



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

REPHANY FONSECA PEIXOTO

**INVESTIGAÇÃO DA IMUNOMODULAÇÃO POR SUBPOPULAÇÕES
DE LINFÓCITOS NA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA**

JOÃO PESSOA – PB

2018

REPHANY FONSECA PEIXOTO

**INVESTIGAÇÃO DA IMUNOMODULAÇÃO POR SUBPOPULAÇÕES
DE LINFÓCITOS NA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa Multicêntrico de Pós-
Graduação em Ciências Fisiológicas
da Universidade Federal da Paraíba,
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatjana Keesen de Souza Lima

JOÃO PESSOA – PB

2018

P379i Peixoto, Rephany Fonseca.

Investigação da imunomodulação por subpopulações de
linfócitos na leishmaniose visceral humana / Rephany
Fonseca Peixoto. - João Pessoa, 2018.

130 f. : il.

Orientação: Tatjana Keesen de Souza Lima.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Ciências Fisiológicas. 2. Leishmaniose visceral. 3.
Leishmania - Infecção. I. Lima, Tatjana Keesen de
Souza. II. Título.

UFPB/BC

REPHANY FONSECA PEIXOTO

**INVESTIGAÇÃO DA IMUNOMODULAÇÃO POR SUBPOPULAÇÕES
DE LINFÓCITOS NA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA**

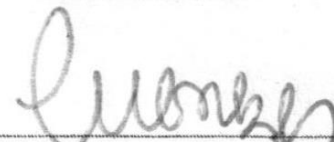
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Data da Aprovação: ____/____/____.

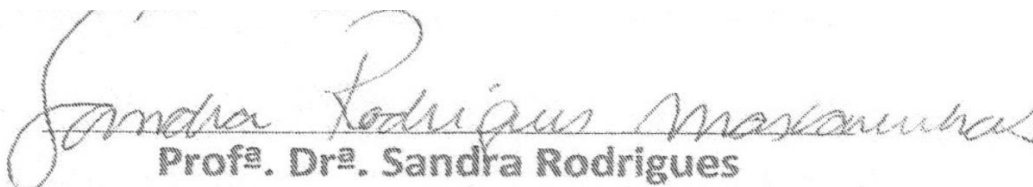
BANCA EXAMINADORA:


Prof^a. Dr^a. Tatjana Keesen de Souza Lima

Clemente


Prof^a. Dr^a. Cristiane Alves da Silva

Menezes


Prof^a. Dr^a. Sandra Rodrigues

Mascarenhas

Aos meus pais, Edizio e Yaponira.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida e por ser o meu refúgio! Sou grata por ele me capacitar a construir diariamente a vontade dele na minha vida;

Aos meus pais, **Edizio e Yaponira**, por serem minhas grandes paixões e que se sacrificam todos os dias por mim! Por serem meus maiores exemplos de dignidade e luta! Meu amor por vocês é imenso! OBRIGADA POR TUDO!

Ao meu irmão **Erick**, por ser o meu companheiro inseparável e uma eterna criança no meu coração! Amo você;

Ao meu noivo, **João Wictor**, por me incentivar tanto a conquistar os meus sonhos, por compartilhar os seus sonhos comigo e por ser aquele que escolhi para constituir uma família. Te amo;

Aos meus **avós**, tão amados e presentes na minha vida, que estão ao meu lado apoiando minhas decisões! Celebrando minhas conquistas;

Aos meus queridos **amigos**, por compartilharem comigo suas vidas e tornarem a minha muito mais leve. Em especial, **Bruna Macêdo, Isabel Cristina, Juliana Rocha, Cinthia Nóbrega, Deyse Cristina, Eduarda Lopes e Éssia Almeida**, por todo cuidado, carinho, amizade e por acompanharem diariamente o desenvolvimento desse trabalho.

A minha orientadora, Professora **Tatjana Keesen**, por me ensinar tanto e por ser responsável pela imensa paixão que tenho pela imunologia de doenças infecciosas, uma vez que me transferiu através de suas experiências tal sentimento. Obrigada por confiar no meu trabalho e por ter nos apresentado com a pequena **Helena**;

A toda **família LABIDIC**, por tornarem o laboratório um lugar suave e harmonioso! Por toda a disponibilidade em servir uns aos outros e principalmente, pelas gargalhadas diárias, MUITO OBRIGADA!

A **todos os professores** do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, que com seus conhecimentos me formaram como profissional;

A **equipe do departamento de doenças infecto-parasitárias** do Hospital Universitário Lauro Wanderley – UFPB, pela presteza na disponibilização dos dados dos pacientes e por todo auxílio com as coletas, em especial a **Marineuma Martins**;

Aos **voluntários** por se disponibilizarem a participar da pesquisa, contribuindo de maneira essencial para desenvolvimento desse trabalho;

A equipe do **Laboratório de Farmacologia Cardiovascular**, por apoio estrutural. Em especial, a **Fátima Azevedo** por ser tão amável e uma verdadeira amiga;

A equipe do **Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular**, por todo auxílio estrutural. Em especial, a **Teresa Cristina Grisi** por toda disponibilidade, doação e carinho.

A **equipe do Laboratório de Imunogenética** da Universidade Federal do Rio Grande do Norte pelo auxílio no desenvolvimento do presente trabalho;

Aos membros da Banca Examinadora, **Sandra Rodrigues Mascarenhas e Cristiane Alves da Silva Menezes**, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento desse trabalho! Obrigada!

“... Isto é uma ordem: sê firme e corajoso.
Não te atemorizes, não tenhas medo, porque
o Senhor está contigo em qualquer parte
para onde fores...”

Josué 1:9

RESUMO

As leishmanioses se caracterizam como um complexo de doenças infecto-parasitárias, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Essas doenças estão presentes em 98 países, nos quais cerca de 350 milhões de pessoas encontram-se sob risco de infecção. A leishmaniose visceral (LV) é a forma clínica mais grave da doença e induz respostas imunes mediadas por distintas subpopulações celulares, incluindo células T *natural killer* invariantes (iNKT-CD3+6B11+), células T reguladoras (Tregs - CD4 + CD25^{high}FOXP3 +), as quais podem ser classificadas em Treg natural (CD4 + CD25^{high}FOXP3 + CD45RA +) e Treg de memória (CD4 + CD25^{high}FOXP3 + CD45RA-). A IL-10 é uma citocina chave na imunopatologia dessa doença e os mecanismos de ação envolvidos na modulação imunológica da leishmaniose visceral humana, ainda não foram bem elucidados, no que diz respeito as subpopulações supracitadas. Assim, nosso objetivo foi caracterizar os mecanismos das células iNKT, células T reguladoras natural (nTreg) e de memória (mTreg) na doença e avaliar as principais citocinas produzidas por elas. Para atingir esse objetivo, na primeira parte desse trabalho coletou-se sangue total de pacientes LV (n=10) e indivíduos não infectados (n=7), e as subpopulações nTreg e mTreg foram avaliadas, com e sem estimulação específica do antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA). A análise das células iNKT também foram realizadas, com e sem estimulação específica do antígeno total de *Leishmania* (TLA) em amostras de sangue total nos grupos de pacientes LV (n=12), em controles não endêmicos (CNE – n = 6) e no grupo controle negativo endêmico (CNegE – n = 6). Todas as análises foram realizadas através de citometria de fluxo. Em relação as células Tregs, os resultados demonstraram que: 1) Um número elevado de células Tregs de memória foi observado quando comparado ao número total de células Tregs naturais em todos os grupos avaliados; 2) Uma redução significativa na expressão de CD39/CD73 em células mTreg foi observada nos grupos LV na ausência e/ou presença de estímulo; 3) Uma diminuição na expressão de CTLA-4 foi observada em células mTreg no grupo LV na ausência de estímulo, quando comparada ao grupo controle. Entretanto, o SLA induziu aumento na expressão de CTLA-4, nos pacientes com LV; 4) Alterações significativas na produção de IFN-γ não foram observadas em nenhum dos grupos avaliados e 5) Baixos níveis de IL-10 foram observados em células mTreg nos grupos LV independentemente de estímulo. Já nas células iNKT observamos que, 6) o número total *ex vivo* de células no grupo de pacientes LV não se alterou significativamente em relação aos grupos CNE e CNegE; 7) Em relação ao perfil de ativação recente dessas células, os pacientes LV não apresentaram alterações significativas na expressão de CD69, em comparação aos grupos controle tanto *ex vivo* como após a cultura *in vitro* (meio e TLA); 8) Após o estímulo com TLA de *L. infantum* as células iNKT reduziram a produção de IFN-γ. No entanto, a maior produção de IFN-γ foi observada em células iNKT no grupo CNE; 9) Em relação a produção de IL-17, alterações significativas não foram observadas, antes ou após a estimulação com o TLA, em todos os grupos avaliados; 10) Uma elevação na produção de IL-10, foi observada no grupo CNE quando comparado ao CNegE e pacientes com LV de forma independente a estimulação. Dessa forma, nossos resultados sugerem que as células nTreg e células iNKT, auxiliam na manutenção dos efeitos da IL-10 na cronicidade da doença. Por outro lado, as células mTreg atuam contrabalanceando a imunossupressão mediada pela IL-10, através de mecanismos que auxiliam na indução de respostas efectoras na doença. Entretanto, apesar da atuação compensatória das células mTreg contribuir para o estabelecimento de mecanismos de controle da LV, o perfil patogênico regulado pela IL-10 ainda prevalece na doença.

Palavras-chave: Leishmaniose. Infecção. Linfócito T.

ABSTRACT

Leishmaniasis is characterized as a complex of infectious-parasitic diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. These diseases are present in 98 countries, where about 350 million people are at risk of infection. Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe clinical form of the disease and induces immune responses mediated by distinct cell subpopulations, including invariant natural killer T cells (iNKT-CD3 + 6B11 +), regulatory T cells (Tregs - CD4 + CD25^{high}FOXP3 +), which can be classified into natural Treg (CD4 + CD25^{high}FOXP3 + CD45RA +) and memory Treg (CD4 + CD25^{high}FOXP3 + CD45RA-). IL-10 is a key cytokine in the immunopathology of this disease and the mechanisms of action involved in the immunological modulation of human visceral leishmaniasis have not yet been well elucidated with respect to the subpopulations. Thus, our aim was to characterize iNKT and T regulatory cells (nTreg and mTreg) mechanisms during the diseases, and consequently evaluate the main cytokines produced. To achieve this goal, in the first part of this study, whole blood was collected from LV (n = 10) and uninfected (n = 7) patients, and the nTreg and mTreg subpopulations were evaluated with and without specific stimulation of the soluble antigen of *Leishmania* (SLA). The analysis of iNKT cells were also performed with and without specific stimulation of total *Leishmania* antigen (TLA) in whole blood samples in the LV (n = 12), nonendemic (CNE - n = 6) and in the endemic negative control group (CNegE - n = 6). All analyzes were performed by flow cytometry. Regarding the Tregs cells, the results demonstrated that: 1) A high number of memory Treg cells was observed when compared to the total number of natural Treg cells in all groups evaluated; 2) A significant reduction in CD39 / CD73 expression in mTreg cells was observed in the LV groups in the absence and / or presence of stimulus; 3) A decrease in CTLA-4 expression was observed in mTreg cells in the LV group in the absence of stimulation, when compared to the control group. However, SLA induced increased expression of CTLA-4 in patients with VL; 4) Significant changes in the production of IFN- γ were not observed in any of the groups evaluated and 5) Low levels of IL-10 were observed in mTreg cells in the LV groups regardless of stimulus. In the iNKT cells, we observed that 6) the total ex vivo number of cells in the LV group did not change significantly in relation to the CNE and CNegE groups; 7) Regarding the recent activation profile of these cells, LV patients did not present significant changes in CD69 expression, as compared to the control groups both ex vivo and after culture in vitro (medium and TLA); 8) Following stimulation with *L. infantum* TLA, iNKT cells reduced IFN- γ production. However, increased IFN- γ production was observed in iNKT cells in the CNE group; 9) Regarding the production of IL-17, significant alterations were not observed, before or after TLA stimulation, in all the groups evaluated; 10) An increase in IL-10 production was observed in the CNE group when compared to CNegE and patients with VL independently stimulation. Thus, our results suggest that nTreg cells and iNKT cells, help maintain the effects of IL-10 on the chronicity of the disease. On the other hand, mTreg cells act counterbalancing the IL-10 mediated immunosuppression through mechanisms that aid in the induction of effector responses in the disease. However, despite the compensatory action of mTreg cells contributing to the establishment of VL control mechanisms, the pathogenic profile regulated by IL-10 still prevails in the disease.

Keywords: Leishmaniasis. Infection. T Lymphocyte.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Formas celulares de parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	26
FIGURA 2. Fêmea do inseto vetor das leishmanioses.....	29
FIGURA 3. Ciclo de Vida dos parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	31
FIGURA 4. Manifestações clínicas das leishmanioses	32
FIGURA 5. Caracterização de Células nTreg e mTreg.....	39
FIGURA 6. Mecanismos de Ação das Células Treg.....	41
FIGURA 7. Caracterização de Células iNKT.....	43
FIGURA 8. Estratégia de análise utilizada para identificar as subpopulações de células Treg (CD4+CD25 ^{high} FOXP3+) no sangue total.....	56
FIGURA 9. Estratégia de análise utilizada para identificar as subpopulações de células iNKT (CD3+6B11+) no sangue total.....	57
Gráfico 1. Número Total de células T reguladoras naturais (nTreg) e células T reguladoras de memória (mTreg) no grupo controle e no grupo de pacientes com leishmaniose visceral (LV), submetidos ou não a estimulação por SLA.....	61
Gráfico 2. Expressão de CD39 em células nTreg e mTreg no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV), submetidos ou não a estimulação por SLA.....	62
Gráfico 3. Expressão de CD39 em células nTreg e mTreg no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV), submetidos ou não a estimulação por SLA.....	63

Gráfico 4. Co-expressão de CD39/CD73 em células nTreg e mTreg no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV), submetidos ou não a estimulação por SLA.....	64
Gráfico 5. Expressão de CTLA-4 em células nTreg e mTreg no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV), submetidos ou não a estimulação por SLA.....	65
Gráfico 6. Produção de IFN- γ por células nTreg e mTreg no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV), submetidos ou não a estimulação por SLA.....	66
Gráfico 7. Produção de IL-10 por células nTreg e mTreg no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV), submetidos ou não a estimulação por SLA.....	67
Gráfico 8. Número Total de células iNKT (CD3 + 6B11 +) nos grupos CNE, CNegE e LV.....	70
Gráfico 9. Produção de IFN- γ em células iNKT nos grupos CNE, CNegE e LV, submetidos ou não a estimulação por TLA.....	71
Gráfico 10. Produção de IFN- γ por células iNKT no grupo LV, submetido ou não a estimulação por TLA.....	72
Gráfico 11. Produção de IL-17 em células iNKT dos grupos CEN, CNegE e LV, submetidos ou não a estimulação por TLA.....	73
Gráfico 12. Produção de IL-10 em células iNKT dos grupos CEN, CNegE e LV, submetidos ou não a estimulação por TLA.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média de idade, perfil sorológico e gênero dos grupos CTL e LV.....	60
Tabela 2. Média de idade, perfil sorológico e gênero dos grupos CTL e LV.....	69
Tabela 3. Frequência de CD69 em células iNKT.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: Adenosina trifosfato

BSA: Albumina Sérica Bovina

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

FOXP3: *Forkhead box P3*

HULW: Hospital Universitário Lauro Wanderley

IFN- γ : Interferon- γ

IIFA: Imunofluorescência Indireta (IIFA)

IL-1: Interleucina-1

IL-10: Interleucina-10

IL-12: Interleucina-12

IL-13: Interleucina-13

IL-17: Interleucina-17

IL-22: Interleucina-22

IL-4: Interleucina-4

IL-7: Interleucina-7

KDa: Kilodaltons

LCD: Leishmaniose Cutânea Difusa

LCL: Leishmaniose Cutânea Localizada

LCPC: Leishmaniose Cutânea Pós Calazar

LD: Leishmaniose Disseminada

LMC: Leishmaniose Mucocutânea

LT: Leishmaniose Tegumentar

LV: Leishmaniose Visceral

iNKT: Linfócitos T *Natural Killer* Invariante

PBMC: Células Mononucleadas do Sangue Periférico

PCR: Reação em Cadeia de Polimerase

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SLA: Antígeno Solúvel de *Leishmania*

TCR: Receptor de células T

TGF- β : Fator de transformação do crescimento- β

Th1: Células T auxiliares do tipo 1

Th17: Células T auxiliares do tipo 7

Th2: Células T auxiliares do tipo 2

TLA: Antígeno Total de *Leishmania*

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral- α

Treg: Células T reguladoras

UFPB: Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
2.1. Leishmanioses.....	23
2.1.1. Breve Histórico e Epidemiologia.....	23
2.1.2. Agente Etiológico.....	25
2.1.3. Insetos Vetores.....	27
2.1.4. Ciclo Biológico do Parasita.....	29
2.1.5. Manifestações Clínicas.....	31
2.1.6. Diagnóstico.....	34
2.1.7. Imunologia.....	36
3. OBJETIVOS	46
3.1. Objetivo Geral.....	46
3.1.1. Objetivos Específicos	46
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1. Considerações Éticas.....	49
4.2. Grupos utilizados para Análise de Células Treg.....	48
4.3. Grupos utilizados para Análise de Células iNKT.....	49
4.4. Coleta de Dados Clínico-Epidemiológicos.....	50
4.5. Material Biológico	51
4.7. Antígeno de <i>L. infantum</i>	51
4.8. Determinação da infecção por <i>Leishmania</i>	52
4.10. Imunofluorescência para análise de células Treg (CD4+CD25 ^{high} FOXP3+) e células iNKT (CD3+6B11+) expressando marcadores de superfície e intracelulares em pacientes infectados por <i>L. infantum</i>	54
4.11. Anticorpos monoclonais	55
4.12. Aquisição e análise dos dados por citometria de fluxo	55
4.13. Análise estatística.....	57

5. RESULTADOS I.....	59
5.1. Caracterização clínico-epidemiológica dos grupos controle (CTL) e de pacientes com leishmaniose visceral (LV) em relação a gênero, média de idade, sintomatologia e diagnóstico realizado.....	59
5.2. Número Total de células T reguladoras naturais (nTreg) e células T reguladoras de memória (mTreg) no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV)	60
5.3. Expressão das ectonucleotidases (CD39 e CD73) em células T reguladoras naturais (nTreg) e células T reguladoras de memória (mTreg) no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV)	61
5.4. Co-expressão de CD39 e CD73 em células T reguladoras naturais (nTreg) e células T reguladoras de memória (mTreg) no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV)	63
5.5. Expressão de CTLA-4 em células T reguladoras naturais (nTreg) e células T reguladoras de memória (mTreg) no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV)	64
5.6. Expressão de IFN- γ e IL-10 em células T reguladoras naturais (nTreg) e células T reguladoras de memória (mTreg) no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV)	65
6. RESULTADOS II.....	69
6.1. Caracterização clínico-epidemiológica dos grupos de controles não endêmicos (CNE), controles negativos endêmicos (CNegE) e pacientes com leishmaniose visceral (LV) por meio da análise dos parâmetros gênero, média de idade e sorologia.....	69
6.2. Número Total e Padrão de Ativação das células iNKT nos grupos de controles não endêmicos (CNE), controles negativos endêmicos (CNegE) e pacientes com leishmaniose visceral (LV)	69
6.3. Produção de IFN- γ pelas células iNKT nos grupos de controles não endêmicos (CNE), controles negativos endêmicos (CNegE) e pacientes com leishmaniose visceral (LV)	71

6.4. Produção de IL-10 e IL-17 pelas células iNKT nos grupos de controles não endêmicos (CNE), controles negativos endêmicos (CNegE) e pacientes com leishmaniose visceral (LV)	72
7. DISCUSSÃO	74
8. CONCLUSÃO	84
9. REFERÊNCIAS.....	87
10. ANEXOS	103
ANEXO I - Parecer de aprovação emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley – UFPB.....	103
ANEXO II – Questionário aplicado durante anamnese dos voluntários da pesquisa.....	104
ANEXO III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	107
11. APÊNDICES.....	109

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, acentuou-se o desenvolvimento de pesquisas na área das doenças infecciosas, visando uma maior compreensão do mecanismo de ação das distintas infecções e consequentemente, avanços no controle e diagnóstico dessas afecções (PAES; SILVA, 1999).

Devido ao alto impacto na saúde pública mundial, doenças tropicais endêmicas, como as leishmanioses, são relevantes alvos de estudo. Cerca de um bilhão de pessoas são acometidas por doenças tropicais ao redor do mundo, sendo os países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento os mais afetados. Tal fato está associado à desnutrição, deslocamento populacional, condições precárias de habitação e insuficiência de recursos para investimento em infraestrutura e em pesquisa que possibilitem o acompanhamento dessas infecções (OMS, 2013; LINDOSO; LINDOSO, 2009).

As leishmanioses se caracterizam como um complexo de doenças infecto-parasitárias causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (DAVID; CRAFT, 2009). Tais infecções apresentam-se clinicamente na forma tegumentar e visceral. A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave cujos os agentes etiológicos são a *Leishmania donovani* e a *Leishmania infantum* (DE FREITAS et al., 2016).

Os protozoários *Leishmania* spp. são parasitos que ao infectar mamíferos, residem em macrófagos, nos quais convertem-se na sua forma intracelular obrigatória, denominada amastigota (VANNIER-SANTOS; MARTINY; SOUZA, 2002). De maneira geral, na fase inicial da doença, a resposta imunológica inata desenvolve-se através da ativação de macrófagos infectados. Tal ativação decorre na produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o Interferon- γ (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) pelas células T, as quais desempenham papel fundamental no controle da carga parasitária durante a infecção inicial (NASCIMENTO et al., 2015; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002;).

As células T atuam na ativação/desativação de macrófagos, além de também produzirem citocinas. Dentre as distintas subpopulações de linfócitos T auxiliares, as células T reguladoras (Treg) serão uma das populações alvo do presente estudo. Essa subpopulação caracteriza-se pela expressão de CD4+CD25^{high}FOXP3+ e

possui como marcador auxiliar o CD127 (receptor de IL-7) que está associado com a ativação dos linfócitos T (MELO; CARVALHO, 2009). Essas células se subdividem ainda em Treg natural (oriundas do timo) e Treg de memória (induzidas na periferia), podendo ser o CD45RA+ o marcador diferencial desses subtipos (MAIZELS; SMITH, 2011).

Para o estudo da modulação imunológica na leishmaniose pelas Treg, os seguintes mecanismos podem ser investigados: 1) Contato célula-célula dado por receptores de inibição e moléculas co-estimulatórias; 2) Controle da resposta inflamatória pela quebra de ATP extracelular e conversão em adenosina; 3) Modulação mediada por citocinas e 4) Citotoxicidade das células Treg: indução de apoptose (MELO; CARVALHO, 2009).

Os linfócitos T *Natural Killers* invariantes (iNKT), outra subpopulação celular aqui avaliada, se caracterizam por reconhecerem antígenos glicolípidicos apresentados via moléculas CD1d (YANG et al., 2016). Outra característica importante dessa subpopulação é a rápida liberação de IL-4, IFN- γ e TNF- α em resposta às infecções (SEHEE et al., 2017; HUANG et al., 2016). Brennan et al. (2013) demonstraram que a ativação das iNKT por glicolípidos pode aumentar a resistência em vários modelos de doenças infecciosas, incluindo infecções parasitárias, como a leishmaniose visceral. Sendo assim, a análise do perfil de ativação e da expressão de citocinas são estratégias relevantes em pesquisas envolvendo as iNKT.

Diversas citocinas contribuem para a depuração de agentes patogênicos intracelulares, como o IFN- γ e TNF- α . Entretanto, um outro exemplo é a interleucina-17 (IL-17), a qual atua recrutando neutrófilos para o local da infecção e estimulando diferentes células imunes a produzir mediadores pró-inflamatórios como IL-1 e TNF- α . (BANERJEE et al., 2016; DUPAGE; BLUESTONE, 2016; KORN; BETTEL; OUKKA; KUCHROO, 2009).

Pitta et al. (2009) observaram em soro de indivíduos assintomáticos para LV níveis elevados da IL-17 quando comparado ao soro de pacientes sintomáticos. Então, ao analisar nesses indivíduos respostas de citocinas Th1, Th2 e Th17 em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) observaram que juntamente com as citocinas Th1, IL-22 e IL-17 possuem papéis complementares na proteção contra a LV humana. Os mecanismos de ação da IL-17 na infecção por *L. infantum* ainda não foram bem elucidados, entretanto alguns estudos apontam para uma ação de auxílio ao perfil de resposta Th1, favorecimento da atividade leishmanicida dos

macrófagos e regulação negativa de células T reg junto à produção de IL-10 (NASCIMENTO et al., 2015).

A interleucina-10 (IL-10), por sua vez, tem apresentado um papel imunopatogênico na infecção pela *L. infantum*. Caldas et al. (2005) investigam a imunopatogênese dessa citocina através da análise dos níveis plasmáticos de IL-10 e IFN- γ de pacientes com leishmaniose visceral. Seus resultados indicam que a presença de IL-10 suprime a atividade do IFN- γ , a qual está relacionada com a ativação de macrófagos infectados. Kumar et al. (2014) comprovaram a presença dessa citocina em amostras de sangue total de pacientes com leishmaniose visceral e demonstram que o IFN γ endógeno produzido nesses pacientes atua limitando o crescimento do parasita. Sendo assim, sugere-se que a insuficiência no desenvolvimento de uma resposta efetora contra o parasita da *Leishmania*, observada em pacientes com LV, se deve a indução de supressão imune por diversos fatores, como a produção de IL-10 e não-responsividade de macrófagos infectados (KUMAR et al., 2014; GOTO; PRIANTI, 2009). Diante da modulação imunológica exercida por cada uma das citocinas supracitadas, torna-se notória a necessidade de compreender os mecanismos envolvidos no balanço dos níveis de IL-10 e IFN- γ durante a infecção por *Leishmania*. Assim como, a identificação da principal célula produtora de IL-10 e os mecanismos que elevam os níveis desta citocina.

Atualmente, a terapêutica que envolve a leishmaniose visceral possui desvantagens significativas, incluindo a toxicidade, baixa especificidade e ineficácia (WILLYARD, 2013). Em relação à diagnóstico, todos os métodos utilizados apresentam desvantagens significativas, dentre as quais podemos citar, alterações de sensibilidade e custo elevado.

Dessa forma, torna-se notória a necessidade de que pesquisas na área continuem sendo desenvolvidas para traçar o perfil dos mecanismos imunológicos envolvidos na doença. Assim, se viabiliza a geração de estratégias de prevenção, diagnóstico e alvos terapêuticos para a doença humana, como por exemplo, a imunoterapia baseada na modulação desses marcadores. Tais fatores justificam a elaboração e delineamento do presente estudo.

REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Leishmanioses

2.1.1. Breve Histórico e Epidemiologia

Na história da parasitologia, o período entre os anos de 1875 a 1925 foi de significativos avanços, como a elucidação do ciclo de vida de distintos parasitos e a descoberta dos vetores de transmissão. Diversos cientistas e clínicos, em sua maioria escoceses, contribuíram para o desenvolvimento de pesquisas envolvendo a etiologia das doenças infecciosas e parasitárias, como a leishmaniose (COX, 2017).

Os primeiros registros de doenças semelhantes às leishmanioses ocorreram entre os séculos XVIII e XIX. A forma cutânea, nesse período, era uma doença de pele comum no norte da Índia, no mediterrâneo oriental e em países do norte da África. Entretanto, a leishmaniose cutânea na época era descrita como uma úlcera indolor e possuía distintas nomenclaturas de acordo com o local em que ocorria, como por exemplo, Botão de Aleppo (Síria), Botão do Oriente e Botão de Creta (RAFATI et al., 2014).

No início do século XIX médicos militares começaram a documentar casos de uma nova doença febril que também possuía diferentes denominações, como por exemplo, Febre de Dumdum e Doença Negra. Na época, tal enfermidade era considerada pelos médicos uma variação da malária, entretanto na realidade tratava-se da forma visceral da leishmaniose (COX, 2016). A primeira descrição da LV ocorreu em 1835, quando médicos gregos documentaram na ilha de Hidra um caso de esplenomegalia infantil, sintoma relacionado a doença (FIOCRUZ, [2010]). Em 1883, foi denominada na Índia como calazar, que significa “doença negra” em Hindu (AZIZI et al., 2016).

