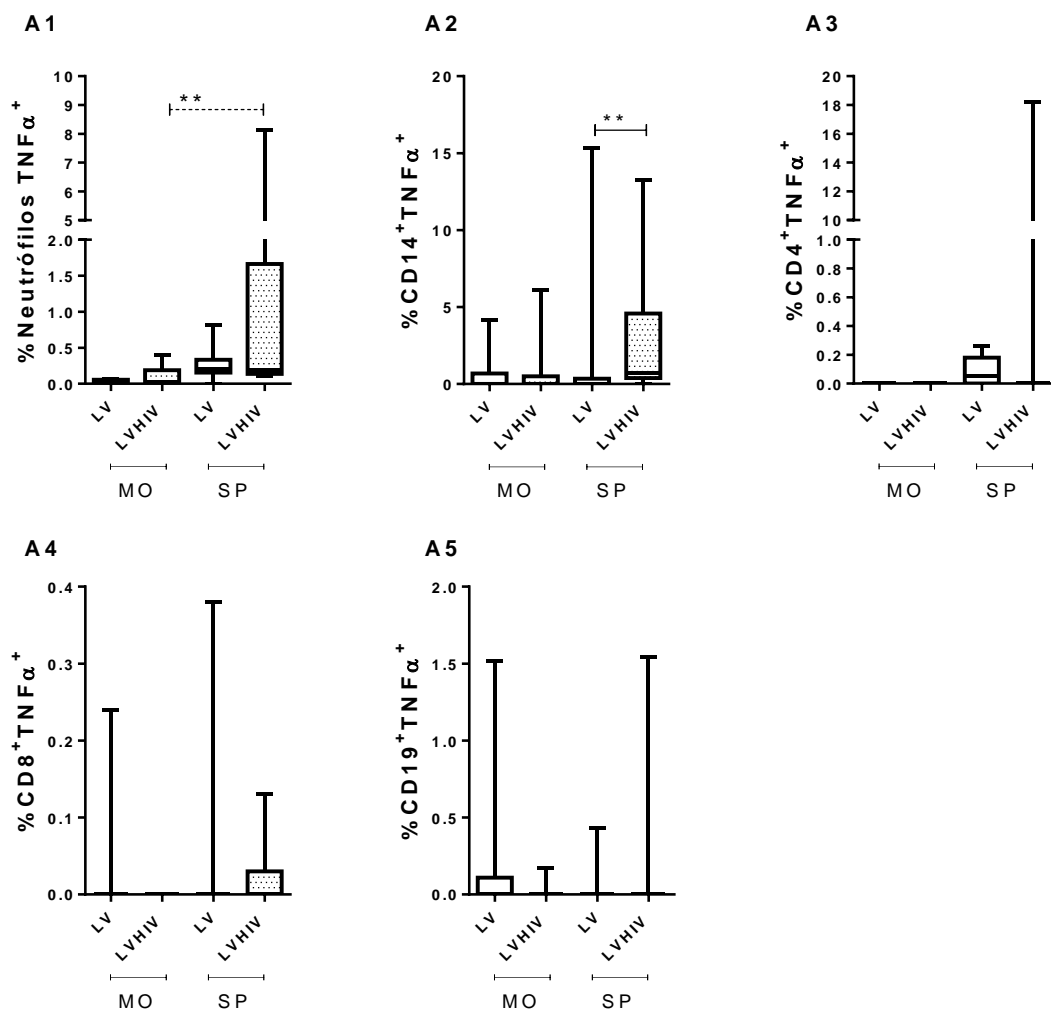


FIGURA 18 Expressão de TNF α pelos leucócitos no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com LV e HIV comparados com pacientes com LV. O número de pacientes incluídos em cada análise está representada da seguinte maneira: tipo celular (LV+HIV/LV). (A1) %neutrófilos TNF α ⁺SP (12/10) e %neutrófilos TNF α ⁺MO (9/9). (A2) %CD14⁺ TNF α ⁺ SP (12/11) e %CD14⁺ TNF α ⁺ MO (9/10). (A3) %CD4⁺TNF α ⁺SP (12/11) e %CD4⁺ TNF α ⁺MO (11/7). (A4) %CD8⁺TNF α ⁺SP (12/11) e %CD8⁺ TNF α ⁺ MO (11/9). (A5) %CD19⁺ TNF α ⁺SP (12/11) e %CD19⁺ TNF α ⁺ MO (9/9). Os testes estatísticos utilizados foram Mann-Whitney e Wilcoxon.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

5.3.4.4 Perfil de expressão intracelular de INF γ

Nesta pesquisa, não foi possível registrar diferença significativa na expressão de INF γ entre neutrófilos ($p=0,37$), monócitos ($p=0,56$), linfócitos T CD4 ($p=0,11$), T CD8 ($p=0,81$) e linfócitos B ($p=0,39$) (figura 19 A1-A5) no sangue periférico de pacientes coinfectados quando comparado ao de pacientes com LV.

Na medula óssea de pacientes coinfectados, não foi possível registrar diferença significativa na expressão de INF γ entre monócitos ($p=0,38$), linfócitos T CD4 ($p=0,45$), T CD8 ($p=0,59$), % neutrófilos INF γ^+ ($p=0,13$) e linfócitos B ($p=0,94$) (figura 19 A1-A5) quando comparado ao de pacientes com LV.

Ao comparar sangue periférico e medula óssea foi possível registrar que linfócitos B ($p=0,008$) expressam mais INF γ na medula óssea (figura 19 A5). Provavelmente pacientes coinfectados apresentam um aumento significativo na % neutrófilos INF γ^+ ($p=0,09$) na medula óssea (figura 19 A1). Não foi possível observar diferença significativa para monócitos ($p=0,64$), linfócitos T CD4 ($p=0,50$), T CD8 ($p=0,37$) (figura 19 A2-A4).

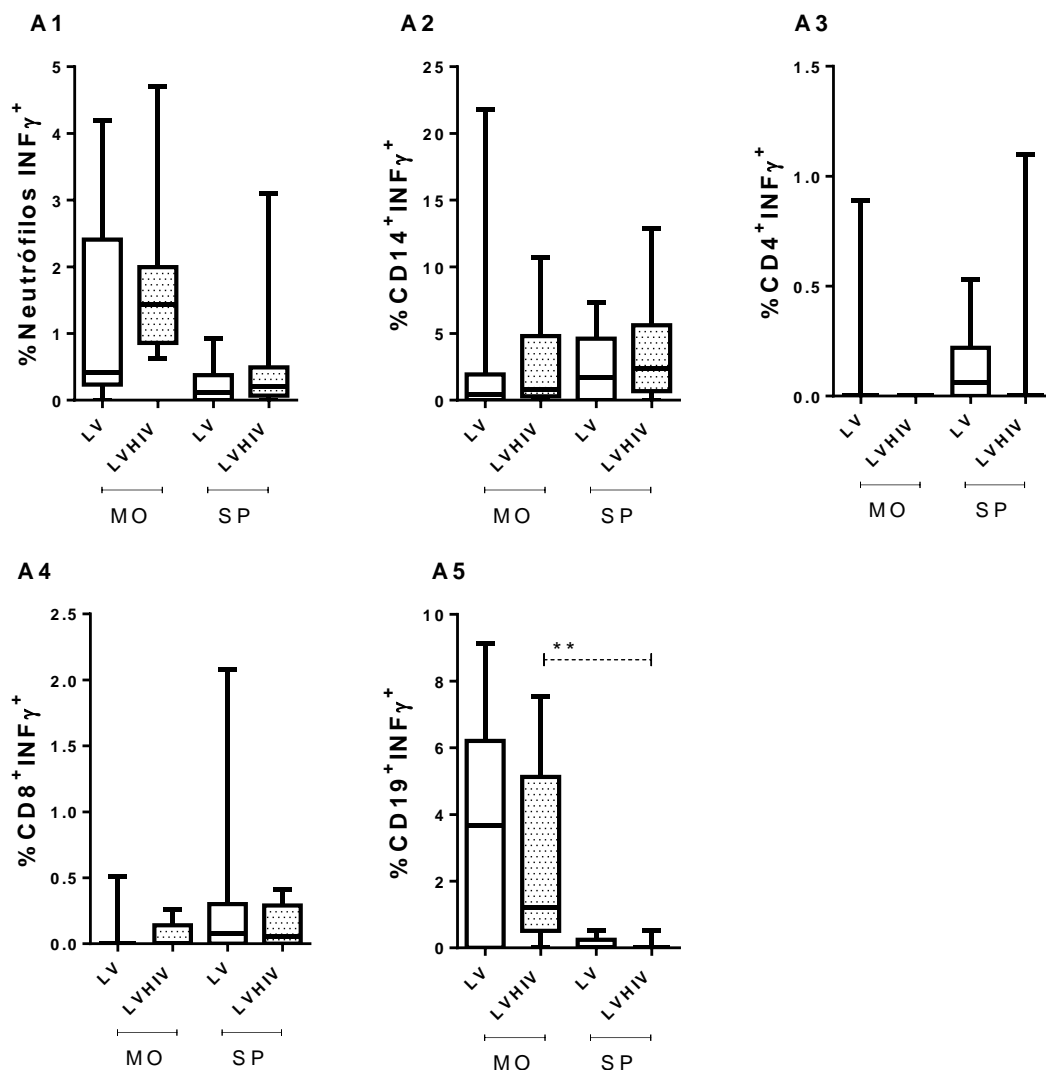


FIGURA 19 Expressão de $\text{INF}\gamma$ pelos leucócitos no sangue periférico e na medula óssea de pacientes coinfetados comparada a expressão de pacientes com LV. O número de pacientes incluídos em cada análise está representada da seguinte maneira: tipo celular (LV+HIV/LV). (A1) %neutrófilos $\text{INF}\gamma^+$ SP (12/10) e %neutrófilos $\text{INF}\gamma^+$ MO (9/9). (A2) % $\text{CD}14^+$ $\text{INF}\gamma^+$ SP (12/11) e % $\text{CD}14^+$ $\text{INF}\gamma^+$ MO (9/10). (A3) % $\text{CD}4^+$ $\text{INF}\gamma^+$ SP (12/11) e % $\text{CD}4^+$ $\text{INF}\gamma^+$ MO (11/9). (A4) % $\text{CD}8^+$ $\text{INF}\gamma^+$ SP (12/11) e % $\text{CD}8^+$ $\text{INF}\gamma^+$ MO (11/9). (A5) % $\text{CD}19^+$ $\text{INF}\gamma^+$ SP (12/11) e % $\text{CD}19^+$ $\text{INF}\gamma^+$ MO (9/9). Os testes estatísticos utilizados foram Mann-Whitney e Wilcoxon.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

5.3.4.5 Correlação entre as citocinas circulantes na medula óssea e no sangue periférico em pacientes coinfetados com a expressão de citocinas pelas células

5.3.4.5.1 Medula óssea

Na medula óssea de pacientes coinfetados não foi registrada correlação entre os níveis de IL-6 circulante e as células T CD8⁺IL6⁺ (Rs=0,05; $p=0,59$), T CD4⁺IL6⁺ (Rs=0,01; $p=0,78$), T CD14⁺IL6⁺ (Rs=0,13; $p=0,38$), T CD19⁺IL6⁺ (Rs=0,03; $p=0,65$) e neutrófilos IL6⁺ (Rs=0,03; $p=0,69$).

Com relação aos níveis de CXCL-8 na medula óssea, apenas as células T CD14⁺ CXCL-8⁺ (Rs=0,84; $p=0,0005$) apresentaram correlação significativa. É provável que as células T CD19⁺ CXCL-8⁺ (Rs=0,26; $p=0,16$), neutrófilos CXCL-8⁺ (Rs=0,35; $p=0,09$) apresentem correlação significativa, fato não esperado para T CD14⁺ CXCL-8⁺ (Rs=0,06; $p=0,52$) e T CD8⁺ CXCL-8⁺.

Não foi possível observar correlação entre os níveis de IL-10 na medula óssea e as células T CD8⁺IL10⁺ (Rs=0,15; $p=0,75$), T CD4⁺IL10⁺ (Rs=0,0008; $p=0,94$), T CD14⁺IL10⁺ (Rs=0,14; $p=0,31$), T CD19⁺IL10⁺ (Rs=0,004; $p=0,86$) e neutrófilos IL10⁺ (Rs=0,0007; $p=0,95$).

Não foi possível observar correlação entre os níveis de INF γ na medula óssea e as células T CD8⁺INF γ ⁺ (Rs=0,03; $p=0,69$), T CD4⁺INF γ ⁺, T CD14⁺INF γ ⁺ (Rs=0,03; $p=0,68$), T CD19⁺INF γ ⁺ (Rs=0,03; $p=0,66$) e neutrófilos INF γ ⁺ (Rs=0,05; $p=0,58$).

Com relação aos níveis de TNF α na medula óssea, apenas as células T CD19⁺TNF α ⁺ (Rs=0,94; $p<0,0001$) apresentou correlação significativa, enquanto as células T CD14⁺TNF α ⁺ (Rs=0,0005; $p=0,96$), T CD4⁺TNF α ⁺, T CD8⁺TNF α ⁺ e neutrófilos TNF α ⁺ (Rs=0,01; $p=0,77$) não apresentaram correlação significativa.

5.3.4.5.2 Sangue periférico

No sangue periférico de pacientes com LV e HIV, não foi registrada correlação entre os níveis de IL-6 circulante e as células T CD8⁺IL6⁺ (Rs=0,03; $p=0,71$), T CD4⁺IL6⁺ (Rs=0,002; $p=0,92$), T CD14⁺IL6⁺ (Rs=0,14; $p=0,36$), T CD19⁺IL6⁺ (Rs=0,07; $p=0,54$) e neutrófilos IL6⁺ (Rs=0,008; $p=0,83$).

Com relação aos níveis de CXCL-8 no sangue periférico, apenas os neutrófilos CXCL-8⁺ (Rs=0,90; $p<0,0001$) apresentaram correlação significativa, não foi registrada para as células T CD14⁺ CXCL-8⁺ (Rs=0,02; $p=0,66$), as células T CD19⁺ CXCL-8⁺ (Rs=0,0002; $p=0,97$), T CD4⁺ CXCL-8⁺ (Rs=0,01; $p=0,77$) e T CD8⁺IL6⁺ (Rs=0,19; $p=0,18$).

Não foi registrada correlação entre os níveis de IL-10 no sangue periférico e as células T CD8⁺IL-10⁺ ($R_s=0,07$; $p=0,42$), T CD4⁺IL10⁺ ($R_s=0,01$; $p=0,74$), T CD14⁺IL6⁺ ($R_s=0,02$; $p=0,68$), T CD19⁺IL10⁺ e neutrófilos IL6⁺ ($R_s=0,05$; $p=0,49$).

Não foi registrada correlação entre os níveis de INF γ no sangue periférico e as células T CD8⁺INF γ ⁺ ($R_s=0,09$; $p=0,44$), T CD4⁺INF γ ⁺ ($R_s=0,02$; $p=0,72$), T CD14⁺INF γ ⁺ ($R_s=0,03$; $p=0,19$), T CD19⁺INF γ ⁺ ($R_s=0,02$; $p=0,72$) e neutrófilos INF γ ⁺ ($R_s=0,02$; $p=0,72$).

Com relação aos níveis de TNF α no sangue periférico, as células T CD19⁺TNF α ⁺ ($R_s=0,006$; $p=0,82$), T CD14⁺TNF α ⁺ ($R_s=0,18$; $p=0,20$), T CD19⁺TNF α ⁺ ($R_s=0,006$; $p=82$), T CD4⁺TNF α ⁺ ($R_s=0,01$; $p=0,75$), T CD8⁺TNF α ⁺ ($R_s=0,02$; $p=0,71$) e neutrófilos TNF α ⁺ ($R_s=0,04$; $p=0,52$) não apresentaram correlação significativa.

6 DISCUSSÃO

A apresentação clínica e laboratorial dos pacientes com LV deste estudo fora condizentes com neutropenia, redução do número de hemácias, dos níveis de hemoglobina, queda do hematócrito e das plaquetas de forma significativamente mais intensa quando são comparados aos controles não saudáveis. De fato, pacientes com LV apresentam leucopenia e eosinopenia quando são comparados com controles saudáveis (GRECH et al., 2000; VARMA; NASEEM, 2010). De forma análoga aos dados obtidos no hemograma, a análise por imunofenotipagem confirmou a neutropenia no sangue periférico em pacientes com LV. No entanto, na medula óssea não foi registrada neutropenia, sugerindo que a neutropenia observada na periferia não tem como principal causa os distúrbios que ocorrem na medula óssea em decorrência da presença da *Leishmania* como, por exemplo, a disgranulopoiese (SHAHRIAR et al., 1999). Tal achado reforça o fato de que o hiperesplenismo (VARMA; NASEEM, 2010) é a principal causa da neutropenia observada no sangue periférico em pacientes com LV.

Pesquisas tem registrado que não existe diferença significativa em número ao comparar os linfócitos T CD8 no sangue periférico de pacientes com LV e controles saudáveis (GHOSH et al., 1996; NYLÉN et al., 2007). O interessante da presente pesquisa é que não foi registrada diferença significativa dos linfócitos T CD8 na medula óssea e no sangue periférico de pacientes com LV ativa, antes do tratamento farmacológico, quando comparado aos controles não saudáveis. Estudos realizados em cães com LV demonstraram que linfócitos T CD8 dos animais com doença assintomática e oligosintomática parecem ser resistentes a *Leishmania* no início da infecção, porque essas células apresentaram número significativamente mais elevado no sangue periférico e associação negativa significativa com a carga parasitária (REIS et al., 2006). Os linfócitos T CD8 de pacientes assintomáticos, infectados com *L. brasiliensis*, apresentaram menor atividade citotóxica e sintetizaram significativamente mais INF γ quando comparado aos pacientes com a doença ativa. Desta forma, estimulam a ativação dos macrófagos e contribuem para a eliminação do parasita (CARDOSO et al., 2015). Com a progressão da LV, os linfócitos T CD8 perdem seu papel protetor e tornam-se mais citotóxicos e anérgicos (GAUTAM et al., 2014).

O aumento dos linfócitos T CD4 na medula óssea e no sangue periférico de pacientes com LV quando comparado aos controles não saudáveis, pode refletir a migração dessas células para os órgãos parasitados. Pesquisas utilizando camundongos também demonstraram que há o recrutamento de linfócitos T CD4 para o local da infecção (TEIXEIRA et al., 2014). Análises histopatológicas descreveram a presença de histiócitos parasitados e linfócitos, principalmente, T CD4⁺ no baço (DOS-SANTOS et al., 2014) e nódulos linfáticos (GHOSH et al., 1996). Análise do aspirado esplênico por imunofenotipagem de pacientes com LV demonstraram um aumento significativo dos linfócitos T CD4⁺ antes do tratamento quando comparado ao baço dos pacientes após o tratamento e ao baço de pessoas saudáveis (NYLÉN et al., 2007). Desta forma, os linfócitos T CD4⁺ podem migrar para os órgãos parasitados, estabelecer contato com os macrófagos através da interação HLA-TCR e, em seguida, linfócitos T CD4 deveriam produzir INF- γ para ativar macrófagos (KUMAR et al., 2014).

Na medula óssea de pacientes com LV, não foi registrado o aumento dos linfócitos B como descrito no sangue periférico, esse achado sugere que talvez possa ocorrer proliferação dos linfócitos B em órgãos linfoides secundários como baço, justificando assim o aumento dessas células apenas no sangue periférico. O aumento significativo nas células B apenas no sangue periférico pode estar relacionado com a proliferação e sobrevivência aumentada de células plasmáticas no baço desses pacientes assim como registrado em cães com LV (SILVA-O'HARE et al., 2016). Tal fato também pode estar relacionado com aumento nos níveis plasmáticos de BAFF (fator de ativação de células B) (GOTO et al., 2014). Possivelmente, em pacientes com LV aconteça a proliferação de linfócitos B de forma a manter o número dessas células dentro dos parâmetros de normalidade. Um estudo realizado anteriormente não registrou diferença significativa ao comparar células CD19⁺ de pacientes com LV com as células CD19⁺ de indivíduos saudáveis (NYLÉN et al., 2007). Esse aumento das células B, como registrado na presente pesquisa, —pode contribuir diretamente com a hipergamaglobulinemia observada em pacientes com LV (CALDAS et al., 2005). Os linfócitos B na presença de IL-6 diferenciam-se em plasmócitos e passam a produzir mais imunoglobulinas (DIENZ et al., 2009), contribuindo para a persistência da infecção (SMELT et al., 2000). De fato, IL-6 encontra-se elevada em pacientes com quadro clínico grave de LV (COSTA et al., 2013) e malária (MBENGUE et al., 2015), por exemplo, e estimula a proliferação e diferenciação de linfócitos B, muito embora não seja a única via (KOPF et al., 1994).

A hipergamaglobulinemia é um sinal importante da doença, talvez possa contribuir com a imunossupressão porque os anticorpos IgG1 e IgG3, presentes em níveis significativamente mais elevados no sangue periférico de pacientes com LV (CALDAS et al., 2005), poderiam opsonizar *Leishmania*, formar complexos antígeno-anticorpo que se ligariam a receptores Fc γ na superfície dos macrófagos (MILES et al., 2005), aumentando assim a síntese de IL-10 por essas células (KANE; MOSSER, 2001).