Considerando a ordem cronológica dos registros científicos das leishmanioses, especialmente da leishmaniose visceral, temos que as principais descobertas ocorreram a partir de 1900. Nesse ano Willian Boog Leishman, um médico militar escocês, encontrou parasitos em células do baço de um militar acometido pela febre de Dumdum na Índia. A partir de então, a presença desses organismos foi

observada em aspirados esplênicos de outros indivíduos. Até que em 1903, Charles Donovan e William Leishman, descreveram, de forma independente, o agente etiológico da leishmaniose visceral, o qual foi então denominado de *Leishmania donovani* (COX, 2016; LEISHMAN, 1903; ROSS, 1903; DONOVAN, 1903). No ano de 1904, foram descritas características relevantes da *L. donovani*, como possuir forma flagelada (FIOCRUZ, [2010]; ROGERS, 1904). No mesmo ano, observadores constataram que casos de calazar estavam sendo relatados em diferentes regiões do mundo. Nas décadas seguintes, tais fatos possibilitaram a caracterização das distintas espécies de *Leishmania* e a elucidação de aspectos relacionados à doença, como vetores de transmissão e ciclo de vida (FIOCRUZ, [2010]).

No Brasil, o primeiro caso descrito de leishmaniose visceral ocorreu em 1934, quando parasitos do gênero *Leishmania* foram encontrados em amostras histológicas hepáticas *post mortem* de indivíduos com suspeita de febre amarela. Em 1936, o primeiro diagnóstico *in vivo* da doença foi realizado, por Evando Chagas, decorrendo na identificação de uma nova espécie, denominada *L. chagasi* (CHAGAS et al., 1937; CUNHA; CHAGAS, 1937). Na década de 50, houve no estado do Ceará, o primeiro surto da doença no país, sendo a infecção por *Leishmania* recorrente no Brasil até os dias atuais (GONTIJO; MELO, 2004; DEANE, 1956, PENNA, 1934).

Do ponto de vista epidemiológico, atualmente as doenças tropicais endêmicas representam um grande problema de saúde pública mundial, dentre as quais estão inseridas as leishmanioses. Cerca de um bilhão de pessoas são acometidas por doenças tropicais, sendo os países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento os mais afetados. Tal fato está associado à desnutrição, deslocamento populacional, condições precárias de habitação, ausência de repertório imunológico e insuficiência de recursos para investimento em infraestrutura e em pesquisa que possibilitem o acompanhamento dessas afecções (OMS, 2013; LINDOSO; LINDOSO, 2009).

As leishmanioses são endêmicas em 98 países, predominantemente, na África, Ásia e América Latina onde está o Brasil. Cerca de 350 milhões de pessoas estão sob risco de infecção e dois milhões de novos casos são estimados por ano em todo o mundo. A leishmaniose tegumentar é predominante em áreas urbanas e periurbanas e se caracteriza por grandes surtos em cidades densamente povoadas, em zonas de guerra e conflitos, campos de refugiados e em regiões de intensa migração. Os principais países afetados com os subtipos de leishmaniose

tegumentar são: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e da Síria.

Em relação a leishmaniose do tipo visceral, casos humanos foram relatados em aproximadamente 54 países localizados em regiões tropicais e subtropicais. A maioria desses estão concentrados em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão. Na África Oriental, elevadas taxas de morbidade e mortalidade são registradas por epidemias recorrentes da LV (MARCONDES; ROSSI, 2013; OMS, 2015).

Na América Latina, o real número de casos é desconhecido, pois os países não possuem sistemas de vigilância eficazes, resultando em um negligenciamento nas notificações. Entretanto, apesar das subnotificações o Brasil é o país que possui cerca de 90% dos registros de leishmaniose visceral no continente americano. Entre os anos de 1980 e 2008, foram registrados 70 mil casos de LV e 3.800 óbitos no mesmo período, sobretudo na região Nordeste do País (WERNECK, 2010; BARRETO, 2011). Segundo Paho (2017), no ano de 2015, 3.456 novos casos de LV ocorreram nas américas e 19.395 novos casos da leishmaniose tegumentar, sendo o Brasil o país mais acometido. Ainda em relação à LT, o Ministério da Saúde do Brasil (2010) registrou aproximadamente 240 mil casos na primeira década dos anos 2000, principalmente nas regiões Norte e Nordeste.

Brasil (2013) relatou a incidência de casos da doença na Paraíba no ano de 2012, cerca de 110 casos de LT e 157 casos de LV foram registrados, sendo a grande maioria das notificações realizadas na capital João Pessoa onde estão situados os maiores complexos ambulatoriais e hospitalares do estado.

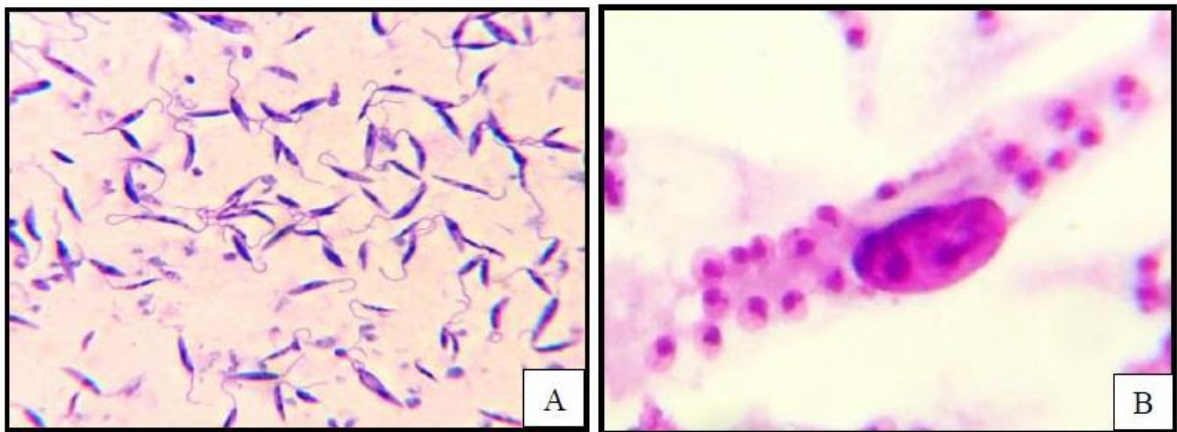
2.1.2. Agente Etiológico

Leishmaniose é um termo global utilizado para doenças viscerais e cutâneas originadas a partir da infecção pelos protozoários do gênero *Leishmania* (MC GWIRE; SATOSKAR, 2013).

Durante o ciclo de vida heteroxênico, tais parasitos alternam-se entre as formas: promastigota e amastigota (**Figura 1**). No seu hospedeiro intermediário, mosquitos pertencentes ao gênero *Phlebotomo* e *Lutzomya*, as espécies de

Leishmania se apresentam na forma promastigota, caracterizada como uma forma extracelular, de formato alongado, com flagelo exteriorizado e motilidade. Já em mamíferos, seus hospedeiros definitivos, como os seres humanos encontra-se a forma intracelular obrigatória denominada amastigota, de formato ovalado, sem flagelo exteriorizado e parasitando principalmente os macrófagos (GLUENZ; GINGER; MC KEAN., 2010; VANNIER-SANTOS; MARTINY; SOUZA, 2002). Além das diferenças morfológicas, as promastigostas e amastigotas diferem também bioenergeticamente, como na utilização de enzimas e ácidos graxos envolvidos na via glicolítica (COOMBS et al., 1982).

FIGURA 1 – Formas celulares de parasitas do gênero *Leishmania*



Fonte: Rodrigues, K.A.F, 2013. A: Promastigotas; B: Amastigotas.

Em relação à taxonomia, esses organismos estão inseridos na ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*, o qual se divide em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (DOMINGUEZ, 2015; FRAGA et al., 2010). As relações filogenéticas deste gênero foram determinadas por parâmetros como manifestações clínicas, especificidade vetorial e distribuição geográfica. Além desses fatores, também se destacam as abordagens moleculares, pois estudos vêm sendo desenvolvidos na área objetivando realizar análise de polimorfismos gênicos e o uso de marcadores genéticos, tornando possível assim uma maior compreensão das relações evolutivas entre as espécies de *Leishmania* (MARCILLI et al., 2014; LUKES et al., 2007).

Cerca de 30 espécies desses protozoários já foram identificadas e descritas, sendo 20 dessas patogênicas para seres humanos (AKHOUNDI et al., 2016; BORGHI et al., 2016). No velho mundo, que compreende o continente europeu,

asiático e africano, encontram-se diversas espécies como *Leishmania* (*Leishmania*) *major*, *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani*, *Leishmania* (*Leishmania*) *tropica* e *Leishmania* (*Leishmania*) *aethiopica*. Já no novo mundo, que abrange o continente americano, os principais agentes etiológicos que podemos citar são *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania* (*Leishmania*) *mexicana*, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*. (KEVRIC et al., 2015; AKHOUNDI et al., 2016). No Brasil, as principais espécies reconhecidas são *L. (L.) amazonenses* e *L. (L.) infantum*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* (BRASIL, 2007).

No que se refere à leishmaniose visceral, no velho mundo tal doença é causada pelo parasita da espécie *L. donovani* (MURRAY et al., 2005). Entretanto, no início da década passada, diversos questionamentos surgiram em relação ao agente etiológico e a origem da LV no Novo Mundo, sobretudo na América latina. Duas hipóteses eram discutidas: 1) uma possível introdução da doença no continente americano na época da colonização europeia, na qual o agente etiológico seria a *L. infantum* e 2) Uma introdução associada à dos canídeos há milhões de anos, causada pela *L. chagasi*. Sendo assim, diante das semelhanças entre as espécies técnicas bioquímicas e moleculares foram realizadas visando elucidar tais questionamentos e demonstraram se tratar de uma única espécie (GONTIJO; MELO., 2004; MAURÍCIO; STOHARD; MILES, 2000). Diante desse contexto, atualmente é estabelecido que a espécie responsável pela doença visceral na América latina, assim como no Brasil, é a *L. infantum* (ROMERO, 2010; ALVAR et al., 2004).

2.1.3. Insetos Vetores

Flebotomíneos são pequenos insetos que apresentam relevância médica, por estarem envolvidos na transmissão de patógenos como os parasitos do gênero *Leishmania* (SHIMABUKURO; ANDRADE; GALATI, 2017). A transmissão ocorre através do repasto sanguíneo realizado pelo flebotomíneo fêmea infectado, podendo acarretar em um quadro clínico de leishmaniose (WHO, 2010).

Taxonomicamente, os mosquitos vetores da leishmaniose pertencem a ordem *Díptera*, a família *Psychodidae* e a subfamília *Phlebotominae* (OMS, 2010). Os gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) são os de relevância clínica na área das leishmanioses, por abrangerem cerca de 90 espécies dos vetores do parasito da *Leishmania*, dentre as quais se destacam: *Lutzomyia longipalpus* e *Phlebotomus papatasi* (**Figura 2**) (SOUZA; BRAZIL; ARAKI, 2017; WHO, 2017; SHIMABUKURO; ANDRADE; GALATI, 2017).

O ciclo de vida dos flebotomíneos têm início em microambientes úmidos onde ovos, larvas e pupas se desenvolvem originando, por fim, o mosquito adulto. Esses insetos são comumente encontrados em ambientes protegidos e úmidos, devido seu tamanho pequeno e sua sensibilidade às mudanças climáticas. Também se caracterizam por possuírem um par de asas e um par de pequenas estruturas, denominadas halteres ou balancins, os quais permitem sua locomoção por voos curtos e saltos (BASTOS, 2016). Apenas as fêmeas dos flebotomíneos são hematófagas, devido à necessidade de nutrientes presentes no sangue para maturar seus ovos. Geralmente, realizam repasto sanguíneo ao anoitecer, horário de maior atividade dos insetos vetores devido pouca luminosidade (DAVID; CRAFT, 2009).

Em relação a distribuição geográfica dos insetos vetores, nos países da Europa, Ásia e África acometidos pelas leishmanioses a principal espécie responsável pela transmissão dos parasitas *Leishmania* é a *Phlebotomus papatasi*. Por outro lado, no continente americano sobretudo na América Latina diversas espécies de flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* foram relatadas como vetores da doença, dentre as quais podemos citar *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia cruciata*, *Lutzomyia barretoii* *majuscula* e *Lutzomyia durani* (RAYMOND; MC HUGH; KERR, 2010).

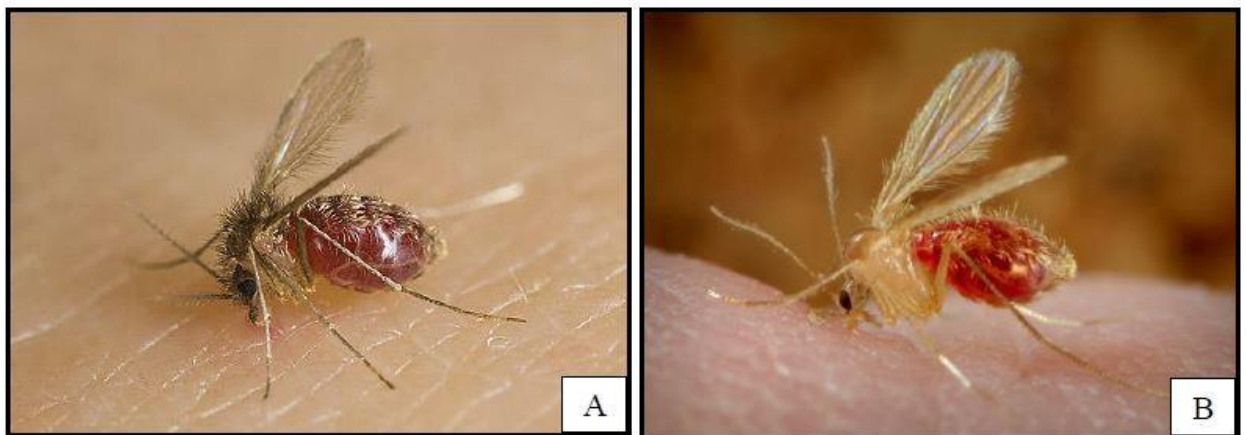
Lutzomyia longipalpis é a principal espécie de vetores das leishmanioses no Brasil, principalmente da leishmaniose visceral, uma vez que atende aos critérios de competência vetorial estabelecidos como a antropofilia, a distribuição espacial correlacionada a ocorrência de casos humanos da doença e infecção natural por *L. infantum* (RANGEL; VILELA, 2008; LAINSON; RANGEL, 2005; KILLICK-KENDRICK, 1990).

Diversos vertebrados funcionam como reservatórios da leishmaniose, dentre os quais podemos citar o cão doméstico no ciclo urbano e as raposas e marsupiais no ciclo silvestre da doença (BRASIL, 2013). Diferentes tipos de leishmaniose

podem ocorrer, de acordo com a forma de transmissão que pode ser zoonótica, ou seja, o parasito é transmitido de um animal infectado ao vetor e por fim, ao humano e a antroponótica, na qual a transmissão ocorre do humano para o vetor e novamente, ao humano. (DE FREITAS et al., 2016; ALVAR et al., 2012).

O ciclo de transmissão é considerado bem-sucedido quando decorre na sobrevivência dos parasitos de *Leishmania* e na propagação da doença. Características intrínsecas das distintas espécies de *Leishmania*, ambiente e clima adequados para sua replicação são fatores que favorecem diretamente a eficácia da transmissão entre reservatórios e hospedeiros (MORICONI et al., 2017; WHO, 2017a; DUJARDIN et al., 2008).

FIGURA 2 – Fêmea do inseto vetor das leishmanioses



Fonte: Rodrigues, K.A.F, 2013. A: *Lutzomyia longipalpis*; B: *Phlebotomus papatasi*.

2.1.4. Ciclo Biológico do Parasita

O ciclo evolutivo dos parasitos do gênero *Leishmania* se caracteriza como heteroxênico ou digenético, uma vez que necessitam de um hospedeiro intermediário e um definitivo, representados por insetos dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (hospedeiros invertebrados) e por mamíferos, como o ser humano, respectivamente (**Figura 3**) (MC GWIRE; SATOSKAR,2013).

O início do ciclo de vida do parasito é marcado pelo repasto sanguíneo realizado, em um indivíduo infectado, pelo vetor flebotomíneo fêmea. Assim, as formas amastigotas livres ou presentes em macrófagos são então ingeridas (BATES;

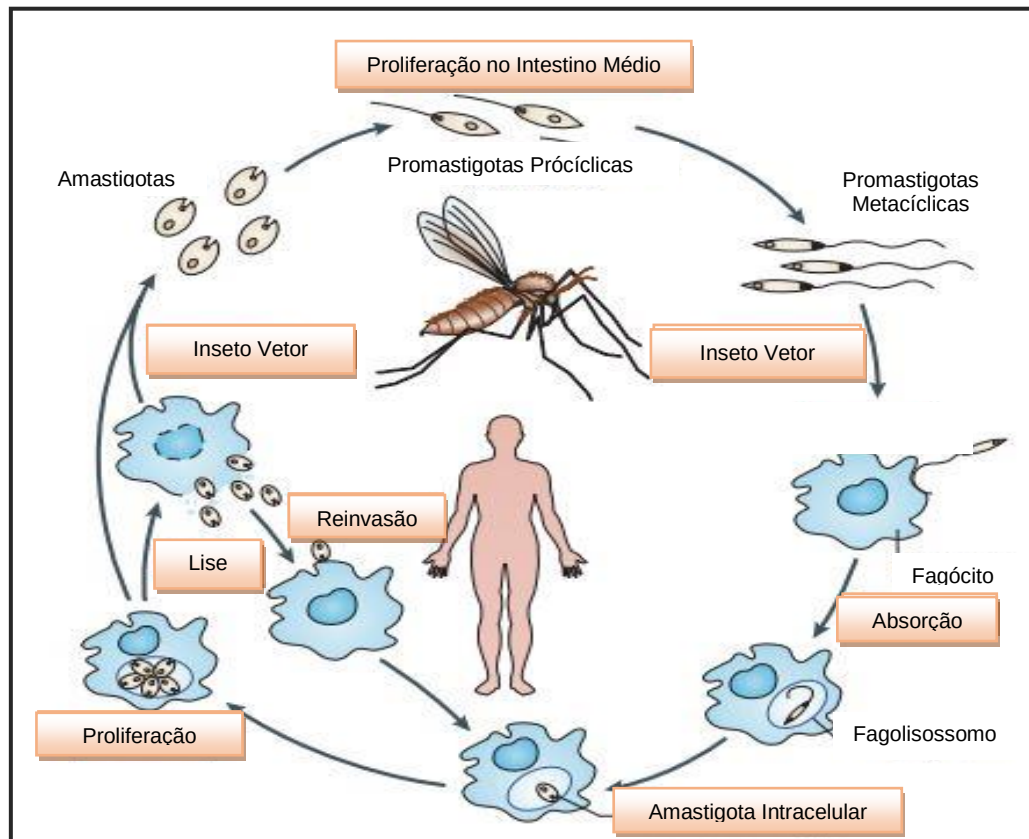
ROGERS, 2004). No trato digestivo do inseto vetor, na porção média do intestino, as amastigotas tornam-se resistentes as enzimas digestivas por serem envolvidas pela matriz peritrófica, uma membrana quitinosa secretada pelo epitélio local. Na porção posterior do intestino, significativas alterações ocorrem como mudança de pH e temperatura decorrendo na diferenciação dos parasitos em promastigotas procíclicas, as quais possuem como uma das principais características a presença de um flagelo curto (KAMHAWI, 2006; BATES, 2007).

A metacicloênese, definida como o conjunto de modificações bioquímicas e morfológicas durante os estágios de diferenciação das promastigotas, ocorre cronologicamente da seguinte forma: inicialmente, as promastigotas procíclicas se diferenciam em nectomonadas, forma que possibilita sua migração para a porção anterior do intestino do inseto vetor. Posteriormente, se diferenciam em leptomonadas, uma forma caracterizada por replicação intensa e infecção exacerbada no segmento anterior do trato digestivo. E por fim, evoluem para estágio de promastigotas metacíclicas, considerada a forma infectiva, as quais possuem um flagelo alongado conferindo motibilidade (KAUFER et al., 2017; KAMHAWI, 2006).

Ao realizar um novo repasto sanguíneo, o flebótomo fêmea infectado dá continuidade ao ciclo, infectando um indivíduo susceptível ao regurgitar as formas promastigotas metacíclicas, associadas a fatores imunomodulatórios e componentes da saliva. Tal processo desencadeia respostas inflamatórias no indivíduo recém infectado e consequente a migração de células imunológicas para o sítio de infecção (KRAEVA et al., 2016; KATO et al., 2010).

Assim, as formas promastigotas são internalizadas por neutrófilos e em seguida por macrófagos. No interior dos macrófagos ocorre a diferenciação das formas promastigotas metacíclicas em amastigotas. Tal diferenciação ocorre no vacúolo parasitóforo ou fagolisossomo, uma estrutura com ambiente ácido e rico em proteases/hidrolases que favorece tal processo, além de garantir a sobrevivência intracelular do parasito. Posteriormente, essas amastigotas se replicam por divisão binária e acarretam a lise da célula hospedeira, favorecendo a reinfecção de fagócitos locais (CHARMOY et al., 2010; LIESE; SCHLEICHER; BOGDAN, 2008; CHANG et al., 2003; GRIMALDI; SCHOTTELIUS, 2001).

FIGURA 3 – Ciclo de Vida dos parasitas do gênero *Leishmania*

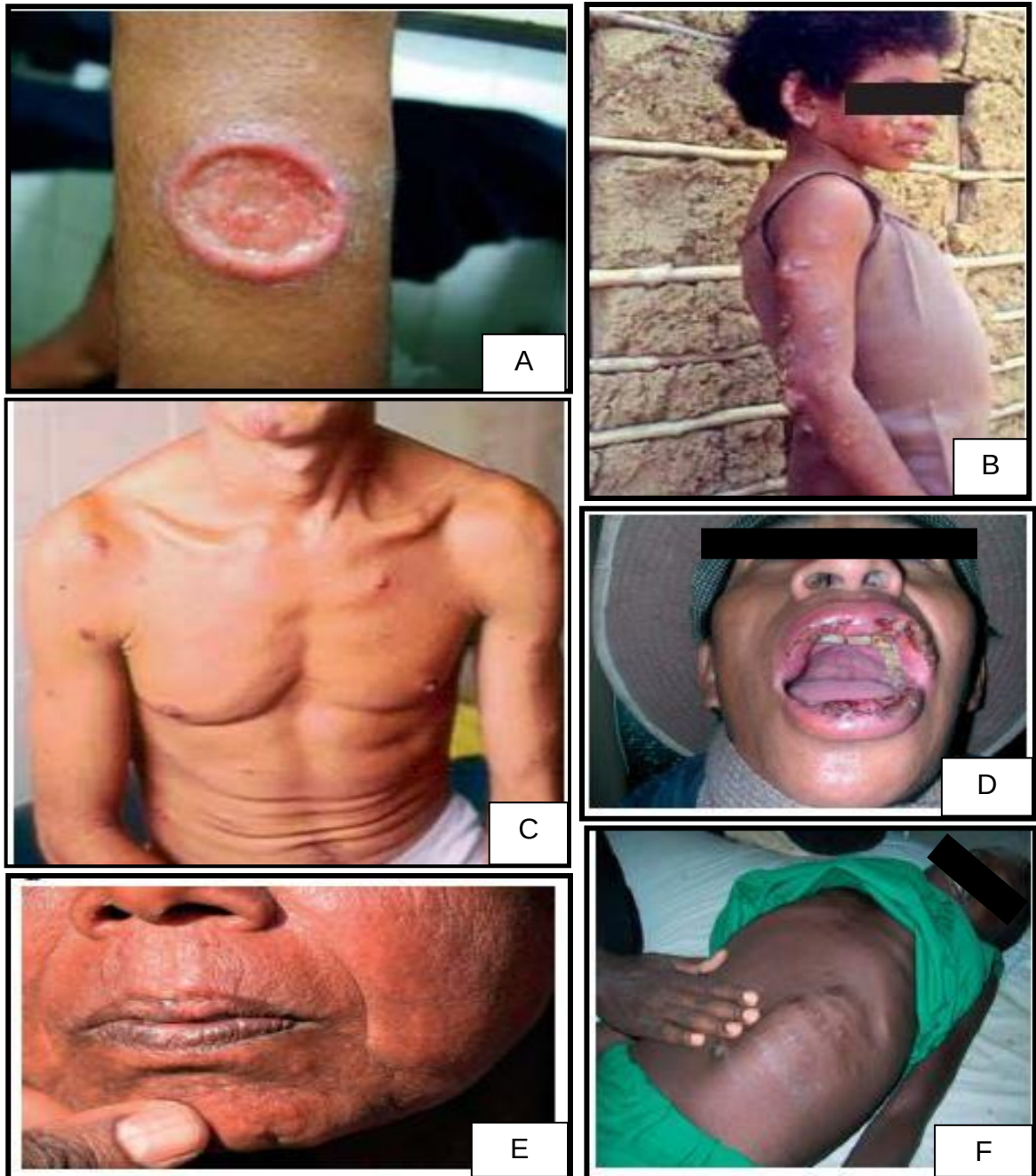


Fonte: modificado de Kaye; Scott, 2011.

2.1.5. Manifestações Clínicas

As leishmanioses se manifestam clinicamente de duas formas: a tegumentar e a visceral (GUIMARÃES-E-SILVA et al., 2017). A leishmaniose tegumentar se caracteriza pela infecção do parasito na derme do hospedeiro e se subdivide em cinco subtipos: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose cutânea disseminada (LD), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose cutânea pós-calazar (LCPC); (HANDLER et al., 2015). Já a leishmaniose visceral apresenta tropismo pelas vísceras do hospedeiro mamífero, principalmente baço e fígado (**Figura 4**) (JAIN; JAIN, 2015; ZIJLSTRA et al., 2003).

FIGURA 4 - Manifestações clínicas das leishmanioses



Fonte: CHAPPUIS et al., 2007; BRASIL, 2007. A: cutânea localizada; B: cutânea difusa; C: cutânea disseminada; D: mucocutânea; E: cutânea pós-calazar; F: visceral.

A forma clínica de menor gravidade da leishmaniose é a cutânea localizada, caracterizada por lesões ulcerativas ou nodulares e causada principalmente por *L. major* e *L. tropica* nos países da África, Ásia e Europa e por *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. braziliensis* no continente americano (MCGWIRE; SATOSKAR, 2013; GOTO; LAULETTA LINDOSO, 2012).

No local da picada do inseto, as lesões se iniciam como pápula ou nódulos e se ampliam formando úlceras arredondadas indolores, com bordas violáceas elevadas e fundo granuloso. A cura espontânea pode ocorrer, porém é possível a evolução do quadro para outras formas da doença (HANDLER et al., 2015; GOTO; LAULETTA LINDOSO, 2012; DARMSTADT; LANE; TUNNERSSEN, 1993).

A forma anérgica da leishmaniose tegumentar é a cutânea difusa (CONVIT; REYES; KERDEL, 1957). Seus principais agentes etiológicos são *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. aethiopica* (HANDLER et al., 2015; SILVEIRA et al., 2008). Este tipo de manifestação clínica comumente acometem indivíduos com deficiência imunológica e é considerada rara. Suas lesões se caracterizam como nodulares não ulcerativas que progridem lentamente e podem afetar praticamente toda a superfície cutânea, principalmente a pele do rosto, orelhas, cotovelos e joelhos (GOTO; LAULETTA LINDOSO, 2012; SILVEIRA et al., 2008; CONVIT; REYES; KERDEL, 1957). Outra forma da leishmaniose também considerada rara é a cutânea disseminada marcada pela presença de múltiplas lesões papulares, ulceradas e acneiformes localizadas em duas ou mais áreas não adjacentes. *L. braziliensis* e *L. amazonensis* são as principais espécies responsáveis pelo estabelecimento clínico da LD (TURETZ et al., 2002; GOTO; LAULETTA LINDOSO, 2012).

L. braziliensis é o principal agente etiológico da doença mucocutânea, pois, apresenta tropismo pelo tecido mucoso. A principal característica desse tipo de manifestação clínica é a presença de lesões crônicas na pele e lesões destrutivas em regiões de mucosa, principalmente mucosa oral e nasal. Outras espécies também podem causar a forma mucocutânea, como *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. panamensis* nos distintos continentes (STRAZZULLA et al., 2013).