Nesta pesquisa, os monócitos de pacientes com LV no sangue periférico expressam significativamente mais IL-10 quando são comparados aos controles não saudáveis. De fato, estudos demonstraram que os monócitos de pacientes com LV expressam significativamente mais IL-10 no sangue periférico quando comparado aos controles saudáveis (ROY et al., 2015). No entanto, a presente pesquisa foi a primeira a registrar que monócitos de pacientes com LV no sangue periférico expressam significativamente mais IL-10 em comparação com ~~pacientes apresentando quadro clínico semelhante ao da LV, mas com diagnóstico negativo~~ (controles não saudáveis). O mesmo pode ocorrer em órgãos parasitados, os esplenócitos de pacientes com LV expressam mais IL-10 quando comparados aos controles (DOS-SANTOS et al., 2014). Os monócitos têm sido apontados como células que apresentam relevante expressão de IL-10 na periferia (NYLÉN; SACKS, 2007) e no baço (GAUTAM et al., 2011) na LV. Nesta pesquisa, a ausência de diferença significativa na expressão de IL-10 entre sangue periférico e medula óssea de pacientes com LV sugere que os monócitos são uma importante célula produtora de IL-10 na medula óssea. A principal atividade desempenhada por IL-10 na LV talvez seja condicionar macrófagos para aumentar a sobrevivência e o crescimento do parasita, portanto, IL-10 prejudica a habilidade dos macrófagos em eliminar *Leishmania* em resposta a sinais de ativação (NYLÉN et al., 2007). Estudos *in vitro* demonstraram que macrófagos derivados da medula óssea de camundongos infectados com amastigotas produziram altos níveis de IL-10 e baixos níveis de IL-12 (MILES et al., 2005). Esse aumento significativo na expressão de IL-10 pelos monócitos, observado nesta pesquisa, pode ser uma consequência da modulação dessas células pela *Leishmania* nos órgãos parasitados. Autores sugerem que *L.infantum* poderia ativar TLR (*toll like receptors*) 3 e 9 e isso acionaria a produção de citocinas regulatórias (QUIRINO et al., 2016).

Os resultados obtidos na presente pesquisa sugerem que um aumento significativo na síntese de IL-10 pelos monócitos, a baixa expressão de INF γ e TNF α no sangue periférico e na medula óssea é uma consequência da instalação de um quadro anti-inflamatório/regulatório (COSTA et al., 2010) e apoptótico (POTESTIO et al., 2004) que caracteriza, portanto, a depressão imune em pacientes com LV. Assim sendo, IL-10 circulante e o aumento na expressão de IL-10 pelos monócitos contribuiriam com a imunossupressão em pacientes com LV porque a própria *Leishmania modularia os monócitos a um perfil regulatório incapaz de* promover sua eliminação. Outros tipos celulares parecem ser modulados pela *Leishmania*, em um ensaio *in vitro*, linfócitos B expostos a *L. infantum* aumentam a produção de RNA mensageiro de IL-10, que poderia favorecer a disseminação do parasita pelo organismo (ANDREANI et al., 2015). Nesta pesquisa, foi registrado uma expressão significativa de IL-10 por linfócitos B de pacientes com LV quando comparado aos controles não saudáveis.

Os leucócitos respondem de forma diferente ao microambiente de cada compartimento. Níveis elevados de IL-10 e INF γ na medula óssea também foram anteriormente registrados e podem estar relacionados com a dificuldade que os macrófagos do hospedeiro têm para eliminar *Leishmania*, porque IL-10 suprime a atividade dos macrófagos (KARP et al., 1993) mesmo na presença de níveis elevados de INF γ . A exposição prévia das células a IL-10 inibe o estímulo de INF γ (KANE; MOSSER, 2001). Estudos *in vitro* demonstraram que células derivadas de camundongos IL-10^{-/-} produzem níveis significativamente mais elevados de INF γ (PADIGEL; FARRELL, 2016). Outras células presentes na medula óssea como as células estromais (ROUGIER et al., 1998) podem também ser responsáveis pelo aumento significativo nos níveis de IL-6, IL-10, INF γ , TNF α e IL-1 β registrados nesta pesquisa. Enquanto células tronco mesenquimais inibiriam a atividade inflamatória, a formação de infiltrado inflamatório e diminuiria a permeabilidade das células endoteliais (PATI et al., 2011). Estudos ~~também sugerem~~ que níveis elevados de TNF α na medula óssea tem relação com distúrbios na hematopoiese em pacientes com LV (YARALI et al., 2002).

Nesta pesquisa foi possível registrar que a medula óssea de pacientes com LV contribui com os níveis de citocinas circulantes IL-6, CXCL-8, INF γ , TNF α , IL-1 β e IL-10 no sangue periférico, enquanto que a medula óssea de pacientes com outras patologias (não LV) parece contribuir apenas com os níveis circulantes de CXCL-8, no

entanto, a amostra reduzida do grupo controle pode interferir nesses resultados. Estudos *in vitro* sugeriram que órgãos parasitados como a medula óssea e o baço contribuem com os níveis de citocinas circulantes. Isto porque, quando os leucócitos no sangue periférico são estimulados *in vitro* com antígeno de *Leishmania* não produziram INF- γ e, portanto, não seriam responsáveis pelos níveis elevados de INF- γ presente no plasma de pacientes com LV (CALDAS et al., 2005).

Na medula óssea de pacientes com LV, os dados obtidos permitem sugerir que o estímulo para a produção de IL-6 pelos linfócitos T CD8, monócitos, neutrófilos parece não ter a mesma intensidade registrada no sangue periférico. O fato de apenas os linfócitos T CD4 apresentarem aumento significativo na expressão de IL-6 no sangue periférico e na medula óssea reforça que possa haver o fluxo dessas células para os órgãos parasitados. Tais resultados indicam que parte da ~~resposta~~ imunológica parece ser compartimentalizada, assim como sugerido em estudos realizados em cães (RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2016). Em outros órgãos como o baço, possivelmente, essas células seriam estimuladas a produzir IL-6 e IL-10. Pesquisa realizada em modelo animal de infarto agudo do miocárdio demonstrou que o baço contribuiu com 41% dos monócitos com perfil inflamatório presente no tecido isquêmico, enquanto não há efluxo desses monócitos da medula óssea para o tecido lesionado (SWIRSKI et al., 2009). Nesta pesquisa, uma expressão significativa de IL-6 pelos neutrófilos no sangue periférico em pacientes com LV e controles não saudáveis talvez tenha relação com um perfil inflamatório. Assim como observado em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *Leishmania braziliensis*, os neutrófilos circulantes produziram mais CXCL-8, CXCL-9, contribuindo com o recrutamento de mais neutrófilos e células Th1 para o local da infecção (CONCEIÇÃO et al., 2016). ~~Na medula óssea, a exposição constante das células ao parasita pode condicionar algumas células a continuar apresentando comportamento semelhante na periferia. Na presente pesquisa foi possível demonstrar que a síntese de IL-10 por neutrófilos e INF γ por linfócitos B e T CD4 parece ser semelhante nos dois compartimentos.~~

As citocinas circulantes no sangue periférico representam uma miscelânea das citocinas produzidas em todos os órgãos parasitados como a medula óssea, o baço, fígado, nódulos linfáticos e intestino. É interessante ressaltar que a intensidade e o tipo de citocinas produzidas por cada um desses órgãos pode ser variável como registrado em camundongos (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). Além disso, as citocinas

circulantes podem ser não específicas para a LV porque podem ser produzidas devido a outras condições como infecções bacterianas, por exemplo. Essa miscelânea também pode ser aplicada para o DNA de *Leishmania*, que no sangue periférico pode representar parasita vivo ou morto (SILVA et al., 2016). Na presente pesquisa, pacientes com LV quando comparados com controles não saudáveis apresentam níveis significativamente mais elevados de IL-6 e IL-10 no sangue periférico, essas citocinas apresentam uma forte correlação positiva mesmo nos estágios iniciais da doença (RAMOS et al., 2016) e contribuem para o processo inflamatório e ~~na~~ imunossupressão. Esse cenário de SIRS e imunossupressão pode favorecer infecções (COSTA et al., 2010).

~~Em pacientes com LV,~~ IL-6 desempenha uma função inflamatória porque ~~apresentou~~ correlação positiva com proteína C reativa (PCR), uma proteína plasmática de fase aguda positiva (COSTA et al., 2013). No entanto, IL-6 pode exercer função anti-inflamatória porque inibe a diferenciação Th1, diminuindo a síntese de INF γ pelos linfócitos T CD4 (DIEHL et al., 2000). Ao mesmo tempo em que estimula a diferenciação Th2, contribuindo para uma maior produção de anticorpos (DIEHL et al., 2002). Nesses pacientes os níveis de IL-6 estão mais elevados na presença de infecções e sangramentos, considerados importantes parâmetros de gravidade (COSTA et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2016). ~~Isso porque~~ quanto maior o número de pontos de sangramento maior a gravidade (COSTA, 2009; BELO et al., 2014). IL-6 parece interferir nos fatores pró-coagulates e anti-coagulates do processo de coagulação sanguínea. Em pacientes com LV, IL-6 talvez participe da dissolução dos coágulos por ter sido registrado um aumento nos níveis dos produtos de degradação da fibrina e dímero D (COSTA et al., 2013). No entanto, IL-6 também aumenta a produção de fatores pró-coagulantes como a trombina (VAN DER POLL et al., 1994) e a expressão do fator tissular (CREASEY et al., 1993; ~~ESMON~~, 2004). Pesquisas futuras poderão investigar o papel exato de IL-6 no sangramento observado em pacientes com LV. Em casos de cirrose hepática, IL-6 apresentou níveis mais elevados nos pacientes que apresentaram sangramento das varizes e desfecho fatal, com uma maior expressão de STAT-3 (KAO et al., 2015). Níveis elevados de IL-6 estão correlacionados com a exacerbação da LV (VAN DER POLL; ZIJLSTRA; MEVISSSEN, 1995), mais precisamente níveis acima de 200 pg/mL foram registrados em pacientes com LV que foram a óbito (DOS SANTOS et al., 2016), indicando que os níveis de IL-6 serão maiores quanto maior a gravidade do paciente.

Em pacientes com LV, apenas a expressão de IL-6 pelos linfócitos T apresentou correlação com os níveis circulantes dessa citocina no sangue periférico, contribuindo para o aumento dos níveis de IL-6 no plasma. Essa correlação não foi observada na medula óssea. Os linfócitos T CD8 e T CD4 parecem ser acionados para sintetizar IL-6 em casos considerados graves, porque os pacientes com maior expressão de IL-6 apresentaram infecção e sangramentos. Em casos de pneumonia causada por *Mycoplasma pneumoniae*, resistente à terapia com antibióticos macrolídeos, as crianças apresentaram aumento significativo na porcentagem de neutrófilos, linfócitos T CD8 e nos níveis de IL-6, IL-10 e INF γ , quando comparado ao quadro clínico de pacientes com a forma não resistente (ZHANG et al., 2016). Um possível estímulo, talvez indireto, para a produção de IL-6 pelos linfócitos T CD4 e, principalmente, T CD8 em pacientes com LV mais grave seria o aumento dos níveis de CD14 solúvel (DOS SANTOS et al., 2016) e LPS (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2011), no entanto tem sido questionado se o aumento dos níveis de LPS contribui com o aumento dos níveis de IL-6. O CD14 solúvel pode acionar a resposta inflamatória por estimular a produção de IL-6, IL-10 e IL-27 (DOS SANTOS et al., 2016).

A expressão de citocinas pelos leucócitos na medula óssea, principalmente células T, não ~~contribui~~ com os níveis de IL-6 circulantes nesse compartimento, reforçando o fato de que os leucócitos não são estimulados a produzir IL-6 na mesma intensidade registrada no sangue periférico em pacientes com LV grave. Desta forma, a medula óssea talvez não participe ativamente da resposta inflamatória sistêmica. É importante ressaltar que tem sido sugerido que os linfócitos T quando presentes nesse microambiente desempenham um papel regulatório no sistema imunológico, hematopoiético e no remodelamento ósseo (BONOMO et al., 2016). A medula óssea pode ser considerada o santuário para *Leishmania* porque células tronco mesenquimais, resistentes aos tratamentos farmacológicos, atuam nesse órgão como reservatórios da *Leishmania*, permitindo a sobrevivência do parasita mesmo após tratamento, favorecendo a recidiva da doença (LOPES et al. 2016, no prelo).

Os linfócitos T CD8 desempenham um papel de proteção (MARY et al., 1999; GAUTAM et al., 2014) e resistência (KAUSHAL et al., 2014) do hospedeiro à *Leishmania*. No entanto, com a constante exposição aos antígenos de *Leishmania*, as células T CD8 tornam-se mais anérgicas, apoptóticas (HAILU et al., 2005) em órgãos parasitados, tais como baço. Ao passo que, na corrente sanguínea apresentam-se

anérgicas, embora com maior atividade citotóxica pela maior expressão de perforina. No entanto, linfócitos T CD8 parecem ser acionados à exaustão na LV, afetando sua habilidade de contribuir com a resposta imune protetora (GAUTAM et al., 2014). Em casos de leishmaniose cutânea, linfócitos T CD8⁺ granzima B⁺ são responsáveis pela destruição tecidual (SANTOS et al., 2013). Nestas condições características de LV grave, a presença de inflamação sistêmica, distúrbios de coagulação e infecções pode provocar desordens imunológicas que acionariam as atividades inflamatória e citotóxica dos linfócitos TCD8 no sangue periférico.

Algumas pesquisas estabeleceram escores de gravidade (COSTA et al., 2013; COURA-VITAL et al., 2014) e todas sugerem que pacientes com sangramentos e infecções são considerados com LV grave e, conseqüentemente, apresentam probabilidade de morte elevada. A presença de neutropenia igualmente favorece a instalação de infecções (BELO et al., 2014) e se o paciente apresentar simultaneamente infecção e sangramento, apresentará um risco de morte elevado. Ao contrário de IL-6, IL-10 não apresenta correlação direta com desfechos fatais (COSTA et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2016), mas estabelece imunossupressão dos monócitos (ROY et al., 2015), instalando um ciclo vicioso que irá contribuir com o aumento da carga parasitária, progressão da doença e óbito (SILVA et al., 2014).

IL-6 é uma citocina relacionada com gravidade da LV, sangramento, edema, óbito, co-morbidade, petéquias, hemorragia, diarreia, oligúria, sepse (COSTA et al. 2013; SENE, 2013). Na presente pesquisa, IL-6 livre foi a única citocina que apresentou correlação positiva com a probabilidade de morte dos pacientes no sangue periférico e na medula óssea. O aumento da expressão de IL-6 por linfócitos T CD4 e, principalmente, T CD8 estaria correlacionado com gravidade, porque foram as únicas células que apresentaram correlação positiva com a probabilidade de morte no sangue periférico. No entanto, não houve observação na medula óssea. Assim sendo, a população de linfócitos T CD4⁺IL6⁺ e, principalmente, T CD8⁺IL6⁺ talvez participem diretamente da patogênese da LV grave no sangue periférico e poderiam ser consideradas indicadores de gravidade em pacientes com LV.

A medula óssea de pacientes com probabilidade de morte acima de 15%, considerados de maior gravidade, apresentou uma queda significativa na produção de IL-10. Enquanto que no sangue periférico foi registrado um aumento significativo nos níveis de IL-6 e CXCL8, citocinas consideradas como marcadores de gravidade

(COSTA et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2016). No sangue periférico apenas linfócitos T CD8⁺ expressaram mais IL-6⁺ em pacientes com probabilidade de morte acima de 15%, reforçando a hipótese de que T CD8 produzindo IL-6 contribuem para aumentar a gravidade.

Os linfócitos T CD8 desempenham um papel de proteção (MARY et al., 1999; GAUTAM et al., 2014) e resistência (KAUSHAL et al., 2014) do hospedeiro à *Leishmania*. No entanto, com a constante exposição aos antígenos de *Leishmania* as células T CD8 tornam-se mais anérgicas, apoptóticas (HAILU et al., 2005) em órgãos parasitados, tais como baço. Ao passo que, na corrente sanguínea apresentam-se anérgicas, embora com maior atividade citotóxica pela maior expressão de perforina. No entanto, linfócitos T CD8 parecem ser acionados à exaustão na LV, afetando sua habilidade de contribuir com a resposta imune protetora (GAUTAM et al., 2014). Em casos de leishmaniose cutânea, linfócitos T CD8⁺ granzima B⁺ são responsáveis pela injúria no tecido (SANTOS et al., 2013). Nestas condições características de LV grave, a presença de inflamação sistêmica, distúrbios de coagulação e infecções pode provocar desordens imunológicas que acionariam as atividades inflamatória e citotóxica dos linfócitos TCD8 no sangue periférico.

Na presente pesquisa, os pacientes infectados com LV e HIV apresentaram significativamente menor contagem de linfócitos T CD4 no sangue periférico e na medula óssea. É importante ressaltar que mesmo recebendo a terapia antiretroviral e apresentando carga viral baixa ou ausente, pacientes com LV e HIV podem apresentar uma queda na contagem de TCD4, fato que induz a erros de interpretação (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2010).

Os pacientes infectados com LV e HIV apresentaram níveis plasmáticos significativamente elevados de TNF α e IL-12 quando foram comparados aos pacientes com LV. Anteriormente, foi registrado que pacientes com LV e HIV quando comparados a pacientes com LV também apresentaram níveis significativamente mais elevados de TNF α (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2013). Tem sido demonstrado que pacientes com HIV podem apresentar uma restauração da imunidade protetora porque os linfócitos T CD8 e T CD4 encontram-se ativados, aumentam a expressão de CD38⁺HLA-DR⁺, contribuindo com o declínio da carga viral (SCULLY et al., 2016). Em pacientes com LV e HIV também tem sido sugerido que a *Leishmania* contribui para a ativação dos linfócitos T, foi registrado um aumento significativo na

porcentagem de expressão de CD38 por linfócitos T CD8 (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2010).

Talvez o aumento nos níveis plasmáticos de IL-12 observados nesta pesquisa possa contribuir com a ativação dos linfócitos T que, por sua vez, produziram INF γ para ativar macrófagos. Os baixos níveis de IL-10 registrados em pacientes coinfectados, apesar de não significativo, permitem um aumento dos níveis de IL-12, visto que IL-10 suprime a atividade de IL-12 (BACELLAR et al., 1996). A ativação dos monócitos por INF γ induz a produção de espécies reativas de oxigênio e TNF α , na presente pesquisa foi possível registrar que pacientes com LV e HIV apresentam uma expressão significativa mais elevada de TNF α pelos monócitos quando comparado aos monócitos de pacientes com LV. Em pacientes com HIV, após estímulo com LPS, a porcentagem de expressão de TNF α pelos monócitos apresentou correlação negativa significativa com a carga viral (SCULLY et al., 2016). Provavelmente, os níveis elevados de IL-12 e TNF α registrados no sangue periférico de pacientes coinfectados parece não ter relação com os níveis registrados na medula óssea. Desta forma, outros órgãos podem contribuir de forma mais intensa com o aumento dessas citocinas no sangue periférico.

A coinfeção também contribui para a replicação do vírus através do contato entre as células infectadas com *Leishmania* e linfócitos T CD4 como demonstrado em estudo *in vitro*, e pela liberação de fatores solúveis como IL-6 e TNF α (GARG et al., 2009). O próprio LPG da *Leishmania* é um indutor da transcrição do vírus em células T através da via NF-K β (BERNIER et al., 1998). Pacientes com LV e HIV ativa apresentam carga viral maior quando comparado àqueles que estão com a remissão da doença (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2013).

Os pacientes com LV e os coinfectados apresentaram níveis elevados de IL-6, CXCL-8 e INF γ no sangue periférico, no entanto os linfócitos T dos pacientes coinfectados não apresentaram um aumento na expressão de IL-6 como observado no casos graves de LV. A expressão significativa de IL-6 por neutrófilos, monócitos e linfócitos T CD8 no sangue periférico quando comparado a medula óssea reitera o fato de que o estímulo para a produção de IL-6 parece não ter origem na medula óssea.

Nesta pesquisa, considerando que os pacientes foram avaliados em apenas um momento da evolução clínica da doença, novos estudos poderão especificar os

mecanismos envolvidos em tais diferenças registradas. O número de pacientes analisados foi um fator limitante para o presente estudo, apenas quatro pacientes apresentaram LV grave e o baço não foi analisado. Além disso, em pacientes infectados com LV e HIV não foi verificado o fato do paciente apresentar recidiva da doença. No entanto, os resultados obtidos nesta pesquisa são de grande relevância para entender a complexa patogênese da LV.

7 CONCLUSÕES

As principais conclusões deste estudo são:

1. A presença da *Leishmania* na medula óssea parece contribuir com um aumento significativo nos níveis de IL-6, IL-10, INF γ , TNF α , IL-1 β quando comparado aos controles não saudáveis.
2. O estímulo para a expressão significativa de IL-6 pelos neutrófilos, monócitos e linfócitos T CD8 de pacientes com LV e HIV provavelmente não terá origem na medula óssea. No entanto, estudo de cinética de produção de IL-6 poderia comprovar tais achados.
3. Pacientes infectados com LV e HIV apresentam níveis significativamente mais elevados de IL-12 e TNF α no sangue periférico e na medula óssea quando são comparados aos pacientes com LV. No entanto, não foi registrada correlação entre os níveis dessas citocinas determinados no sangue periférico e na medula óssea.
4. Os monócitos de pacientes com LV e HIV expressam significativamente mais TNF α quando comparado aos pacientes com LV.
5. Pacientes com LV apresentam significativamente mais linfócitos B quando são comparados com pacientes sem LV. Desta forma, a hipergamaglobulinemia característica da LV pode ser uma consequência do aumento significativo dos linfócitos B no sangue periférico.
6. Pacientes com LV apresentam níveis plasmáticos significativamente mais elevados de IL-6 e IL-10, quando são comparados a indivíduos não saudáveis (sem LV), um reflexo dos processos inflamatórios e imunossupressores que são característicos da doença.

7. Os monócitos de pacientes com LV no sangue periférico são importantes células produtoras de IL-10.
8. Apenas a síntese de IL-6 pelos linfócitos T CD8 e TCD4 no sangue periférico contribui diretamente com o aumento dos níveis plasmáticos de IL-6.
9. A IL-6 apresenta correlação direta com a gravidade em pacientes com LV. A concentração de IL-6 circulante no sangue periférico e na medula óssea podem ser considerados parâmetros de gravidade.
10. Parece que a medula óssea não participa diretamente na doença grave no que diz respeito ao estímulo para a síntese de IL-6 pelos linfócitos T. No entanto, estudo de cinética de produção de IL-6 poderia comprovar tais achados. Os linfócitos T CD8 e T CD4 na medula óssea não produzem IL-6 com a mesma intensidade registrada no sangue periférico.
11. Na amostra analisada, apenas o aumento dos linfócitos T CD8⁺IL6⁺, principalmente, e T CD4⁺IL6⁺ no sangue periférico pode ser considerado um indicador de gravidade.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos nesta pesquisa sugerem fortemente que os linfócitos T no sangue periférico em pacientes com maior gravidade apresentam uma expressão significativa de IL-6, contribuindo para o aumento da concentração de IL-6 no plasma. Como o aumento dos níveis plasmáticos da IL-6 apresenta correlação com o óbito em pacientes com LV, pesquisas futuras *in vivo*, utilizando modelos experimentais, e *in vitro* poderiam identificar o estímulo que induz a síntese da IL-6 por essas células. Tais resultados também incentivam pesquisas experimentais e clínicas com a terapia anti-IL-6 em pacientes com LV grave.

9 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. **Imunologia Celular e Molecular**, 2012.
- AGRAWAL, Y. et al. Hematological profile in visceral leishmaniasis. **International Journal of Infection and Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 39–44, 2013.
- AKUFFO, H. O.; BRITTON, S. F. F. Contribution of non-*Leishmania*-specific immunity to resistance to *Leishmania* infection in humans. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 87, p. 58–64, 1992.
- ALKIRE, K.; COLLINGWOOD, J. Physiology of blood and bone marrow. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 6, n. 2, p. 99–108, 1990.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- ANDREANI, G. et al. *Leishmania infantum* Amastigotes Trigger a Subpopulation of Human B Cells with an Immunoregulatory Phenotype. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003543, 2015.
- ANSARI, N. A.; SALUJA, S.; SALOTRA, P. Elevated levels of interferon- γ , interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. **Clinical Immunology**, v. 119, n. 3, p. 339–345, 2006.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian Journal of Medical Research**, v. 119, n. 6, p. 238–258, 2004.
- BACELLAR, O. et al. Interleukin-12 Restores Interferon- Production and Cytotoxic Responses in Visceral Leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 173, n. 6, p. 1515–1518, 1 jun. 1996.
- BARRERA, G. et al. Model of polymicrobial peritonitis that induces the proinflammatory and immunosuppressive phases of sepsis. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 3, p. 1280–1288, 2011.
- BELO, V. S. et al. Risk Factors for Adverse Prognosis and Death in American Visceral Leishmaniasis: A Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.
- BERNIER, R. et al. The lipophosphoglycan of *Leishmania donovani* up-regulates HIV-1 transcription in T cells through the nuclear factor-kappaB elements. **The Journal of immunology**, v. 160, p. 2881–2888, 1998.
- BONOMO, A. et al. A T cell view of the bone marrow. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. MAY, 2016.
- BRASIL, M. DA S. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. Brasília: [s.n.].

CALDAS, A. et al. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC infectious diseases**, v. 5, p. 113, 2005.

CARDOSO, T. M. et al. Protective and Pathological Functions of CD8⁺ T Cells in Leishmania braziliensis Infection. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 3, p. 898–906, 2015.

CARTWRIGHT, G. E.; CHUNG, H. .; CHANG, A. Studies on the pancytopenia of kala-azar. **Blood**, n. 3, p. 249–275, 1948.

CARVALHO, E. M. et al. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **The Journal of clinical investigation**, v. 76, n. 6, p. 2066–2069, 1985.

CASTRO, A. J. M. DE. **Leishmaniose visceral - Avaliação citomorfológica da medula óssea e correlação com a gravidade da doença.** [s.l.] Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

CERMAK, J. et al. C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. **Blood**, v. 82, n. 2, p. 513–520, 1993.

CHANDRA, H.; CHANDRA, S.; KAUSHIK, R. M. Visceral leishmaniasis with associated common, uncommon, and atypical morphological features on bone marrow aspirate cytology in nonendemic region. **Journal of tropical medicine**, v. 2013, p. 861032, jan. 2013.

CLARÊNCIO, J. et al. Could the lower frequency of CD8⁺CD18⁺CD45RO⁺ lymphocytes be biomarkers of human VL? **International Immunology**, v. 21, n. 2, p. 137–144, 2009.

CLARK, P.; NORMANSELL, D. E.; INNES, D.J.; HESS, C. E. Lymphocyte subsets in normal bone marrow. **Blood**, v. 67, n. 6, p. 1600–1606, 1986.

COLOVAI, A. I. et al. Flow cytometric analysis of normal and reactive spleen. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 17, n. 8, p. 918–27, ago. 2004.

CONCEIÇÃO, J. et al. Characterization of Neutrophil Function in Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania braziliensis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004715, 2016.

COSTA, C. H. N. et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? – A case control study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 386–392, 2010.

COSTA, D. L. **Fatores de prognóstico na leishmaniose visceral: Alterações clínicas e laboratoriais associadas à resposta imune, aos distúrbios da coagulação e à morte.** 2009. 194f. Tese (Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical) U. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, 2009.

COSTA, D. L. et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. **Pathogens and global health**, v. 107, n. 2, p. 78–87, 2013.

COSTA-PEREIRA, C. et al. One-year timeline kinetics of cytokine-mediated cellular immunity in dogs vaccinated against visceral leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**, v. 11, p. 92, 2015.

COTTERELL, S. E.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Leishmania donovani infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha. **Blood**, v. 95, n. 5, p. 1642–1651, 2000.

COURA-VITAL, W. et al. Prognostic Factors and Scoring System for Death from Visceral Leishmaniasis: An Historical Cohort Study in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, 2014.

CREASEY, A. A. et al. Tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from Escherichia coli septic shock. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 6, p. 2850–2860, 1993.

DE FREITAS BALANCO, J. M. et al. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Current Biology**, v. 11, n. 23, p. 1870–1873, 2001.

DE JONG, H. K.; VAN DER POLL, T.; WIERSINGA, W. J. The systemic pro-inflammatory response in sepsis. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 5, p. 422–430, 2010.

DE MOURA, T. R. et al. Cross-resistance of Leishmania infantum isolates to nitric oxide from patients refractory to antimony treatment, and greater tolerance to antileishmanial responses by macrophages. **Parasitology Research**, v. 115, n. 2, p. 713–721, 2016.

DE QUEIROZ SAMPAIO, M. J. A. et al. Risk factors for death in children with visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 11, p. 1–6, 2010.

DIAO, H.; KOHANAWA, M. Endogenous interleukin-6 plays a crucial protective role in streptococcal toxic shock syndrome via suppression of tumor necrosis factor alpha production. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 6, p. 3745–3748, 2005.

DIEHL, S. et al. Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. **Immunity**, v. 13, n. 6, p. 805–815, 2000.

DIEHL, S. et al. Induction of NFATc2 expression by interleukin 6 promotes T helper type 2 differentiation. **The Journal of experimental medicine**, v. 196, n. 1, p. 39–49, 2002.

DIENZ, O. et al. The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, n. 1, p. 69–78, 2009.

DOS SANTOS, P. L. et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004375, 2016.

DOS-SANTOS, W. L. C. et al. A case of conventional treatment failure in visceral leishmaniasis: leukocyte distribution and cytokine expression in splenic compartments. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 491, jan. 2014.

DUARTE, M. I.; CORBETT, C. E. **Histopathological patterns of the liver involvement in visceral leishmaniasis.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 1987.

ESMON, C. T. The impact of the inflammatory response on coagulation. **Thrombosis Research**, v. 114, n. 5–6 SPEC. ISS., p. 321–327, 2004.

FRAZIER, W. J.; HALL, M. W. Immunoparalysis and Adverse Outcomes from Critical Illness. **Pediatric Clinics of North America**, v. 55, n. 3, p. 647–668, 2008.

GARG, R. et al. Leishmania infantum amastigotes enhance HIV-1 production in cocultures of human dendritic cells and CD4 T cells by inducing secretion of IL-6 and TNF-alpha. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 5, p. e441, 2009.

GAUTAM, S. et al. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 7, p. 1134–1137, 2011.

GAUTAM, S. et al. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 2, p. 290–299, 2014.

GHOSH, M. K. et al. Subpopulations of T lymphocytes in the peripheral blood and lymph nodes of Indian kala-azar patients. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 185, n. 3, p. 183–187, 1996.

GOTO, Y. et al. Elevation of Serum B-Cell Activating Factor Levels During Visceral Leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 5, p. 912–914, 2014.

GRECH, V. et al. Visceral leishmaniasis in Malta--an 18 year paediatric, population based study. **Archives of disease in childhood**, v. 82, n. 5, p. 381–385, 2000.

HAILU, A. et al. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with Leishmania donovani. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 117, n. 2, p. 182–91, nov. 2005.

HUNTER, C. A; JONES, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nature Publishing Group**, v. 16, n. 5, p. 448–457, 2015.

JONES, D. E. et al. Impairs Phagocyte Function Exhaustion during Visceral Leishmaniasis Mediated T Cell – Programmed Death 1 Programmed Death 1–Mediated T Cell Exhaustion during Visceral Leishmaniasis Impairs Phagocyte Function. **The Journal of Immunology**, 2013.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, p. 1141–1147, 2001.

KAO, J.-T. et al. IL-6 significantly correlates with p-STAT3 expression and presents high variceal bleeding with mortality in cirrhotic patients: A cross-sectional study. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, p. 1–11, 2015.

KAPLANSKI, G. et al. IL-6: A regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 1, p. 25–29, 2003.

KARP, C. L. et al. In Vivo Cytokine Profiles in Patients with Kala-azar. **The journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. January, p. 1644–1648, 1993.

KAUSHAL, H. et al. Role of CD8+ T cells in protection against *Leishmania donovani* infection in healed Visceral Leishmaniasis individuals. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 8–14, 2014.

KOPF, M. et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. **Nature**, v. 368, n. 6469, p. 339–342, 1994.

KUMAR, P. V. et al. Visceral leishmaniasis: bone marrow biopsy findings. **Journal of pediatric hematology/oncology**, v. 29, n. 2, p. 77–80, fev. 2007.

KUMAR, R. et al. Reactive oxygen intermediates , nitrite and IFN- γ in Indian visceral leishmaniasis. n. February, p. 262–265, 2001.

KUMAR, R. et al. *Leishmania* Specific CD4 T Cells Release IFN γ That Limits Parasite Replication in Patients with Visceral Leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 10, p. e3198, out. 2014.

KURKJIAN, K. M. et al. Multiplex Analysis of Circulating Cytokines in the Sera of Patients with Different Clinical Forms of Visceral Leishmaniasis. v. 358, n. April, p. 353–358, 2006.

LEE, Y.-J. et al. IL-6 induced proliferation and cytotoxic activity of CD8+ T cells is elevated by SUMO2 overexpression. **Archives of Pharmacal Research**, v. 39, n. 5, p. 705–712, 2016.

LEHMBERG, K.; EHL, S. Diagnostic evaluation of patients with suspected haemophagocytic lymphohistiocytosis. **British Journal of Haematology**, v. 160, n. 3, p. 275–287, 2013.

MACDONALD, S. P. J. et al. Sustained elevation of resistin, NGAL and IL-8 are associated with severe sepsis/septic shock in the emergency department. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

MARY, C. et al. Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigen-specific T cells. **Infection and immunity**, v. 67, n. 11, p. 5559–66, nov. 1999.

MATZNER, Y. et al. Systemic leishmaniasis mimicking malignant histiocytosis. **Cancer**, v. 43, n. 1, p. 398–402, 1979.

MBENGUE, B. et al. Inflammatory cytokine and humoral responses to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols correlates with malaria immunity and pathogenesis. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 4, n. 1, p. 24–34, 2015.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 8, p. 606–16, 2005.

MEDEIROS, I. M. DE; CASTELO, A.; SALOMÃO, R. **Presence of Circulating Levels of Interferon- γ , Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- α in Patients with Visceral Leishmaniasis.** Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46651998000100007&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 19 jun. 2016.

- MIKOŁAJCZYK, T. P. et al. Interaction of human peripheral blood monocytes with apoptotic polymorphonuclear cells. **Immunology**, v. 128, n. 1, p. 103–113, 2009.
- MILES, S. A et al. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 5, p. 747–54, 2005.
- MUIGAI, R. et al. Jejunal Function and Pathology in Visceral Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 322, n. 8348, p. 476–479, 1983.
- MUNOZ, C. et al. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 5, p. 1747–1754, 1991.
- MURRAY, H. W. Accelerated control of visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin-6-deficient mice. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 4088–4091, 2008.
- NEMETH, E. et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 9, p. 1271–1276, 2004.
- NYLÉN, S. et al. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4⁺CD25⁺ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 4, p. 805–17, 16 abr. 2007.
- NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in immunology**, v. 28, n. 9, p. 378–84, set. 2007.
- PADIGEL, U. M.; FARRELL, J. P. Associated with Reduced Production of IL-10 and TGF- β by parasited cells. **The Journal of immunology**, v. 174, p. 6340–6345, 2016.
- PASSLICK, B.; FLIEGER, D.; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. L. Identification and Characterization of a Novel Monocyte Subpopulation in Human Peripheral Blood. **Blood**, v. 74, n. 7, p. 2527–2534, 1989.
- PATI, S. et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cells inhibit inflammation and preserve vascular endothelial integrity in the lungs after hemorrhagic shock. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.
- PEDDIE, C. M. et al. Oxidative DNA damage in CD34⁺ myelodysplastic cells is associated with intracellular redox changes and elevated plasma tumour necrosis factor- α concentration. **British journal of haematology**, v. 99, n. 3, p. 625–631, 1997.
- PERUHYPE-MAGALHÃES, V. et al. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. **Scandinavian journal of immunology**, v. 62, n. 5, p. 487–495, 2005.
- PERUHYPE-MAGALHÃES, V. et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor- α (+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Clinical and experimental immunology**, v. 146, n. 1, p. 124–32, out. 2006.
- POTESTIO, M. et al. CD4⁺ CCR5⁺ and CD4⁺ CCR3⁺ lymphocyte subset and monocyte apoptosis in patients with acute visceral leishmaniasis. **Immunology**, v. 113, p. 260–268, 2004.

QUIRINO, G. F. S. et al. **Interleukin-27 Mediates Susceptibility to Visceral Leishmaniasis by Suppressing the IL-17-Neutrophil Response.** Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27245409>>.

RAI, A. K. et al. Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic site of human visceral leishmaniasis. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31551, jan. 2012.

RAMOS, P. K. et al. Serum Cytokine Responses over the Entire Clinical-Immunological Spectrum of Human Leishmania (L .) infantum chagasi Infection. **BioMed Research International**, v. 2016, n. 1, 2016.

REIS, A B. et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by Leishmania chagasi. **Clinical and experimental immunology**, v. 146, n. 2, p. 303–11, nov. 2006.

REMICK, D. G. Interleukin-8. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. Suppl, p. S466–S467, 2005.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Efficient Capture of Infected Neutrophils by Dendritic Cells in the Skin Inhibits the Early Anti-Leishmania Response. v. 8, n. 2, 2012.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. May, p. 1–8, 2012.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. et al. Compartmentalized Immune Response in Leishmaniasis: Changing Patterns throughout the Disease. **Plos One**, v. 11, n. 5, p. e0155224, 2016.

ROHTAGI, A. et al. Blood, bone marrow and splenic lymphocyte subset profiles in Indian visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 431–434, 1996.

ROUGIER, F. et al. IL-6 and IL-8 production by human bone marrow stromal cells. **Cytokine**, v. 10, n. 2, p. 93–7, 1998.

ROY, S. et al. A Defective Oxidative Burst and Impaired Antigen Presentation are Hallmarks of Human Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 35, n. 1, p. 56–67, 2015.

SANTOS, C. D. S. et al. CD8+ Granzyme B+ -Mediated Tissue Injury Versus CD4+IFN γ + -Mediated Parasite Killing in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 1, p. 1, 2013.

SANTOS-OLIVEIRA, J. R. et al. High levels of T lymphocyte activation in Leishmania-HIV-1 co-infected individuals despite low HIV viral load. **BMC infectious diseases**, v. 10, n. 1, p. 358, 2010.

SANTOS-OLIVEIRA, J. R. et al. Evidence that lipopolisaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 7, p. e1198, jul. 2011.

SANTOS-OLIVEIRA, J. R. et al. Microbial translocation induces an intense proinflammatory response in patients with visceral leishmaniasis and HIV type 1

- coinfection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 1, p. 57–66, 2013.
- SARKARI, B. et al. Visceral Leishmaniasis in Southwestern Iran: A Retrospective Clinico-Hematological Analysis of 380 Consecutive Hospitalized Cases (1999–2014). **Plos One**, v. 11, n. 3, p. e0150406, 2016.
- SCULLY, E. P. et al. Innate immune reconstitution with suppression of HIV-1. **JCI Insight**, v. 1, n. 3, p. 1–14, 2016.
- SEIXAS DUARTE, M. I. et al. Human visceral leishmaniasis expresses Th1 pattern in situ liver lesions. **Journal of Infection**, v. 57, n. 4, p. 332–337, 2008.
- SHAHRIAR, D. et al. Cytological clues of bone marrow findings in Kala-Azar. **Diagnostic cytopathology**, v. 20, n. 4, p. 208–11, 1999.
- SILVA, A. et al. Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 735–739, 2012.
- SILVA, J. C. et al. Comparison of optical microscopy and quantitative polymerase chain reaction for estimating parasitaemia in patients with kala-azar and modelling infectiousness to the vector *Lutzomyia longipalpis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 8, p. 517–522, 2016.
- SILVA, J. M. et al. Bone marrow parasite burden among patients with new world kala-azar is associated with disease severity. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 621–626, 2014.
- SILVA-O'HARE, J. et al. Disruption of splenic lymphoid tissue and plasmacytosis in canine visceral leishmaniasis: Changes in homing and survival of plasma cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–17, 2016.
- SINEIDI, K. AL et al. Visceral leishmaniasis and haemophagocytic syndrome in an Omani child. v. 4, p. 45–48, 2002.
- SINGH, O. P. et al. Cytokine responses to novel antigens in an Indian population living in an area endemic for visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 10, p. e1874, jan. 2012a.
- SINGH, O. P. et al. Reassessment of immune correlates in human visceral leishmaniasis as defined by cytokine release in whole blood. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 19, n. 6, p. 961–6, jun. 2012b.
- SKRZECZYŃSKA-MONCZNIK, J. et al. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 67, n. 2, p. 152–159, 2008.
- SMELT, S. C. et al. B Cell-Deficient Mice Are Highly Resistant to *Leishmania donovani* Infection, but Develop Neutrophil-Mediated Tissue Pathology. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 7, p. 3681–3688, 2000.
- SOONG, T.; LI, Y. Comparative merits of sternum, spleen and liver punctures in the study of human visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, n. 5, p. 629–636, 1948.

SUEMATSU, S. et al. IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 19, p. 7547–51, 1989.

SWIRSKI, F. K. et al. Identification Monocytes Inflammatory of Splenic Reservoir and Their Deployment Sites. **Science**, v. 325, n. 5940, p. 612–616, 2009.

TEIXEIRA, C. et al. Characterization of the Early Inflammatory Infiltrate at the Feeding Site of Infected Sand Flies in Mice Protected from Vector-Transmitted *Leishmania major* by Exposure to Uninfected Bites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. 2–11, 2014.

TEMIZ, F. et al. An association of leishmaniasis and dyserythropoiesis in children. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 30, n. 1, p. 19–21, 2014.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **The Journal of Experimental Medicine COMMENTARY JEM**, v. 0, n. 2, p. 239–243, 2007.

UCKER, D. S. Exploiting death: apoptotic immunity in microbial pathogenesis. **Cell Death and Differentiation**, v. 1, n. 6, p. 1–7, 2016.

VAN DER POLL, T. et al. Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. **The Journal of experimental medicine**, v. 179, n. 4, p. 1253–9, 1994.

VAN DER POLL, T.; ZIJLSTRA, E. E.; MEVISSSEN, M. Interleukin 6 during active visceral leishmaniasis and after treatment. **Clinical immunology and immunopathology**, v. 77, n. 1, p. 111–114, 1995.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4177–4184, 2002.

VARMA, N.; NASEEM, S. Hematologic changes in visceral Leishmaniasis/Kala Azar. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 26, n. 3, p. 78–82, 2010.

VERESS, B. et al. Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. **Immunology**, v. 33, n. 5, p. 605–610, 1977.

VERMA, S. et al. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: Il-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, 2010.

WAAGE, A. et al. the Complex Pattern of Cytokines in Serum. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 169, n. January, p. 333–338, 1989.

WANDERLEY, J. L. M. et al. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 176, n. 3, p. 1834–1839, 2006.

WICKRAMASINGHE, S. N.; ABDALLA, S. H.; KASILI, E. G. Ultrastructure of Bone-Marrow in Patients With Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Pathology**,

v. 40, n. 3, p. 267–275, 1987.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M. B.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial Pathogenesis**, v. 38, n. 4, p. 147–160, 2005.

YARALI, N. et al. Myelodysplastic features in visceral leishmaniasis. **American Journal of Hematology**, v. 71, n. 3, p. 191–195, 2002.

ZHANG, Y. et al. The Clinical Characteristics and Predictors of Refractory *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia in Children. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0156465, 2016.

ZHAO, C.; PAPADOPOULOU, B.; TREMBLAY, M. J. *Leishmania infantum* promotes replication of HIV type 1 in human lymphoid tissue cultured ex vivo by inducing secretion of the proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1 alpha. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, p. 3086–3093, 2004.

ZHAO, E. et al. Bone marrow and the control of immunity. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 9, n. 1, p. 11–19, 2012.

10 APÊNDICE

TABELA 5A Comparação entre leucócitos (células/mm³) na medula óssea de pacientes com LV e sem LV (grupo controle) analisados por imunofenotipagem.

Células (mm ³) MO	LV [#]			Sem LV			Valor de p
	Média ± DP	Mediana	Min- Max	Média ±DP	Mediana	Min- Max	
Neutrófilos	5668 ±4670	4469	1068- 19349	11191 ±17719	4727	380,4- 60148	0.44
Monócitos	355,4 ±196	322,1	57,6- 814,4	314 ±246,1	224,8	88,7- 920,6	0.26
T CD4⁺	781,3 ±425,4	739,6	172,6- 1710	860,1 ±1373	352,6	24,3- 4714	0.052
T CD8⁺	858,3 ±538,7	686,3	211,6- 1961	1080 ±937	825	225,3- 3266	0.53
Linfócitos B	657,4 ±722,6	480,4	9,3- 3402	1085 ±2600	296,9	20,1- 8455	0.26

[#]O teste estatístico utilizado para comparar os grupos foi Mann-whitney e valores com p<0.05 foram considerados significativos. O número de pacientes incluídos em cada análise será representada da seguinte maneira: tipo celular (sem pacientes com LV/LV). Neutrófilos (10/26), monócitos (11/27), linfócitos T CD4⁺ (12/25), linfócitos T CD8⁺ (12/25) e linfócitos B (10/26).