O foco do presente estudo é a leishmaniose do tipo visceral, uma doença infecciosa sistêmica, causada por parasitas das espécies *L. infantum* e *L. donovani*, os quais possuem tropismo por macrófagos residentes em órgãos sistêmicos, como fígado, baço e medula óssea (LUKES et al., 2007; GRIENSVEN; DIRO, 2012; DE FREITAS et al., 2016). A LV se apresenta clinicamente através de sintomas clássicos, como febre intermitente, hepatoesplenomegalia, tosse seca, perda de peso, astenia, leucopenia e hipergamaglobulinemia. Além disso, de acordo com a progressão da doença, diarreia, vômito, edema periférico e icterícia podem surgir, dificultando o diagnóstico dessa afecção. A forma clínica visceral é considerada a mais grave dentre as leishmanioses, uma vez que pode ser letal devido a

associação de comorbidades, como diagnóstico tardio, desnutrição e ausência de tratamento adequado (ADRIAENSEN et al, 2018; DE OLIVEIRA et al., 2010). Além disso, infecções oportunistas podem ocorrer devido a leucopenia e imunossupressão decorrente da LV nos indivíduos infectados, elevando assim o potencial de agravo e letalidade dessa forma clínica (BARATI et al., 2008).

A leishmaniose cutânea pós-calazar (LCPC), por sua vez, é considerada uma complicação da leishmaniose visceral, e se caracteriza pela presença de erupção macular, maculopapular e nodular em pacientes com cura aparente da LV. Tais lesões geralmente têm início ao redor da boca e espalham-se para outras partes do corpo em correlação com a gravidade da doença (ZIJLSTRA et al., 2003).

O tratamento atual das distintas formas de leishmaniose, inclusive da LV, ocorre basicamente através de terapia farmacológica. Essa se baseia no uso de fármacos como a pentamidina, anfotericina B e antimoniais pentavalentes, como o glucantime, o medicamento considerado de primeira escolha em casos de infecção por *Leishmania* spp. (SINGH et al., 2016). Entretanto, tal terapêutica possui desvantagens significativas, incluindo a toxicidade, baixa especificidade e ineficácia (WILLYARD, 2013).

2.1.6. Diagnóstico

O diagnóstico das distintas formas clínicas da leishmaniose humana, de maneira geral, é realizado com base em parâmetros clínicos e epidemiológicos associados a diferentes técnicas laboratoriais, como por exemplo, sorologia e detecção parasitária (GOTO; LAULETTA LINDOSO, 2012).

O diagnóstico clínico se baseia na avaliação de sinais e sintomas e principalmente na forma visceral da doença é considerado complexo, uma vez que, a doença humana apresenta sintomatologia semelhante à de outras patologias, como Doença de Chagas e Malária (GONTIJO; MELO, 2004). Justificando dessa forma, a necessidade de realização do diagnóstico laboratorial.

As técnicas utilizadas para detecção das formas de leishmaniose tegumentar se baseiam na análise microscópica de amostras oriundas da lesão, obtida por meio de raspagem ou biópsia. Em relação ao diagnóstico baseado em parâmetros

imunológicos para a doença tegumentar, um ensaio clássico é o teste de Montenegro, o qual tem como princípio detectar uma reação de hipersensibilidade através da aplicação intradérmica de uma suspensão do antígeno de *Leishmania*. Além disso, cultura do parasito, imuno-histoquímica, imunofluorescência indireta (IIFA) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) também podem ser realizados para o devido fim (OYAMA et al., 2018; DIAS et al., 2018).

Em relação ao diagnóstico da leishmaniose visceral, além da avaliação clínica diferentes técnicas são utilizadas inclusive baseadas na detecção parasitária microscópica a partir de biópsia e aspiradas de baço, fígado e medula óssea. Entretanto, limitações como variação de sensibilidade e o procedimento invasivo de obtenção das amostras são observadas nessa abordagem de diagnóstico, evidenciando assim vantagens na utilização de técnicas imunológicas.

Para utilização de ensaios imunológicos é válido considerar que uma importante característica da LV consiste na estimulação policlonal de linfócitos B, resultando na hipergamaglobulinemia e em expressiva produção de anticorpos, o que favorece a utilização de testes sorológicos para diagnóstico (GONTIJO; MELO, 2004). No Brasil, são utilizadas as técnicas de imunofluorescência indireta (IIFA), aglutinação direta (DAT) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), sendo essa última a mais utilizada para diagnóstico de doença sintomática e descrita como um teste rápido, de fácil execução, de sensibilidade considerável sendo capaz de detectar concentrações baixas de anticorpos (WRIGHT et al., 1986).

O princípio básico de tais técnicas sorológicas consiste na utilização de soro obtido a partir amostras de sangue periférico de indivíduos sintomáticos em associação com antígenos de *L. infantum* e *L. donovani* derivados de promastigostas em cultura, parasitas intactos ou moléculas solúveis (SUNDAR; RAI, 2002). Entretanto, antígenos recombinantes também têm sido utilizados por demonstrarem maior sensibilidade do que os antígenos brutos, pois quando empregados possibilitam a detecção de concentrações baixas de anticorpos. O antígeno A2, Anti-66Kda são exemplos desses antígenos (CARVALHO et al., 2002; VINAYAK et al., 1994).

Dentre os antígenos recombinantes destaca-se o rK39, o qual bioquimicamente consiste em uma sequência de aproximadamente 300 aminoácidos com peso molecular de 39 kilodaltons (kDA), específico para as espécies do complexo *L. donovani*, no qual a *L. infantum* está inserida. Em geral, esse antígeno ao ser

empregado no ELISA, demonstrou-se específico e de sensibilidade desejável (98%). Além disso, um teste rápido utilizando o rK39 foi desenvolvido e é rotineiramente utilizado (DA SILVA et al., 2017; SILVA, 2004; GONTIJO; MELO, 2004; BURNS et al., 1983).

Outra abordagem no diagnóstico das leishmanioses e identificação dos respectivos agentes etiológicos tem sido utilizada e é baseada em técnicas de biologia molecular. Ensaio como hibridização com sonda, reação em cadeia de polimerase (PCR) e a eletroforese são exemplos dessas técnicas (OYAMA et al., 2018; REITHINGER et al., 2007; WEIGLE et al., 1987).

Todos os métodos utilizados para leishmaniose atualmente apresentam certas desvantagens, que variam entre custo elevado, ocorrência de reações cruzadas por alguns métodos e limitações de aplicabilidade a determinados grupos (ASSIS et al., 2017). Dessa forma, diversos estudos são desenvolvidos na atualidade em busca do desenvolvimento de novos testes diagnósticos, cada vez mais específicos e confiáveis.

2.1.7. Imunologia

As manifestações clínicas das leishmanioses se associam diretamente ao tipo de resposta imunológica desencadeada pelo hospedeiro mamífero ao ser infectado pelo parasito (BOGDAN et al., 1996). No estabelecimento de uma resposta imunológica à infecção por *Leishmania* spp. diversos processos humorais e celulares são desencadeados mediante atuação coordenada de células da imunidade inata e adaptativa (WANDERLEY et al., 2012).

Na infecção humana por *Leishmania* spp. a resposta imune humoral é caracterizada pelo surgimento de anticorpos anti-*Leishmania* no soro dos indivíduos infectados. Ao comparar a produção de anticorpos durante a doença ativa em pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral, têm-se níveis baixos de anticorpos no soro na LC, enquanto que a LV é caracterizada por elevados níveis de anticorpos anti-*Leishmania* (SHARMA; SINGH, 2009). Nylén e Sacks (2007) descreveram a presença de anticorpos auto-reativos e formação de complexos imunes favorecendo a patogenicidade da doença visceral, por meio da geração de

danos teciduais e estimulação da produção de IL-10 por macrófagos e monócitos. Entretanto, a influência na progressão ou controle da doença, desses elevados níveis de anticorpos anti-*Leishmania* observados na LV, ainda não está totalmente elucidada.

A imunidade mediada por células T promovem a geração de respostas específicas e de memória, sendo predominante na leishmaniose humana e experimental. Em linhas gerais, o perfil de resposta Th1 associa-se à resistência do hospedeiro a infecção por *Leishmania* devido à produção de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- γ , que ativa o macrófago e contribui para a eliminação do parasito. E o perfil Th2, por sua vez, está associado à susceptibilidade do hospedeiro devido à produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e TGF- β , que bloqueiam a ativação de macrófagos e contribui para a proliferação do parasito (OWEN et al., 2012).

Na leishmaniose tegumentar, um paradigma de associação entre Th1 / Th2 e resistência/suscetibilidade foi investigado em modelo murino infectados por *L.major* e foi demonstrado que a diferenciação de células T CD4⁺ virgens em células T CD4⁺ efectoras de perfil Th1 ou Th2 depende da modulação inicial mediada por citocinas. A interleucina-12 (IL-12), oriunda de macrófagos e o IFN- γ oriundo de células NK, promovem a diferenciação das células T CD4⁺ virgens em células efectoras do tipo Th1. Já a indução da diferenciação de células CD4⁺ em Th2, se dá, pela presença de IL-4, sendo esse o perfil descrito nos estágios iniciais da doença. Entretanto, o perfil de resposta imune predominante nesse modelo experimental é o mediado por células Th1 (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007). Em humanos com distintas formas de leishmaniose tegumentar, também ocorre a predominância de um perfil Th1, caracterizado pela presença significativa das citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ e TNF- α , as quais atuam favorecendo a eliminação do parasita (SHARMA; SINGH, 2009; RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998).

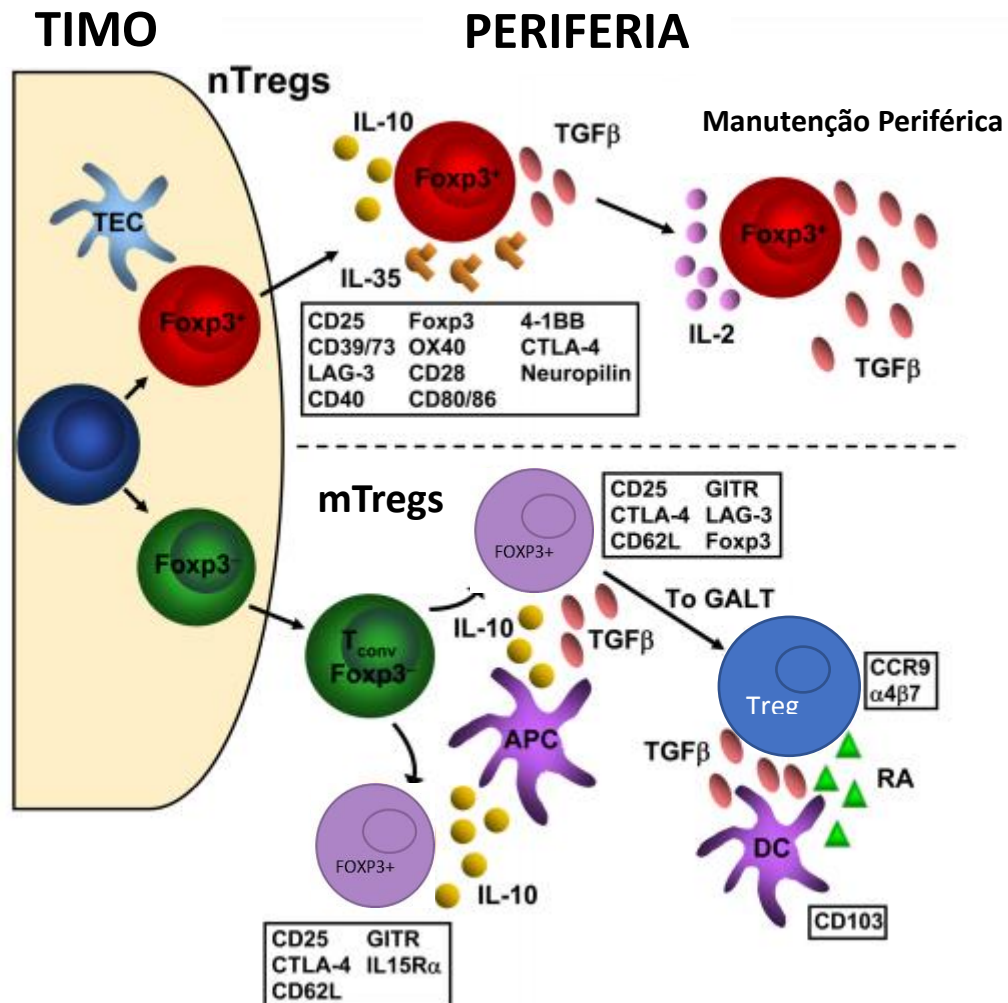
Na doença visceral, a resposta do hospedeiro a tal infecção parasitária difere da observada na forma cutânea da doença. Na LV humana, a predominância de células que produzem IFN- γ mediando respostas Th1 e resistência à doença não foi identificada (KHALIL et al., 2005). De maneira geral, em indivíduos infectados por *L.donovani* ou *L.infantum*, observa-se uma supressão de resposta Th1 mediada pela elevada produção de citocinas regulatórias, como IL-10 e TGF- β , as quais suprimem a respostas de macrófagos ao IFN- γ , tornam a presença significativa desse IFN- γ

insuficiente para controlar a doença e favorecem a sobrevivência do parasita e progressão da doença (GOLLOB; VIANA; DUTRA, 2014).

Nesse contexto de modulação imune da leishmaniose visceral, a ausência de uma resposta imune efetiva Th1 é demonstrada como a principal causa da patogenia da doença (RAI et al., 2011). Dessa forma, distintas subpopulações celulares estão envolvidas nessa imunomodulação, dentre as quais estão as células T reguladoras (Treg), as quais representam aproximadamente 5 a 10% das células TCD4+ periféricas e são caracterizadas como células CD4+CD25^{high} que expressam o fator de transcrição FOXP3 e atuam suprimindo células T efetoras, bloqueando a ativação e função desses linfócitos (MELO; CARVALHO, 2009).

As células Treg se subdividem em células Treg natural (nTreg) e células Treg de memória (mTreg) (VALMORI et al., 2005). As nTreg se desenvolvem no timo e se caracterizam como uma subpopulação de células T naíves que expressam FOXP3, constitutivamente. Tais células são, comumente, caracterizadas como CD4+CD25^{high}FOXP3+CD45RA+. Em suma, as nTregs utilizam, dentre outros mecanismos, citocinas como IL-10, IL-35 e TGFβ para exercer seus efeitos supressores sobre as células T convencionais. E citocinas como TGFβ e IL-2 são essenciais para sua manutenção periférica. Já as células mTreg (CD4+CD25^{high}FOXP3+CD45RA-) se desenvolvem a partir de linfócitos T CD4+ convencionais periféricos e células nTreg, os quais são induzidos a expressarem FOXP3+ através de um microambiente gerado pela secreção de IL-10 e TGF-β por células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas e macrófagos. As T reguladoras de memória compartilham marcadores de superfície celular e mecanismos com as nTreg, entretanto apresentam características relevantes que as diferem, como por exemplo, a capacidade das mTreg de sobreviver na ausência de antígeno ou em baixos níveis de exposição antigênica intermitente e aptidão para acelerar respostas efetoras em casos de reexposição antigênica (ROSEMBLUN et al., 2016; WORKMAN et al., 2010).

Figura 5 – Caracterização das células nTreg e mTreg



Fonte: Modificado de Workman et al., 2010. As nTreg se desenvolvem no timo e se caracterizam como uma subpopulação de células T naíves que expressam FOXP3, constitutivamente. As nTregs utilizam, dentre outros mecanismos, citocinas como IL-10, IL-35 e TGFβ para exercer seus efeitos supressores sobre as células T convencionais. E citocinas como TGFβ e IL-2 são essenciais para sua manutenção periférica. As células mTreg, por sua vez, se desenvolvem a partir de linfócitos T CD4⁺ convencionais periféricos e células nTreg, os quais são induzidos a expressarem FOXP3⁺ através de um microambiente gerado pela secreção de IL-10 e TGF-β por células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas e macrófagos. As T reguladoras de memória compartilham marcadores de superfície celular e mecanismos com as nTreg (Quadros). TEC = célula epitelial tímica; Tconv = célula T convencional; DC = célula dendrítica; RA = ácido retinóico.

As células nTreg e mTreg atuam por meio de diversos mecanismos na modulação imunológica, dentre os quais temos a supressão da resposta efetora de linfócitos T ativados mediada pela secreção de citocinas, consideradas inibitórias, como a IL-10, IL-35 e TGF-β. No contexto da regulação imunológica na leishmaniose visceral, a IL-10 é uma citocina comumente associada a susceptibilidade do

hospedeiro à doença. Estudos comprovam que elevados níveis de IL-10 promovem a supressão imune, persistência do parasito e cronicidade da doença (MURRAY et al, 2002; NYLEN et al., 2007). Outro estudo relata que a neutralização dos níveis de IL-10 no baço de pacientes com leishmaniose visceral, promove o controle da carga parasitária celular e eleva a produção de IFN- γ e TNF- α , citocinas fundamentais na erradicação do parasito (GAUTAM et al., 2011). Outra informação relevante é que uma associação entre níveis plasmáticos de IL-10 e IFN- γ na leishmaniose durante a doença ativa foi demonstrada e um perfil de modulação imune baseado no balanço dessas citocinas foi sugerido por Caldas et al. (2005).

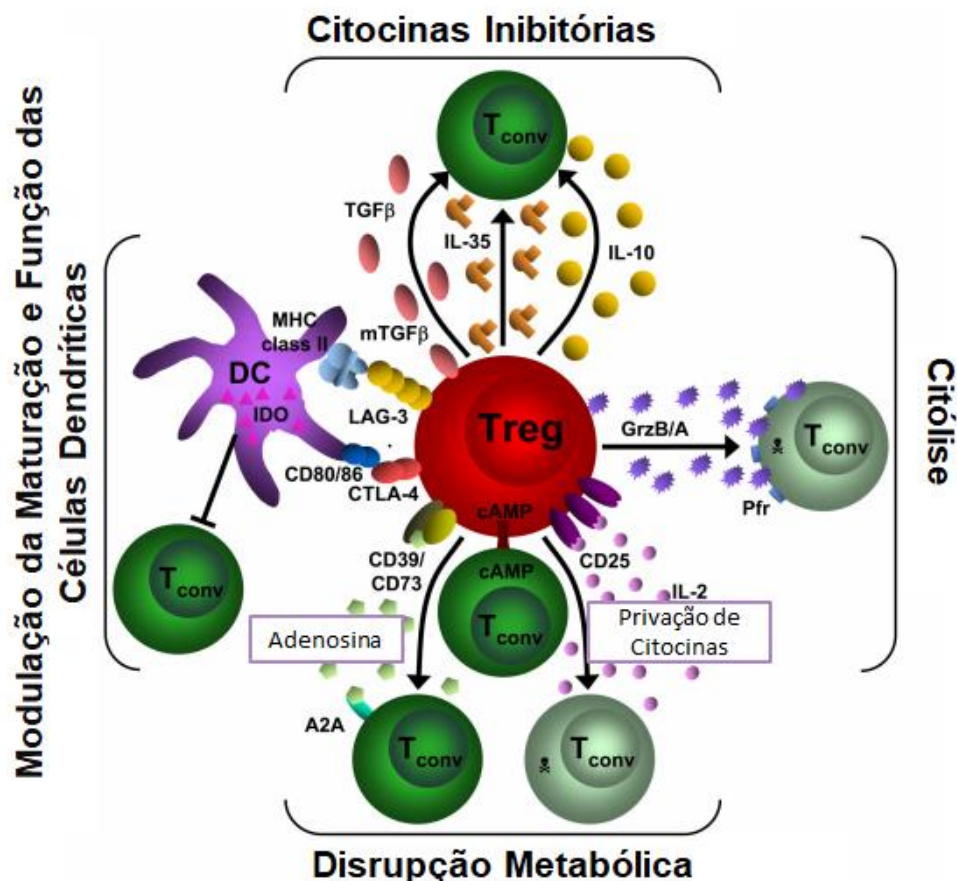
Outro mecanismo desempenhado pelas células Treg é o contato célula-célula mediado por receptores inibitórios, dentre os quais podemos citar o CTLA-4, um regulador negativo de ativação das células T que se liga às moléculas co-estimuladoras, CD80 e CD86, também conhecidas como B7-1 e B7-2, respectivamente. Devido a uma alta afinidade, o CTLA-4 se sobrepõe a atividade do receptor CD28, anulando assim o sinal de ativação das células T efectoras (RUDD et al., 2009). Além disso, a inibição da maturação e função de células dendríticas também pode ocorrer através da interação entre o LAG-3, uma proteína inibitória, ao MHC de Classe II expresso na APC (VIGNALI et al., 2008). As células Treg também podem expressar uma proteína denominada PD-1 que quando associada ao seu ligante (PD-1L), induz a apoptose celular (JACOBS et al., 2009).

A citólise caracterizada por ser um mecanismo citotóxico mediado pelas células Treg, consiste na indução de apoptose a partir da secreção de perforina e granzima, moléculas responsáveis pela poros na membrana da célula alvo e clivagem de caspases, respectivamente. Por fim, temos o mecanismo de disrupção metabólica, representado principalmente por ser o mecanismo que envolve as ectonucleotidases. Consiste na produção da adenosina, uma molécula anti-inflamatória que exerce controle sobre o sistema imunológico, através da sinalização de receptores purinérgicos na superfície de células imunes. A adenosina é produzida através da ação das ectoenzimas CD39 e CD73, as quais são expressas na superfície das subpopulações de células T reguladoras (DE OLIVEIRA BRAVO; CARVALHO; SALDANHA-ARAÚJO, 2016). De maneira geral, sua produção ocorre através da desfosforilação do ATP no meio extracelular. O CD39 hidrolisa o ATP/ADP extracelular em AMP, o CD73, por sua vez, converte o AMP em adenosina. Uma vez produzida, a adenosina atua sobre receptores purinérgicos específicos (A2AR) presentes na

superfície de linfócitos T efetores, inibindo nessas células suas respostas efectoras, reduzindo consequentemente a inflamação (HAN et al., 2017; ALLARD; TURCOTTE; STAGG, 2012; SITKOVSKY et al., 2008). No entanto, estudos que avaliem o papel das ectonucleotidases e da adenosina no desenvolvimento da imunossupressão induzida pela infecção por *L. infantum*, espécie alvo do nosso estudo, ainda não foram desenvolvidos.

Ainda no contexto de supressão mediada por alterações metabólicas, outras duas vias podem ocorrer: 1) Consumo de IL-12 do meio devido à alta expressão de CD25 por células Treg, resultando na morte da célula alvo por privação de citocinas e 2) Inibição da proliferação e da produção de IL-2 por linfócitos T convencionais, devido a transferência de AMPc pelas células Treg por meio de junções comunicantes (VIGNALI et al., 2008). Todos esses mecanismos desempenhados pelos subtipos de células Treg, nTreg e mTreg, evidencia que tais subpopulações celulares são essenciais no controle do sistema imune (TIWANANTHAGORN et al., 2012).

FIGURA 6 – Mecanismos de Ação das Células Treg



Fonte: Modificado de Workman et al., 2010 (Legenda referente a figura da página anterior). Essa figura descreve os quatro modos básicos de ação das células Treg. Inicialmente, está representado o mecanismo de supressão mediado por citocinas inibitórias, como IL-10, IL-35 e TGF β . nTreg e mTreg também induzem a citólise através da secreção de granzima A / B e perforina (Pfr). Outro mecanismo demonstrado é o denominado disrupção metabólica, o qual pode ocorrer pela privação celular de IL-2 que resulta em apoptose, inibição via AMPc ou imunossupressão mediada por A2A gerada por CD39 / CD73. E por fim, as células Treg também podem modular a maturação e/ou a função de células dendríticas através da interação CD80 / 86 e CTLA-4 ou através da interação entre LAG-3 e MHC de Classe II. Tconv = célula T convencional; AMPc = monofosfato de adenosina cíclico; A2A = receptor purinérgico de adenosina; DC = célula dendrítica.

Outros subtipos celulares também participam da modulação imune a infecção por *Leishmania* spp., como as células NKT invariantes (iNKT) que são um subconjunto importante de células efectoras, que compartilham recursos de outros linfócitos T convencionais e propriedades inatas, como a responsividade ágil aos diversos estímulos e a consequente produção de citocinas (SEHEE et al., 2017; HUANG et al., 2016; BENDELAC; SAVAGE; TEYTON, 2007). Essas células são caracterizadas por reconhecerem antígenos glicolipídicos apresentados via CD1d, uma molécula de MHC não convencional e possuem um TCR invariante com o rearranjo V α 24J α 18 associado ao V β 11 (BELO et al., 2017; YANG; ZOU; SINGH, 2016).

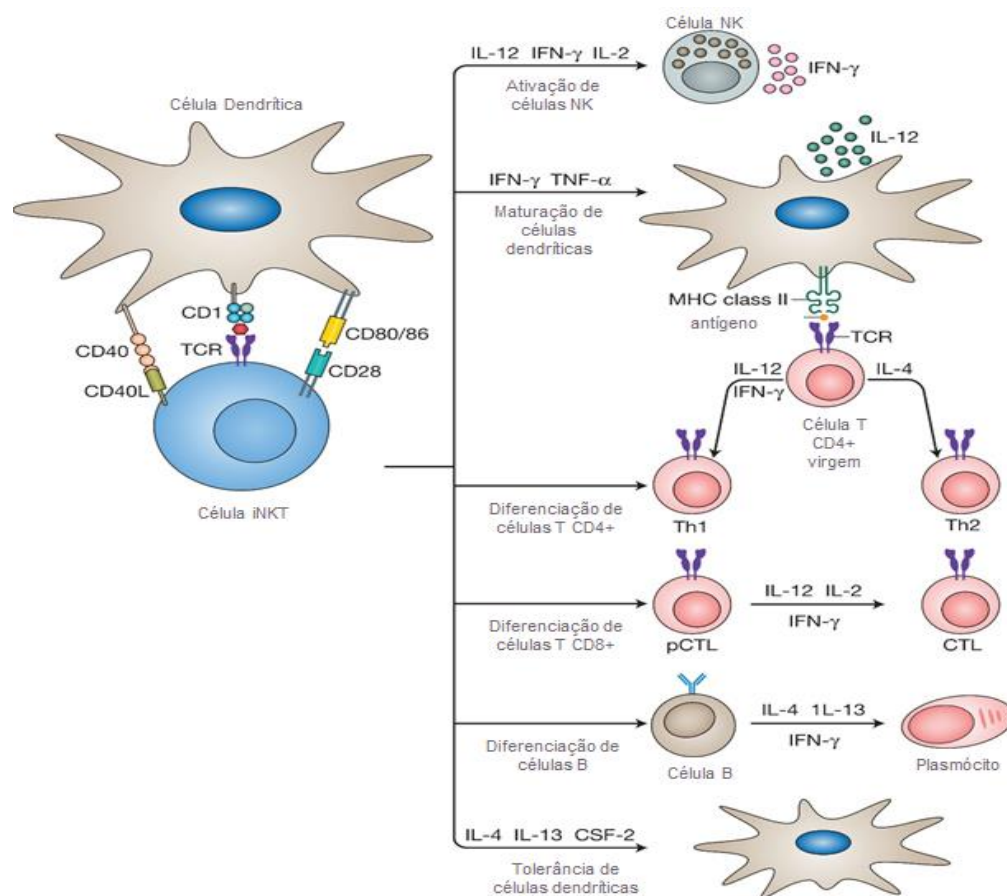
Nos seres humanos, as células iNKT representam menos de 1% da população de linfócitos T no sangue periférico e já foram relatadas no baço e fígado. (DETILIO, 2012; BRENNAN; BRIGH; BRENNER, 2013). Marcadores como CD3 e 6B11+ ou anti-iNKT, um anticorpo direcionado a porção V α 24 do TCR invariante, caracterizam molecularmente essa população (GHARAGOZLOO et al., 2018;).

A interação entre o TCR invariante da iNKT e seu antígeno cognato, assim como as interações entre moléculas co-estimulatórias (CD28, CD80, CD40 e CD40L) promovem a ativação das células iNKT. Imediatamente após a ativação, sinalizado por moléculas como o CD69, essas células secretam citocinas como IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13 que contribuem para diferenciação e ativação de células Th1, Th2, linfócitos T citotóxicos e linfócitos B. Além disso, citocinas como o IFN- γ também secretadas pelas iNKT, induzem a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas. A IL-12, por sua vez, estimula as células NK a secretar IL-4 e IL-13 induzindo o desenvolvimento de células dendríticas tolerogênicas, as quais suprimem respostas imunes patogênicas (FLORENCE; BATH; JOYCE, 2008).

Outra citocina que pode ser produzida pelas células iNKT, em estágios iniciais de infecção, é a IL-17 a qual estimula diferentes células do sistema imunológico e

induz a produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-1, TNF- α e quimiocinas, promovendo assim uma modulação da resposta imune (DUPAGE; BLUESTONE, 2016; CUA; TATO, 2010). Assim, as células iNKT ativadas podem potencializar ou moderar a resposta imune em vários modelos de doenças infecciosas, incluindo infecções virais, bacterianas e parasitárias (MIHAYLOVA et al., 2007).

FIGURA 7 – Caracterização de Células iNKT



Fonte: Modificado de Florence; Bhat; Joyce, 2008. A interação entre o TCR invariante da iNKT e seu antígeno cognato, assim como as interações entre moléculas co-estimulatórias (CD28, CD80, CD40 e CD40L) promovem a ativação das células iNKT. Imediatamente após a ativação, essas células secretam citocinas como IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13 que contribuem para diferenciação e ativação de células Th1, Th2, linfócitos T citotóxicos e linfócitos B. Além disso, as iNKT citocinas como o IFN- γ também secretadas pelas iNKT, induzem a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas. A IL-12, por sua vez, estimula as células NK a secretar IFN- γ , IL-4 e IL-13 induzindo o desenvolvimento de células dendríticas tolerogênicas, as quais suprimem respostas imunes patogênicas.

Nesse contexto, alguns estudos com humanos e murinos foram realizados visando esclarecer o perfil dual de resposta imunológica que as iNKT apresentam na

leishmaniose visceral. Amprey et al. (2004) observaram que em camundongos BALB/C com deficiência de CD1d, as células iNKT são importantes na proteção do hospedeiro na LV causada por *L. donovani*. Em contrapartida, Stanley et al. (2008) afirmam que em camundongos C57BL/6 as iNKT não apresentam um papel essencial no controle da infecção por *L. donovani*, evidenciando o quadro de dados controversos em modelos murinos sobre a atuação das iNKT. Em humanos, Rai et al. (2011) avaliaram a ativação das células iNKT via LPG de *Leishmania donovani* e observou a larga produção de IFN- γ por células iNKT derivadas da medula óssea e sugeriram uma modulação imune para um perfil de resposta Th1 por parte das iNKT. Um estudo desenvolvido com *L. infantum*, avaliou as possíveis estratégias utilizadas pelo parasito para evadir-se da resposta imune e comprovou que os exoprodutos liberados pelo protozoário em vesículas, inibem a expansão das iNKT no sangue periférico humano nos estágios iniciais da doença (BELO et al., 2017).

Contudo, nas distintas populações celulares estudos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de firmar explicações, cada vez mais robustas e completas sobre mecanismos e estratégias imunológicas utilizadas pelos organismos durante infecções bacterianas, virais e parasitárias, como é o caso da LV, justificando assim a execução do presente trabalho.

Dessa forma, a hipótese que norteou esse trabalho foi a de que fatores imunológicos e celulares associados à leishmaniose visceral podem ser utilizados para uma caracterização imunológica da doença. Além disso, subpopulações de células Tregs e células iNKT podem estar envolvidas com a resposta imune de maneira distinta nos pacientes infectados e em indivíduos não infectados, podendo possuir mecanismos importantes durante a infecção e interferir no estabelecimento de respostas protetoras ou patogênicas na doença.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar a modulação imunológica na infecção por *Leishmania infantum*, visando avaliar o papel das células T reguladoras e células iNKT entre os diferentes grupos de indivíduos analisados.

3.1.1. Objetivos Específicos

- ✓ Analisar características clínico-epidemiológicas dos grupos controle e pacientes acometidos por leishmaniose visceral envolvidos no presente estudo.

1- Células Treg:

Avaliar células de pacientes com leishmaniose visceral comparando as de indivíduos não infectados, estimuladas ou não com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) a partir da:

- ✓ Caracterização das subpopulações de células nTreg (CD4+CD25^{high}FOXP3+CD45RA+) e mTreg (CD4+CD25^{high}FOXP3+CD45RA-);
- ✓ Avaliação do papel dos marcadores CD39, CD73 e CTLA-4 em células nTreg e mTreg;
- ✓ Avaliação da produção das citocinas IL-10 e IFN-γ por células nTreg e mTreg.

2- Células iNKT:

Avaliar células de pacientes com leishmaniose visceral comparando as dos controles não endêmicos e controles negativos endêmicos, estimuladas ou não com antígeno total de *Leishmania* (TLA) a partir da:

- ✓ Caracterização fenotípica da subpopulação de células iNKT (CD3+6B11+);
- ✓ Avaliação do perfil de ativação das células iNKT (CD3+6B11+CD69+);
- ✓ Avaliação da produção das citocinas IL-10, IFN- γ e IL-17 por células iNKT.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Considerações Éticas

O presente estudo constitui parte de um projeto maior, intitulado: “Leishmaniose Visceral Humana: Estudo de marcadores imunológicos e sua importância no prognóstico de doença sintomática e assintomática”, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley – CEP/HULW (Número do Parecer 404.854 / 2013 e CAAE: 17813013.8.0000.5183) (**ANEXO I**).

4.2. Grupos utilizados para Análise de Células Treg

Para estudo de avaliação das células Treg, 17 indivíduos foram incluídos e agrupados da seguinte forma: 1) Pacientes com leishmaniose visceral (LV) (n=10) e 2) Indivíduos controles (CTL) (n = 7). Os casos de LV foram incluídos após o diagnóstico de LV no Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba e os indivíduos CTL foram recrutados em áreas endêmicas da cidade de João Pessoa/PB.

Os dois grupos foram analisados de acordo com o resultado da infecção por *Leishmania infantum*. O grupo LV continha pessoas sintomáticas com diagnóstico laboratorial positivo que ainda não haviam sido submetidos ao tratamento. Enquanto que pessoas com sorologia negativa que não apresentavam sintomas de LV, após anamnese detalhada, foram inseridas no grupo CTL.

Os critérios de inclusão para o grupo LV foram resultados positivos para o antígeno rK39 associado a doença sintomática, a qual foi definida como histórico de febre intermitente, astenia, hepatoesplenomegalia, leucopenia, dentre outros. Já para o grupo CTL os critérios foram resultado negativo para o antígeno rK39 e ausência de sintomatologia.

Os critérios de exclusão para todos os grupos foram indivíduos com deficiência física ou mental, indivíduos com doenças crônicas, indivíduos com idade inferior a 18 anos ou que se recusaram a participar do estudo.

4.3. Grupos para Análise de Células iNKT

Para o estudo com as células iNKT, 24 indivíduos foram selecionados e agrupados em: 1) Controles não endêmicos (CNE) (n=6), 2) Controles negativos endêmicos (CNegE) (n=6) e 3) Pacientes com leishmaniose visceral (LV) (n=12). Os casos de LV foram incluídos após o diagnóstico de LV no Hospital Universitário Onofre Lopes da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, os indivíduos CNegE foram recrutados em áreas endêmicas da cidade de Natal/RN e os indivíduos CNE foram oriundos da América de Norte.

Os dois grupos foram analisados de acordo com o resultado da infecção por *Leishmania infantum*. O grupo LV continha pessoas sintomáticas com sorologia positiva que ainda não haviam sido submetidas a tratamento. Nos grupos CNE e CNegE, foram inseridas pessoas com sorologia negativa que não apresentavam sintomas de LV, após anamnese detalhada.

Os critérios de inclusão para o grupo LV foram positividade para antígeno solúvel de *L. infantum* associado a doença sintomática, a qual foi definida como histórico de febre intermitente, astenia, hepatoesplenomegalia, leucopenia, dentre outros. Já para CNE e CNegE, os critérios foram resultado negativo para antígeno solúvel de *L. infantum* e ausência de sintomatologia.

Os critérios de exclusão para todos os grupos foram indivíduos com deficiência física ou mental, indivíduos com doenças crônicas, indivíduos com idade inferior a 18 anos ou que se recusaram a participar do estudo.

O presente estudo foi realizado em colaboração com a professora Dra. Selma Jerônimo e o grupo do Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

4.4. Coleta de Dados Clínico-Epidemiológicos

O prontuário dos pacientes LV foi disponibilizado para análise, do qual foram retiradas informações sobre o perfil clínico epidemiológico desses indivíduos, enquanto que nos demais grupos tais características foram analisadas por meio de entrevista e preenchimento de um questionário contendo informações relevantes de acordo com os critérios de inclusão aqui utilizados (ANEXO II).

4.5. Material Biológico

Amostras de sangue periférico de todos os voluntários foram coletadas, por via intravenosa, em tubos sem anticoagulante e com anticoagulante (Heparina) para obtenção de leucócitos. Para estudo de células Treg e células iNKT, técnicas como estimulação com antígenos de *Leishmania infantum* e realização da citometria de fluxo foram realizadas em todos os indivíduos coletados.

Todos os indivíduos que contribuíram para a realização deste estudo foram devidamente esclarecidos sobre a importância do trabalho e participaram voluntariamente da pesquisa mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Após coleta, todas as amostras eram transportadas e devidamente processadas no laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (**ANEXO III**).

4.6. Processamento das amostras e obtenção do soro

A obtenção do soro das amostras coletadas dos voluntários foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: Inicialmente, os tubos de amostras foram mantidos à temperatura ambiente em estante para tubos de ensaio por, no mínimo, 1 hora para que houvesse a retração do coágulo. Então, tais tubos foram centrifugados à 1.500 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente e desaceleração 0.

Em seguida, os tubos foram levados para câmara de fluxo laminar e o soro foi transferido para tubos do tipo eppendorf secos e estéreis. Por fim, o soro foi mantido por 24h em temperatura de -20°C e após esse período foram transferidos para um freezer -80°C, onde ficaram armazenados até a utilização para o teste sorológico.

4.7. Antígeno de *L. infantum*

As cepas *L. infantum* (MHOM / BR / 1974 / PP75) (IOC / L0579) foram obtidas da Instituição Oswaldo Cruz (Fiocruz, Brasil). Para obtenção do antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), antígeno utilizado para estimulação de células Treg, promastigotas de *L. infantum* foram lavadas com PBS e ajustadas para uma

concentração de 10^8 promastigotas/mL. Em seguida, foram realizados 3 ciclos de congelamento (-80°C) e descongelamento. Após esses ciclos, uma ultrasonicação foi realizada seguida de uma centrifugação (1800 rpm à 4°C). Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteína foi medida pelo método de Bradford.

Para obtenção do antígeno total de *Leishmania* (TLA), utilizado para estimular células iNKT, o mesmo protocolo foi utilizado, entretanto não foi realizada a centrifugação após o processo de ultrasonicação (MENDONÇA; RUSSELL; COUTINHO., 1991). Dessa forma, pôde-se garantir a presença dos glicolípidos no sobrenadante, uma vez que essas são as moléculas que são reconhecidas pelas iNKT (YANG; ZOU; SINGH, 2016).

Todos os antígenos foram testados usando leucócitos de pacientes infectados com *L.infantum* e armazenados à -20°C até o uso.

4.8. Determinação da infecção por *Leishmania*

O teste de sorologia foi realizado para confirmar/descartar a presença do anticorpo anti-*L.infantum* no soro das amostras coletadas. O método de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) foi utilizado para diagnóstico sorológico dos voluntários. Inicialmente, placas de 96 poços de fundo chato foram sensibilizadas, durante 18 horas à 4°C , pelo antígeno solúvel de *L. infantum* (250ng/poço) ou pelo antígeno recombinante rK39 (100ng/poço). Após esse período, a solução de sensibilização foi desprezada e adicionou-se 200 μL por poço de solução de bloqueio composta por PBS 1x e Tween 1% e foi mantida incubada por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, a solução de bloqueio foi desprezada e a placa foi lavada quatro vezes com 100 μL por poço de solução de lavagem composta por PBS 1x e Tween 0,1%. Então, o soro dos voluntários diluído em PBS 1x + Tween 0,1% foi adicionado em uma proporção de 1:500, para o antígeno solúvel de *L. infantum* e de 1:100, para o rK39 e manteve-se a placa incubada por 1 hora à temperatura ambiente.

Após o plaqueamento do soro dos voluntários, a placa foi lavada, quatro vezes, com a solução de lavagem e adicionou-se a solução Anti-IgG humana, contendo

100µL de PBS 1x +Tween 0,1% e 0,057 µL do anticorpo por poço, a placa foi então mantida em incubação por 1h à temperatura ambiente. Posteriormente, a placa foi lavada, quatro vezes, com solução de lavagem e foi adicionado 100µL/poço da solução de cromógeno, constituída de 0,006g de ABTS (2,2-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic), 11mL de tampão citrato-fosfato e 11µL de peróxido de hidrogênio. Em seguida, a placa foi submetida à uma nova incubação de 30 minutos, em temperatura ambiente e em local protegido da luz. Então, a solução de cromógeno foi desprezada e adicionou-se 100µL/poço da solução de parada, composta de SDS (Sodium dodecyl sulphate) 5%. Por fim, A absorbância foi determinada a 405 nm em espectrofotômetro. Todos esses ensaios foram realizados em triplicata (BRAZ et al., 2002).

4.9. Obtenção de Leucócitos para Ensaios Biológicos

Inicialmente, as amostras de sangue dos voluntários foram submetidas a estimulação por SLA/TLA. Alíquotas de 2 mL foram distribuídas em tubos falcons e 200µL de SLA/TLA (11 µg/mL) ou 200µL de RPMI foram adicionados aos respectivos tubos, seguidos por incubação durante 16h em estufa de CO₂ à 37°C. Em seguida, adicionou-se a brefeldina A (1mg/mL) a qual agiu sobre a estrutura do complexo de Golgi, impedindo a exportação de proteínas para o meio extracelular. Nessa condição, os tubos foram mantidos por mais 4h em estufa de CO₂ à 37°C.

Ao final das quatro horas, obtiveram-se os leucócitos através do processo de lise de hemácias (Solução de Lise -BD). As células foram lavadas três vezes com tampão PBS por meio de centrifugação (2000 rpm em 25°C por 5 minutos), desprezou-se o sobrenadante e foram vortexadas. Por fim, os leucócitos obtidos foram ressuspensos em um volume de 500µL e foram utilizados para análises biológicas.

Apenas para a subpopulação de células iNKT ensaios *ex vivo* também foram realizados, ou seja, nessa condição os leucócitos foram obtidos sem serem mantidos durante 16h em estufa de CO₂ à 37°C.

4.10. Imunofluorescência para análise de células Treg (CD4+CD25^{high}FOXP3+) e células iNKT (CD3+6B11+) expressando marcadores de superfície e intracelulares em pacientes infectados por *L. infantum*

Inicialmente, utilizando placa estéril de 96 poços de fundo em “u”, foram adicionados 25 µL da suspensão de leucócitos em cada poço, conjuntamente com 40 µL dos anticorpos anti-marcadores de superfície já diluídos, conforme titulação anteriormente padronizada no nosso laboratório. Após adição dos anticorpos, incubou-se a placa por 15 minutos a 4°C ao abrigo da luz. Terminado o período de incubação, realizou-se a lavagem das células adicionando 150 µL de PBS gelado em cada poço. A placa foi então, centrifugada durante 8 minutos (1300 rpm, 4°C). Ao final da centrifugação, retirou-se o sobrenadante e, em seguida, a placa foi agitada a fim de ressuspender as células. Posteriormente adicionou-se, em cada poço, 100µL de PBS e 100µL de solução de formaldeído 4%, para a fixação por 20 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução de fixação foi removida por centrifugação e as células lavadas novamente com 150µL de PBS.

O seguinte passo executado foi a permeabilização celular, na qual incubou-se as células por 10 minutos em solução de permeabilização (saponina 10% + wash B) à temperatura ambiente. A placa foi então centrifugada por 8 minutos (1300 rpm, 4°C) e o sobrenadante desprezado. Em seguida, adicionou-se sobre as células, 40µL da solução de anticorpos intracelulares adequadamente diluídos em solução de permeabilização. As amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e após este período, as células foram lavadas, por centrifugação, em solução de saponina. Esta operação repetiu-se por duas vezes, porém na última vez, as células foram lavadas com PBS/BSA. E finalmente, após desprezar o sobrenadante e agitar a placa, as células foram diluídas em 200µL de solução Wash B (PBS + albumina sérica bovina). O volume final de 200µL de solução contendo as células marcadas foi transferido para tubos próprios de leitura no citômetro de fluxo FACSCANTOII (Becton & Dickinson). As células foram mantidas a 4°C, ao abrigo da luz para que as fluorescências não fossem perdidas até a leitura no citômetro.

4.11. Anticorpos monoclonais

Os anticorpos utilizados para a marcação de moléculas de superfície foram: anti-CD4 (APCCy7), anti-CD3 (APC), anti-CD8 (PECy5), anti-iNKT (FITC), anti-CD25 (PECy7), anti-CD127 (APC), anti-CD45RA (PECy5), anti-CD39 (PE) e anti-CD73 (APC) e anti-CD69 (PE). Para marcações intracelulares os seguintes anticorpos foram utilizados: anti-FOXP3 (FITC), anti-CTLA4 (PE), anti-IL17 (PE), anti-IL-10 (APC), anti-IFN- γ (PE). Os controles de isotipo, igG (FITC) e igG (PE) foram utilizados para descartar marcação inespecífica. Todos os anticorpos utilizados serão adquiridos das companhias BD PharmingenTM (CA, EUA) ou Ebioscience (San Diego, CA, EUA).

4.12. Aquisição e análise dos dados por citometria de fluxo

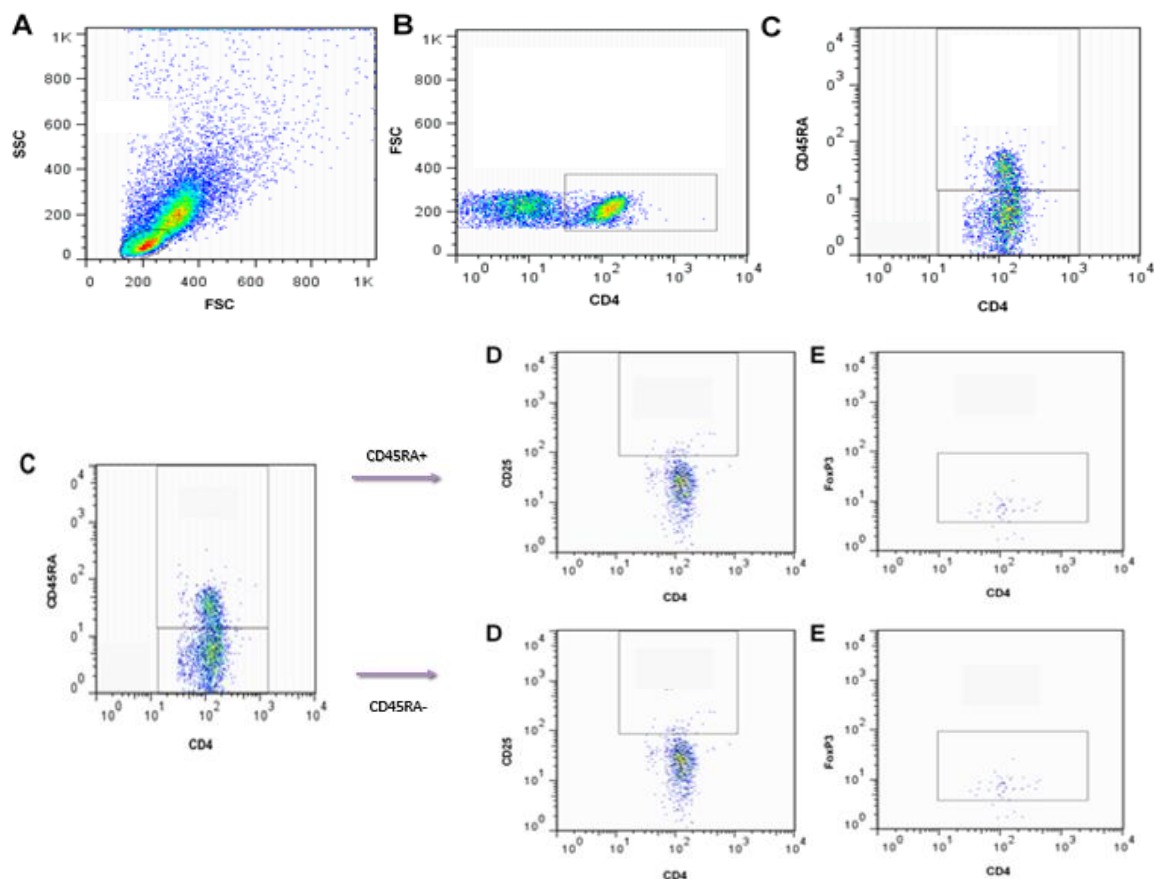
As preparações celulares marcadas com os anticorpos monoclonais fluorescentes foram avaliadas em citômetro de fluxo - FACSCANTOII (Becton & Dickinson) após a marcação, já descrita. Durante a aquisição dos dados foram coletados 70.000 eventos para avaliação das Treg e 100.000 eventos para avaliação das células iNKT.

Em geral, a estratégia de análise consistiu na determinação da população celular de interesse, através de marcadores fenotípicos utilizando o programa Flow Jo (Tree Star, Ashland, Oregon, EUA). Inicialmente, para todas as populações estudadas realizou-se a identificação da população celular de linfócitos, por meio do gráfico de tamanho *versus* granulosidade devido conhecimento prévio sobre a localização dessas células (Figura 1A).

As células Treg (CD4+CD25^{high}FOXP3+) foram analisadas quanto a expressão de marcadores de superfície e de citocinas intracelulares. A estratégia de análise utilizada para identificação das células Treg e seus subtipos foi iniciada com a seleção dos linfócitos totais, seguida pela identificação da subpopulação CD4+ através do gráfico de tamanho *versus* CD4 (Figura 1B). As células Treg naturais e de memória foram então identificadas, por meio do gráfico CD4+ *versus* CD45RA (Figura 1C). Posteriormente, em ambas subpopulações, as células com alta expressão do marcador de ativação CD25^{high} foram delimitadas. Em seguida a identificação completa das Treg foi realizada por meio da visualização das células FOXP3+ (Figuras 1D e 1E). Por fim, a análise dos respectivos marcadores de

superfície e citocinas foi realizada dentro das subpopulações de células nTreg (CD4+ CD25^{high}FOXP3+ CD45RA+) e mTreg (CD4+ CD25^{high}FOXP3+CD45RA-).

Figura 8 – Estratégia de análise utilizada para identificar as subpopulações de células Treg (CD4+CD25^{high}FOXP3+) no sangue total

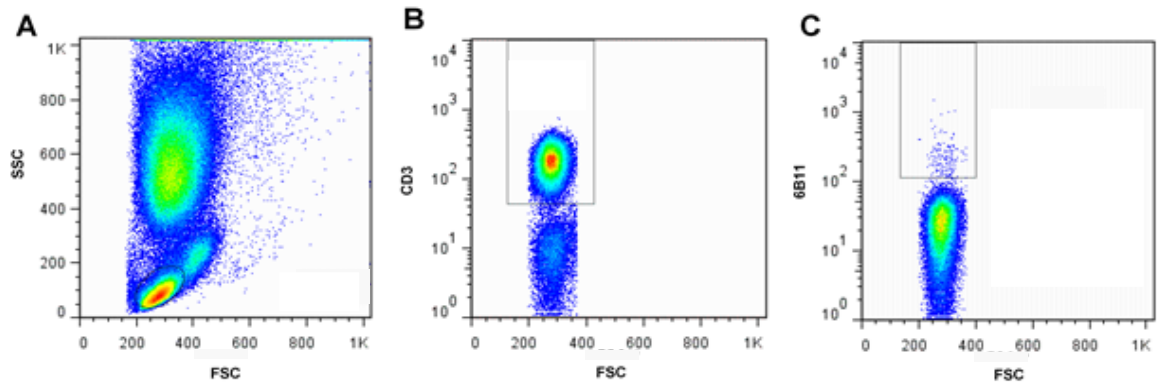


Fonte: PEIXOTO, R.F., 2018. (A) A população de linfócitos foi visualizada no gráfico tamanho vs. granulosidade (FSC vs. SSC) e foi feito um gate em torno da população, excluindo a maioria dos debris e monócitos. (B) Em seguida, essas células foram visualizadas no gráfico CD4 vs tamanho (FSC) selecionando-se apenas a população de linfócitos CD4+. (C) As células foram visualizadas no gráfico CD45RA vs. CD4, identificando assim os linfócitos T naturais e de memória. (D) O gráfico CD25 vs CD4 demonstrou as células T naturais e de memória ativadas. (E) Por fim, as células T reguladoras foram totalmente delimitadas a partir do gráfico FOXP3 vs CD4.

As células iNKT (CD3 + 6B11 +), por sua vez, foram analisadas quanto à sua ativação e perfil de citocinas. Resumidamente, após a seleção dos linfócitos totais (FIGURA 2A), as células CD3 + foram selecionadas (Figura 2B) e, nesta subpopulação, a população total de células iNKT (CD3+6B11+) foi determinada

(Figura 2C). Em seguida a análise de marcadores de ativação e citocinas foi realizada dentro das células CD3 e iNKT positivas.

Figura 9 – Estratégia de análise utilizada para identificar as subpopulações de células iNKT (CD3+6B11+) no sangue total



Fonte: PEIXOTO, R.F., 2018. (A) População de linfócitos foi delimitada pelo gráfico tamanho vs. granulosidade (FSC vs. SSC) no qual um gate foi feito em torno da população, excluindo a maioria dos debris e monócitos. (B) Em seguida, essas células foram visualizadas no gráfico CD3 vs tamanho (FSC) selecionando-se apenas a população de linfócitos CD3+. Por fim, as células iNKT foram determinadas como 6B11+ a partir do gráfico 6B11 vs FSC.

4.13. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0 (San Diego, EUA). Para análises comparativas entre os distintos grupos foram utilizados o teste Mann Whitney e o teste ANOVA One Way, seguido pelo teste Tukey. Os dados avaliados foram normalizados e o nível de significância foi estabelecido em 95%, sendo as diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS - I

5. RESULTADOS I

Os resultados dessa dissertação serão apresentados em duas partes, sendo o capítulo de resultados I utilizado para discorrer sobre as células Tregs e resultados II para células iNKT.

5.1. Caracterização clínico-epidemiológica dos grupos controle (CTL) e de pacientes com leishmaniose visceral (LV) em relação a gênero, média de idade, sintomatologia e diagnóstico realizado

Um total de 17 indivíduos foram avaliados, sendo 10 pacientes com leishmaniose visceral e 7 indivíduos controles. A média de idade dos pacientes com LV foi de 40,8 ($\pm 12,05$) anos e nos indivíduos controle de 37,8 ($\pm 16,4$) anos, as quais não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si. Em relação a gênero, no grupo dos pacientes com LV foi observado uma maior prevalência de indivíduos do sexo masculino. Já no grupo controle, a maioria dos indivíduos recrutados para a pesquisa eram do sexo feminino.

Os principais sintomas compartilhados entre os pacientes LV foram: febre alta (39 °C) e astenia. Entretanto, também foram citados sintomas característicos da doença como hepatoesplenomegalia, anemia grave, tontura, dor abdominal e perda de peso. O teste rápido rK39 foi utilizado, em associação com parâmetros clínicos-epidemiológicos, para diagnosticar a doença no grupo de pacientes com LV (**Tabela 1**).