TABELA 6A Comparação entre leucócitos (células/mm³) no sangue periférico de pacientes com LV e sem pacientes com LV (grupo controle) analisados por imunofenotipagem.

Células SP	LV [#]			Sem LV			Valor de <i>p</i>
	Média ± DP	Mediana	Min- Max	Média ±DP	Mediana	Min- Max	
Neutrófilos	1515 ±1965	713,4	48,3- 7641	2603 ±1692	2447	627,5- 5550	0,016*
Monócitos	137 ±147,4	129,8	4,0- 525,6	154,5 ±132,4	64,3	21,4- 462,9	0,515
T CD4⁺	928,3 ±788,4	678,5	35,7- 3610	534,1 ±572,8	304,6	18,3- 2037	0,057
T CD8⁺	792 ±1031	468,6	21,7- 5743	738,3 ±582,6	548,1	185- 1839	0,811
Linfócitos B	301 ±281,8	259,7	8,4- 1177	60,5 ±47,1	52,72	6,15- 158	0,0017**

[#]O teste estatístico utilizado para comparar os grupos foi Mann-whitney e os valores com $p < 0.05$ foram considerados significativos. O número de pacientes incluídos em cada análise será representada da seguinte maneira: tipo celular (sem pacientes com LV/LV). Neutrófilos (10/28), monócitos (10/29), linfócitos T CD4⁺ (10/29), linfócitos T CD8⁺ (10/29) e linfócitos B (10/29).

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

TABELA 7A Níveis de citocinas plasmáticas em pacientes com LV e controle (sem LV).

Citocinas SP	LV			Sem LV			Valor de <i>p</i>
	Média ± DP	Mediana	Min- Max	Média ± DP	Mediana	Min- Max	
IL-6	1071 ±3534	45,82	6,2- 15942	20,7± 10,4	20,1	6,5- 37,5	0,025 *
CXCL-8	399,5 ±1385	48,1	7,2- 6948	33,1± 25,4	23,6	12,4- 77,3	0,29
IL-10	57,2 ±64,6	30,1	1,7- 274,2	5,8± 6,8	2,1	0,4- 17	0,0006 ***
INFγ	32,5 ±57,1	7,0	0,0- 204,4	2,0± 1,0	2,0	0,9- 3,2	0,06
TNFα	4,6 ±5,1	2,8	0,0- 24,8	1,2± 2,5	1,1	0,0- 6,3	0,11
IL-1β	5,5 ±8,1	3,7	0,0- 31,1	1,5± 1,7	1,1	0,0- 4,0	0,11
IL-12	1,2 ±1,2	1,0	0,0- 4,0	1,6± 2,8	0,2	0,0- 7,2	0,63

#Os valores das citocinas foram expressos em pg/dL. O teste estatístico utilizado foi Mann-Whitney, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Nesta análise, a amostra do grupo controle apresenta 6 pacientes, enquanto que o grupo LV apresenta 25 pacientes para todas citocinas, com exceção da INF γ com 24 pacientes.

* $p < 0,05$

*** $p < 0,001$

TABELA 8A Níveis de citocinas no sobrenadante da medula óssea de pacientes com LV e controle (sem LV).

Citocinas MO	LV [#]			Sem LV			Valor de <i>p</i>
	Média ± DP	Median a	Min- Max	Média ± DP	Median a	Min- Max	
IL-6	752,2 ±2963	79,1	12,7- 14890	18,6± 9,6	16,3	6,6-31	0,003
CXCL-8	541,2 ±1409	99,5	12,8- 6765	96,6± 71,5	68,3	36,2- 226,7	0,76
IL-10	61,5 ±69,1	43,9	2,7- 301	5,4± 7,1	2,2	0,0- 18,5	0,0003
INFγ	33,7 ±66	11,3	1,0- 268	1,8± 1,3	1,3	0,5- 3,7	0,0017
TNFα	5,7 ±5,3	4,4	0,0- 21,6	1,7± 3,0	0,6	0,0- 7,6	0,014
IL-1β	9,6 ±9,3	6,3	0,7-37	2,4± 1,9	1,8	0,9- 6,0	0,008
IL-12	1,8 ±1,2	1,9	0,0-4,2	1,2± 1,5	0,8	0,0- 3,9	0,26

[#] Os valores das citocinas foram expressos em pg/dL. O teste estatístico utilizado foi Mann-Whitney, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Nesta análise, a amostra do grupo controle apresenta 6 pacientes, enquanto que o grupo LV apresenta 25 pacientes para todas citocinas, com exceção da IL-12 com 24 pacientes.

TABELA 9A Expressão de INF γ , TNF α e CXCL8 pelos leucócitos no sangue periférico.

Sangue periférico [#]	LV	Sem pacientes com LV
Imunidade inata	Média \pm DP	Média \pm DP
Neutrófilos		
INF γ	0.29 \pm 0.64	0.52 \pm 1.03
TNF α	0.41 \pm 0.46	0.22 \pm 0.27
CXCL8	0.28 \pm 0.31	0.12 \pm 0.02
Monócitos (CD14⁺)		
INF γ	3.4 \pm 5.14	2.3 \pm 5.7*
TNF α	1.12 \pm 3.22	0.35 \pm 0.51
CXCL8	3.03 \pm 2.19	1.68 \pm 2.2
Imunidade adquirida		
Linfócitos		
T CD4⁺		
INF γ	0.86 \pm 3.9	0.09 \pm 0.18
TNF α	0.04 \pm 0.07	0.0 \pm 0.0*
CXCL8	0.04 \pm 0.06	0.03 \pm 0.05
T CD8⁺		
INF γ	0.5 \pm 0.88	0.12 \pm 0.27*
TNF α	0.04 \pm 0.09	0.03 \pm 0.08
CXCL8	2.5 \pm 6.3	0.16 \pm 0.04*
B (CD19⁺)		
INF γ	0.07 \pm 0.15	2.9 \pm 5.8
TNF α	0.15 \pm 0.08	1.04 \pm 3.3
CXCL8	0.03 \pm 0.5	0.0 \pm 0.0

[#] Os valores representam a % de expressão de INF γ , TNF α e CXCL8 pelas células.

TABELA 10A Expressão de INF γ , TNF α e CXCL8 pelos leucócitos na medula óssea.

Medula óssea [#]	LV	Sem pacientes com LV
Imunidade inata	Média \pm DP	Média \pm DP
Monócitos (CD14⁺)		
INF γ	4.6 \pm 6.3	3.13 \pm 3.1
TNF α	0.57 \pm 1.03	1.59 \pm 1.8
CXCL8	1.2 \pm 1.35	3.2 \pm 4.04
Neutrófilos		
INF γ	2.1 \pm 1.73	0.72 \pm 0.75*
TNF α	0.03 \pm 0.03	0.11 \pm 0.21
CXCL8	0.70 \pm 0.9	0.0 \pm 0.0
Imunidade adquirida		
Linfócitos		
T CD4⁺		
INF γ	0.07 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0
TNF α	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
CXCL8	0.25 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0
T CD8⁺		
INF γ	0.1 \pm 0.23	0.007 \pm 0.26
TNF α	0.07 \pm 0.23	0.0 \pm 0.0
CXCL8	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
B (CD19⁺)		
INF γ	2.9 \pm 4.7	0.27 \pm 0.44**
TNF α	0.1 \pm 0.31	0.01 \pm 0.04
CXCL8	0.35 \pm 0.53	0.0 \pm 0.0

[#] Os valores representam a % de expressão de INF γ , TNF α e CXCL8 pelas células.

TABELA 11A Comparação entre a expressão de INF γ , TNF α e CXCL8 pelos leucócitos no sangue periférico e na medula óssea.

Sangue periférico [#]	SP	MO
Imunidade inata		
Neutrófilos		
INF γ	0.29±0.67	1.95±1.63****
TNF α	0.45±0.48	0.03±0.03 ****
CXCL8	0.30±0.32	0.82±0.97 *
Monócitos (CD14⁺)		
	±	±
INF γ	3.57±5.53	4.65±6.39
TNF α	1.25±3.47	0.45±0.77
CXCL8	2.79±2.25	1.21±1.25 *
Imunidade adquirida		
Linfócitos		
T CD4⁺		
INF γ	0.11±0.21	0.07±0.21
TNF α	0.05±0.08	0.0±0.0 *
CXCL8	0.04±0.07	0.27±0.43
T CD8⁺		
INF γ	0.50±0.90	0.11±0.24 p=0.018
TNF α	0.03±0.06	0.07±0.25
CXCL8	1.13±1.12	0.0±0.0****
B (CD19⁺)		
INF γ	0.07±0.16	2.94±5.06 ****
TNF α	0.02±0.09	0.12±0.33
CXCL8	0.04±0.06	0.38±0.56 **

[#] Os valores representam a % de expressão de INF γ , TNF α e CXCL8 pelas células.

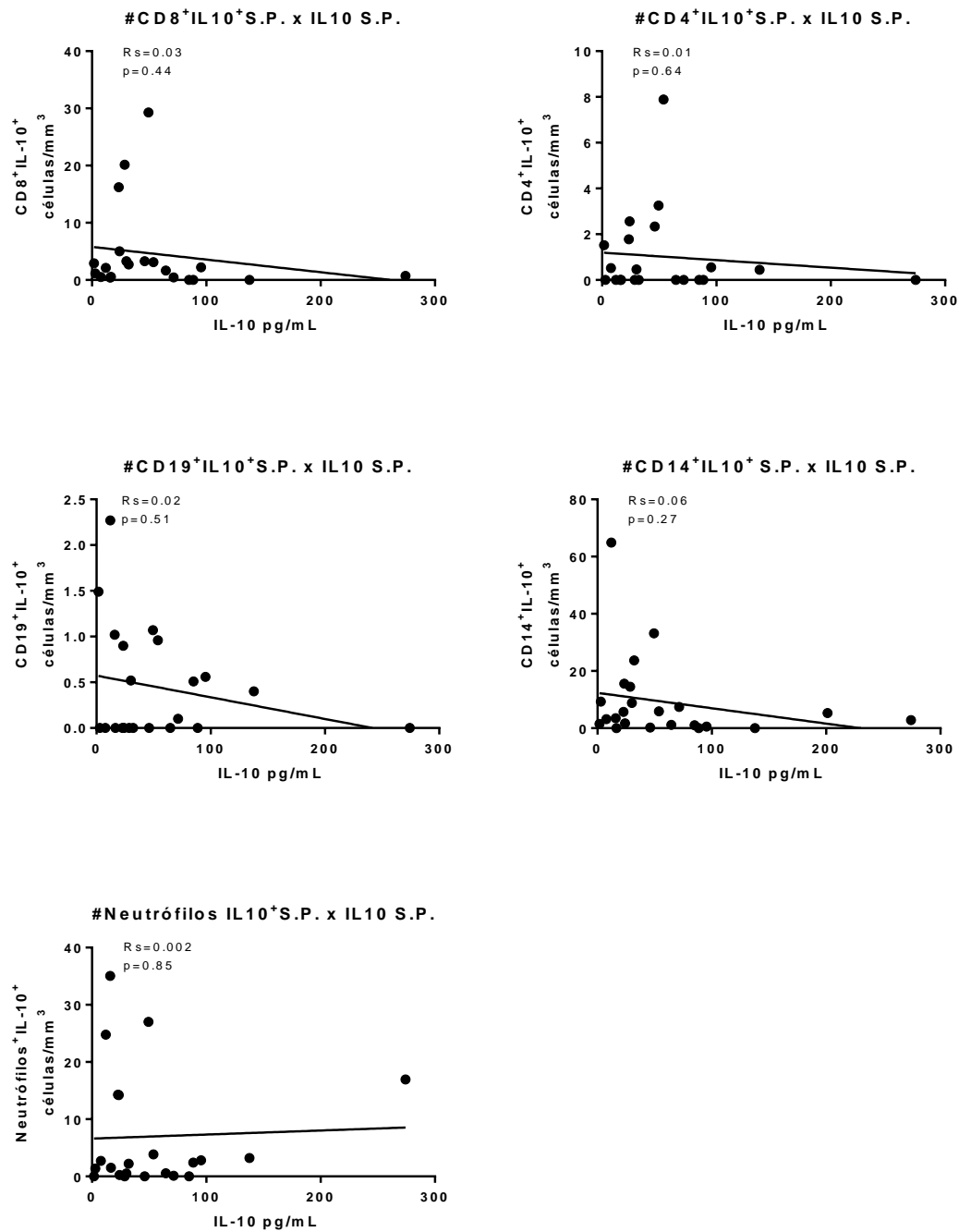


Figura 20A Correlação entre a expressão de IL-10 pelos leucócitos (células/mm³) no sangue periférico e níveis de IL-10 plasmática (pg/mL). Regressão linear simples e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. CD8⁺IL10⁺ (n=21), CD4⁺IL10⁺ (n=21), CD19⁺IL10⁺ (n=22), CD14⁺IL10⁺ (n=23), Neutrófilos IL10⁺ (n=21).

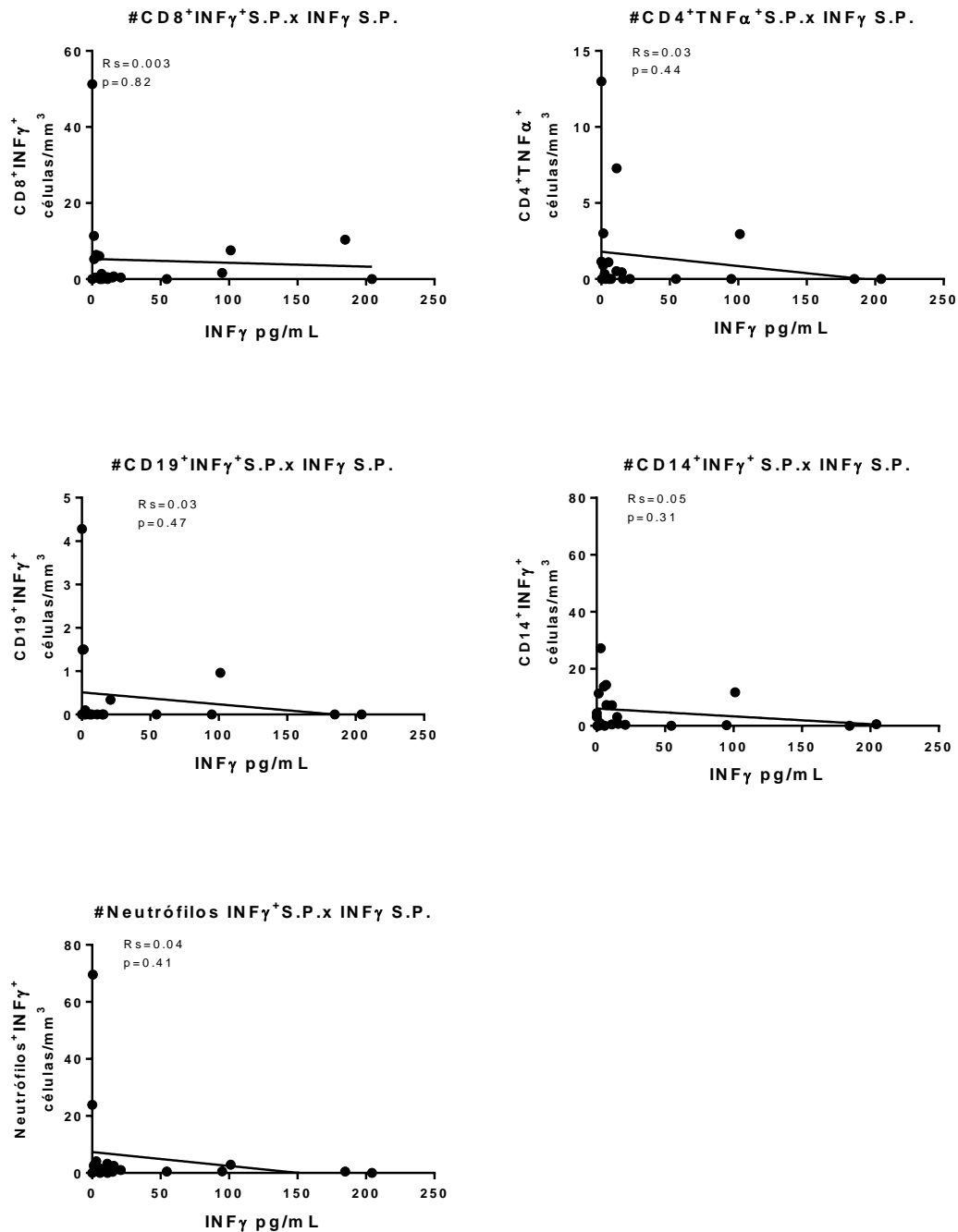


Figura 21A Correlação entre a expressão de $\text{INF}\gamma$ pelos leucócitos (células/ mm^3) no sangue periférico e níveis de $\text{INF}\gamma$ plasmática (pg/mL). Regressão linear simples e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. $\text{CD}8^+ \text{INF}\gamma^+$ (n=21), $\text{CD}4^+ \text{INF}\gamma^+$ (n=21), $\text{CD}19^+ \text{INF}\gamma^+$ (n=21), $\text{CD}14^+ \text{INF}\gamma^+$ (n=21), Neutrófilos $\text{INF}\gamma^+$ (n=21).

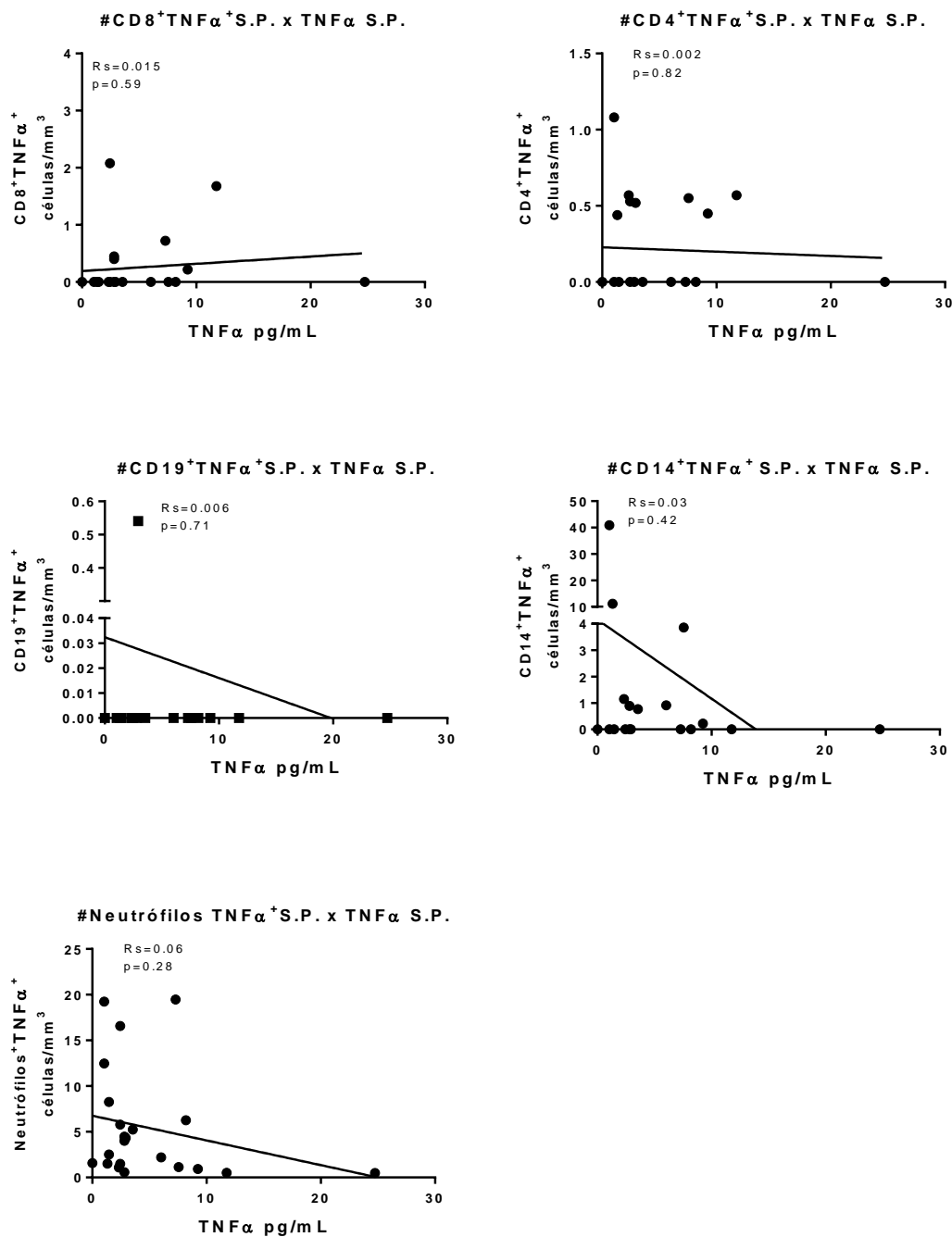


FIGURA 22A Correlação entre a expressão de TNF α pelos leucócitos (células/mm³) no sangue periférico e níveis de TNF α plasmática (pg/mL). Figura 22A Correlação entre a expressão de TNF α pelos leucócitos (células/mm³) no sangue periférico e níveis de TNF α plasmática (pg/mL). Regressão linear simples e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. CD8⁺TNF α ⁺ (n=22), CD4⁺TNF α ⁺ (n=22), CD19⁺ TNF α ⁺ (n=22), CD14⁺ TNF α ⁺ (n=22), neutrófilos TNF α ⁺ (n=22).