Tabela 1. Média de idade, perfil sorológico e gênero dos grupos CTL e LV

Parâmetros	CTL (n=7)	LV (n=11)
Média de Idade	37,8±16,4	40,8±12,05
Gênero		
Masculino	1	7
Feminino	6	3
Sinais e Sintomas		
Hepatoesplenomegalia	0	4
Febre Alta	0	10
Astenia	0	7
Perda de Peso	0	4
Dor abdominal	0	4
Anemia Severa	0	4
Tontura	0	4
Diagnóstico		
rK39	0	10

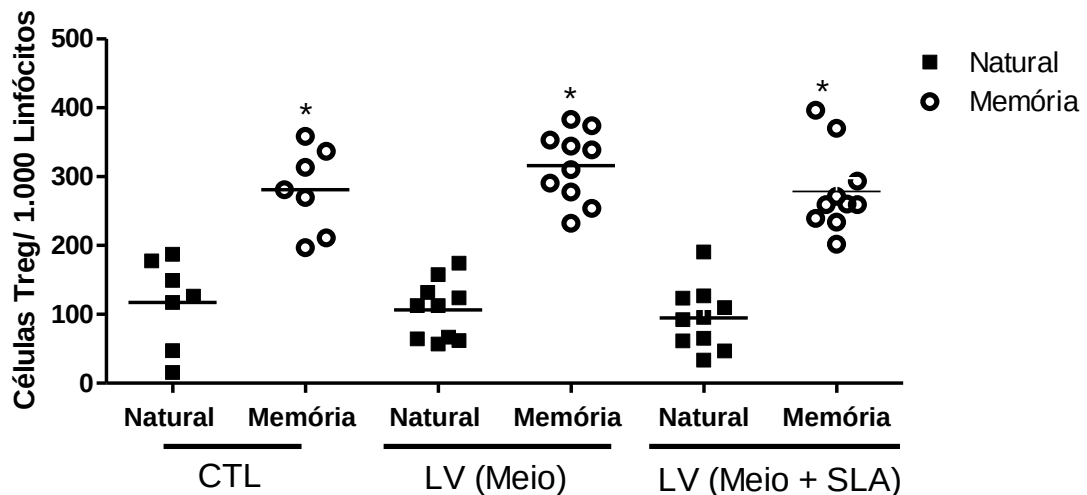
Fonte: PEIXOTO, R.F., 2018. Os dados de idade estão expressos em média $\pm$ desvio padrão.

5.2. Número Total de células T reguladoras naturais (nTreg) e células T reguladoras de memória (mTreg) no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV)

A média do número total de células Treg, a cada 1.000 linfócitos, foi analisada em todos os grupos estudados. No grupo controle, observou-se uma média de 159,7 ($\pm$ 129,4) nTreg e cerca de 245,8 ($\pm$ 111,5) mTreg. No grupo de pacientes LV sem estímulo por SLA, para células nTreg foi observada uma média de 106,3 ($\pm$ 42,23) e para mTreg a média foi de 315,8 ($\pm$ 51,15). No grupo de pacientes LV submetido à estimulação, as médias foram de 91,5 ($\pm$ 53,7) e 302,26 ($\pm$ 84,80) para células nTreg e mTreg, respectivamente.

De maneira geral, tem-se que o número total de Treg de memória foi maior em relação às células Treg naturais no grupo de pacientes com LV de forma independente ao estímulo. Traçando um comparativo entre todos os grupos avaliados, alterações significativas não foram observadas (**Gráfico 1**).

Gráfico 1. Número Total de células T reguladoras naturais (nTreg) e células T reguladoras de memória (mTreg) no grupo controle e no grupo de pacientes com leishmaniose visceral (LV), submetidos ou não a estimulação por SLA

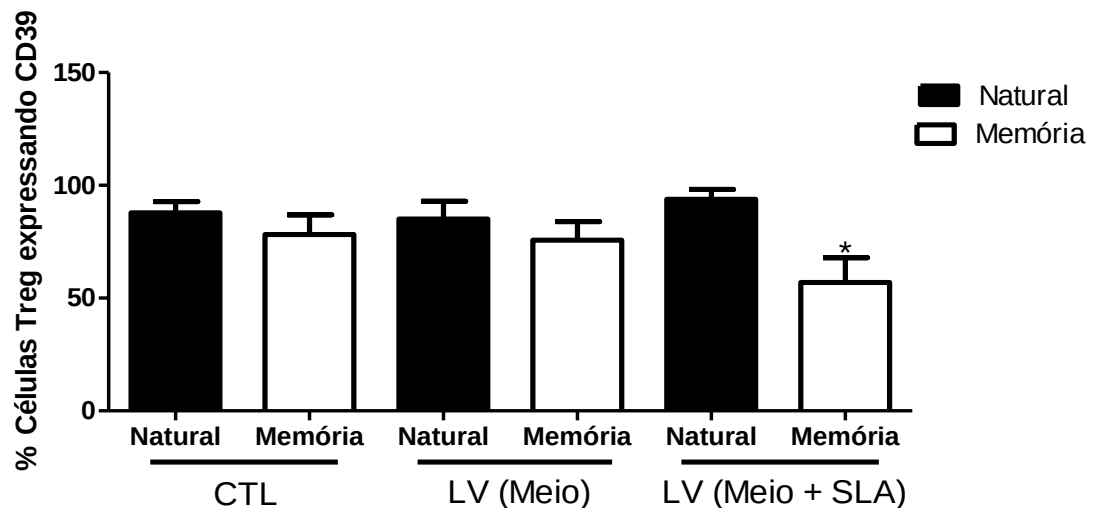


Fonte: PEIXOTO, R.F., 2018. Número total de células nTreg (■) e mTreg (○) nos grupos controle (CTL) (n=7) e de pacientes LV (n=10) na presença e ausência do estímulo por SLA. (*) representa as diferenças significativas observadas entre células Tregs naturais e de memória em cada grupo. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5.3. Expressão das ectonucleotidases (CD39 e CD73) em células T reguladoras naturais (nTreg) e células T reguladoras de memória (mTreg) no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV)

A análise comparativa da frequência de expressão do CD39, por células nTregs e mTreg, foi realizada em cada grupo. Entretanto, apenas no grupo de pacientes LV estimulados pelo SLA alterações significativas foram observadas, uma vez que houve redução na expressão do CD39 nas células mTreg em comparação as células nTreg do mesmo grupo. Alterações significativas na expressão desse marcador não foram observadas quando comparativo similar foi realizado entre os distintos grupos (Gráfico 2).

Gráfico 2. Expressão de CD39 em células nTreg e mTreg no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV), submetidos ou não a estimulação por SLA

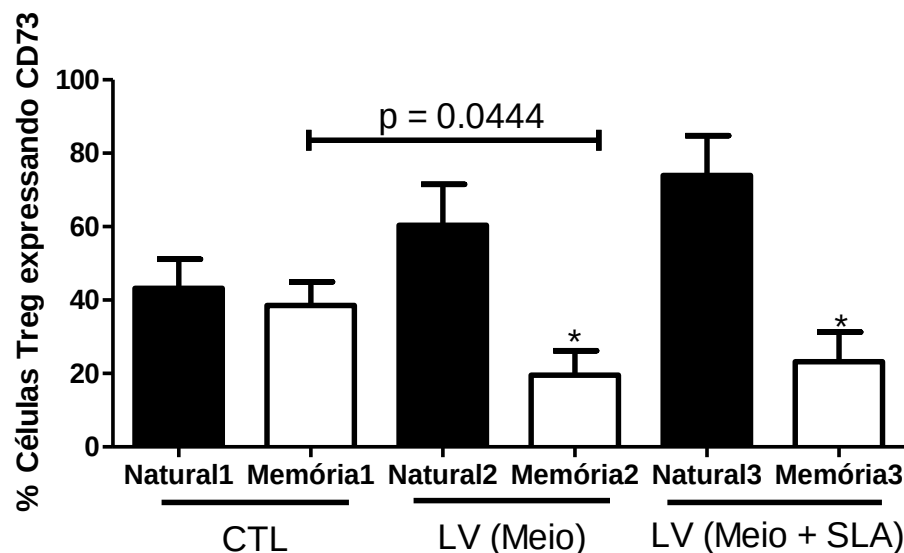


Fonte: PEIXOTO, R.F., 2018. Expressão de CD39 em nTreg e mTreg nos grupos CTL (n=7) e de pacientes LV (n=10) na presença e ausência do estímulo por SLA. (*) representa as diferenças significativas observadas entre células nTreg e de mTreg em cada grupo. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Análise semelhante também foi realizada em relação à frequência de expressão de CD73. Ao avaliar os grupos separadamente, observou-se que os grupos dos pacientes LV estimulados ou não pelo SLA, apresentaram reduções significativas na expressão de CD73 nas células mTreg em comparação a expressão observada nas células nTreg. No grupo controle, não houve alterações significativas na expressão do CD73 entre as subpopulações de células Treg (**Gráfico 3**).

Ao analisar comparativamente os distintos grupos estudados, temos que as células mTreg apresentam menor expressão de CD73 no grupo de pacientes LV submetidos ou não a estimulação do que o grupo controle (**Gráfico 3**).

Gráfico 3. Expressão de CD73 em células nTreg e mTreg no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV), submetidos ou não a estimulação por SLA



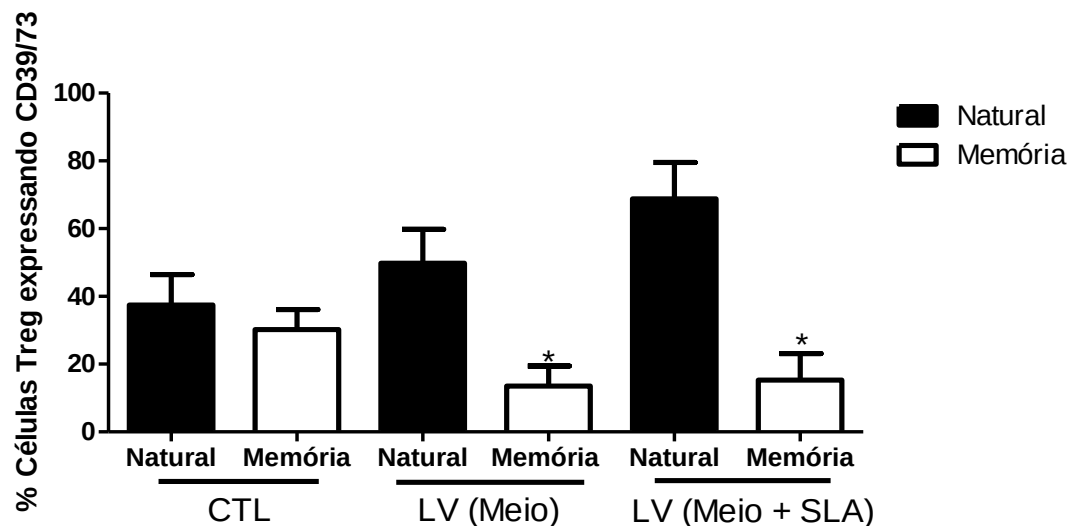
Fonte: PEIXOTO, R.F., 2018. Expressão de CD73 em nTreg e mTreg nos grupos CTL (n=7) e de pacientes LV (n=10) na presença e ausência do estímulo por SLA. (*) representa as diferenças significativas observadas entre células nTregs e mTreg em cada grupo. (—) representa diferenças significativas observadas nas subpopulações de células Treg entre os grupos avaliados. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5.4. Co-expressão de CD39 e CD73 em células T reguladoras naturais (nTreg) e células T reguladoras de memória (mTreg) no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV)

A análise da frequência da co-expressão de CD39/CD73 foi realizada em cada um dos grupos. Uma redução significativa na expressão desses marcadores foi observada apenas no grupo LV, entre células nTreg e mTreg, apenas no grupo LV de maneira independente do estímulo com SLA (**Gráfico 4**).

Uma análise comparativa das frequências de co-expressão entre os grupos, em ambos os subtipos celulares, demonstrou que não houve alterações significativas de co-expressão na presença ou na ausência do SLA (**Gráfico 4**).

Gráfico 4. Co-expressão de CD39/CD73 em células nTreg e mTreg no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV), submetidos ou não a estimulação por SLA



Fonte: PEIXOTO, R.F., 2018. Co-expressão de CD39/CD73 em nTreg e mTreg nos grupos CTL (n=7) e de pacientes LV (n=10) na presença e ausência do estímulo por SLA. (*) representa as diferenças significativas observadas entre células nTregs e mTreg em cada grupo. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

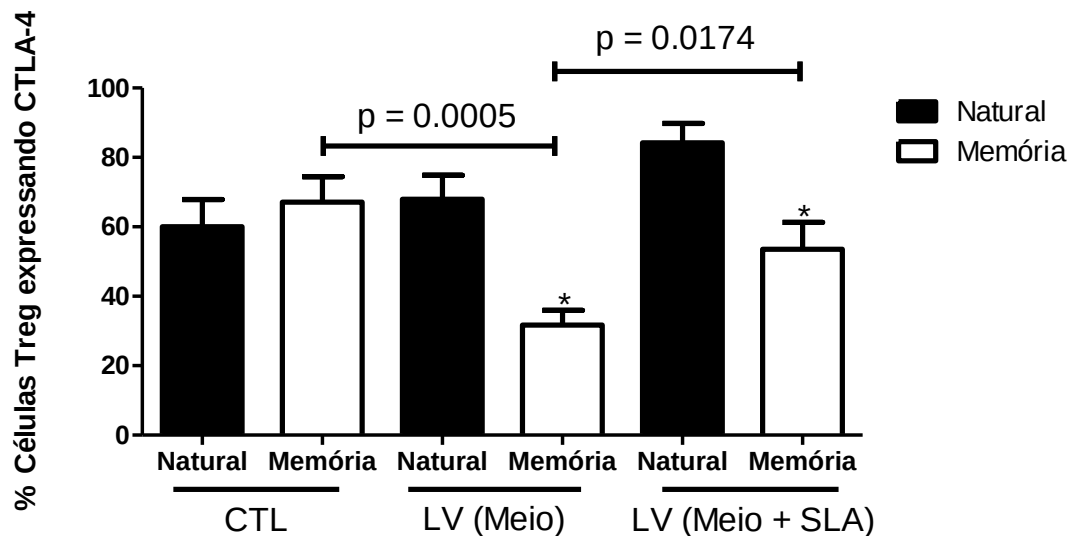
5.5. Expressão de CTLA-4 em células T reguladoras naturais (nTreg) e células T reguladoras de memória (mTreg) no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV)

Ao analisar a frequência de expressão de CTLA-4 nos grupos estudados, observou-se uma redução significativa na expressão desse marcador em células mTreg quando comparado às nTreg, no grupo LV submetido ou não a estimulação por SLA. Tal redução não foi observada entre as subpopulações do grupo controle (**Gráfico 5**).

Comparando entre os grupos a expressão de CTLA-4 notou-se, entre as células mTreg do grupo controle e do grupo LV sem estímulo, uma redução significativa nessa expressão. Entretanto, quando comparada entre o grupo LV não estimulado e

o grupo LV na presença do SLA, observou-se um reestabelecimento da expressão do CTLA-4 também pelas células mTreg (**Gráfico 5**).

Gráfico 5. Expressão de CTLA-4 em células nTreg e mTreg no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV), submetidos ou não a estimulação por SLA

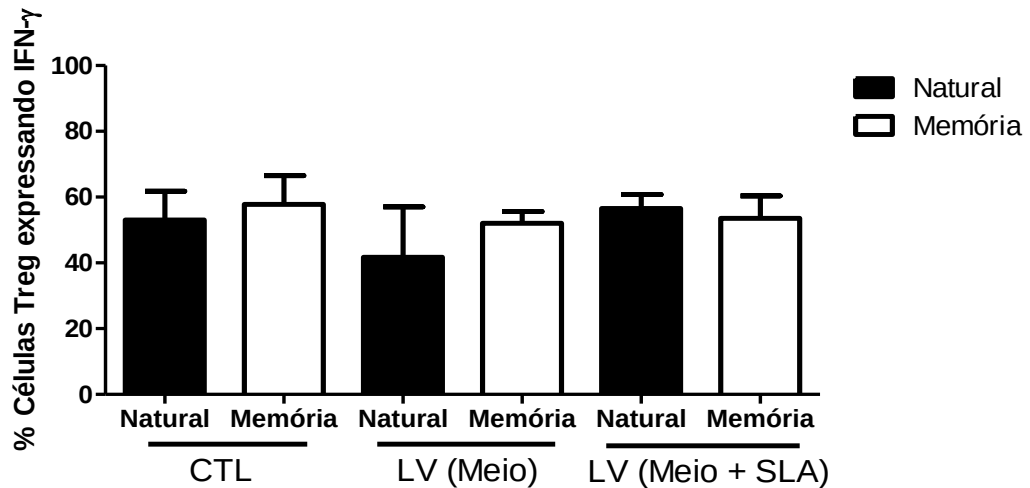


Fonte: PEIXOTO, R.F., 2018. Expressão de CTLA-4 em nTreg e mTreg nos grupos CTL (n=7) e de pacientes LV (n=10) na presença e ausência do estímulo por SLA. (*) representa as diferenças significativas observadas entre células nTregs e mTreg em cada grupo. (—) representa diferenças significativas observadas nas subpopulações de células Treg entre os grupos avaliados. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5.6. Expressão de IFN- γ e IL-10 em células T reguladoras naturais (nTreg) e células T reguladoras de memória (mTreg) no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV)

A análise comparativa da expressão do IFN- γ foi realizada por grupo. Não houve alterações na expressão desse marcador por células nTreg e mTreg, em nenhum dos grupos avaliados. Perfil semelhante foi observado quando o comparativo das distintas subpopulações entre os grupos foi realizado (**Gráfico 6**).

Gráfico 6. Expressão de IFN- γ por células nTreg e mTreg no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV), submetidos ou não a estimulação por SLA

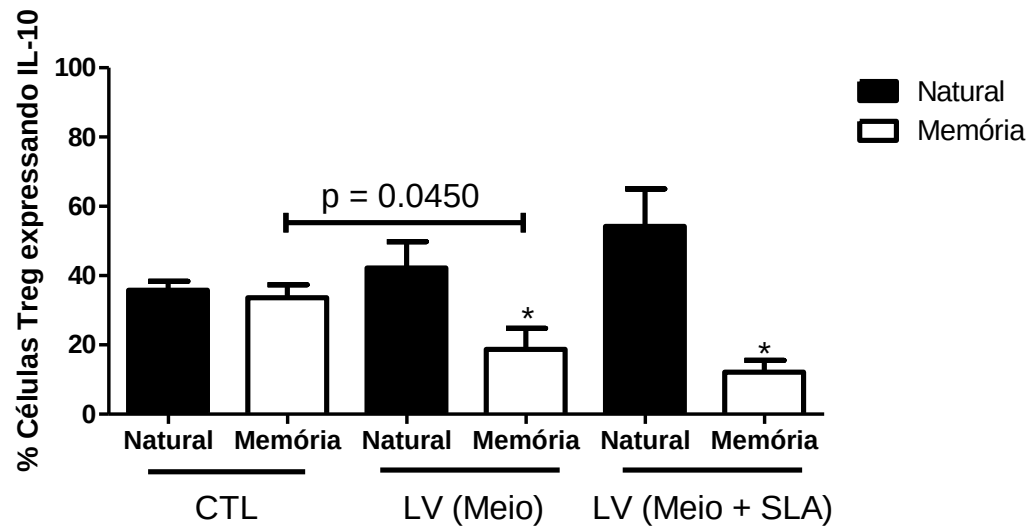


Fonte: PEIXOTO, R.F., 2018. Expressão de IFN- γ em nTreg e mTreg nos grupos CTL (n=7) e de pacientes LV (n=10) na presença e ausência do estímulo por SLA.

Ao avaliar individualmente os grupos estudados em relação a expressão de IL-10, notou-se uma significativa redução na produção dessa citocina nos pacientes LV por células mTreg, na presença ou ausência do SLA, em relação às nTreg. No grupo controle, não houve alteração significativa na produção de IL-10 entre as subpopulações de células Treg (**Gráficos 7**).

Ao analisar comparativamente os distintos grupos estudados, a expressão de IL-10 nas células mTreg foi reduzida nos pacientes LV, submetidos ou não a estimulação, quando comparado ao grupo controle. Em relação às nTreg, nos diferentes grupos a expressão se manteve constante (**Gráfico 7**).

Gráfico 7. Produção de IL-10 por células nTreg e mTreg no grupo controle e em pacientes com leishmaniose visceral (LV), submetidos ou não a estimulação por SLA



Fonte: PEIXOTO, R.F., 2018. Expressão de IL-10 em nTreg e mTreg nos grupos CTL (n=7) e de pacientes LV (n=10) na presença e ausência do estímulo por SLA. (*) representa as diferenças significativas observadas entre células nTregs e mTreg em cada grupo. (—) representa diferenças significativas observadas nas subpopulações de células Treg entre os grupos avaliados. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS - II

6. RESULTADOS II

6.1. Caracterização clínico-epidemiológica dos grupos de controles não endêmicos (CNE), controles negativos endêmicos (CNegE) e pacientes com leishmaniose visceral (LV) por meio da análise dos parâmetros gênero, média de idade e sorologia.

Um total de 24 indivíduos foram avaliados, sendo 12 casos de LV, 6 controles endêmicos negativos e 6 controles não endêmicos. A média de idade dos pacientes com LV foi de 40,3 ($\pm$ 13,9) anos, no controle endêmico negativo a média observada foi de 38,7 ($\pm$ 11,2) anos e nos controles não endêmicos de 31,2 ($\pm$ 9,5) anos. Diferença estatística não foi observada, entre os grupos de estudo, nesse parâmetro. Em relação ao gênero dos pacientes com LV, os indivíduos do sexo masculino apresentaram uma maior incidência da doença em comparação com pacientes do sexo feminino.

No que diz respeito aos antígenos anti-*Leishmania*, os grupos controles não apresentaram positividade para antígenos de *L. infantum*, enquanto que no grupo LV, todos os pacientes foram positivos. A **tabela 3** resume esses achados.

Tabela 2 - Média de idade, perfil sorológico e gênero dos grupos CTL e LV.

	Média de Idade	Sexo (M:F)	Anticorpos anti - <i>Leishmania</i> (SLA - <i>L. infantum</i>)
CNE (n=6)	31.2 $\pm$ 9.5	04:02	0
CNegE(n=6)	38.7 $\pm$ 11.2	04:02	0
LV (n=12)	40.3 $\pm$ 13.9	10:02	12

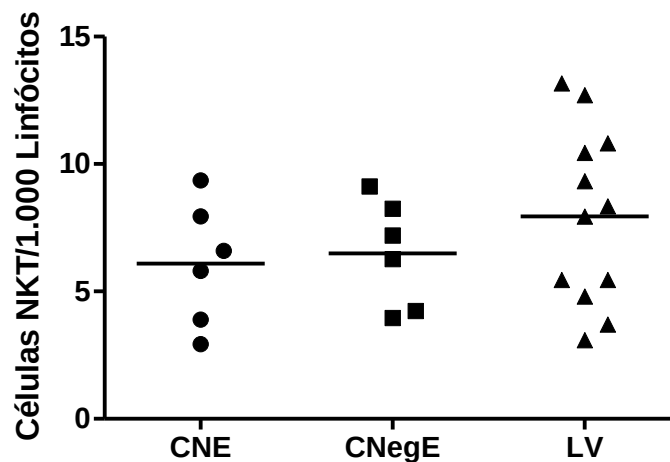
Fonte: PEIXOTO, R.F., 2018. Os dados de idade estão expressos em média $\pm$ desvio padrão.

6.2. Número Total e Padrão de Ativação das células iNKT nos grupos de controles não endêmicos (CNE), controles negativos endêmicos (CNegE) e pacientes com leishmaniose visceral (LV)

A média do número total de células iNKT *ex vivo* a cada 1.000 linfócitos, no sangue periférico dos indivíduos de todos os grupos estudados, foi observada. Em pacientes LV uma média de 7,93 ($\pm$ 3,60) células foi obtida, nos controles não

endêmicos a média encontrada foi de 6,08 ($\pm 2,41$) células e em controles endêmicos negativos observou-se uma média de 6,49 ($\pm 2,1$) células. De maneira geral, comparando os resultados entre os grupos notou-se que o número de células iNKT no sangue periférico dos pacientes LV não se alterou significativamente em relação aos grupos de controle (**Gráfico 8**).

Gráfico 8. Número Total de células iNKT (CD3 + 6B11 +) nos grupos CNE, CNegE e LV.



Fonte: PEIXOTO, R.F., 2018. Não foram observadas alterações significativas no número total de células iNKT, a cada 1.000 linfócitos, no sangue periférico de pacientes LV quando comparado aos grupos controle.

Em relação ao perfil de ativação recente dessas células, os pacientes com LV não apresentaram alterações significativas na expressão de CD69 em comparação com os grupos NonEC e NEC, *ex vivo* e após a cultura *in vitro* (meio e meio contendo TLA) (**Tabela 4**).

Tabela 3. Frequência de CD69 em células iNKT.

Grupos Estudados	% CD69		
	<i>Ex vivo</i>	Meio	Meio + TLA
CNE	10.3 $\pm$ 3.5	9.8 $\pm$ 3.3	9.3 $\pm$ 2.9
CNegE	15.9 $\pm$	12 $\pm$ 5.6	12.8 $\pm$ 11.2
LV	8.5 $\pm$ 7.8	14.8 $\pm$	11.3 $\pm$ 8.5

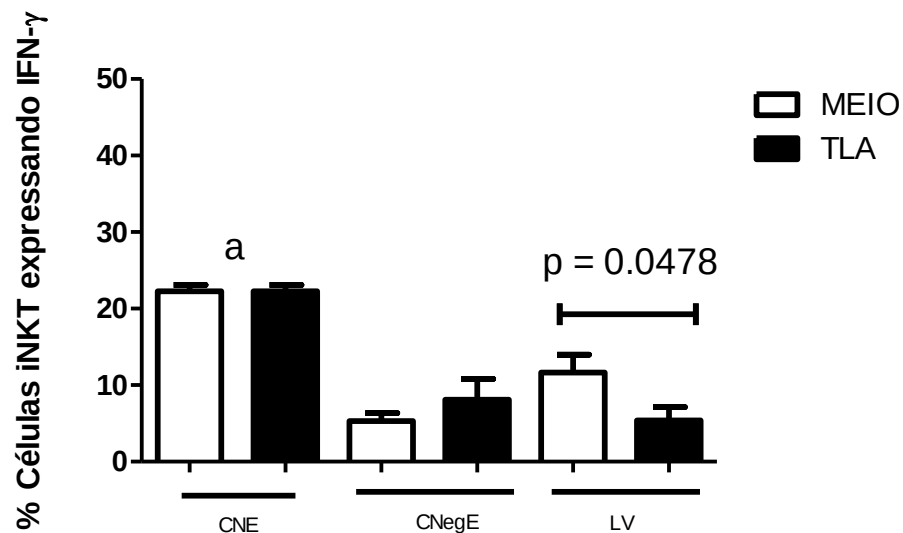
Fonte: PEIXOTO, R.F., 2018. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

6.3. Produção de IFN- γ pelas células iNKT nos grupos de controles não endêmicos (CNE), controles negativos endêmicos (CNegE) e pacientes com leishmaniose visceral (LV)

Ao comparar a frequência do IFN- γ em células iNKT, entre os grupos LV e CNegE, não foi observada diferença relevante entre eles. No entanto, ao comparar a produção de IFN- γ em células iNKT no CNE, observamos que este grupo apresentou uma expressão maior de IFN- γ do que os demais grupos avaliados (Gráfico 9).

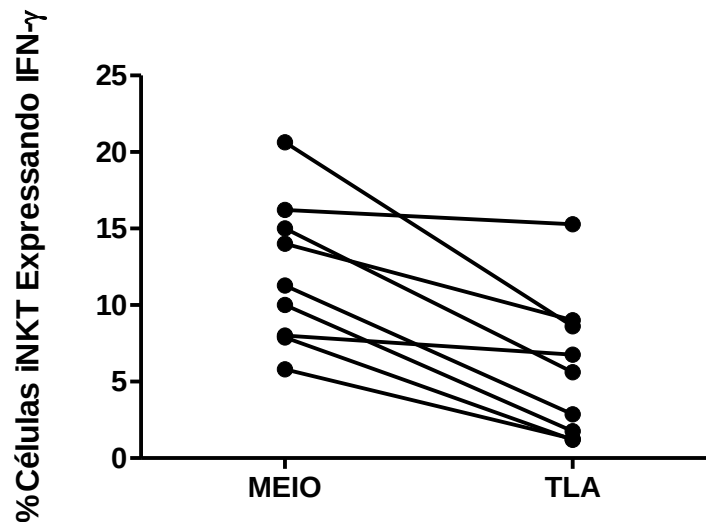
Ao analisar a produção de IFN- γ pelas iNKT em sangue total de pacientes com LV observou-se que na presença do estímulo por TLA, as células iNKT reduziram a produção de IFN- γ (Gráfico 10).

Gráfico 9. Produção de IFN- γ em células iNKT nos grupos CNE, CNegE e LV, submetidos ou não a estimulação por TLA.



Fonte: PEIXOTO, R.F., 2018. A expressão de IFN- γ em células iNKT (CD3 + 6B11 +) foi medida nos grupos CNE (n=6), CNegE (n=6) e LV (n=12) antes (barras brancas) e após estimulação com TLA (barras pretas). As barras representam o erro padrão médio ($\pm$) para cada grupo com um valor de $p < 0,05$ considerado significativo. (a) representa diferenças significativas entre o CNE e os demais grupos analisados.

Gráfico 10. Produção de IFN- γ por células iNKT no grupo LV, submetido ou não a estimulação por TLA.



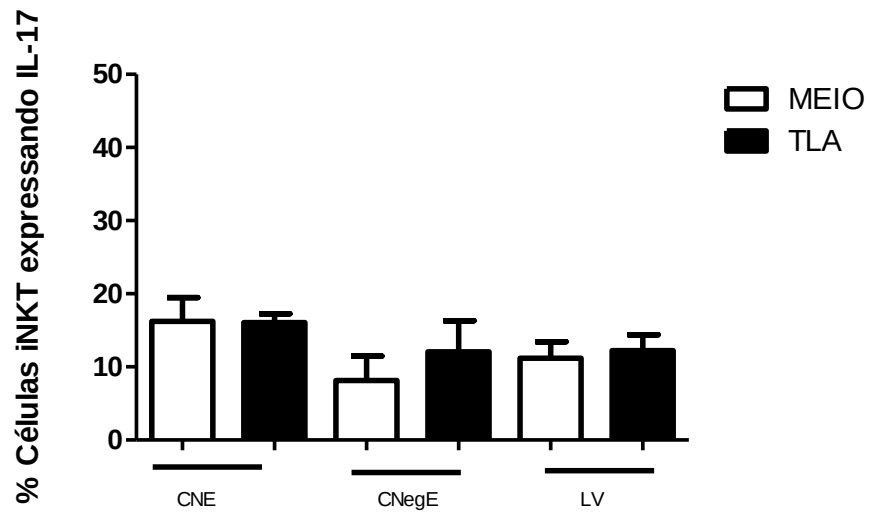
Fonte: PEIXOTO, R.F., 2018. A expressão de IFN- γ em células iNKT (CD3 + 6B11 +) foi reduzida no grupo LV (n=12), após o estímulo com TLA, em comparação ao grupo não estimulado.

6.4. Produção de IL-10 e IL-17 pelas células iNKT nos grupos de controles não endêmicos (CNE), controles negativos endêmicos (CNegE) e pacientes com leishmaniose visceral (LV)

Em todos os grupos avaliados, não foram observadas alterações significativas na produção de IL-17, por células iNKT na presença ou ausência do TLA, como representado no **Gráfico 11**.

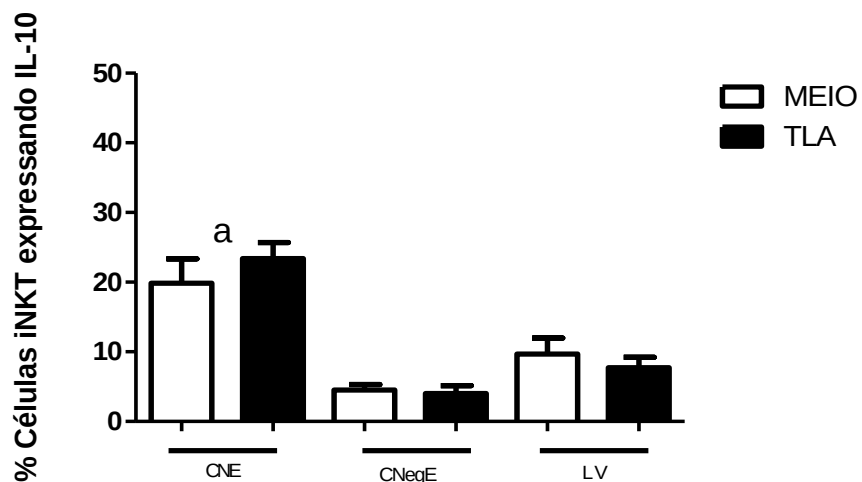
Em relação à produção de IL-10, observou-se um perfil semelhante a expressão da IL-17. Entretanto, o grupo CNE apresentou maior produção de IL-10 em células iNKT quando comparado ao CNegE e pacientes com LV de forma independente a estimulação (**Gráfico 12**).

Gráfico 11. Produção de IL-17 em células iNKT dos grupos CEN, CNegE e LV, submetidos ou não a estimulação por TLA.



Fonte: PEIXOTO, R.F., 2018. A expressão de IL-17 em células iNKT (CD3 + 6B11 +) foi medida nos grupos CNE (n=6), CNegE (n=6) e LV (n=12) antes (barras brancas) e após a estimulação com TLA (barras pretas). As barras representam o erro padrão médio ($\pm$) para cada grupo com um valor de $p < 0,05$ considerado significativo.

Gráfico 12. Produção de IL-10 em células iNKT dos grupos CEN, CNegE e LV, submetidos ou não a estimulação por TLA.



Fonte: PEIXOTO, R.F., 2018. A expressão de IL-10 em células iNKT (CD3 + 6B11 +) foi medida nos grupos CNE (n=6), CNegE (n=6) e LV (n=12) antes (barras brancas) e após a estimulação com TLA (barras pretas). As barras representam o erro padrão médio ($\pm$) para cada grupo com um valor de $p < 0,05$ considerado significativo. (a) representa diferenças significativas entre o CNE e os demais grupos analisados.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Devido ao alto impacto na saúde pública mundial, doenças tropicais endêmicas, como as leishmanioses, são relevantes alvos de estudo em áreas como a imunologia, epidemiologia e saúde coletiva (OMS, 2013). Características clínico-epidemiológicas devem ser consideradas no âmbito científico, uma vez que fornecem dados relevantes para o desenvolvimento de estratégias de prevenção, diagnóstico e terapêutica inerente a determinada população.

Nesse contexto, relacionando aos voluntários da presente pesquisa, alguns parâmetros clínicos-epidemiológicos foram considerados. Nos voluntários agrupados para avaliação de ambas populações celulares aqui avaliadas, as médias de idade oscilaram entre 30 e 40 anos de idade. Alguns estudos demonstraram um perfil semelhante, como o de El Jeri et al. (2017) que realizaram um estudo retrospectivo com indivíduos hospitalizados, acometidos por leishmaniose visceral, no qual a média de idade observada nos voluntários foi de 40,5 anos. Outro estudo investigou pacientes acometidos pela forma tegumentar da doença e constatou que a população mais acometida pela doença foi a adulta e economicamente ativa (SILVA; GURGEL, 2013). Fatores como exposição ao mosquito vetor ligada a atividades ocupacionais, condições precárias de habitação e ausência de esclarecimento sobre a doença e sua transmissão, devem ser levados em consideração para justificar o acometimento de indivíduos nessa faixa etária (VANZELI; KANAMURA, 2007; SILVA; GURGEL, 2013).

No grupo de pacientes LV de todas as subpopulações estudadas, foi observada uma prevalência de indivíduos do sexo masculino. Um estudo envolvendo 126 pacientes com leishmaniose visceral, co-infectados ou não pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), relatou que aproximadamente 80% desses pacientes eram homens (VIANA et al., 2017). A maior proporção de pacientes do sexo masculino do que feminino também foi demonstrada em áreas epidêmicas de *Leishmania*, reforçando os resultados aqui descritos (MONTROYA et al., 2007). Fatores hormonais são consideráveis para explicar tal fato, uma vez que a testosterona está associada à replicação parasitária em indivíduos do sexo masculino, sugerindo assim uma susceptibilidade à doença (LIU et al., 2006). Entretanto, a possibilidade de fatores genéticos estarem envolvidos em uma maior

susceptibilidade masculina quanto a leishmaniose visceral também é discutida (BORGES et al., 2008; COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990).

A sintomatologia analisada nos grupos aqui analisados corrobora com os sintomas estabelecidos da leishmaniose visceral, como por exemplo, febre, hepatomegalia, esplenomegalia e leucopenia (ADRIAENSEN et al., 2018). Em consonância com os critérios de inclusão baseado em sintomas utilizados aqui, temos que GAO et al. (2013) analisaram 137 casos de leishmaniose visceral na China, dos quais o diagnóstico foi realizado baseado na presença de febre prolongada, hepatoesplenomegalia, leucopenia e hipergamaglobulinemia. Adicionalmente, também corroborando com os dados aqui observados, em um estudo indiano que avaliou 91 casos de LV, cerca de 97% desses, apresentaram febre alta como principal sintoma descrito. É válido comentar que sintomas como perda de peso, dor abdominal e hepatoesplenomegalia também foram citados (GUPTA; KANT; MIRDHA, 2017).

Ainda no contexto dos critérios de inclusão utilizados no presente estudo, a utilização do teste rK39 para o diagnóstico da LV, é reforçada por Gao et al. (2013) que descreveram o teste rápido de imunocromatografia utilizando o antígeno rk39 como o de maior eficiência na detecção da doença visceral (LEMOS et al., 2003). Além disso, tal antígeno quando empregado por ELISA mostrou 100% de especificidade e 98% de sensibilidade evidenciando sua eficiência no diagnóstico da LV (GONTIJO; MELO, 2004; BURNS et al., 1983). Entretanto a sorologia, também foi utilizada como parâmetro de seleção desses pacientes. A coerência de tal abordagem é confirmada através de Elmahallawy et al. (2014) que relatam o diagnóstico da leishmaniose visceral feito através da combinação de ensaios sorológicos e parâmetros clínicos.

Além da compreensão de aspectos clínicos e epidemiológicos, definir a função e os mecanismos utilizados por células Treg e iNKT na infecção por *Leishmania infantum* é importante por fornecer uma visão geral a respeito da imunomodulação, fornecendo perspectivas sobre possíveis alvos terapêuticos ou moléculas alvo para diagnóstico.

Inicialmente, visando compreender o papel das células Tregs na leishmaniose visceral, a dinâmica de suas subpopulações em indivíduos infectados foi aqui avaliada. Observou-se assim, um número maior de células mTreg em comparação ao número de células nTreg em todos os grupos analisados. Seddiki et al. (2006)

demonstraram que em indivíduos adultos o número médio de células Treg CD45RA+ (nTreg) é aproximadamente a metade do número de células Tregs CD45RO+ (mTreg), dado que corrobora com o aqui demonstrado. Uma possível explicação para tal perfil consiste na diminuição progressiva da produção de células T reguladoras oriundas do timo, devido à involução tímica que está correlacionada a idade. Além disso, foi descrito que as células nTreg podem atuar como precursores das células Treg de memória, o que poderia explicar sua redução em amostras de sangue periférico onde a maioria das células encontradas possuem o fenótipo de memória (VALMORI et al., 2005)

Células Treg de memória são consideradas uma poderosa ferramenta terapêutica para doenças auto-imunes, inflamação e tratamento anti-tumoral devido seu perfil imunorregulador (WORKMAN et al., 2012). Quando estimuladas, tais células expandem-se rapidamente, secretam citocinas regulatórias e atuam suprimindo condições imunopatológicas excessivas mediadas por células T efetoras de memória, inclusive em casos de reinfecção (SANCHEZ et al., 2012). Evidências sugerem a sua manutenção no organismo ao longo da vida e a participação das mTreg em doenças crônicas, entretanto sua atuação na modulação imune dessas afecções ainda não está bem elucidada (GRATZ; CAMPBELL., 2014; VENKEN et al., 2008).

Ao investigar os distintos mecanismos exercidos pelas subpopulações de células Treg, observamos a manutenção dos níveis de expressão de CD39 e CD73 pelas células nTreg. Por outro lado, em células mTreg observou-se uma redução na expressão de CD39 induzida pelo SLA no grupo LV e na expressão de CD73 no mesmo grupo, na ausência e presença do SLA. Considerando o mecanismo de produção de adenosina, especificamente o mediado por células Treg, sugere-se que na presença do SLA ocorre uma redução da conversão de ATP/ADP em AMP devido a redução do CD39 e devido a diminuição da expressão do CD73, sugere-se uma redução na desfosforilação do AMP em adenosina. Tendo em vista que o aumento na concentração de adenosina extracelular inibe as funções efectoras das células do sistema imune do hospedeiro e que pacientes com LV apresentam altos níveis de adenosina no soro (SERAPHIM; ALVISI; LIMA, 2012; RAI et al., 2011), pode-se sugerir que as células mTreg na infecção por *L.infantum* atuam na tentativa de reduzir a disponibilidade de adenosina extracelular e consequentemente, a sinalização inibitória mediada por receptores purinérgicos nesses pacientes. Tal

papel favoreceria o estabelecimento de uma resposta imune efetora contra o parasita.

O mecanismo de contato célula-célula via CTLA-4 foi avaliado e uma manutenção na expressão do CTLA-4 por células nTreg em todos os grupos foi aqui observada. No entanto, as células mTreg avaliadas no grupo LV, na ausência de SLA, reduziram tal expressão em comparação ao grupo controle. A função inibitória desse marcador foi comprovada através do bloqueio de CTLA-4 e pela restauração das respostas de linfócitos T ativados na infecção por *L. chagasi*, após tal procedimento. É válido ressaltar que esse bloqueio, ou seja, a ausência da expressão de CTLA-4 favoreceu a geração de uma resposta Th1 através da produção de IFN- γ , da secreção de IL-2 e consequentemente, da proliferação celular (GOTO; LINDOSO, 2004; GOMES et al., 1998). Em modelos murinos após infecção por *L. donovani*, uma resistência do hospedeiro ao patógeno intracelular foi demonstrada (MURPHY et al., 1998). Além disso, o bloqueio de CTLA-4 também foi relacionado ao estabelecimento de respostas T efetoras em pacientes acometidos por doenças crônicas (SMALL et al., 2007). Nesse contexto, pode-se sugerir uma imunomodulação pelas células mTreg baseada na redução dos efeitos inibitórios do CTLA-4.

Entretanto, o SLA induziu aumento da expressão de CTLA-4, nas células mTreg no grupo de pacientes com LV. Rosemlun et al. (2016) descreveram as células mTreg como células aptas a responder agilmente em casos de reexposição antigênica, como durante a estimulação por SLA. Em doenças infecciosas, demonstrou-se que tais células secretam citocinas como a IL-10 e atuam regulando condições imunopatológicas mediadas por células T de memória, como anteriormente citado (SANCHEZ et al., 2012). Sendo assim, pode-se sugerir que o estímulo promovido pelo SLA nessas células induziria a expressão de CTLA-4, uma vez que tal marcador constitui um dos mecanismos desempenhados por células Treg. Além disso, a secreção de IL-10 e os níveis elevados dessa citocina descritos na LV, favorecem a proliferação e ativação de células Treg presentes nesse microambiente, as quais podem expressar CTLA-4, justificando assim o resultado aqui observado (GANNAVARAM et al., 2016).

No que diz respeito à IL-10 e IFN- γ , os resultados aqui demonstrados evidenciaram uma manutenção na expressão dessas citocinas nas células nTreg, em todos os grupos avaliados. Por outro lado, células mTreg mantiveram os níveis

de expressão do IFN- γ nos grupos estudados. Além disso, nessas células houve uma redução no nível de IL-10, no grupo LV, independentemente do estímulo. Nylen e Sacks (2007) sugerem que elevados níveis de IL-10 caracterizam imunologicamente a LV e que tal perfil seria um possível mecanismo homeostático para controlar a inflamação persistente induzida pela infecção. De fato, distintos mecanismos imunossupressores são desencadeados pela presença de IL-10, dentre os quais podemos citar a não responsividade de macrófagos à sinais de ativação como a presença de IFN- γ , apoptose de células T ativadas, produção de anticorpos auto-reativos e a deposição de complexos imunes, os quais estimulam macrófagos e monócitos a produzirem IL-10 (feedback positivo) (NYLÉN; SACKS, 2007; GHALIB et al, 1993).

Além disso, há relatos que na infecção crônica por *L.major*, um perfil de resposta pró-inflamatória é induzido por células T efetoras e células Treg secretoras de IFN- γ . Contudo, um dado interessante consiste no fato de tais células estimularem a supressão imune mediada por IL-10, para controlar uma resposta à inflamação excessiva (ANDERSON et al., 2007; LUNDQVIST et al., 2005). Levando em consideração, a associação entre os níveis plasmáticos de IL-10 e IFN- γ e uma suposta regulação imune mediada pelo equilíbrio entre elas, pode-se sugerir que a manutenção dos níveis de IFN- γ , nas células nTreg e mTreg, aqui observados seria para contrabalancear a imunossupressão mediada pelos elevados níveis de IL-10 observados na LV (CALDAS et al., 2005). As mTreg, especificamente, ainda demonstram contribuir de maneira relevante nessa regulação, uma vez que além de manter os níveis de expressão do IFN- γ , também reduzem a expressão de IL-10.

De maneira geral, todos os resultados até aqui descritos evidenciam uma redução nos mecanismos regulatórios das células mTreg e a manutenção destes pelas nTreg, o que pode sugerir um equilíbrio na modulação da resposta imune mediado por essas células. Isso seria melhor justificado com a avaliação de outras subpopulações, como os monócitos e uma análise de correlação de produção de citocinas pró-inflamatórias e a IL-10. Estudos nesse sentido já estão sendo conduzidos pelo nosso grupo, com a finalidade de entender melhor essa dualidade na resposta imune da leishmaniose visceral em diferentes subpopulações celulares.

O perfil de ativação e produção de citocinas mediado pelas células iNKT também foram investigados. Essa subpopulação possui a capacidade de desenvolver uma resposta imune de forma ágil e contribuir para a ativação de outros

subtipos celulares, desempenhando papéis cruciais no estágio inicial da infecção protozoária intracelular obrigatória (KEESEN et al., 2011; BRENNAN; BRIGL; BRENNER, 2013). Assim, tais características a tornam uma subpopulação alvo interessante para distintas abordagens de pesquisa.

Inicialmente, a identificação de células iNKT foi realizada por citometria de fluxo através da marcação com 6B11 em células T CD3+, de pacientes infectados por *L. infantum*, na presença e ausência de estimulação por TLA. Entre os grupos estudados, não houve mudanças significativas no número total de células iNKT no sangue periférico de indivíduos. Em linhas gerais, as células iNKT representam uma população celular circulante de baixa frequência em humanos, porém seu papel vem sendo amplamente discutido. Isso se relaciona ao fato de que apesar de baixos níveis circulantes, as células iNKT podem ser uma fonte de liberação de IFN- γ , IL-4 e IL-13, que tornam essas células altamente moduladoras do sistema imune, especialmente pela imunomodulação de células dendríticas (BENDELAC et al., 2007). Esses dados indicam que apesar da manutenção de números de células iNKT circulantes nos indivíduos avaliados, o perfil de modulação desse subtipo celular pode ser decisivo na caracterização imunológica dos grupos controle e grupo LV. Entretanto, não há estudos demonstrando o número de células iNKT por linfócitos circulantes em pacientes LV, tornando o presente estudo pioneiro em avaliar células iNKT em amostras de sangue total na leishmaniose visceral.

Rai et al. (2011) demonstram que ao comparar o perfil de ativação das células iNKT, em células do sangue periférico, de pacientes infectados por *L. donovani* e de grupos endêmicos saudáveis, alterações significativas não foram observadas. Tal dado corrobora com o perfil de baixa ativação de células iNKT, oriundas de sangue periférico, aqui observado. A ativação de células iNKT está, comumente, relacionada ao estabelecimento de respostas imunes favoráveis a eliminação de patógenos (BARTHELEMY et al., 2016), sugerindo dessa forma, que a baixa ativação de células iNKT podem ser relacionadas à manutenção parasitária no hospedeiro, favorecendo assim a patogenicidade da doença visceral.

Diante disso, para investigar a atuação das células iNKT por meio da secreção de citocinas em pacientes LV, a expressão de IFN- γ foi inicialmente analisada. No grupo LV houve uma redução significativa na secreção dessa citocina por tais células, na presença do TLA. Em geral, o IFN- γ é uma citocina envolvida na toxicidade parasitária na infecção por *Leishmania* spp., por induzir a ativação de

macrófagos (LICHE et al., 2011; BARATA-MANSINI et al., 2007; LIEW et al., 1994). Entretanto, os elevados níveis de IL-10 na leishmaniose visceral favorecem à supressão da síntese de IL-12 em células acessórias, resultando na inibição da produção de IFN- γ (JIN et al., 2013; BHATTACHERYA et al., 2001; BACELLAR et al., 2000; GHALIB et al., 1993). Sendo assim, considerando a importância do IFN- γ relacionado ao favorecimento da eliminação de patógenos, os dados aqui obtidos sugerem, que a expressão dessa citocina por iNKT na LV pode estar relacionado à sobrevivência do parasita no hospedeiro.

Outra citocina avaliada foi a IL-17, a qual está diretamente relacionada ao recrutamento de neutrófilos para os sítios de infecção e produção de mediadores pró-inflamatórios (DUPAGE; BLUESTONE, 2016). O perfil da IL-17, em modelo murino com leishmaniose visceral foi descrito por GHOSH et al. (2013). Tal estudo associou a IL-17 à proteção do hospedeiro à doença, uma vez que citocinas de perfil pró-inflamatório atuaram reduzindo a carga de parasitas no fígado e baço desses animais. Pitta et al. (2009) avaliaram a diferença de resposta entre indivíduos resistentes, indivíduos curados e pacientes infectados por *L. donovani* e observaram que essa infecção estimulou uma diferenciação de células Th17 produtoras de IL-17 e que essa citocina estava associada a uma resposta imune eficaz contra o parasita. Entretanto, alterações significativas na expressão de IL-17 por células iNKT não foram aqui observadas, entre todos os grupos avaliados. Tal dado indica a ausência de modulação através dessa citocina, sugerindo dessa forma a participação desse subtipo celular no estabelecimento da infecção e favorecimento da cronicidade observada na doença visceral.

Células iNKT pré-tratadas com α GalCer foram descritas reduzindo respostas antitumorais e autoimunes. Estes dados sugerem que as células iNKT produtoras de IL-10 representam um subconjunto distinto de células iNKT com potencial regulador (SAG et al., 2014). Entretanto, os resultados aqui observados mostraram que nos pacientes LV e no grupo CNegE, não houveram diferenças significativas na expressão dessa citocinas por células iNKT, sugerindo que a expressão da IL-10 não é uma característica intrínseca dessa subpopulação celular na doença visceral.

Dessa forma, nossos resultados sugerem que as células nTreg e células iNKT, auxiliam na manutenção dos efeitos da IL-10 na cronicidade da doença. Por outro lado, as células mTreg atuam contrabalanceando a imunossupressão mediada pela IL-10, através de mecanismos que auxiliam na indução de respostas efetoras

na doença. Entretanto, apesar da atuação compensatória das células mTreg contribuir para o estabelecimento de mecanismos de controle da LV, o perfil patogênico regulado pela IL-10 ainda prevalece na doença.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Diante da análise dos resultados, ao investigar a imunomodulação por subpopulações de linfócitos na leishmaniose visceral humana, nas células T reguladoras observou-se:

- Número total elevado de células mTreg em comparação as células nTreg em todos os grupos avaliados;
- Manutenção da expressão de CD39 por células nTreg no grupo LV e indivíduos controles, independente da estimulação por SLA;
- Redução significativa na expressão do CD39 em células mTreg no grupo LV estimulados por SLA;
- Manutenção da expressão de CD73 em células nTreg, em todos os grupos avaliados;
- Redução significativa na expressão de CD73 em células mTreg no grupo LV, independente da estimulação por SLA;
- Manutenção da co-expressão de CD39/CD73 em células nTreg em todos os grupos avaliados;
- Redução significativa da co-expressão de CD39/CD73 em células mTreg no grupo LV, independente da estimulação por SLA;
- Manutenção da expressão de CTLA-4 em células nTreg independente da estimulação por SLA em todos os grupos avaliados;
- Redução significativa na expressão de CTLA-4 em células mTreg no grupo LV na ausência de SLA e reestabelecimento da expressão de CTLA na presença de SLA;

- Manutenção da expressão de IFN- γ por células nTreg e mTreg em todos os grupos avaliados;
- Manutenção da expressão de IL-10 por células nTreg em indivíduos controle e no grupo LV na ausência de SLA;
- Redução da expressão de IL-10 por células mTreg no grupo LV, independente da estimulação por SLA;

Já nas células iNKT, observou-se:

- Número total de células iNKT semelhante entre os grupos estudados;
- Perfil de ativação recente semelhante em todos os grupos estudados determinado pela baixa expressão de CD69;
- Redução significativa na expressão de IFN- γ no grupo de controles negativos endêmicos e no grupo LV na presença e ausência de TLA, em relação ao grupo de controles não endêmicos;
- Manutenção da expressão de IL-17 sem alterações significativas em todos os grupos estudados;
- Redução significativa na expressão de IL-10 no grupo de controles negativos endêmicos e no grupo LV na presença e ausência de TLA, em relação ao grupo de controles não endêmicos.

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

ADRIAENSEN, Wim et al. Immunomodulatory therapy of visceral leishmaniasis in HIV coinfecting patients. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1943, 2017.

AKHOUNDI, Mohammad et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.

ALLARD, Bertrand; TURCOTTE, Martin; STAGG, John. CD73-generated adenosine: orchestrating the tumor-stroma interplay to promote cancer growth. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

ALVAR, Jorge et al. Canine leishmaniasis. **Advances in parasitology**, v. 57, n. 3, p. 1-88, 2004.

ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

AMPREY JL, Im JS, Turco SJ, Murray HW, Illarionov PA, Besra GS, et al. A subset of liver NK T cells is activated during Leishmania donovani infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. **J Exp Med** (2004) 200:895–904. doi:10.1084/jem.20040704.

ANDERSON, Charles F. et al. CD4+ CD25– Foxp3– Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 2, p. 285-297, 2007.

ASSIS, Tália Santana Machado de et al. Budgetary impact of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 33, p. e00142416, 2017.

AZIZI, Mohammad Hossein et al. A history of Leishmaniasis in Iran from 19th century onward. **Arch Iran Med**, v. 19, n. 2, p. 153-162, 2016.

BACELLAR, Olívia et al. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 12, n. 8, p. 1228-1231, 2000.

BANERJEE, Antara et al. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in Leishmania pathogenesis and in protective immunity by Leishmania vaccines. **Cellular immunology**, v. 309, p. 37-41, 2016.

BARATTA-MASINI, Ariane et al. Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. **Front Biosci**, v. 12, n. 1, p. 839-49.10, 2007.

BARRETO, Maurício L. et al. Sucessos e fracassos no controle de doenças infecciosas no Brasil: o contexto social e ambiental, políticas, intervenções e necessidades de pesquisa. **The Lancet**, v. 3, p. 47-60, 2011.

BASTOS, Esp Grace. Prevenção e Controle a Incidência de Infestação de doenças endêmicas e vetoriais.2016. Disponível em:

<https://www.ladario.ms.gov.br/uploads/asset/file/2640/Apostila_ag_Saude-Endemias.pdf>. Acesso em: 20 fev. de 2018.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal of Parasitology**, v. 37, p. 1097-1106, 2007.

BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New Insights into the Developmental Biology and Transmission. Mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**. V. 4, p. 601-609, 2004.

BARATI, M. et al. Bacterial infections in children with visceral leishmaniasis: observations made in Kerman province, southern Iran, between 1997 and 2007. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 102, n. 7, p. 635-641, 2008.

BARTHELEMY, Adeline et al. Exogenous activation of invariant natural killer T cells by α -galactosylceramide reduces pneumococcal outgrowth and dissemination postinfluenza. **MBio**, v. 7, n. 6, p. e01440-16, 2016.

BELO, Renata et al. *Leishmania infantum* exoproducts inhibit human invariant nKT cell expansion and activation. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 710, 2017.

BENDELAC A, Savage PB, Teyton, L. The biology of NKT cells. **Annu. Rev. Immunol** 25: 297-336, 2007.

BHATTACHARYYA, Sandip et al. Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events. **Infection and immunity**, v. 69, n. 3, p. 1499-1507, 2001.