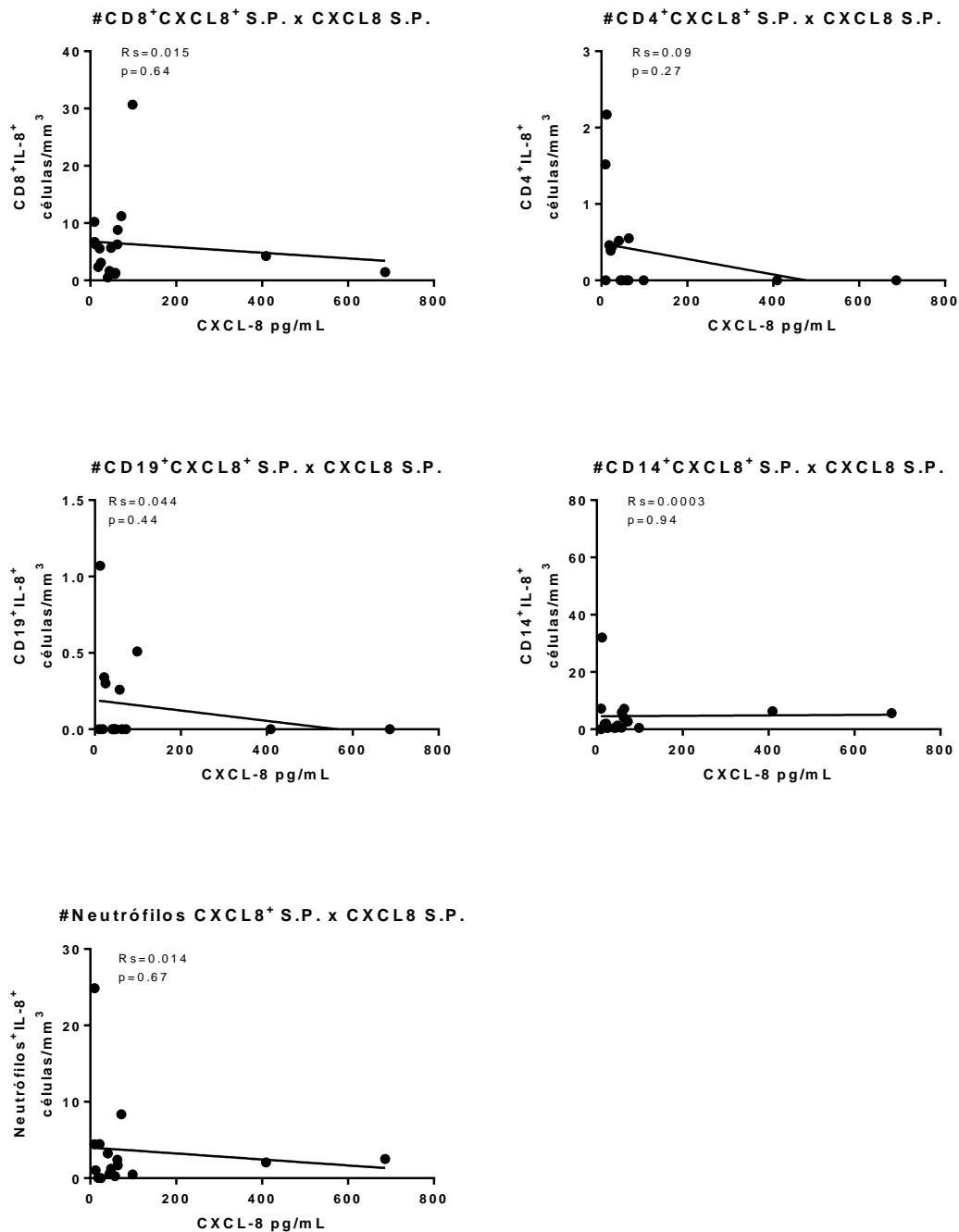


FIGURA 23A Correlação entre a expressão de CXCL8 pelos leucócitos (células/mm³) no sangue periférico e níveis de CXCL8 plasmática (pg/mL). Regressão linear simples e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. CD8⁺CXCL8⁺ (n=17), CD4⁺CXCL8⁺ (n=16), CD19⁺CXCL8⁺ (n=16), CD14⁺CXCL8⁺ (n=17), neutrófilos CXCL8⁺ (n=16).

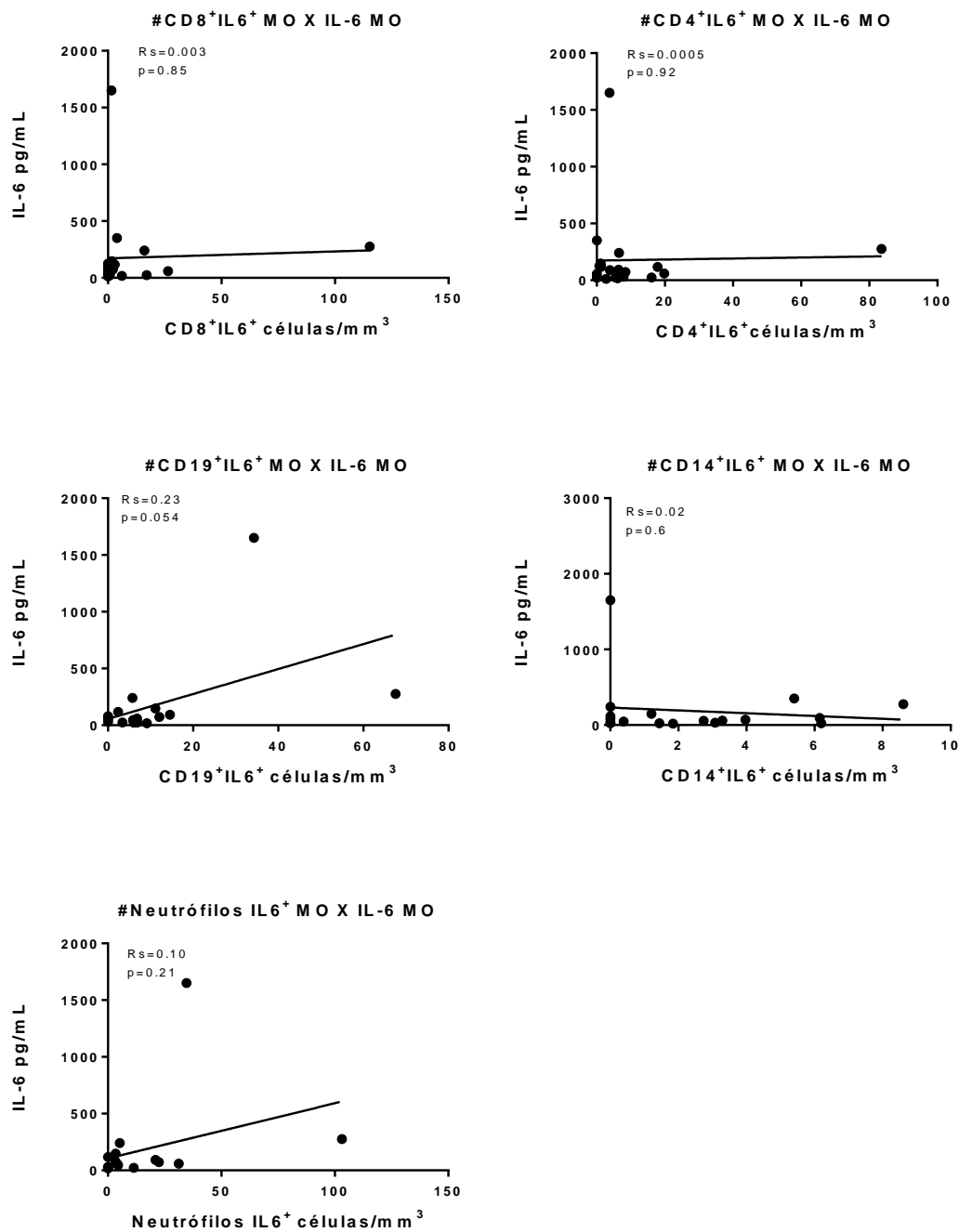


FIGURA 24A Correlação entre a expressão de IL-6 pelos leucócitos (células/mm³) na medula óssea e níveis de IL-6 no sobrenadante da medula óssea na LV (pg/mL). O teste estatístico utilizado foi regressão linear simples e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. CD8⁺IL6⁺ (n=20), CD4⁺IL6⁺ (n=20), CD19⁺IL6⁺ (n=17), CD14⁺IL6⁺ (n=18), neutrófilos IL6⁺ (n=17).

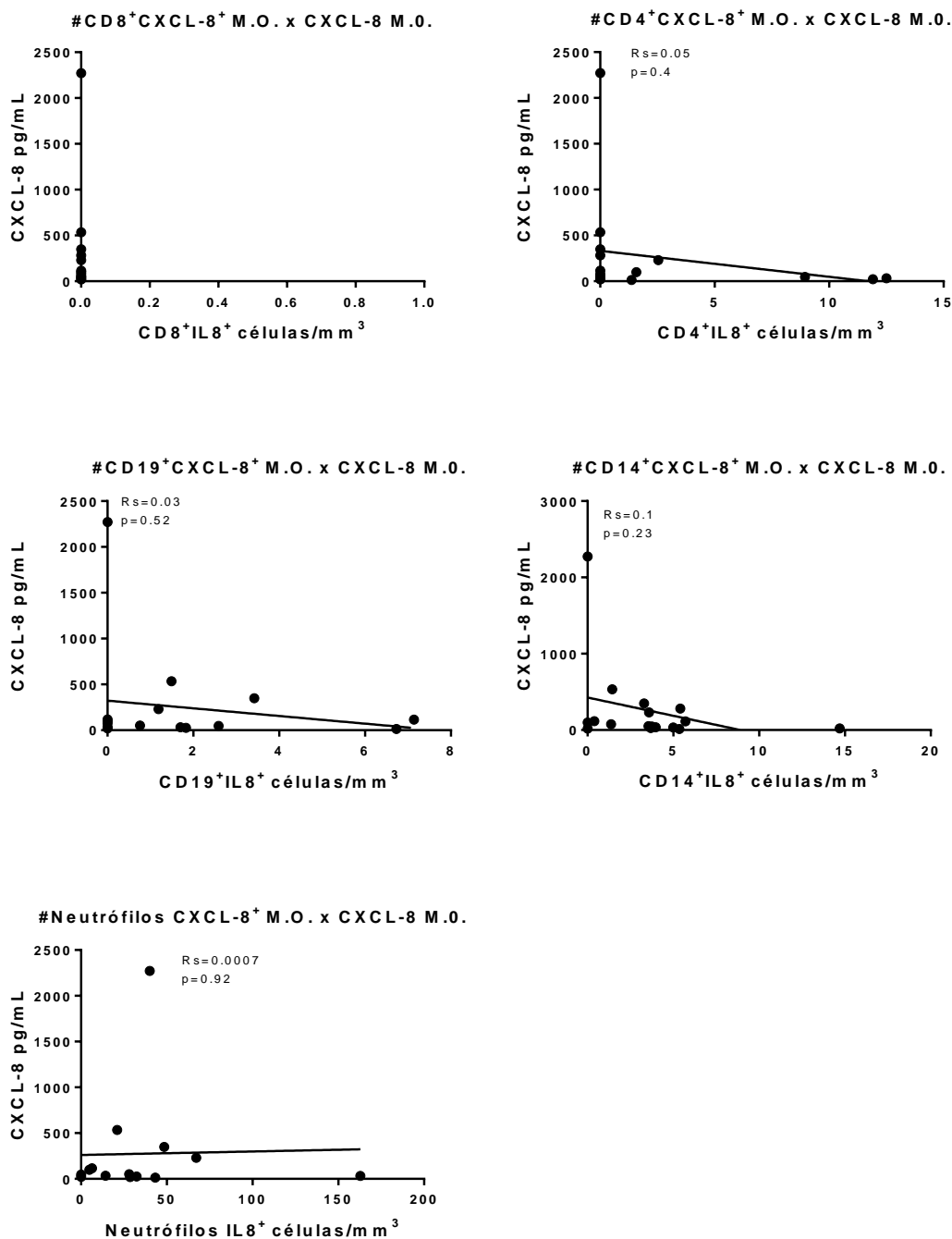


FIGURA 25A Correlação entre a expressão de CXCL8 pelos leucócitos (células/mm³) na medula óssea e os níveis de CXCL8 no sobrenadante da medula óssea na LV (pg/mL). Regressão linear simples e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. CD4⁺ CXCL8⁺ (n=16), CD19⁺ CXCL8⁺ (n=16), CD14⁺ CXCL8⁺ (n=17), neutrófilos CXCL8⁺ (n=14).

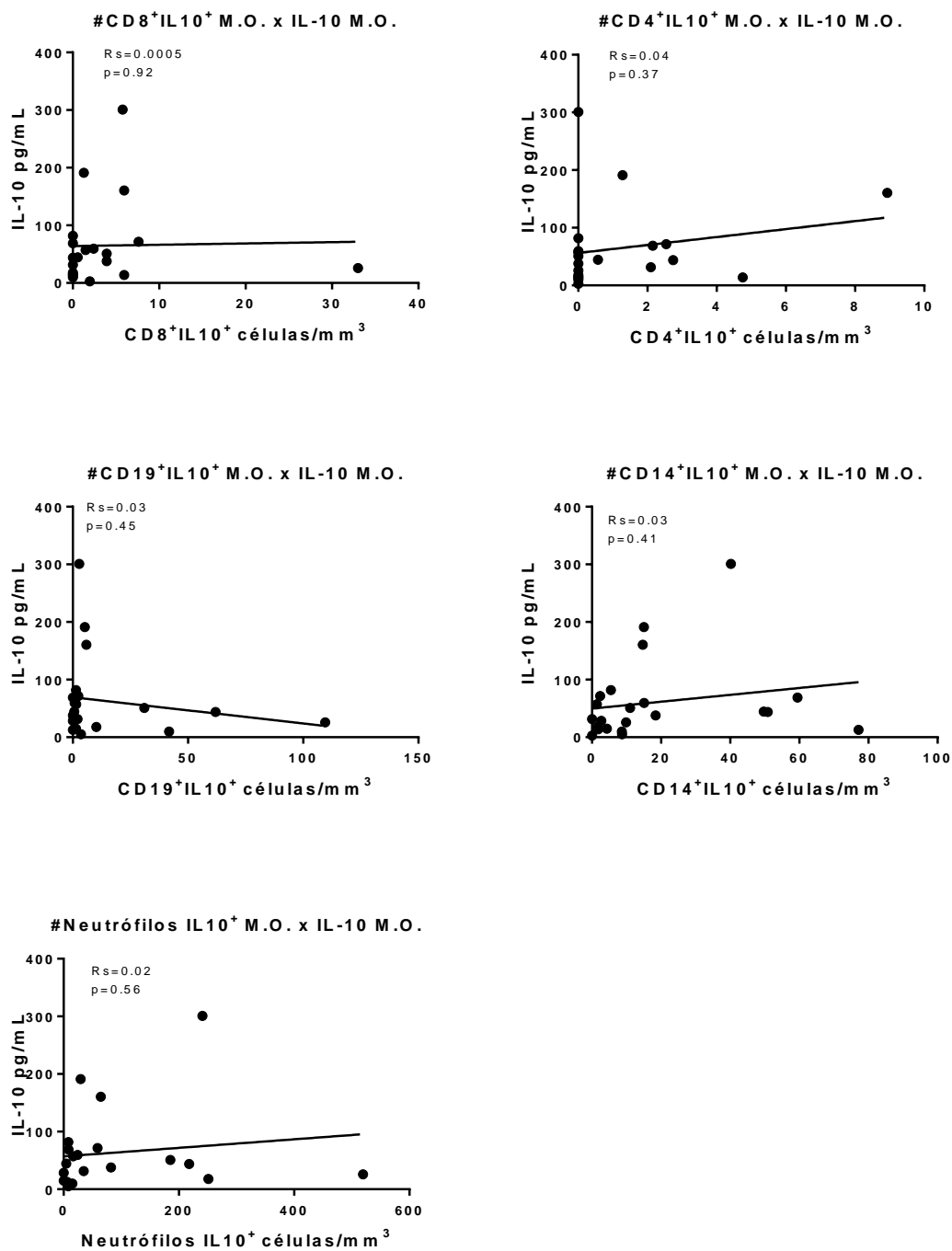


FIGURA 26A Correlação entre a expressão de IL-10 pelos leucócitos (células/mm³) na medula óssea e os níveis de IL-10 no sobrenadante da medula óssea na LV (pg/mL). O teste estatístico utilizado foi de regressão linear simples e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. CD8⁺IL10⁺ (n=20), CD4⁺IL10⁺ (n=20), CD19⁺IL10⁺ (n=21), CD14⁺IL10⁺ (n=22), Neutrófilos IL10⁺ (n=21).

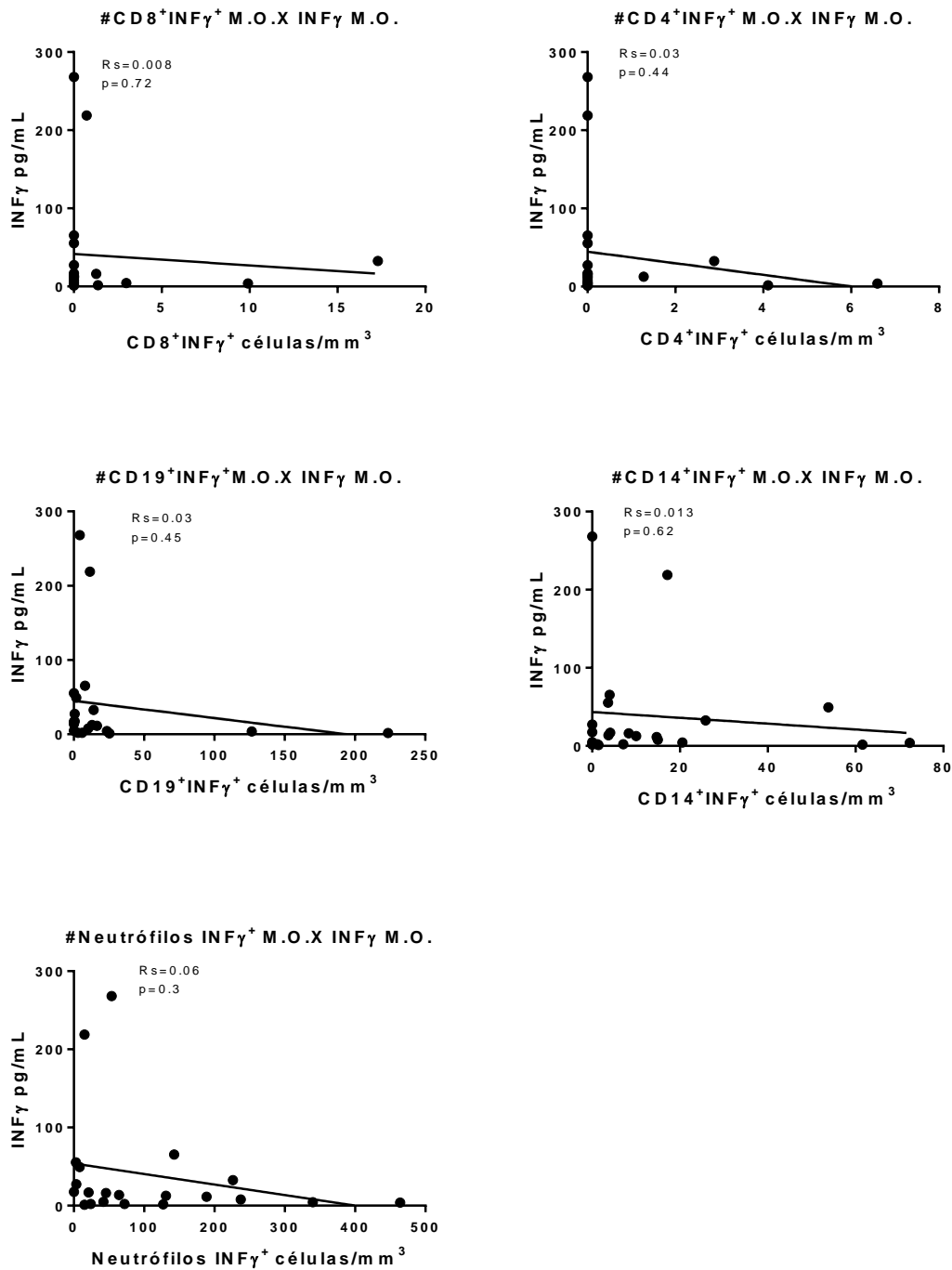


Figura 27A Correlação entre a expressão de $INF\gamma$ pelos leucócitos (células/ mm^3) na medula óssea e os níveis de $INF\gamma$ no sobrenadante da medula óssea na LV (pg/mL). O teste estatístico utilizado foi de regressão linear simples e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. $CD8^+INF\gamma^+$ (n=20), $CD4^+INF\gamma^+$ (n=20), $CD19^+INF\gamma^+$ (n=21), $CD14^+INF\gamma^+$ (n=22), Neutrófilos $INF\gamma^+$ (n=21).

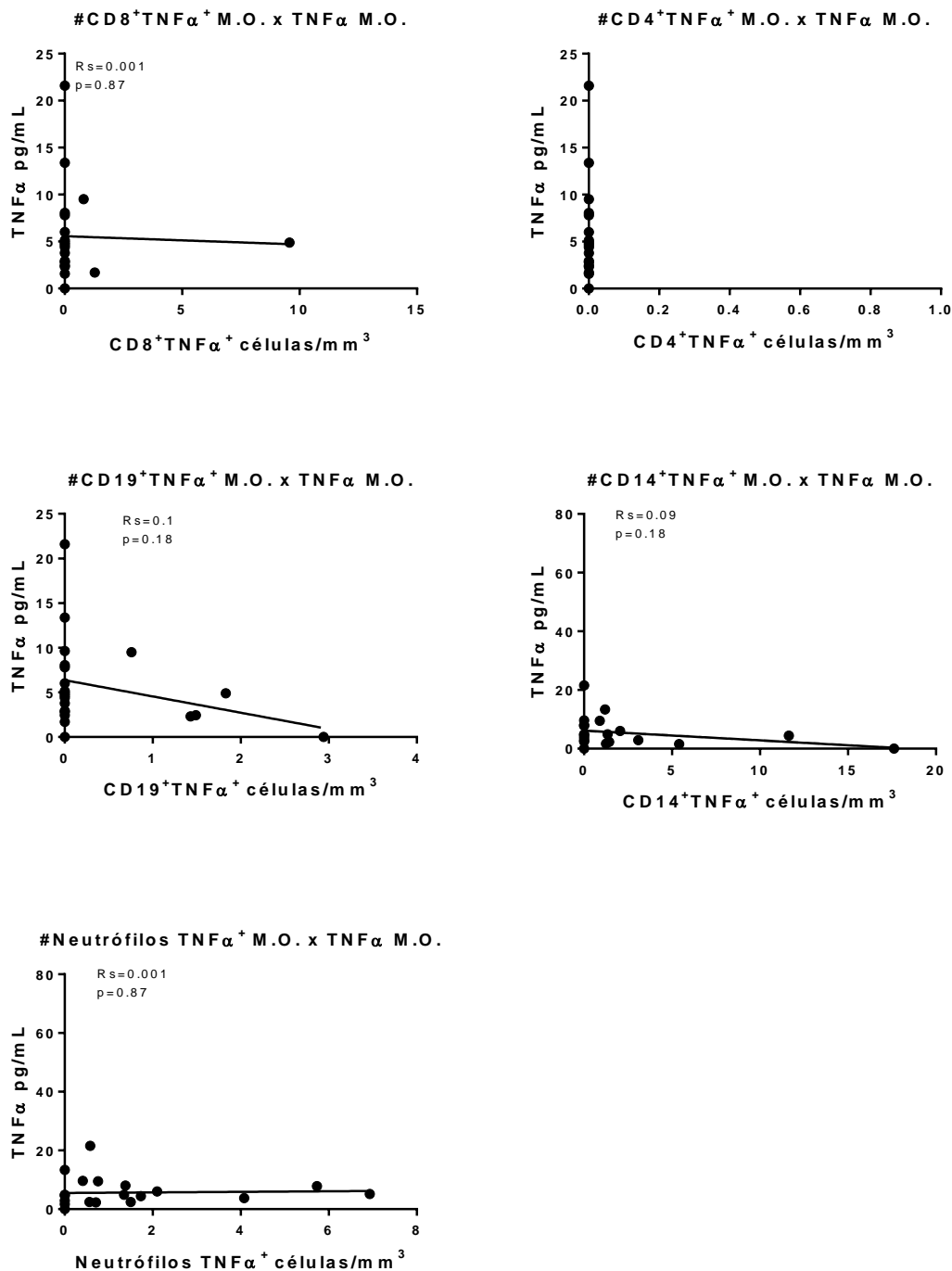


FIGURA 28A Correlação entre a expressão de TNFα pelos leucócitos (células/mm³) na medula óssea e os níveis de TNFα no sobrenadante da medula óssea na LV (pg/mL). O teste estatístico utilizado foi de regressão linear simples e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. CD8⁺TNFα⁺ (n=20), CD19⁺ TNFα⁺ (n=21), CD14⁺ TNFα⁺ (n=22), neutrófilos TNFα⁺ (n=21).

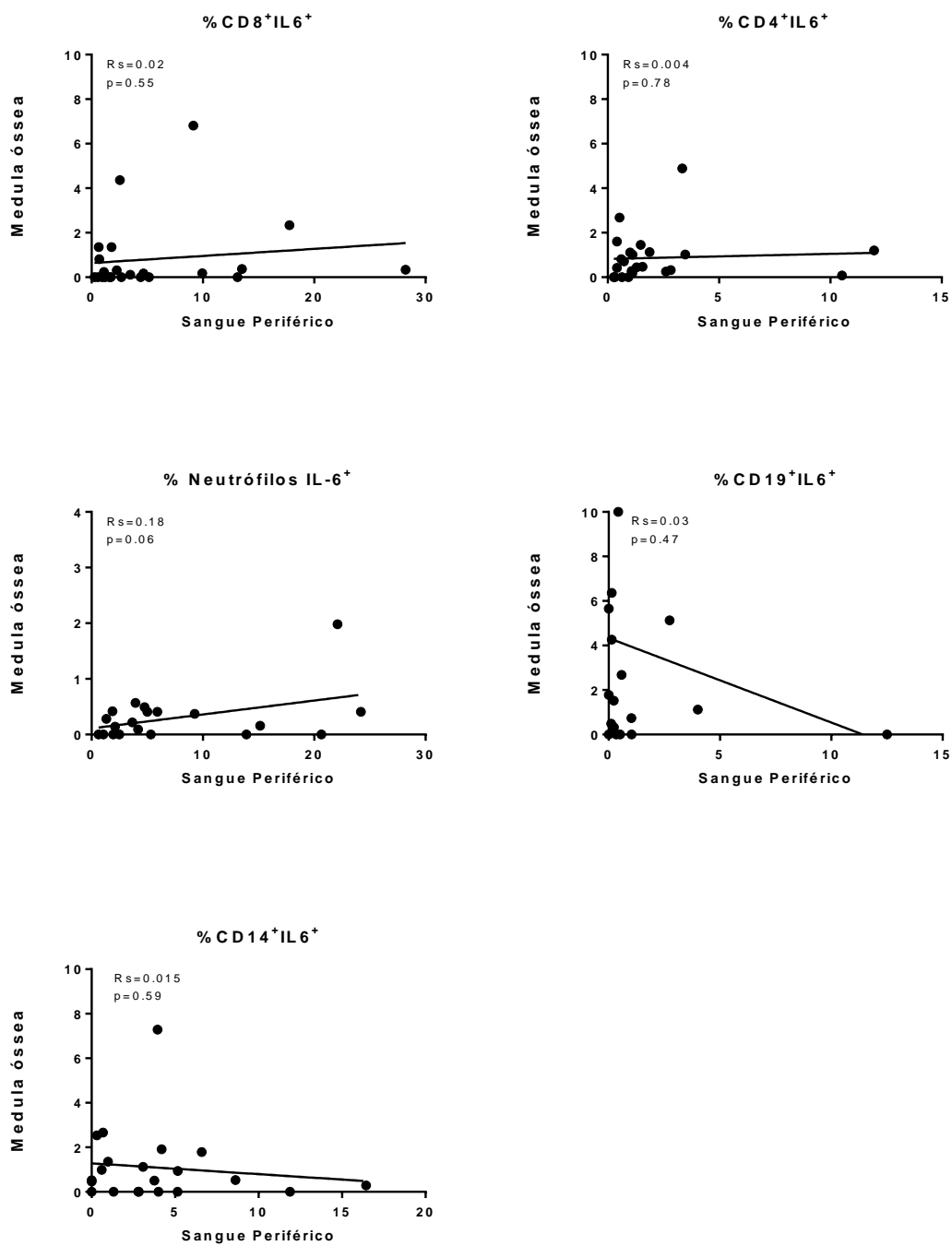


FIGURA 29A Correlação entre a expressão de IL-6 entre as células presentes no sangue periférico e na medula óssea. Regressão linear simples. %CD8⁺IL6⁺ (n=23), %CD4⁺IL6⁺ (n=23), %CD19⁺IL-6⁺ (n=20), %CD14⁺ IL-6⁺ (n=21) e % Neutrófilos IL-6⁺ (n=20).

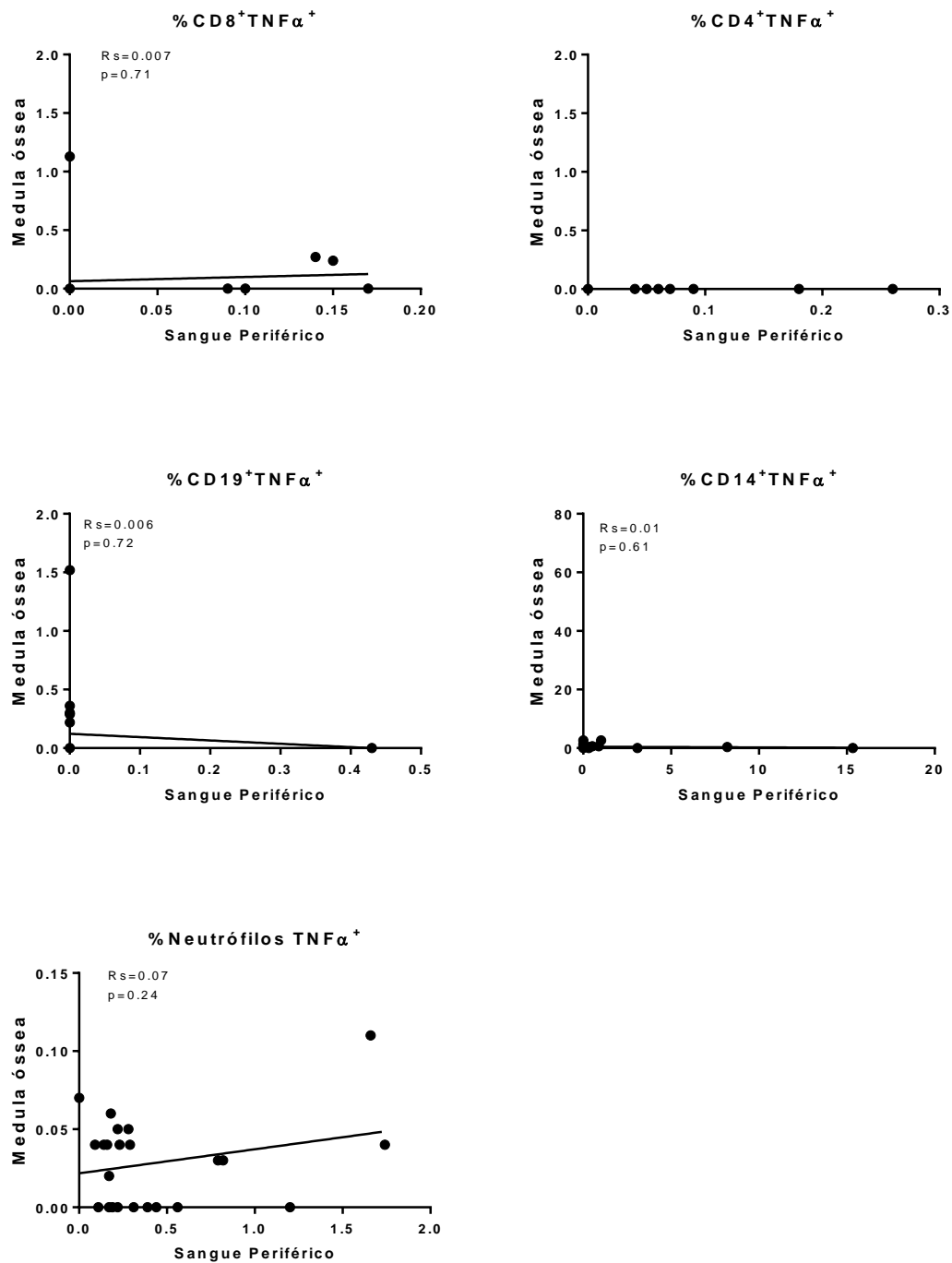


FIGURA 30A Correlação entre a expressão de TNF α entre as células presentes no sangue periférico e na medula óssea. regressão linear simples. %CD8⁺TNF α ⁺ (n=22), %CD19⁺TNF α ⁺ (n=23), %CD14⁺TNF α ⁺ (n=24) e % neutrófilos TNF α ⁺ (n=23).

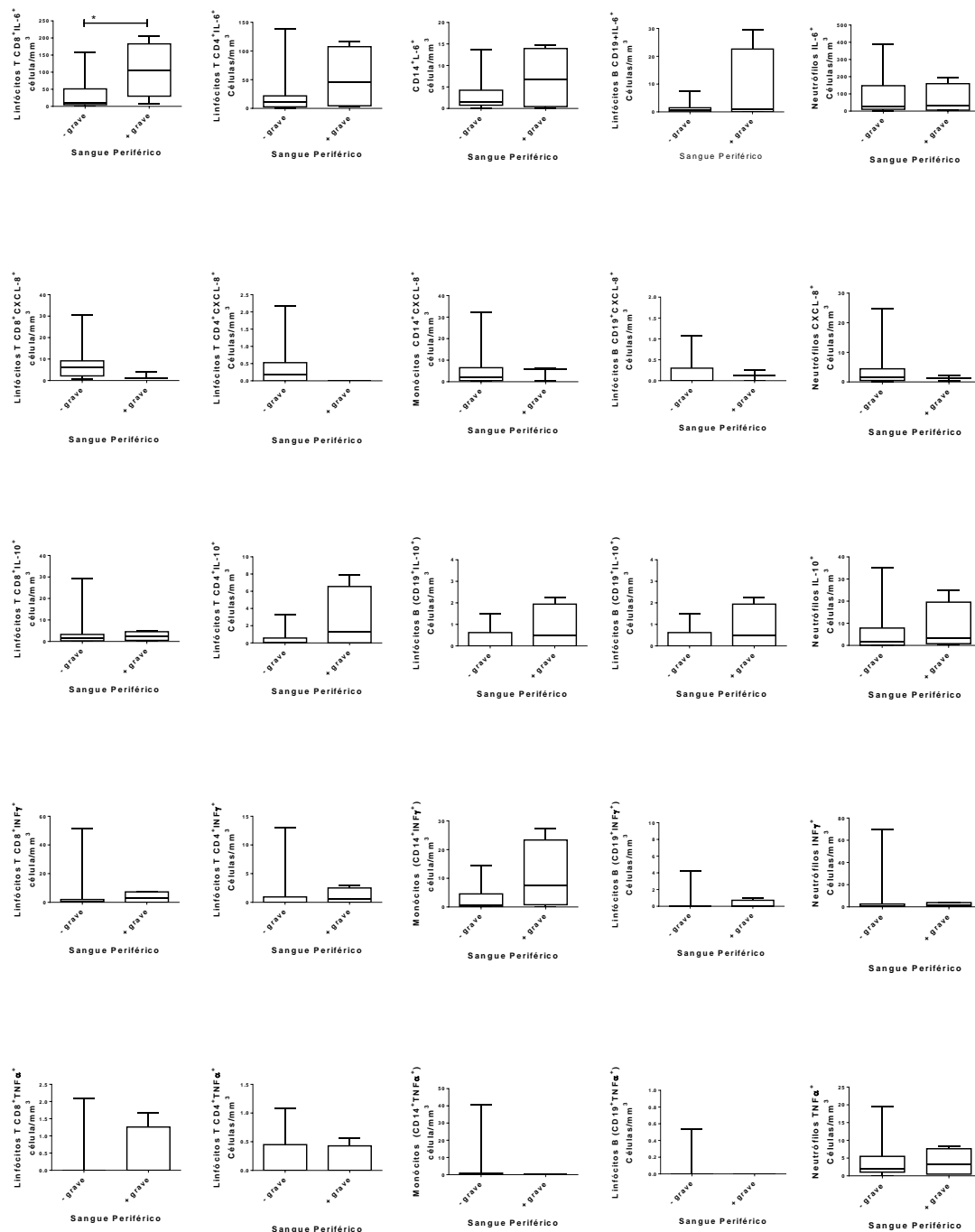


Figura 31A Associação entre a expressão de citocinas pelos leucócitos no sangue periférico de pacientes com gravidade. O número de pacientes (n) será representado por tipo celular (-grave/+grave). $CD8^+IL-6^+$ (23/4), $CD4^+IL-6^+$ (23/4), $CD14^+IL-6^+$ (23/4), $CD19^+IL-6^+$ (23/4), neutrófilos $IL-6^+$ (22/4), $CD8^+CXCL-8^+$ (14/3), $CD4^+CXCL-8^+$ (14/3), $CD14^+CXCL-8^+$ (15/3), $CD19^+CXCL-8^+$ (15/2), neutrófilos $CXCL-8^+$ (15/2), $CD8^+IL-10^+$ (22/4), $CD4^+IL-10^+$ (22/4), $CD14^+IL-10^+$ (23/4), $CD19^+IL-10^+$ (23/4), neutrófilos $IL-10^+$ (22/4), $CD8^+INF\gamma^+$ (23/4), $CD4^+INF\gamma^+$ (22/4), $CD14^+INF\gamma^+$ (23/4), $CD19^+INF\gamma^+$ (23/4), neutrófilos $INF\gamma^+$ (22/4), $CD8^+TNF\alpha^+$ (23/4), $CD4^+TNF\alpha^+$ (23/4), $CD14^+TNF\alpha^+$ (23/4), $CD19^+TNF\alpha^+$ (23/4), neutrófilos $TNF\alpha^+$ (22/4).

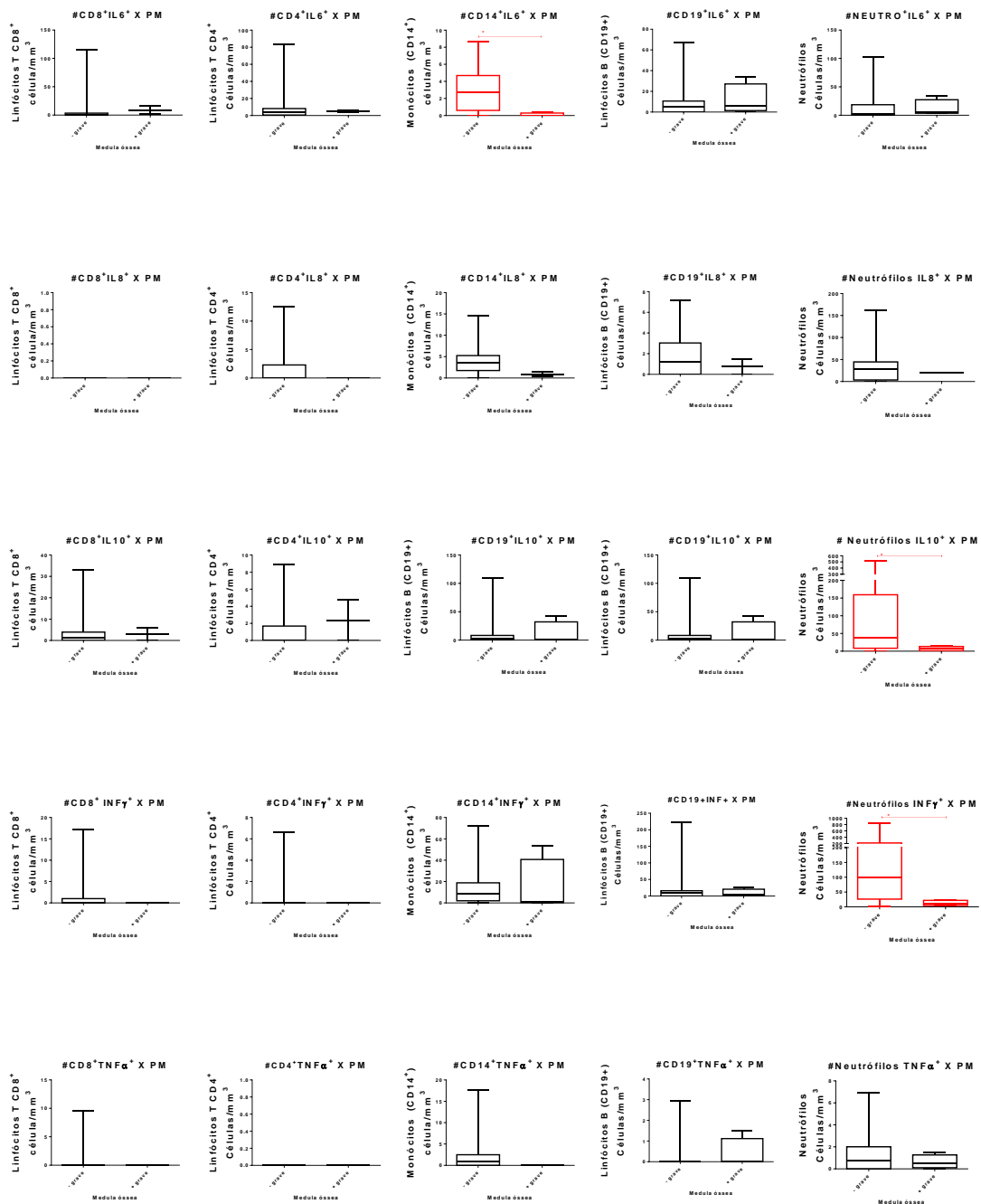


Figura 32A Associação entre a expressão de citocinas pelos leucócitos na medula óssea de pacientes com gravidade. O número de pacientes (n) será representado por tipo celular (-grave/+grave). CD8⁺IL-6⁺ (21/2), CD4⁺IL-6⁺ (21/2), CD14⁺IL-6⁺ (17/4), CD19⁺IL-6⁺ (16/4), neutrófilos IL-6⁺ (16/4), CD8⁺CXCL-8⁺ (16/1), CD4⁺CXCL-8⁺ (16/1), CD14⁺CXCL-8⁺ (16/2), CD19⁺CXCL-8⁺ (15/2), neutrófilos CXCL-8⁺ (14/1), CD8⁺IL-10⁺ (21/2), CD4⁺IL-10⁺ (21/2), CD14⁺IL-10⁺ (21/4), CD19⁺IL-10⁺ (20/4), neutrófilos IL-10⁺ (20/4), CD8⁺INFγ⁺ (21/2), CD4⁺INFγ⁺ (21/2), CD14⁺INFγ⁺ (21/4), CD19⁺INFγ⁺ (20/4), neutrófilos INFγ⁺ (20/4), CD8⁺TNFα⁺ (21/2), CD4⁺TNFα⁺ (21/2), CD14⁺TNFα⁺ (21/4), CD19⁺TNFα⁺ (20/4), neutrófilos TNFα⁺ (20/4).