BOGDAN, C.; Gessener, A.; Solbach, W.; Röllinghoff, M. 1996. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, n. 4, p. 517-525.

BORGES, Bárbara Kellen Antunes et al. Avaliação do nível de conhecimento e de atitudes preventivas da população sobre a leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 4, p. 777-784, 2008.

BORGHI, Sergio M. et al. *Leishmania* infection: painful or painless? **Parasitology research**, v. 116, n. 2, p. 465-475, 2017.

BOTTREL, R. L., W. O. Dutra, F. A. Martins, B. Gontijo, E. Carvalho, M. Barral-Netto, A. Barral, R. P. Almeida, W. Mayrink, R. Locksley, and K. J. Gollob. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.** 69:3232. 2001.

BRASIL. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde. p.120, 2013.

BRASIL. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde. p.120, 2013.

BRASIL. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Ministério da Saúde**. Brasília. 1ª edição, p. 120, 2013.

BRASIL. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Ministério da Saúde**. Brasília, 2ª edição, p. 180, 2007.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da *Leishmaniose* Tegumentar Americana / *Ministério da Saúde*, Secretaria de Vigilância em. Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília: Editora do *Ministério da Saúde*, 2010. 180 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRAZ, Regina FS et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 67, n. 4, p. 344-348, 2002.

BRENNAN PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. **Nat. Rev. Immunol.**13(2):101-17, 2013.

BRENNAN, Patrick J.; BRIGL, Manfred; BRENNER, Michael B. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 2, p. 101, 2013.

BURNS, James M. et al. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 2, p. 775-779, 1993.

CALDAS, Arlene et al. Balance of IL-10 and interferon- γ plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC infectious diseases**, v. 5, n. 1, p. 1, 2005.

CARVALHO, Fernando AA et al. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 43, n. 4, p. 289-295, 2002.

CHAGAS, E. et al. Leishmaniose Visceral Americana (Nova entidade morbida do homem na America do Sul): relatório dos trabalhos realizados pela comissão

encaregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 32, n. 3, p. 321-389, 1937.

CHANG, Kwang-Poo et al. Leishmania model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. **Acta Tropica**, v. 85, n. 3, p. 375-390, 2003.

CONVIT, JACINTO; REYES, OSCAR; KERDEL, FRANCISCO. Disseminated Anergic American Leishmaniasis: Report of Three Cases of a Type Clinically Resembling Lepromatous Leprosy. **AMA archives of dermatology**, v. 76, n. 2, p. 213-217, 1957.

COOMBS, G.H.; CRAFT, J.A.; HART, D.T. A comparative study of *Leishmania mexicana* amastigotes and Promastigotes. Enzyme activities and subcellular locations. **Molecular and Biochemical Parasitology**. V. 5, p.199-211, 1982.

COSTA, Carlos Henrique N.; PEREIRA, Humberto F.; ARAÚJO, Maurílio V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, p. 361-372, 1990.

COX, Francis EG. The Golden Age of parasitology-1875–1925: the Scottish contributions. **Parasitology**, v. 144, n. 12, p. 1567-1581, 2017.

COX, Francis EG. Glasgow encounters with tropical diseases. **Parasitology**, v. 144, n. 12, p. 1561-1566, 2017.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. **Leishmania chagasi**, p. 3-9, 1937.

DA SILVA, José Nivon. ESTUDO DO TESTE RÁPIDO IMUNOENZIMÁTICO. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Ceará, 2004.

DA SILVA, Mauro Roberto Biá et al. Performance of two immunochromatographic tests for diagnosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with HIV. **Parasitology Research**, v. 117, n. 2, p. 419-427, 2018.

DARMSTADT, G. L.; LANE, A. T.; TUNNESSEN JR, W. W. Picture of the month. Cutaneous leishmaniasis. **American journal of diseases of children (1960)**, v. 147, n. 12, p. 1339, 1993.

DAVID, Consuelo V.; CRAFT, Noah. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic therapy**, v. 22, n. 6, p. 491-502, 2009.

DE FREITAS, Elisangela Oliveira et al. The contribution of immune evasive mechanisms to parasite persistence in Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 7, 2016.

DE OLIVEIRA, Janaina Michelle et al. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, p. 188-193, 2010.

DEANE LM. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Serviço Nacional de Educação Sanitária**. Rio de Janeiro; 1956.

DETILIO, Bianca Almeida Natali dos Santos. **Caracterização das células T Natural Killer de células mononucleares de sangue periférico em indivíduos de diferentes continentes**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DIAS, B. R. S. Vacúolos parasitóforos induzidos por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania major* interagem de forma distinta com a via autofágica. 2014. 115 f. **Dissertação** (Mestrado Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

DIAS, Daniel S. et al. Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved *Leishmania* hypothetical protein. **Parasitology international**, 2018.

DOMINGUEZ, Omar Ariel Espinosa. **Diversidade, taxonomia e filogenia de tripanossomatídeos da subfamília Leishmaniinae**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DONOVAN, C. (1903). On the possible occurrence of trypanosomiasis in India. **British Medical Journal** 2, 79.

DUJARDIN JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. **Emerg Infect Dis**. 2008;14(7):1013–8. pmid:18598618

DUPAGE, Michel; BLUESTONE, Jeffrey A. Harnessing the plasticity of CD4+ T cells to treat immune-mediated disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 3, p. 149, 2016.

EL JERI, H. Kaaroud et al. Visceral leishmaniasis in adults with nephropathy. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, v. 28, n. 1, p. 95, 2017.

ELMAHALLAWY, Ehab Kotb et al. Diagnosis of leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 08, p. 961-972, 2014.

FIOCRUZ. Histório das Pesquisas. [2010]. Disponível em: <
<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/histor.html>> Acesso em: 16 fev. 2018.

FLORENCE, William C.; BHAT, Rakesh K.; JOYCE, Sebastian. CD1d-restricted glycolipid antigens: presentation principles, recognition logic and functional consequences. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 10, 2008.

FRAGA, J.; MONTALVO, A. M.; DONCKER, S.; DUJARDIN, J.; AUWERA, G. V. Phylogeny of *Leishmania* species based on heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 238-245, 2010.

GANNAVARAM, Sreenivas et al. Modulation of innate immune mechanisms to enhance Leishmania vaccine-induced immunity: role of coinhibitory molecules. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 187, 2016.

GAO, Q. et al. Clinical analysis of 137 patients with visceral leishmaniasis. **Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi= Chinese journal of parasitology & parasitic diseases**, v. 31, n. 2, p. 135-137, 2013.

GAUTAM, Shalini 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.

GHALIB, Hashim W. et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human Leishmania donovani infections. **The Journal of clinical investigation**, v. 92, n. 1, p. 324-329, 1993.

GHARAGOZLOO, M. et al. Decline in peripheral blood NKG2D+ CD3+ CD56+ NKT cells in metastatic colorectal cancer patients. **Bratislavske lekarske listy**, v. 119, n. 1, p. 6-11, 2018.

GHOSH, Kuntal et al. Successful therapy of visceral leishmaniasis with curdlan involves T-helper 17 cytokines. **The Journal of infectious diseases**, v. 207, n. 6, p. 1016-1025, 2012.

GLUENZ, Eva; GINGER, Michael L.; MCKEAN, Paul G. Flagellum assembly and function during the Leishmania life cycle. **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 4, p. 473-479, 2010.

GODFREY, Dale I. et al. NKT cells: what's in a name?. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 231, 2004.

GOLLOB, K. J.; VIANA, A. G.; DUTRA, W. O. Immunoregulation in Human American Leishmaniasis: Balancing Pathology and Protection. **Parasite Immunol**, v. 36, p.367–376, 2014.

GOMES, Nitza A. et al. Unresponsive CD4+ T Lymphocytes from Leishmania chagasi—Infected Mice Increase Cytokine Production and Mediate Parasite Killing after Blockade of B7-1/CTLA-4 Molecular Pathway. **The Journal of infectious diseases**, v. 178, n. 6, p. 1847-1851, 1998.

GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338-349, 2004.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 615-623, 2004.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infect Dis Clin.** n. 26, p. 293-307, 2012.

GOTO, Hiro; PRIANTI, Maria das Graças. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 241-246, 2009.

GRATZ, Iris K.; CAMPBELL, Daniel J. Organ-specific and memory treg cells: specificity, development, function, and maintenance. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 333, 2014.

GRIMALDI, Gabriel; SCHOTTELIUS, Justus. Leishmaniasis—Their relationships to monoxenous and dixenous trypanosomatids. **Medical microbiology and immunology**, v. 190, n. 1-2, p. 3-8, 2001.

GUIMARÃES-E-SILVA, Antônia Suely et al. Leishmania infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. **PloS one**, v. 12, n. 8, p. e0179052, 2017.

GUPTA, Nitin; KAMLA, K. A. N. T.; MIRDHA, Bijay Ranjan. Clinical and Laboratory Analysis of Patients with Leishmaniasis: A Retrospective Study from a Tertiary Care Center in New Delhi. **Iranian journal of parasitology**, v. 12, n. 4, p. 632, 2017.

HAN, Ling et al. Phenotypical analysis of ectoenzymes CD39/CD73 and adenosine receptor 2A in CD4⁺ CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T-cells in psoriasis. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 59, n. 1, 2018.

HANDLER, Marc Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911-926, 2015.

HASKO, G., Linden, J., Cronstein, B. & Pacher, P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 7(9), 759-70, 2008.

HSIEH, Chyi-Song et al. Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. **Science**, v. 260, n. 5107, p. 547-549, 1993.

HUANG E, Liu, R, Lu Z, Liu J, Liu X, Zhang D, Chu Y. NKT cells mediate the recruitment of neutrophils by stimulating epithelial chemokine secretion during colitis. **Biochem Biophys Res Commun.** 474(2): 252-258,2016.

JACOBS, Joannes FM et al. Regulatory T cells and the PD-L1/PD-1 pathway mediate immune suppression in malignant human brain tumors. **Neuro-oncology**, v. 11, n. 4, p. 394-402, 2009.

JAIN, Keerti; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **Journal of immunological methods**, v. 422, p. 1-12, 2015.

JIN W, Dog C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. **Emerg Microbes Infect.** 2(9): e60, 2013.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?. **Trends Parasitol**, v. 22, p. 439-445, 2006.

KATO, H.; GOMEZ, E. A.; CÁCERES, A. G.; UEZATO, H. MIMORI, T.; HASHIGUCHI, Y. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 814-826, 2010.

KAUFER, Alexa et al. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 287, 2017.

KEESEN, T. S. L. et al. CD4+ T cells defined by their V β T cell receptor expression are associated with immunoregulatory profiles and lesion size in human leishmaniasis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 165, n. 3, p. 338-351, 2011.

KEMP, K. et al. Leishmania-specific T cells expressing interferon-gamma (IFN- γ) and IL-10 upon activation are expanded in individuals cured of visceral leishmaniasis. **Clinical and experimental immunology**, v. 116, n. 3, p. 500, 1999.

KEVRIC, Ines; CAPPEL, Mark A.; KEELING, James H. New world and old world Leishmania infections: a practical review. **Dermatologic clinics**, v. 33, n. 3, p. 579-593, 2015.

KHALIL, E. A. G. et al. Dichotomy of protective cellular immune responses to human visceral leishmaniasis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 140, n. 2, p. 349-353, 2005

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and veterinary entomology**, v. 4, n. 1, p. 1-24, 1990.

KORN T, Bettell E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. **Annual review of immunology**. 27:485-517, 2009.

KRAEVA, Natalya et al. Catalase in Leishmaniinae: With me or against me?. **Infection, Genetics and Evolution**, 2016.

KRUMMEL, M. F; ALLISON, J. P. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. **J. Exp. Med.** 183, 2533, 1996..

LAINSON, Ralph; RANGEL, Elizabeth F. Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **British Medical Journal**. I, 1252 – 1254, 1903.

LEMOS, Elenice Moreira et al. Avaliação do teste rápido utilizando o antígeno recombinante K39 no diagnóstico da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 36-38, 2003.

LIEKE, Thorsten et al. The interplay between Leishmania promastigotes and human Natural Killer cells in vitro leads to direct lysis of Leishmania by NK cells and modulation of NK cell activity by Leishmania promastigotes. **Parasitology**, v. 138, n. 14, p. 1898-1909, 2011.

LIESE, Jan; SCHLEICHER, Ulrike; BOGDAN, Christian. The innate immune response against Leishmania parasites. **Immunobiology**, v. 213, n. 3-4, p. 377-387, 2008.

LIEW, F. Y. Regulation of nitric oxide synthesis in infectious and autoimmune diseases. **Immunology letters**, v. 43, n. 1-2, p. 95-98, 1994.

LINDOSO, J. A. L.; Lindoso, A. A. B. P. Neglected Tropical Diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009.

LIU, Limin et al. Testosterone attenuates p38 MAPK pathway during Leishmania donovani infection of macrophages. **Parasitology research**, v. 99, n. 2, p. 189-193, 2006.

LUKES, Julius et al. Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 22, p. 9375-9380, 2007.

LUNDQVIST, Andreas et al. Mature dendritic cells induce tumor-specific type 1 regulatory T cells. **Journal of Immunotherapy**, v. 28, n. 3, p. 229-235, 2005.

MAIZELS, Rick M.; SMITH, Katherine A. Regulatory T cells in infection. **Adv Immunol**, v. 112, p. 73-136, 2011.

MARCILI, Arlei et al. Phylogenetic relationships of Leishmania species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of Leishmania (L.) infantum chagasi in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 25, p. 44-51, 2014.

MARRA, Francesca; CHIAPPETTA, Maria Celeste; VINCENTI, Vincenzo. Ear, nose and throat manifestations of mucocutaneous Leishmaniasis: a literature review. **Acta Bio Medica Atenei Parmensis**, v. 85, n. 1, p. 3-7, 2014.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of Leishmania chagasi. **Parasitology today**, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2013.

MELO, Karina Mescouto; CARVALHO, Beatriz Tavares Costa. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. **Rev Bras Alergia Immunopatol**, v. 32, n. 5, p. 184-8, 2009.

MENDONCA, S. C. F.; RUSSELL, D. G.; COUTINHO, S. G. Analysis of the human T cell responsiveness to purified antigens of *Leishmania*: lipophosphoglycan (LPG) and glycoprotein 63 (gp 63). **Clinical & Experimental Immunology**, v. 83, n. 3, p. 472-478, 1991.

MIHAYLOVA, Ivana et al. Decreased expression of CD69 in chronic fatigue syndrome in relation to inflammatory markers: evidence for a severe disorder in the early activation of T lymphocytes and natural killer cells. **Neuro endocrinology letters**, v. 28, n. 4, p. 477-483, 2007.

MORICONI, Martina et al. Phlebotomine sand fly–borne pathogens in the Mediterranean Basin: Human leishmaniasis and phlebovirus infections. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 8, p. e0005660, 2017.

MURPHY, Michaela L. et al. Blockade of CTLA-4 enhances host resistance to the intracellular pathogen, *Leishmania donovani*. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 8, p. 4153-4160, 1998.

NASCIMENTO, Manuela Sales Lima et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against *Leishmania infantum* infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 6, p. 1015-1026, 2015.

NYLÉN, Susanne et al. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4⁺ CD25⁺ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 4, p. 805-817, 2007.

NYLÉN, Susanne; SACKS, David. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in immunology**, v. 28, n. 9, p. 378-384, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Disponível em: <http://www.who.int/tdr/disease/leish/diseaseinfo.html>. Acesso em: 24 fev. de 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Disponível em: <http://www.who.int/tdr/disease/leish/diseaseinfo.html>. Acesso em: 30 Jan. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Disponível em: <http://www.who.int/tdr/disease/leish/diseaseinfo.html>. Acesso em 11 fev. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Leishmaniasis. About leishmaniasis. 2013. Disponível em: < http://www.who.int/leishmaniasis/about_disease/en/ >. Acesso: 10 fevereiro 2018.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (PAHO). Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas. **Informe de Leishmanioses**. Nº 5. 2017.

OWENS, Benjamin MJ et al. IL-10-producing Th1 cells and disease progression are regulated by distinct CD11c⁺ cell populations during visceral leishmaniasis. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 7, p. e1002827, 2012.

OYAMA, Jully et al. American tegumentary leishmaniasis: diagnostic and treatment challenges in a clinical case. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, 2018.

PAES, Neir Antunes; SILVA, Lenine Angelo A. Doenças infecciosas e parasitárias no Brasil: uma década de transição. 1999.

PENNA HA. Leishmaniose visceral no Brasil. **Bras Méd**, 1934; 48: 949-50.

PEREIRA SILVA, Ana Elisa; COSTA GURGEL, Helen da. Leishmaniose tegumentar americana e suas relações sócio ambientais no município de Ubatuba-SP. **Confins. Revue franco-brésilienne de géographie/Revista franco-brasilera de geografia**, n. 13, 2011.

PITTA, Maira GR et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 8, p. 2379-2387, 2009.

RAFATI S, Modabber F. History of Cutaneous Leishmaniasis. In: Mc- Dowell MA, Rafati S, eds. **Neglected Tropical Diseases** -Middle East and North Africa. Berlin, Germany: Springer. 118 – 120, 2014.

RAI, Ambak Kumar et al. Early activated Th-1 type and dominantly diverse natural killer T (CD3⁺ CD161⁺ V α 24⁻) cells in bone marrow among visceral leishmaniasis patients. **International journal for parasitology**, v. 41, n. 10, p. 1069-1077, 2011.

RANGEL, Elizabeth F.; VILELA, Maurício L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2948-2952, 2008.

RAYMOND, Russell W.; MCHUGH, Chad P.; KERR, Sara F. Sand flies of Nicaragua: a checklist and reports of new collections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 889-894, 2010.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–96, 2007.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 143-148, 1998.

ROSENBLUM, Michael D.; WAY, Sing Sing; ABBAS, Abul K. Regulatory T cell memory. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 2, p. 90, 2016.

ROGERS, Leonard. Note on the Occurrence of Leishman-Donovan Bodies in "Cachexial Fevers," Including Kala-Azar. **British Medical Journal**, v. 1, n. 2265, p. 1249, 1904.

ROMERO, Gustavo AS; BOELAERT, Marleen. Control of visceral leishmaniasis in Latin America—a systematic review. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 1, p. e584, 2010.

ROSS, R. (1903). Notes on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal** ii, 1261.

RUDD, C.E., TAYLOR, A., e SCHNEIDER, H. CD28 and CTLA-4 core captor expression and signal transduction. **Immunol.Rev.** v.229, p.12–26, 2009.

SACKS, David; NOBEN-TRAUTH, Nancy. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002.

SAG, Duygu et al. IL-10–producing NKT10 cells are a distinct regulatory invariant NKT cell subset. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 9, p. 3725-3740, 2014.

SANCHEZ, Ana M. et al. The development and function of memory regulatory T cells after acute viral infections. **The Journal of immunology**, v. 189, n. 6, p. 2805-2814, 2012.

SEDDIKI, Nabila et al. Persistence of naive CD45RA⁺ regulatory T cells in adult life. **Blood**, v. 107, n. 7, p. 2830-2838, 2006.

SEHEE, Jeong D, Ahn, S, Oh, SJ, Ahn J Y, Lee S H, Chung D H. GM-CSF and IL-4 produced by NKT cells inversely regulate IL-1 β production by macrophages. **Immunol Lett.** 182: 50-56, 2017.

SERAPHIM, Luana; ALVISI, Fabricia; LIMA, PRISCILA. Sociedade Brasileira de Imunologia. **Nucleotidases/Adenosina e o estabelecimento da infecção por Leishmania sp.** 2012. Disponível em: < <http://sbi.org.br/nucleotidasesadenosina-e-o> >. Acesso: 08 Abr 2018.

SHARMA, Umakant; SINGH, Sarman. Immunobiology of leishmaniasis. 2009

SHIMABUKURO, Paloma Helena Fernandes; DE ANDRADE, Andrey José; GALATI, Eunice Aparecida Bianchi. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. **ZooKeys**, n. 660, p. 67, 2017.

SILVEIRA, F. T.; MÜLLER, S. R.; DE SOUZA, A. A. A.; LAISON, R.; GOMES, C. M.C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. *Revista Paraense de Medicina*, v. 22, p. 9-19, 2008.

SILVA, Ana Elisa Pereira; GURGEL, Helen da Costa. Leishmaniose tegumentar americana e suas relações sócio ambientais no município de Ubatuba-SP. 2013.

SIMPSON, Michael H.; MULLINS, J. F.; STONE, O. J. Disseminated anergic cutaneous leishmaniasis. **Arch Dermatol**, v. 97, p. 301-303, 1968.

SINGH, K.; GARG, G.; VAHAB, A. Current Therapeutics, Their Problems and Thiol Metabolism as Potential Drug Targets in Leishmaniasis. **Current Drug Metabolism**, v.17, 1-23, 2016.

SITKOVSKY, M. et al. Adenosine A2A receptor antagonists: blockade of adenosinergic effects and T regulatory cells. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. S1, 2008.

SMALL, Eric J. et al. A pilot trial of CTLA-4 blockade with human anti-CTLA-4 in patients with hormone-refractory prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 6, p. 1810-1815, 2007.

SOUZA, Nataly A.; BRAZIL, Reginaldo P.; ARAKI, Alejandra S. The current status of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species complex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 161-174, 2017.

STANLEY AC, Zhou Y, Amante FH, Randall LM, Haque A, Pellicci DG, et al. Activation of invariant NKT cells exacerbates experimental visceral leishmaniasis. **PLoS Pathog**. 4: e1000028, 2008.

STRAZZULLA, Alessio et al. Mucosal leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

SUNDAR, Shyam; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

TIWANANTHAGORN, Saruda et al. Involvement of CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in persistence of *Leishmania donovani* in the liver of alymphoplastic aly/aly mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 8, p. e1798, 2012.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, 2017.

TRIPATHI, P.; Singh, V.; Naik, S. Immune response to *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 229-242, 2007.

TURETZ ML, Machado PR, Ko AI, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and

emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **J Infect Dis.** 186:1829–34, 2002.

VALMORI, Danila et al. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4+ Tregs. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 7, p. 1953-1962, 2005.

VAN GRIENSVEN, Johan; DIRO, Ermias. Visceral leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics**, v. 26, n. 2, p. 309-322, 2012.

VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 297-318, 2002.

VANZELI, Antonio Carlos; KANAMURA, Hermínia Yohko. Estudo de fatores socioambientais associados à ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no município de Ubatuba, SP, Brasil. **Rev. panam. infectol**, v. 9, n. 3, p. 20-25, 2007.

VENKEN, Koen et al. Natural naive CD4+ CD25+ CD127^{low} regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 6411-6420, 2008.

VIANA, Graça Maria de Castro et al. Epidemiological profile of patients co-infected with visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Northeast, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 613-620, 2017.

VIGNALI, Dario AA; COLLISON, Lauren W.; WORKMAN, Creg J. How regulatory T cells work. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 7, p. 523, 2008.

VINAYAK, V. K. et al. Anti-66 kDa antileishmanial antibodies as specific immunodiagnostic probe for visceral leishmaniasis. **The Indian journal of medical research**, v. 99, p. 109-114, 1994.

WANDERLEY, J. L. M.; COSTA, J. F.; BORGES, V. M.; BARCINSKI, M. Subversion of immunity by *Leishmania amazonensis* parasites: possible role of phosphatidylserine as a main regulator. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

WEIGLE KA, de DAVALOS M, HEREDIA P, et al. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. **Am J Trop Med Hyg.** 36:489–96, 1987.

WERNECK, Guilherme L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil:[editorial]. **Cad. saúde pública**, v. 26, n. 4, p. 644-645, 2010.

WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. 2017a. Disponível em:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em: fevereiro de 2018.

WORKMAN, Creg J. et al. The development and function of regulatory T cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 16, p. 2603, 2009.

WILLYARD, C. Neglected diseases see few new drugs despite upped investment. *Nature Medicine*, v. 19, p. 2-10, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Control of the leishmaniases. Report of a WHO Expert Committee**. WHO, 1990.

WRIGHT, E. P. et al. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA-immunofluorescence and indirect haemagglutination. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 2, p. 271-274, 1986.

YANG J, Zou Y, Singh RR. Effects of Invariant NKT Cells on Parasite Infections and Hygiene Hypothesis. **J Immunol Res**.2016: 2395645, 2016.

ZIJLSTRA, E. E. et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 3, n. 2, p. 87-98, 2003.

ANEXOS

10. ANEXOS

ANEXO I - Parecer de aprovação emitido pelo Cômite de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley – UFPB.

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
LAURO WANDERLEY/UFPB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Leishmaniose Visceral Humana: Estudo de marcadores imunológicos e sua importância no prognóstico de doença sintomática e assintomática

Pesquisador: Tatjana Keesen de Souza Lima

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17813013.8.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 404.854

Data da Relatoria: 24/09/2013

Apresentação do Projeto:

A leishmaniose visceral é uma doença endêmica na região do nordeste incluindo o estado da Paraíba e possui um forte impacto na população. O modelo epidemiológico deixou de ser totalmente rural e esta doença se tornou prevalente também em zonas urbanas e peri-urbanas. O projeto de pesquisa tem como proposta estudar a leishmaniose que é uma doença infecciosa causada por várias espécies de protozoários do gênero Leishmania.

Serão selecionados 3 grupos de indivíduos: 1) com leishmaniose visceral com sintomatologia e 2) indivíduos assintomáticos, com sorologia positiva e sem sintomatologia clínica, além de 3) indivíduos com sorologia negativa e com nenhuma sintomatologia. Os pacientes com leishmaniose visceral serão provenientes de áreas endêmicas da Paraíba. O diagnóstico da doença será baseado em achados clínicos e testes laboratoriais, padrão utilizados nos centros de referência, incluindo demonstração parasitológica e presença de anticorpos anti-leishmania. Os indivíduos não infectados e assintomáticos serão selecionados de acordo com uma anamnese detalhada e exames sorológicos. Todos os indivíduos que contribuirão para a realização deste trabalho participarão voluntariamente da pesquisa, sendo esclarecidos sobre a importância do trabalho e assinarão o termo de consentimento esclarecido (TCLE). Após

Endereço: HULW-4º andar - Campus I - UFPB

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.059-900

UF: PB

Município:

Telefone: (833)216--7302

Fax: (833)216--7522

E-mail: iaponiracortez@yahoo.com.br; cephulw@hotmail.

ANEXO II – Questionário aplicado durante anamnese dos voluntários da pesquisa.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**



QUESTIONÁRIO

Projeto: Análise da Modulação Imunológica por Células T Reguladoras e Células iNKT na Leishmaniose Visceral Humana.

Pesquisadora: Rephany Fonseca Peixoto

IDENTIFICAÇÃO

DATA: ____/____/____

Nome:

Endereço:

Cidade:

Telefone:

Sexo:

Bairro:

País:

Data de nascimento:

Naturalidade:

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Tipo de residência:

Profissão:

Escolaridade:

Algum caso de leishmaniose na família:

Algum caso de leishmaniose na vizinhança:

Possui cães:

Algum caso de calazar em cães:

Algum caso de calazar no bairro:

Teve algum contato com pessoas com leishmaniose:

QUEIXAS

Febre Alta:

Anorexia:

Fadiga:

Palidez:

Dor abdominal:

Astenia:

Tontura:

Perda de Peso:

Outros:

MEDICAMENTO

Uso de algum medicamento de uso crônico?

Quais: _____

DADOS ANTROPOMÉTRICOS

Peso:

Altura:

Circunferência Abdominal:

OBSERVAÇÕES:

|

Responsável pela coleta de dados

ANEXO III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: *Leishmaniose Visceral Humana: Estudo de marcadores imunológicos e sua importância no prognóstico de doença sintomática e assintomática*

Pesquisadora: Tatjana Keesen de Souza Lima

I. Esclarecimentos

Estamos convidando você para participar como voluntário de uma pesquisa sobre calazar ou leishmaniose visceral. Com essa pesquisa nós queremos aprender porque somente algumas pessoas que se contaminam com o germe causador das leishmanioses desenvolvem a doença, enquanto a maioria das pessoas contaminadas não fica doente. Para isto, vamos realizar um estudo imunológico e genético, que é um estudo que usa DNA e outros componentes do sangue. DNA é uma substância encontrada dentro das nossas células, herdada de nossos pais e transmitidas por nós aos nossos filhos. Iremos estudar partes do DNA que na linguagem científica se chama de genes, que estão relacionados com a capacidade (sensibilidade) ou não (resistência) de não desenvolver doenças. Estudaremos também moléculas que estão presentes em determinadas células do sangue e isso poderá nos mostrar se existe diferença entre a pessoa doente e aquela pessoa que não adoece.