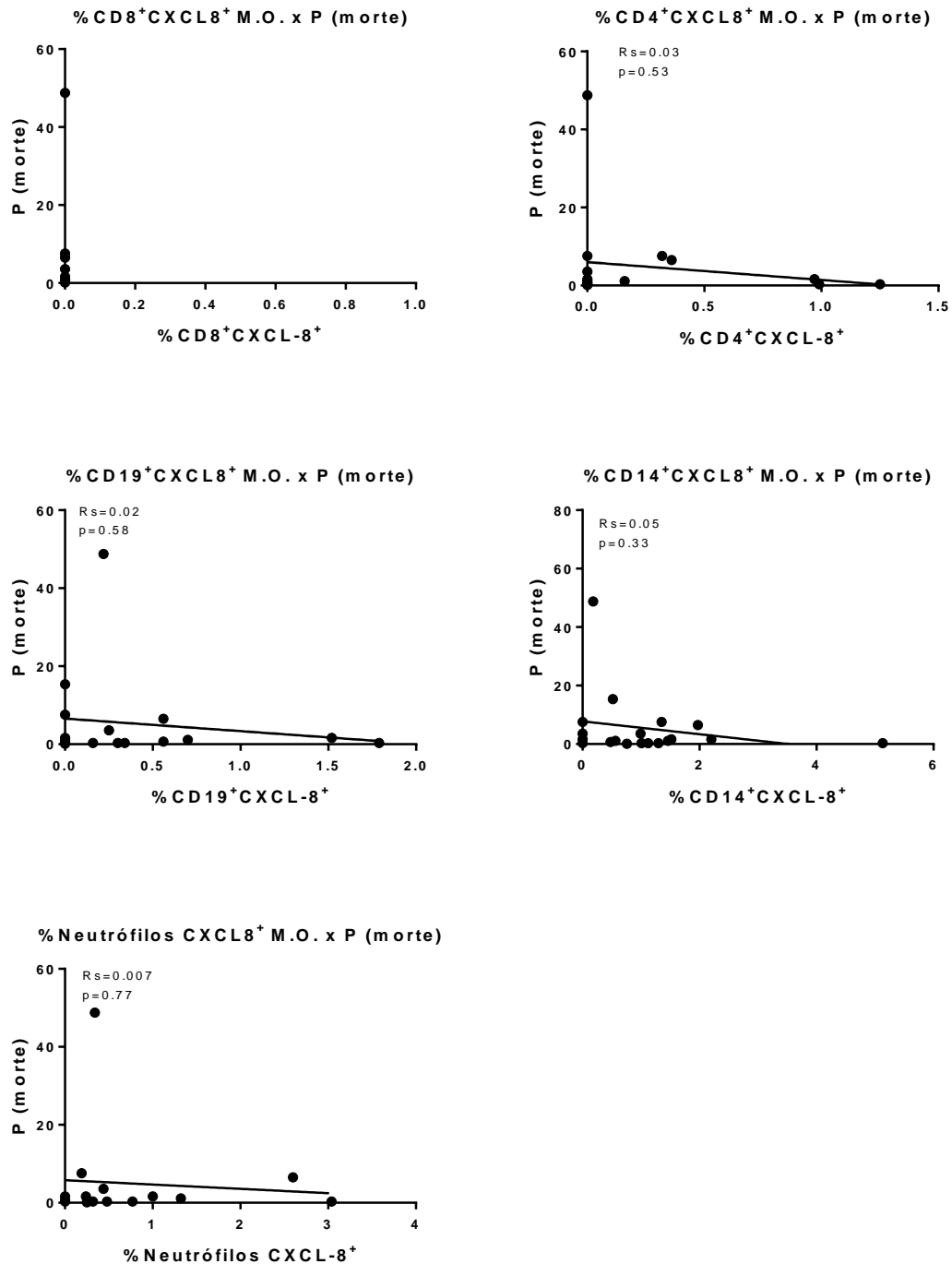


Figura 33A Correlação entre porcentagem de expressão de CXCL8 pelos leucócitos no sangue periférico e probabilidade de morte. Apenas %neutrófilos CXCL8⁺ e %CD19⁺IL8⁺ com n=17, enquanto as outras células apresentaram n=18.

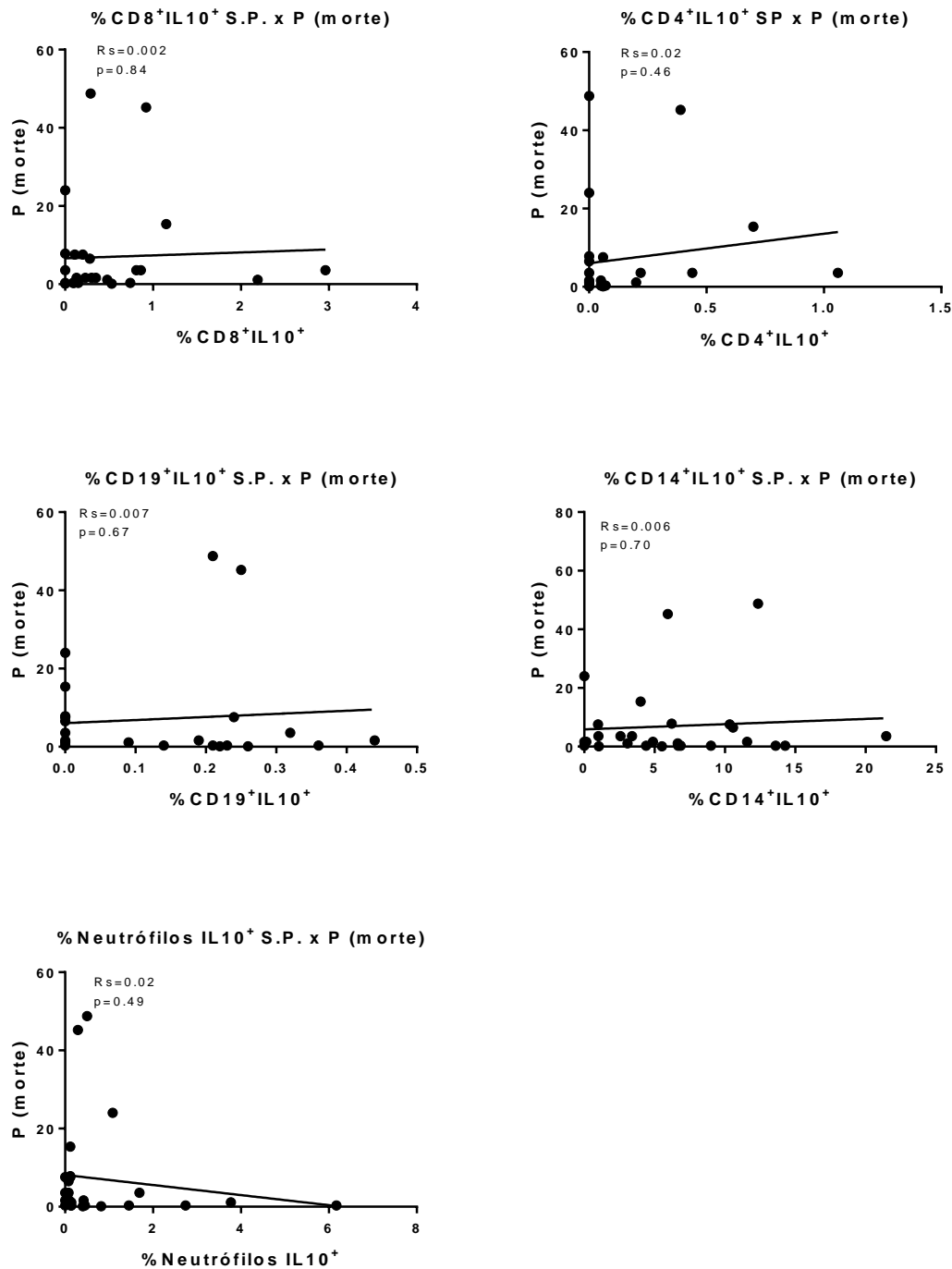


Figura 34A Correla33o entre porcentagem de express33o de IL-10 pelos leuc33ocitos no sangue perif33rico e probabilidade de morte. O teste estat33stico utilizado foi a regress33o linear simples e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. Apenas %neutr33filos IL-10⁺ com $n=26$, enquanto as outras c33elulas apresentaram $n=27$.

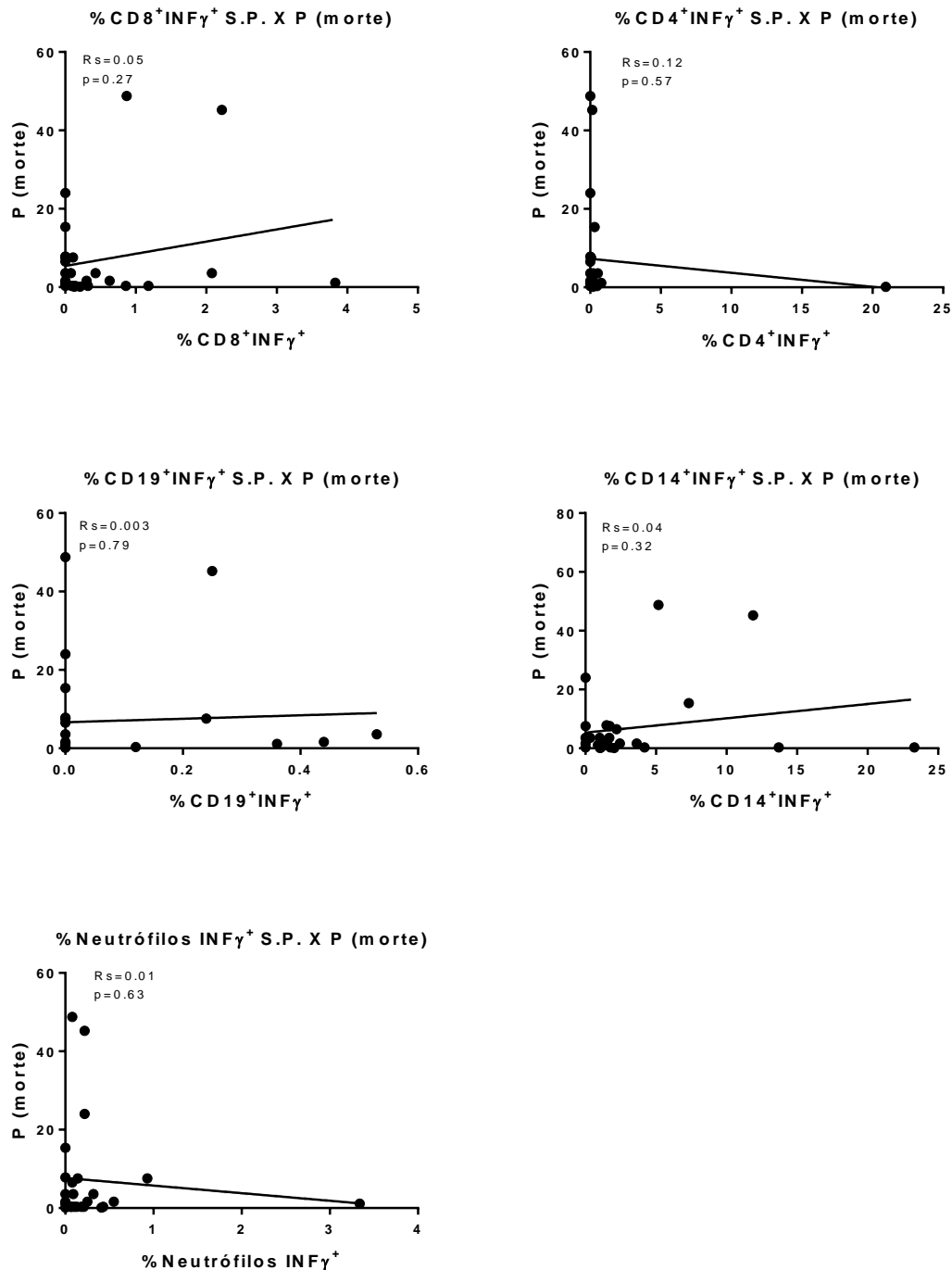


Figura 35A Correla3o3o entre porcentagem de express3o3o de $INF\gamma$ pelos leuc3o3ocitos no sangue perif3e3rico e probabilidade de morte. O teste estat3e3stico utilizado foi regress3o3o linear simples e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. Apenas %neutr3o3filos $INF\gamma^+$ com $n=26$, enquanto as outras c3e3lulas apresentaram $n=27$.

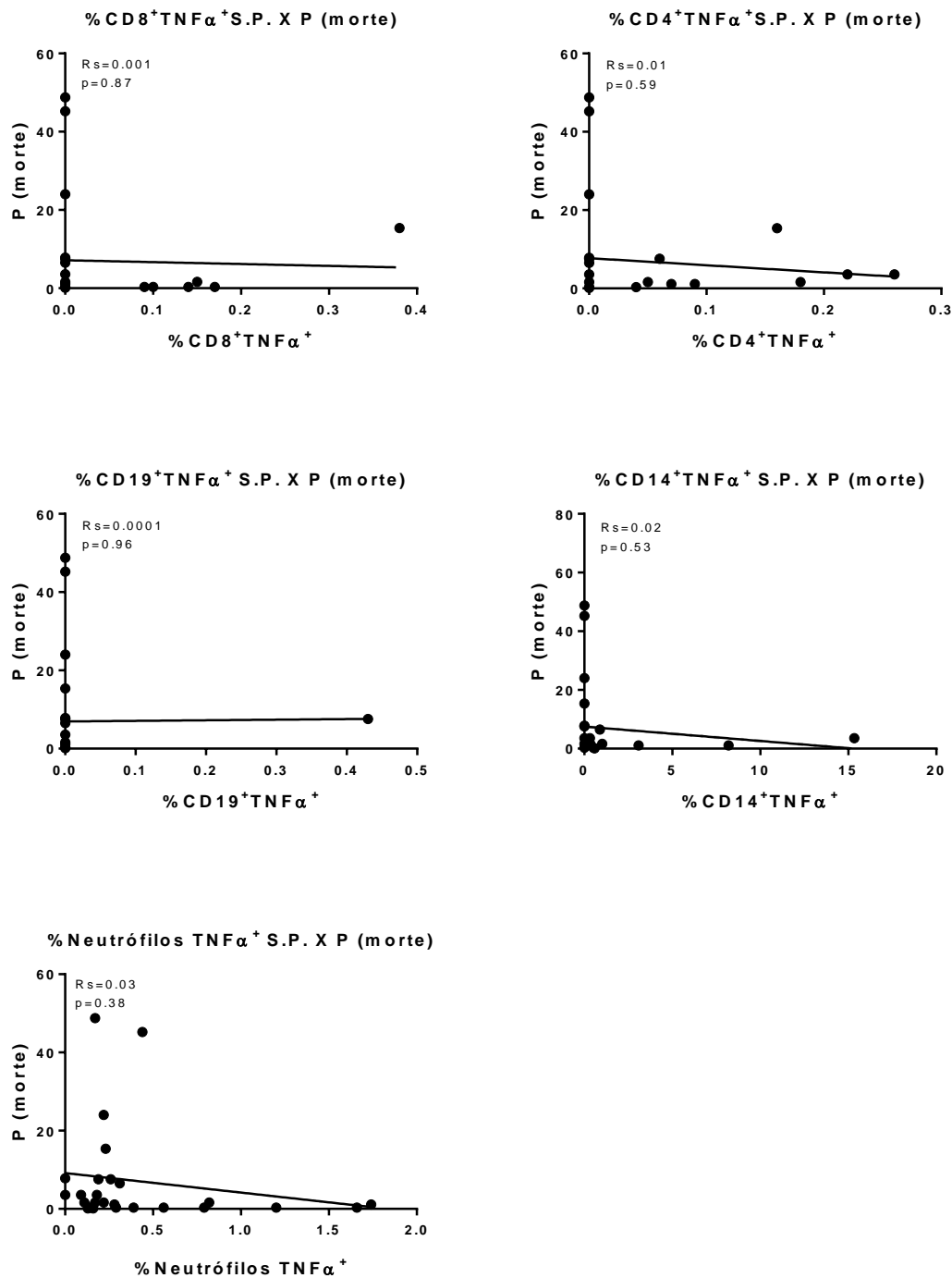


Figura 36A Correlação entre porcentagem de expressão de TNF α pelos leucócitos no sangue periférico e probabilidade de morte. O teste estatístico utilizado foi regressão linear simples e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. Apenas %neutrófilos TNF α^+ com $n=26$, enquanto as outras células apresentaram $n=27$.

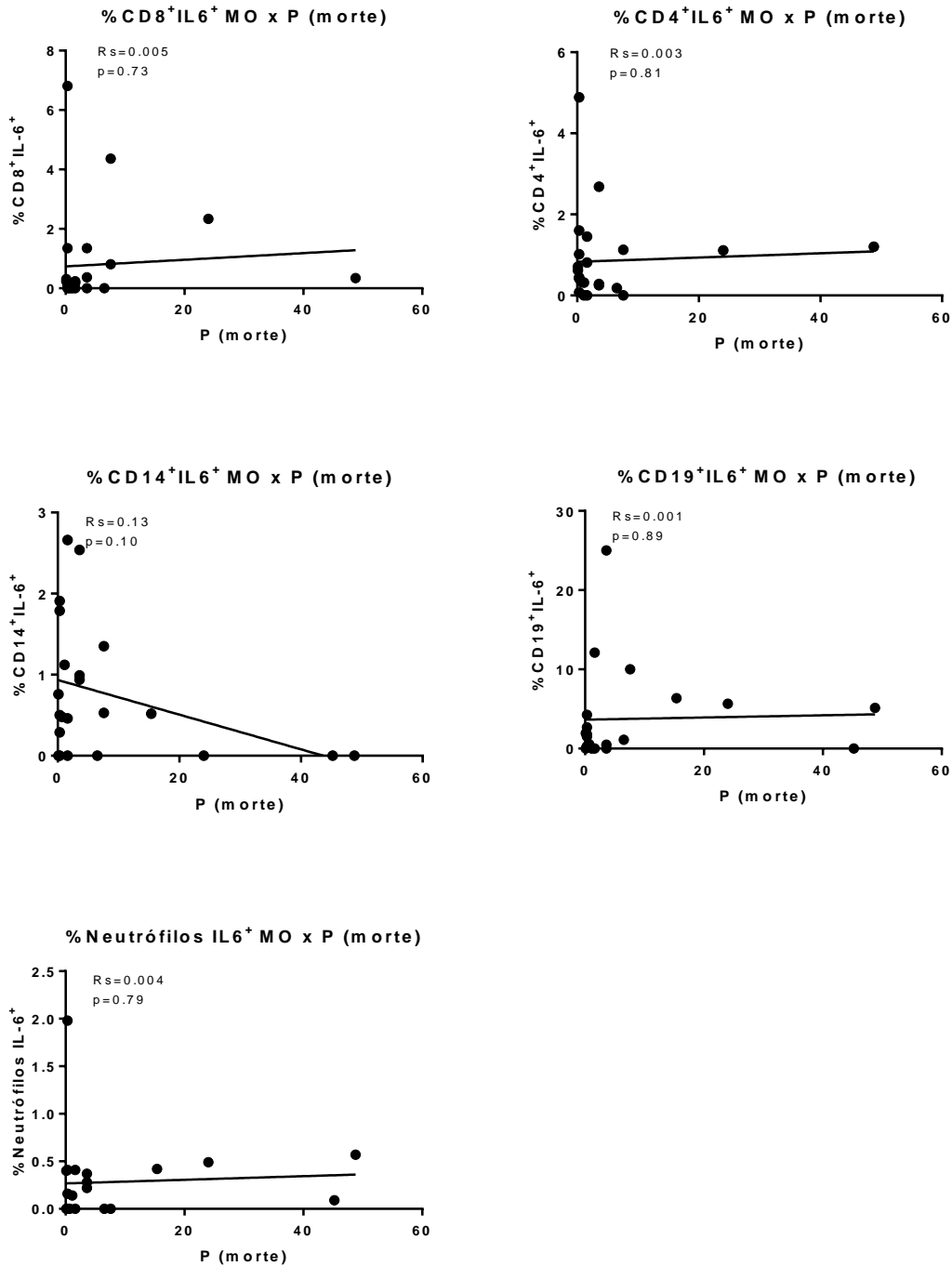


Figura 37A Correlação entre a porcentagem de expressão de IL-6 pelos leucócitos na medula óssea e a probabilidade de morte. O teste estatístico utilizado foi regressão linear simples e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. %CD8⁺IL6⁺ (n=24), %CD4⁺IL6⁺ (n=24), %CD14⁺IL6⁺ (n=22), %CD19⁺IL6⁺ (n=21), %neutrófilos IL6⁺ (n=21).

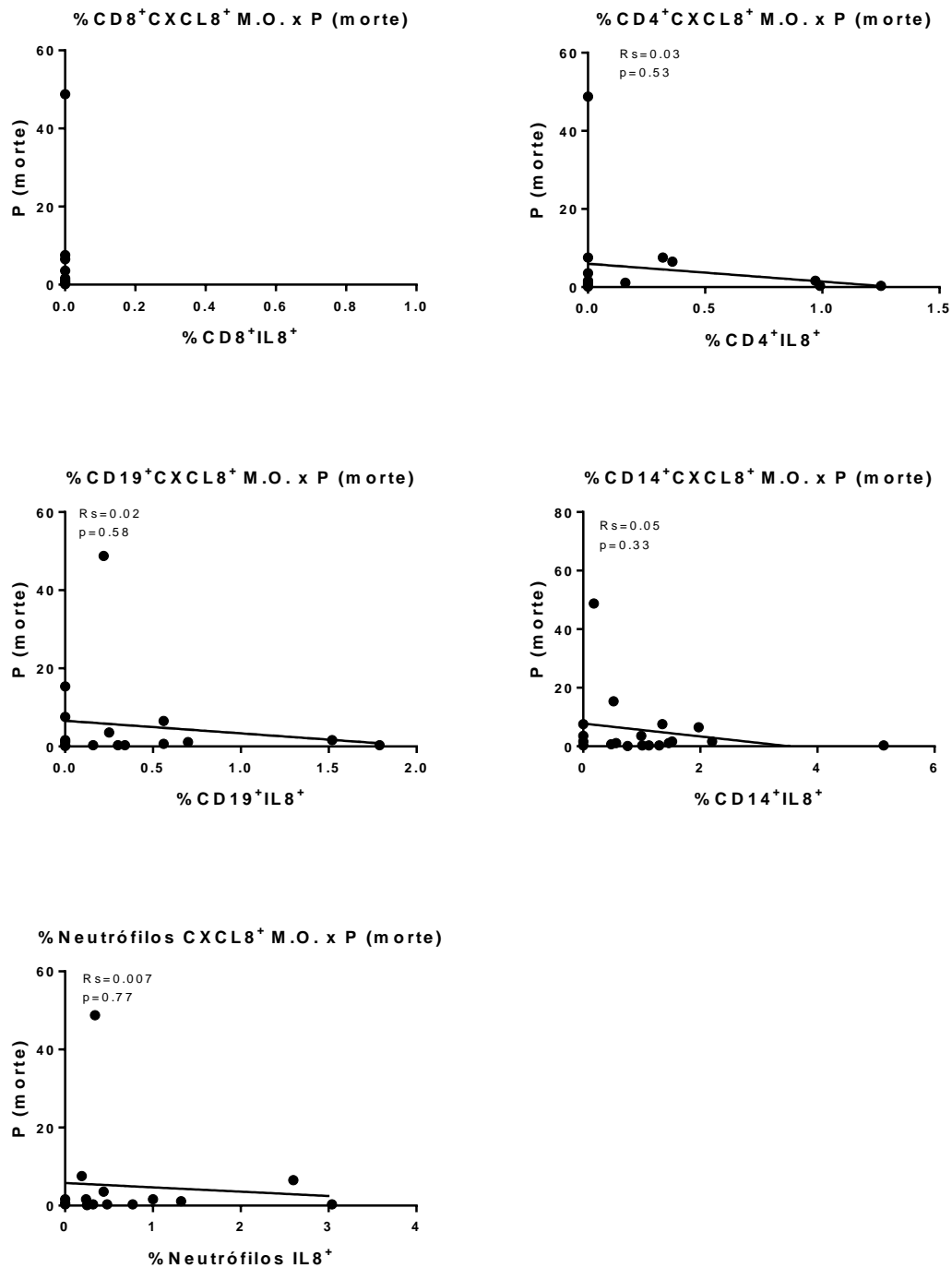


Figura 38A Correlação entre a porcentagem de expressão de CXCL8 pelos leucócitos na medula óssea e a probabilidade de morte. O teste estatístico utilizado foi regressão linear simples e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. %CD4⁺IL8⁺ (n=17), %CD14⁺IL8⁺ (n=19), %CD19⁺IL8⁺ (n=17), %neutrófilos IL8⁺ (n=15).

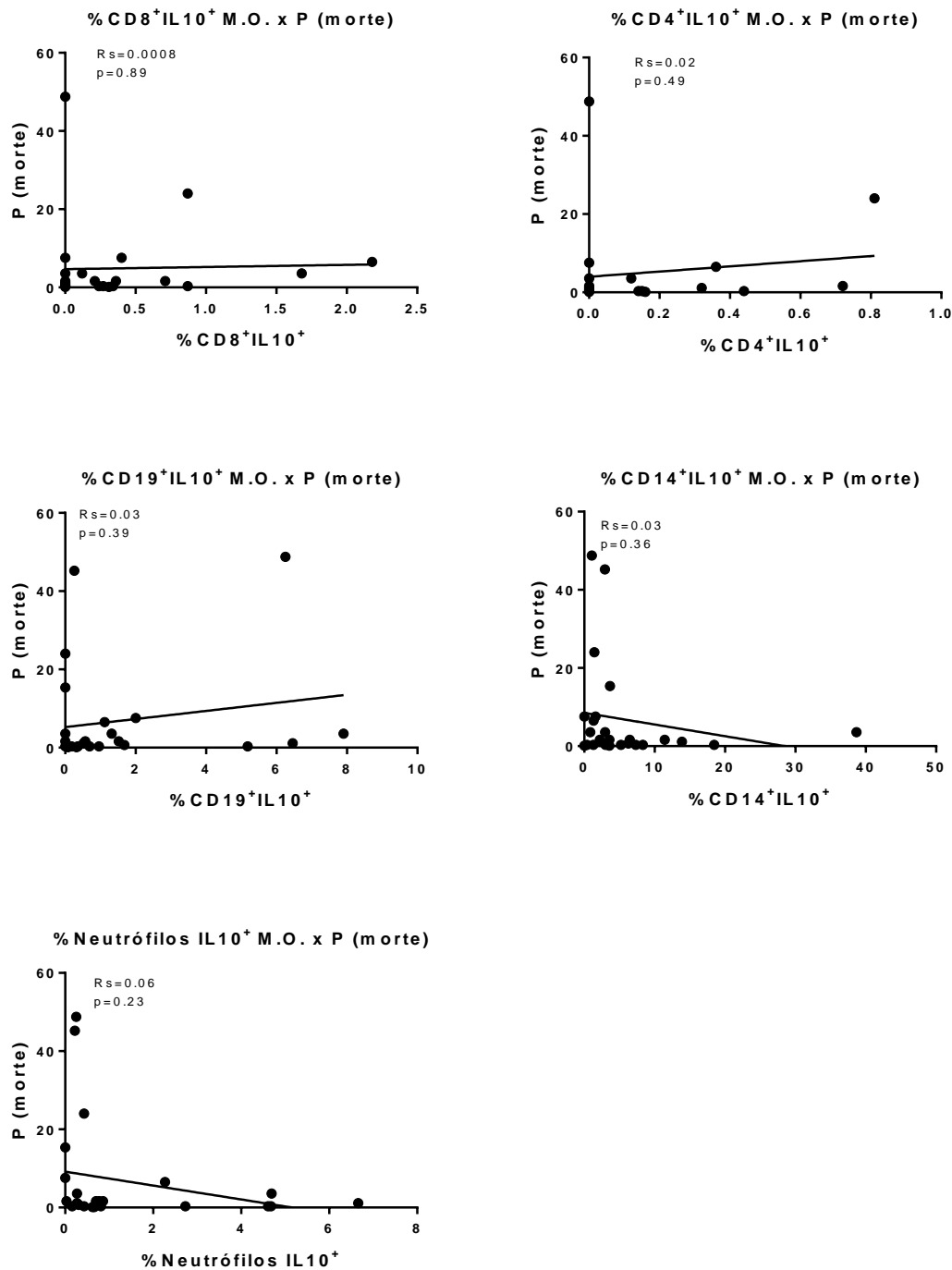


Figura 39A Correlação entre a porcentagem de expressão de IL-10 pelos leucócitos na medula óssea e a probabilidade de morte. O teste estatístico utilizado foi regressão linear simples e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. %CD8⁺IL10⁺ (n=24), %CD4⁺IL10⁺ (n=24), %CD14⁺IL10⁺ (n=26), %CD19⁺IL10⁺ (n=25), %neutrófilos IL10⁺ (n=25).

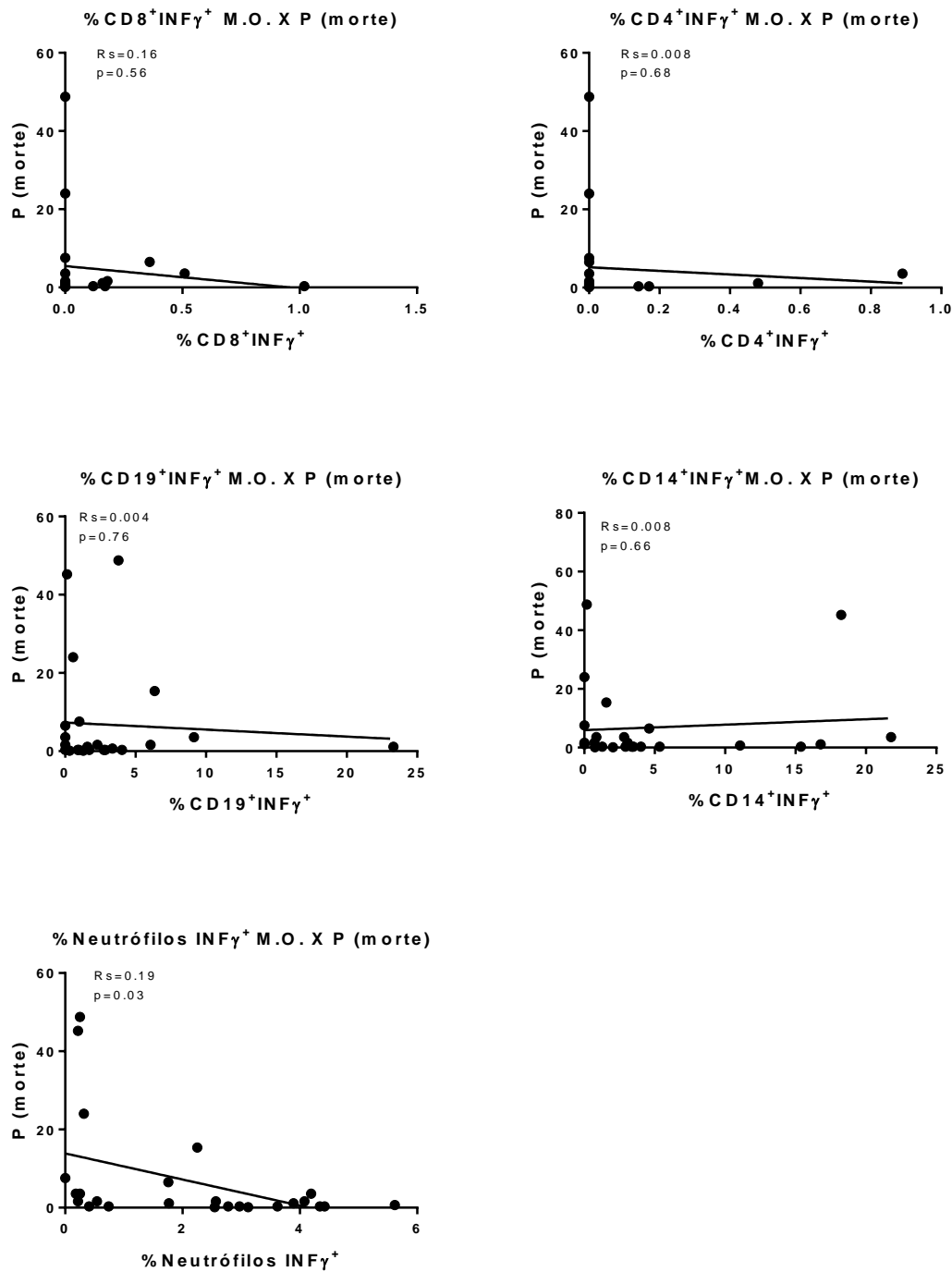


Figura 40A Correla3o3o entre a porcentagem de express3o3o de $\text{INF}\gamma$ pelos leuc3o3ocitos na medula 3o3osa e a probabilidade de morte. O teste estat3o3stico utilizado foi regress3o3o linear simples e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. %CD8⁺INF γ^+ (n=24), %CD4⁺INF γ^+ (n=24), %CD14⁺INF γ^+ (n=26), %CD19⁺INF γ^+ (n=25), %neutr3o3filos INF γ^+ (n=25).

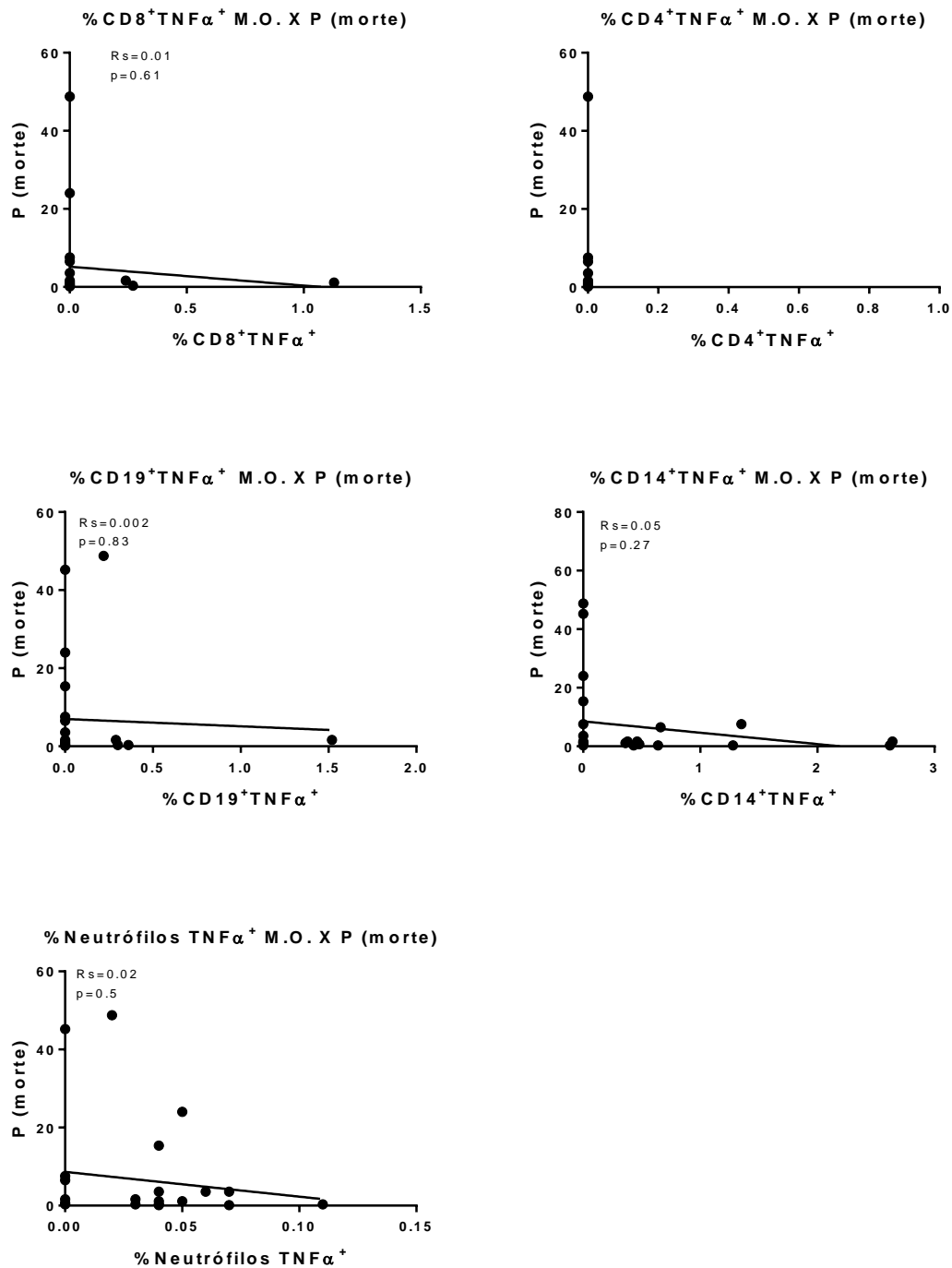


Figura 41A Correlação entre a porcentagem de expressão de TNF α pelos leucócitos na medula óssea e a probabilidade de morte. O teste estatístico utilizado foi regressão linear simples e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. %CD8⁺TNF α ⁺ (n=24), %CD14⁺TNF α ⁺ (n=26), %CD19⁺TNF α ⁺ (n=25), %neutrófilos TNF α ⁺ (n=25).

ANEXO**“INFLUÊNCIA DA MEDULA ÓSSEA NA PATOGENESE DA LEISHMANIOSE VISCERAL”****QUESTIONÁRIO****1. IDENTIFICAÇÃO**

Nº do paciente no estudo: DLC-_____. Número do prontuário no IDTNP: _____

Nome: _____ Sexo: ___M ___F

Data do nascimento: ___/___/___ Data da admissão: ___/___/___ Data da alta: ___/___/___

Procedência (UF) : _____ Município : _____

2. HISTÓRIA CLÍNICA

Tempo de doença: _____ dias

Perda de peso..... () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Se sim, quantificar: _____ g

Febre..... () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Se sim duração da febre: _____ dias

Calafrios..... () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Palidez..... () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Apatia..... () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Agitação / irritabilidade..... () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Fadiga / astenia..... () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Vômitos..... () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Sonolência..... () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Insônia () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Inapetência..... () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Aumento do volume abdominal..... () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Diarréia.....	() 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Constipação intestinal.....	() 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Dor abdominal.....	() 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Tosse.....	() 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Dispnéia.....	() 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Alteração da cor da urina.....	() 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Oligúria.....	() 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Queda de cabelo.....	() 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Edema.....	() 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Petéquias.....	() 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Equimoses.....	() 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Epistaxe.....	() 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Sangramento gengival.....	() 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Sangramento em locais de punção.....	() 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Sangramento digestivo.....	() 1. Sim 2. Não 9. Ignorado
Hematúria macroscópica.....	() 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

1. EXAME FÍSICO

Peso: _____, _____ kg Estatura: _____ cm PA: _____x_____ mmHg FC: _____ bpm FR: _____ irpm

Temperatura axilar máxima durante a internação _____ °C

Estado geral () 1. Bom 2. Regular 3. Comprometido

Consciente () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Cor das mucosas () 1. Normocoradas 2. Palidez leve/moderada 3. Palidez acentuada

Icterícia () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Perfusão periférica () 1. Boa 2. Cianose de extremidades 3. Cianose generalizada

Lesões de pele / Especificar () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Se sim, especificar (tipo da lesão, localização, tamanho, forma, contornos, ulceração, elevação, secreção)

Alopecia () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Linfonodomegalia () 1. Ausente 2. Em 1-2 cadeias 3. Em mais de 3 cadeias

Hidratação () 1. Hidratado 2. Desidratado I 3. Desidratado II 4. Desidratado III 9. Ignorado

Edema () 1. Ausente 2. Edema de MMII 3. Edema generalizado

Estado nutricional: () 1. Eutrófico 2. Desnutrido I 3. Desnutrido II 4. Desnutrido III 9. Ignorado

Dispnéia () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Se sim, retrações intercostais ou subdiafragmáticas () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Ausculta pulmonar () Normal () Estertores crepitantes () Estertores bolhosos
() Sibilos () Roncos

Outras:

Ausculta cardíaca () Normal () Sopro () Arritmia () Ritmo de galope ()

Frêmito

() Atrito pericárdico () Abafamento de bulhas

() Outras:

Esplenomegalia () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Se sim, baço a _____ cm do BCE, na linha hemiclavicular, em direção à ponta

Hepatomegalia () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Se sim, fígado a _____ cm do BCD e _____ cm do apêndice xifóide

Diagnóstico anterior de LV: () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado Data: ___/___/___

Hemotransfusão anterior ao tratamento específico: () 1. Sim 2. Não 9. Ignorado Data: ___/___/___

2. TERAPÊUTICA UTILIZADA 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Terapia de suporte:

() Antibióticos

() Concentrado de hemácias

() Concentrado de plaquetas

() Plasma

Terapia específica

() Antimonial de N metil glucamina Data: ___/___/___

() Desoxicolato de anfotericina B Data: ___/___/___

- () Vitamina K () Anfotericina B lipossomal Data: ___/___/___
- () Complexo protrombínico
- () AAS ou terapia anticoagulante () Miltefosina Data: ___/___/___
- () Outras:
-

3. COMPLICAÇÕES 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

- () Infecção urinária
- () Insuficiência renal
- () Pneumonia
- () Infecção cutânea ou do tecido celular subcutâneo
- () Sepsis
- () Hemorragia
- () Convulsões
- () Outra:
-
-
-

4. CO-MORBIDADES 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

- () HIV / aids
- () Uso de drogas imunossupressoras
- () Câncer.
Especificar: _____
- () Transplante.
Especificar: _____
- () Doença renal crônica

() Doença hepática crônica

() Outra:

5. EVOLUÇÃO CLÍNICA

Número de dias de febre após o início da terapia específica: ____ dias

Tamanho do baço à saída do hospital: ____ cm do RCE

Tamanho do fígado à saída do hospital: ____ cm do RCD

() Alta hospitalar com melhora

() Alta hospitalar sem melhora

() Transferência para UTI

() Transferência para outro serviço

() Óbito

Em caso de óbito, data do óbito: ___/___/___ Causa mortis: _____

Comentários: _____

"INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO DE *LEISHMANIA CHAGASI* SOBRE A PATOGENIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL"

Data	Valores normais	Dia 0	Dia ____	Dia ____	Dia ____
Hemácias	Homens: 4,3 a 5,7 x 10 ⁶ Mulheres e crianças: 3,9 a 5,3 x 10 ⁶				
Hemoglobina	Homens: 13,50 a 18,00g/dL Mulheres e crianças: 12,00 a 16,40/dL				
Hematócrito	Homens: 40 a 54 % Mulheres e crianças: 36 a 47 %				
VCM	Normal: 76,0 – 96,0 μ ³				
HCM	Normal: 27,0 – 32,0 μ μ γ				
CHCM	Normal: 32,0 – 36,0 %				
Leucócitos	Criança: 4.000 a 10.000/mm ³ Adultos: 4.000 a 9.000/mm ³				
Pro, meta e mielócitos	0%				
Bastonetes	1-5%				
Segmentados	Criança: 30 a 55% Adultos: 50 a 70%				
Eosinófilos	Criança: 1 a 5% Adultos: 1 a 4				
Basófilos	0-1%				
Linfócitos	Criança: 30 a 45% Adultos: 20 a 45%				
Monócitos	0-2 %				
Plaquetas	Criança: 150.000 a 430.000/mm ³ Adultos: 150.000 a 400.000/mm ³				
VHS	<10				
AST (TGO)	Homens: <37U/l Mulheres: <31U/l				

ALT (TGP)	Homens: < 40U/l Mulheres: <31U/l				
Fosfatase alcalina	Crianças: 27 a 215 U/dL Adultos: 27 a 100 U/dL				
Bil. Direta	Até 0,4 mg/dL				
Bil. Indireta	Até 0,8 mg/dL				
Creatinina	0,4 – 1,3 mg/dL				
Uréia	15 a 45 mg/dL				
<i>Leishmania</i> na MO	Ausente				
Sorologia p/ <i>Leishmania</i>	Não reagente				
Cultura p/ <i>Leishmania</i>	Sem crescimento				
Teste HIV	Não reagente				
Proteínas Totais	6,0 a 8,0 g/dL				
Albumina	3,5 a 5,5 g/dL				
Globulinas	2,0 a 3,2 g/dL				
Coagulograma					
Tempo sangramento	1-4 min				
Tempo coagulação	Até 12 min				
TAP	70-100%				
INR	0,91 – 1,25				
Exame de Urina					
Proteínas	Ausente				
Hg/hemácias	Ausente				
Cilindros	Ausente				
Piócitos	Até 5 por campo-				
Exame de fezes					
Parasitológico	Negativo				
Radiologia					
Rx Tórax					
Culturas					