Caso você aceite em participar do estudo você fará uma consulta médica e deverá permitir a realização de testes na sua pele e coleta de sangue. Além disto, você deverá autorizar que nós façamos uma revisão no seu prontuário médico, para que possamos coletar informações sobre a sua doença atual e os resultados dos exames realizados. Pedimos a permissão para usar parte do material aspirado da sua medula óssea. Este último exame só será realizado para esclarecimento do diagnóstico da sua doença. Você também deverá responder um questionário a respeito da sua saúde. Quando você estiver respondendo esse questionário se alguma pergunta lhe causar constrangimento você poderá deixar de respondê-la.

Vamos a seguir, explicar a você para que usaremos cada material coletado e os riscos e desconforto que poderão existir.

Coleta de sangue- Serão coletados por uma pessoa treinada aproximadamente 20 ml de sangue, usando-se material estéril e descartável. Os riscos e desconfortos que você correrá nessa coleta são mínimos e poderá ser desmaio, sangramentos, manchas arroxeadas ou infecção no local da coleta. Iremos minimizar este risco com cuidados na realização deste procedimento, que são a limpeza no local da coleta usando-se álcool e pressionando o local de coleta por alguns minutos, depois da retirada da agulha. Com o sangue iremos realizar um hemograma, ou seja, exame das células do seu sangue, para determinar se você tem anemia. Das células do sangue, iremos isolar o seu DNA e fazer estudo das populações diferentes de células que existem no seu sangue, determinando marcadores importantes na sua doença, para estudar seu sistema de defesa (sistema imune).

Os dois testes que você fará na pele chamam-se teste de Montenegro para verificar se você foi contaminado pelo germe da leishmaniose e o teste tuberculínico para verificar se você foi

contaminado com o germe que causa tuberculose. Não há riscos previstos já que eles serão realizados por pessoas treinadas. Você poderá sentir um pouco de dor e poderá ocorrer endurecimento no local do teste. Caso esta reação seja desconfortável, iremos prescrever um creme para uso local. Importante que você não use nenhum tipo de medicamento no local do teste. Esses dois testes não podem ser realizados com frequência, podendo ser realizado, geralmente com um ano de intervalo.

Todos os materiais biológicos utilizados neste trabalho (sangue periférico e sangue da medula óssea) serão utilizados somente para pesquisa.

Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade.

Os benefícios da sua participação nesta pesquisa é que você será informado do resultado do teste para calazar, que iremos realizar com a amostra do sangue coletado. Você também irá facilitar a busca pela melhoria dos estudos na pesquisa da leishmaniose, podendo no futuro contribuir com informações que poderão ser utilizadas na busca da melhoria no tratamento da doença e/ou da cura.

Garantimos que todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários. Caso você tenha interesse nos resultados da pesquisa basta solicitar ao pesquisador responsável.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária, você não será pago por participar do estudo. No entanto, caso você tenha algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, e se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito à indenização.

Você ficará com uma cópia deste documento e toda dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá entrar em contato com a Dr^a Tatjana Keesen de Souza Lima, no Centro de Biotecnologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária- João Pessoa - PB - Brasil - CEP: 58051-900 Fone: (83) 3216-7173.

Dúvidas a respeito de questões éticas desta pesquisa poderão ser esclarecidas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFPB do hospital universitário Lauro Wanderley (CEP/HULW)- Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW- 4º andar. Campus I-Cidade Universitária-Bairro: Castelo Branco-CEP:58059-900-João Pessoa-PB- FAX (083) 32167522- CNPJ:24098477/007-05- Telefone: (083) 32167964- E-mail:comitedeetica@hulw.ufpb.br.

Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será desenvolvida, os riscos e benefícios envolvidos, bem como os meus direitos, e concordo em participar voluntariamente do estudo "***Leishmaniose Visceral Humana: Estudo de marcadores imunológicos e sua importância no prognóstico de doença sintomática e assintomática***" autorizando o uso do meu sangue para a realização deste estudo.

Participante da pesquisa:

_____ data ____/____/____

Voluntário:

_____ data ____/____/____

Pesquisador

11.APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo relacionado a dissertação aceito na revista *Scandinavian Journal of Immunology* (Fator de impacto: 2,256);

APÊNDICE B - Artigo não relacionado a dissertação, publicado na revista da Sociedade Brasileira de Medicina (Fator de impacto: 1,161);

APÊNDICE C – Artigo não relacionado a dissertação, publicado na revista *Lancet Infectious Diseases* (Fator de impacto: 19,864);

APÊNDICE D – Premiação *Travel award* para apresentação dos resultados da dissertação no XLII Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia.

APÊNDICE A

Received: 7 February 2018 | Accepted: 19 April 2018

DOI: 10.1111/ajl.12668

HUMAN IMMUNOLOGY

WILEY **Immunology**

Dual immune effect of iNKT cells considering human cutaneous and visceral leishmaniasis: An example of cell plasticity according to different disease scenarios

B. M. Gois¹ | R. F. Peixoto¹ | B. L. L. Maciel² | J. A. S. Gomes³ |
F. L. A. A. de Azevedo⁴ | R. C. Veras⁴ | L. A. de Medeiros⁴ | T. C. S. de Lima Gris⁵ |
D. A. M. de Araújo⁵ | L. P. G. do Amaral¹ | T. S. L. Keesen¹ 

¹Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

²Department of Nutrition, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil

³Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁴Research Institute for Drugs and Medicines, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁵Department of Biotechnology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

Correspondence

T. Keesen de Souza Lima, Laboratory of Immunology of Infectious Diseases of the Biotechnology Center of the Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil.
Email: tat.keesen@ciotec.ufpb.br

Abstract

Although the semi-invariant natural killer T cells (iNKT) are a small subpopulation of cells in the peripheral blood, they are presumed to play a role in early stages of infection against various pathogens, including protozoa. This work investigates the activation status and cytokine profile of iNKT cells during human *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* infection. We studied iNKT cells in patients with symptomatic active visceral leishmaniasis (AVL) ($n = 8$), patients with symptomatic active cutaneous leishmaniasis (ACL) ($n = 13$), negative endemic controls (NEC) ($n = 6$) and non-endemic controls (NonEC) ($n = 6$), with and without total *Leishmania* antigen stimulus (TLA). The number of iNKT cells in the peripheral blood of patients with ACL and AVL unaltered in relation to control groups. Moreover, the iNKT cells from ACL showed a hyperactivation profile compared to patients with AVL. Additionally, TLA induced IFN- γ production in iNKT cells from patients with ACL, while in iNKT of patients with AVL, TLA induced a decrease in this cytokine. Higher IL-17 and IL-10 production by iNKT cells from patients with ACL were also observed compared to all other groups. There were no changes in iNKT IL-10-producing cells in AVL after TLA stimulation. However, TLA induced increase in IL-10 in iNKT cells in patients with ACL. These findings suggest that, although iNKT cells showed distinct profiles in patients with ACL and AVL, they play a dual role in immune modulation in both *Leishmania* infections.

1 | INTRODUCTION

NKT cells constitute a subpopulation of T cells that recognize glycolipids antigens presented by CD1d molecules.¹ Semi-invariant NKT (iNKT) cells are a major subset of those cells and they are effector cells, sharing

features with other conventional T lymphocytes.² They are unique in the response to infections because of their rapid release of IL-4, IFN- γ and TNF- α ^{3,4} and because they share features not only with Th1 and Th2 cells but also with Th17 cells.⁵⁻⁷ Human iNKT cells have been reported in peripheral blood, liver and in the bone marrow. In humans,² iNKT cells express a predominantly invariant TCR V α 24 J α 18 preferentially associated with V β 11.^{1,8}

B. de Gois Maciel and R. F. Peixoto are contributed equally to this work.

The activation of INKT cells by glycolipids can enhance resistance in several infectious diseases models, including viral, bacterial and parasitic infections.^{1,8} A synthetic glycolipid α -GalCer was shown to enhance resistance against *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* infections.^{9,10} The INKT cells are known to recognize endogenous antigens including α - and β -GalCers and glucosylceramides (GlcCers), isoglobotrihexosylceramide (IGb3), ganglioside D3 (GD3), ether-bonded lipids and glycerophospholipids such as phosphatidylinositol (PI), phosphatidylethanolamine (PE) and lyso-PC.¹¹

In the New World, human Active visceral leishmaniasis (AVL) and Active cutaneous leishmaniasis (ACL) are diseases caused by *Leishmania infantum* (*L. infantum*) and *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*), respectively.^{12,13} In CD1d-deficient BALB/c mice, INKT cells are important for the control of *Leishmania donovani* (*L. donovani*) that causes the visceral disease in the Old World.¹⁴ However, other group demonstrated that INKT cells play a minor physiological role in protection against *L. donovani* infection in C57BL/6 mice.¹⁵ INKT cells also have been implicated in protection against the early stages of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* (*L. major*) infection in genetically resistant mouse strains.¹⁶ Researchers, using a wild-type CD57BL/6 (WT) and INKT-deficient (*Jat18-/-*) murine lineages, showed that, while WT mice controlled the infection, the INKT-deficient mice presented higher parasite loads in all time points studied. However, the role of INKT in human VL and CL remains poorly understood,¹⁷ mainly due to controversial data in murine models.

Here, we investigated the functional role of semi-invariant natural killer T cells in active infections of visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. INKT subpopulation from whole blood was analysed *ex vivo* and after total *Leishmania* antigen stimulation in a well-defined group of patients with active visceral (AVL) and active cutaneous (ACL) leishmaniasis and in subjects residing in the VL and CL endemic area and non-endemic area. Our findings suggest new insights into the functional competence of INKT cells among different leishmaniasis caused by distinct species of *Leishmania*, which will lead to a better understanding of their influence during immune responses against these parasites.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Ethics statement

All experiments were performed in compliance with the relevant laws and institutional guidelines and in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from patients and

approved by the Ethics Committee of the Federal University of Paraíba (CAAE: 17813013.8.0000.5183).

2.2 | Study groups

Subjects were enrolled from an open cohort of people residing in a *L. infantum* and *L. braziliensis* endemic area from Paraíba. The NonEC were recruited from an area outside the state north-east of Brazil without report of human and canine leishmaniasis, in the south of Brazil. A total of 33 people were studied and grouped as follows: (1) active VL (AVL): patients with active VL before treatment ($n = 8$); (2) active CL (ACL): patients with active CL before treatment ($n = 13$); (3) negative endemic control (NegEC): subjects that reside in endemic area to both *Leishmania* and that had negative serology for both diseases ($n = 6$); and (4) non-endemic control (NonEC): subjects with no apparent signs of *L. infantum* and/or *L. braziliensis* infection that had negative serology for both diseases and that did not reside in the endemic area for *Leishmania* infection ($n = 6$).

Active VL and CL cases were recruited in Lauro Wanderley University Hospital of Federal University of Paraíba. The negative endemic controls were household contact of a symptomatic VL and/or CL cases. The non-endemic group lived in south Brazilian regions where VL and CL were not endemic. In the negative endemic and non-endemic controls, serology for both *L. infantum* and *L. braziliensis* antigens was negative. Table 1 shows the characteristics of the studied subjects.

2.3 | Total *Leishmania* antigens

Leishmania infantum (MHOM/BR/1974/PP75) (IOC/L0579) and *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) (IOC 566) strains were obtained from Oswaldo Cruz Institution (Fiocruz, Brazil). A frozen preparation of *Leishmania* was thawed, and promastigotes were washed and adjusted to 10^8 promastigotes/mL in phosphate-buffered saline (PBS—Sigma-Aldrich) followed by repeated freeze/

TABLE 1 Age, gender and serology profile of study groups

	Age (y)	Sex (M:F)	Anti- <i>Leishmania</i> antibodies (TLA - <i>L. infantum</i> / <i>L. braziliensis</i>)
NonEC ($n = 6$)	31.2 $\pm$ 9.5	4:2	0/6
NegEC ($n = 6$)	38.7 $\pm$ 11.2	4:2	0/6
AVL patients ($n = 8$)	40.3 $\pm$ 13.9	7:1	8/8
ACL patients ($n = 13$)	23.7 $\pm$ 9.7	11:2	13/13

throw cycles and a final ultrasonication. The samples were stored at -20°C until use.¹⁸

2.4 | Determination of *Leishmania* infection

Two ELISAs using total *Leishmania* antigens (TLA) from *L. infantum* and *L. braziliensis* as source of antigens of *L. infantum* were used. Briefly, wells of ELISA plates (Costar) were coated with 200 ng of TLA. Each serum sample was assayed in triplicate. Each plate included negative control sera from unexposed Brazilians and positive control sera from patients with documented VL or CL. The A_{405} was determined using a reader platter (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). The cut-off was the mean absorbance of negative control sera plus 3 standard deviations. The cut-off values for the antibodies were established from the analysis of 20 blood samples collected from individuals not exposed to the endemic area.

2.5 | Leucocytes separation and Monoclonal antibodies (Mabs)

Whole blood from patients was processed, and leucocytes were obtained by red cells lyses (Red Blood Cells Lyses Solution—BD Biosciences). Cells were washed once in PBS. Leucocytes were used for *ex vivo* and *in vitro* culture analysis. The antibodies used for staining were immunoglobulin HTc, PE and PERCP controls (BD, San Diego, CA, USA), anti-INKT HTc (6B11) (BD, San Diego, CA, USA), anti-CD69 PE (Ebioscience, San Diego, CA, USA), anti-CD8 PEcy5 (Ebioscience, San Diego, CA, USA), anti-CD3 APC (BD, San Diego, CA, USA) and anti-CD4 APCcy7 (Ebioscience, San Diego, CA, USA). The anticytokine antibodies used were PE-labelled anti-IFN- γ , anti-IL-17 and anti-IL-10 (Ebioscience, San Diego, CA, USA).

2.6 | Cell surface and single-cell cytoplasmic cytokine staining

Leucocytes were analysed for their surface markers and intracellular cytokine expression pattern *ex vivo* or after *in vitro* culture. Briefly, leucocytes were freshly isolated from whole blood or cultured for 20 hours with either medium or TLA-containing medium (at $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ final concentration). Brefeldin A ($1\ \text{mg}/\text{mL}$) was added during the last 4 hours of culture to impair protein secretion, allowing for cytokine intracellular staining. Cells were then stained for surface markers and fixed using 4% formaldehyde. The fixed cells were permeabilized with saponin and stained for 30 minutes at 4°C , using anticytokine monoclonal antibodies directly conjugated with PE. PE-labelled immunoglobulin control antibodies and a control of

unstimulated leucocytes were included in all experiments. Preparations were washed, fixed and acquired using FACS Canto II (BD, San Diego, CA, USA), selecting the total lymphocyte population. In all cases, the surface molecules and cytokine staining were associated with surface marker of INKT cell for studying the expression of cytokines and the phenotype of the cells that produced them. At least 100 000-gated events were acquired for analysis.

2.7 | Flow cytometry data analysis

INKT cells (CD3+ 6B11+) were analysed for their activation and intracellular cytokine profile and frequencies using the program Flow Jo (Tree Star, Ashland, Oregon, USA). Limits for the quadrant markers were set based on negative populations and isotype controls. Six different fluorochromes were associated for each analysis, for example, anti-INKT HTc subpopulation, anti-X-PE, being X a surface marker or a cytokine, and anti-CD8 APC. In this manner, we first selected the total lymphocyte gate and then the CD8+ cells and, within this subpopulation, we analysed the total INKT⁺ subpopulation (Figure S1), followed by the analysis of surface markers and cytokines within of CD8+ INKT+ cells (Figures S2 and S3).

2.8 | Statistical analysis

Analysis was performed using software GraphPad Prism version 5.0 (San Diego, USA). The following tests were performed: (1) the Mann-Whitney test was run to compare two groups; (2) one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test was run to compare three or more groups. In all cases, significance was considered at $P \leq .05$.

3 | RESULTS

3.1 | Age, gender and serology of the study groups

A total of 33 subjects were evaluated, 8 were active visceral leishmaniasis cases, 13 were active cutaneous leishmaniasis, 6 were negative endemic controls, and 6 were non-endemic controls. Mean age of patients with AVL was 40.3 ± 13.9 years, patients with ACL patients 23.7 ± 9.7 years, negative endemic control was 38.7 ± 11.2 years, and negative controls was 31.2 ± 9.5 years. There were no statistic differences in age among the study groups. However, in patients with AVL and ACL, a higher infection rate was observed for male compared to female patients. With respect to anti-*Leishmania* antigens (TLA), the negative groups did not present positivity for either antigens of *L. infantum* and *L. braziliensis*. Lastly, in VL group, all patients were positive for *L. infantum* antibodies (TLA),

and in CL, group all patients were positive for TLA of *L. braziliensis*. Table 1 summarizes these findings.

3.2 | Ex Vivo Number and activation pattern of iNKT in *L. infantum* and *L. braziliensis* infections

We observed the mean of ex vivo number of iNKT cells from non-endemic controls (mean 6.08 ± 2.41), negative endemic controls (mean 6.49 ± 2.1), patients with AVL (mean 7.93 ± 3.60) and patients with ACL (mean 5.88 ± 1.81) and compared these groups (Figure 1A). The number of iNKT cells in the peripheral blood of patients with ACL and AVL was altered in relation to control groups (Figure 1A).

It was also observed mean of ex vivo frequency of iNKT cells from non-endemic controls (mean 0.87 ± 0.21), negative endemic controls (mean 0.93 ± 0.23), patients with AVL (mean 1.32 ± 0.83) and patients with ACL (Figure 1B). Patients with ACL presented a decreased frequency of iNKT cells compared to patients with AVL ($P = .004$). However, there were no significant differences between the NonEC and NEC groups. Moreover, the iNKT frequency of patients with AVL also did not present differences between a controls groups (Figure 1B).

Patients with ACL presented increased CD69 expression compared with NonEC, NEC and AVL cases in ex vivo

and after in vitro culture (medium and TLA-containing medium) ($P < .0001$) (Table 2). TLA stimulation did not alter CD69 expression in iNKT cells from any of the study groups (Table 2).

3.3 | *L. infantum* TLA induced a decrease in iNKT cells IFN- γ production in patients with AVL, while *L. braziliensis* TLA induced an increase in this cytokine in iNKT cells in patients with ACL

Using flow cytometry to analyse IFN- γ within iNKT subpopulation from whole blood of patients with AVL and ACL before and after TLA stimulation, we found that, after stimulus with *L. infantum* TLA in patients with AVL, iNKT cells decreased IFN- γ production (Figure 2A,B). Furthermore, when we are comparing IFN- γ frequency in iNKT cells between NEC and patients with AVL, our results did not show any differences. However, when comparing IFN- γ production in iNKT cells from NonEC, we observed that this group presented higher IFN- γ expression in iNKT cells than NEC and patients with AVL (Figure 2A).

iNKT cells from patients with ACL had a different behaviour in relation to *L. braziliensis* TLA. In these cells, TLA induced higher frequencies of IFN- γ -producing iNKT cells compared to without stimulation (Figure 2A,C). Interestingly, iNKT from patients with ACL showed the highest IFN- γ production among all groups studied, independently from TLA stimulus (Figure 2A).

3.4 | iNKT cells from patients with ACL produced higher IL-17 and IL-10 cytokines compared to other groups

Our results demonstrate that there was no change in IL-17 produced by iNKT cells after TLA stimulation in all groups (Figure 3A). Nevertheless, we observed that patients with ACL presented a higher frequency of IL-17 production in iNKT cells than NonEC, NEC and AVL groups (Figure 3A).

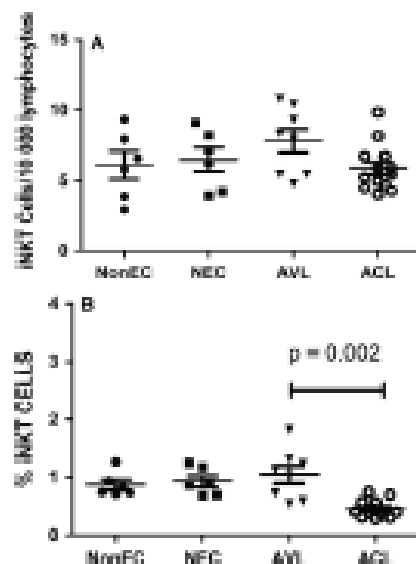


FIGURE 1 Number and frequency of iNKT (CD3+ 6B11+) cells were measured ex vivo for each group. No changes were observed in the number of iNKT cells in the peripheral blood of patients with ACL and AVL in relation to the control groups (A). Higher frequencies ex vivo of iNKT cells are found in AVL cases compared to ACL cases (B)

TABLE 2 Percentage of CD69 expression in iNKT cells

Study Groups	% CD69		
	Ex vivo	Medium	Medium + TLA
Non-endemic control	10.3 $\pm$ 3.5	9.8 $\pm$ 3.3	9.3 $\pm$ 2.9
Negative endemic control	15.9 $\pm$ 15.5	12 $\pm$ 5.6	12.8 $\pm$ 11.2
AVL patients	8.5 $\pm$ 7.8	14.8 $\pm$ 11.5	11.3 $\pm$ 8.5
ACL patient*	80.7 $\pm$ 7.2	80.0 $\pm$ 5.5	92.0 $\pm$ 4.3

Results expressed as mean $\pm$ standard deviation.

*Value significantly higher in CL than all groups ($P < .0001$).

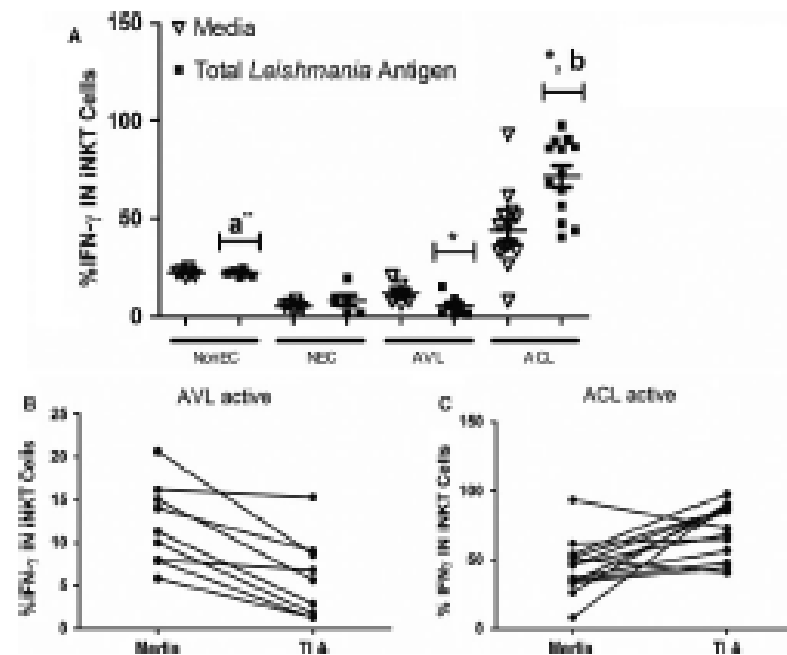


FIGURE 2 Analysis of IFN- γ production in iNKT cells from AVL, ACL, NEC and NonEC groups before and after TLA stimulation. Whole blood cells were maintained in culture without stimulus, as well as with total *Leishmania* antigen. Expression of IFN- γ in iNKT (CD3⁺6B11⁺) from NonEC, NEC, AVL cases and ACL cases (A); comparison of IFN- γ in iNKT cells before and after TLA stimulation in patients with AVL (B); comparison of IFN- γ in iNKT cells before and after TLA stimulation in patients with ACL (C). The bars represent the mean $\pm$ standard error for each group with a *P* value of <0.05 considered significant. (a) represents significant differences between means of NonEC compared to all other groups except for NonEC groups before TLA, and (b) represents significant differences between means of ACL compared to all other groups

Despite TLA stimulation not inducing changes in IL-10 production in NonEC, NEC and patients with AVL, patients with ACL presented higher iNKT IL-10-producing cells stimulated by *L. braziliensis* TLA. Furthermore, NonEC group exhibited higher production of IL-10 in iNKT cells than NEC and patients with AVL. Moreover, iNKT cells from ACL group showed the highest production of IL-10 among all groups, independently of TLA stimulation (Figure 3B).

4 | DISCUSSION

Immunological modulation generated from an infection by species of the genus *Leishmania* promotes activation of different cellular subpopulations, which determines a specific immune response in the host against the pathogen.¹⁹ Among these subpopulations, iNKT are candidates for being able to respond rapidly and contribute to activation of other cell types, playing crucial roles in the early stage of obligate intracellular protozoan infection.^{8,20} Considering the need to understand the events of the immune system in the face of *Leishmania* infections, we investigated iNKT cell mechanisms in active cutaneous (ACL) and visceral

(AVL) leishmaniasis as a key perspective for development of new approaches to immunotherapies.

This study is pioneer in using human leishmaniasis whole blood to evaluate iNKT cells and to compare the production of cytokines and cell activation among patients with ACL and AVL infection. Study groups included non-endemic control and negative endemic control presenting no anti-leishmaniasis antibodies, serving as parameters for immune response in the absence of infection compared to ACL and AVL groups. To ensure homogeneous analysis between groups, mean age of recruited individuals was similar, with no significant statistical differences. Most patients were male, like other study involving leishmaniasis infections, in which peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of 11 men and 1 woman infected with *L. braziliensis* was analysed by flow cytometry.²¹ Besides, the higher proportion of male to female patients was previously demonstrated in *Leishmania* endemic areas.²² Flow cytometry was used to identify iNKT cells stained with mAb 6B11 within CD3⁺ T cells in patients infected by *L. braziliensis* and *L. infantum*, before and after TLA stimulation, and to analyse the iNKT activation and cytokines profile. Previous studies demonstrated the importance of the correct identification of iNKT cells.^{23,24} Researchers

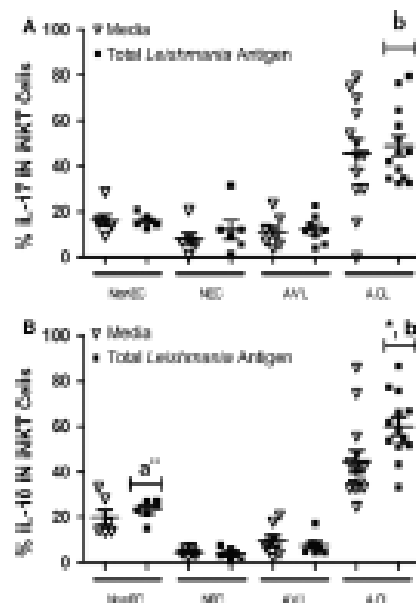


FIGURE 3 Production of IL-17 and IL-10 cytokines from INKT cells in patients with AVL and ACL and NEC and NonEC with or without TLA stimulation. Expression of IL-17 in INKT ($CD8^+6B11^+$) from NonEC, NEC, AVL cases and ACL cases before and after stimulation with TLA (A). Expression of IL-10 in INKT ($CD8^+6B11^+$) from NonEC, NonEC, AVL and ACL cases before and after stimulation with TLA (B). The bars represent the mean $\pm$ standard error for each group with a P value of <0.05 considered significant. (a) represents significant differences between means of NonEC compared to all other groups except for NonEC groups before TLA, and (b) represents significant differences between means of ACL compared to all other groups.

studied INKT cells using distinct markers by flow cytometry, comparing the mAb 6B11 associated with anti-CD8, CD1d-tetramer and Vo24 associated with V β 11 to study INKT and showed that the best characterization of INKT cells was staining with 6B11 mAb, as non-invariant and non-CD1d-restricted T cells can also pair with V β 11 and contribute to the Vo24+ /V β 11 subpopulation,²³ resembling the strategy used in the present study.

Among the studied groups, there were no significant changes in total number of peripheral blood INKT cells of individuals. No study has previously demonstrated the number of circulating INKT cells per lymphocytes of ACL and AVL infected, so our study pioneered this kind of analyses. Despite the maintenance in the number of INKT cells of patients with ACL compared to controls, a hyperactivated profile of these cells was demonstrated when compared to the other study groups.

Moreover, INKT frequency demonstrated higher rates in patients with AVL compared to patients with ACL. Lachal-Naouar et al described low frequencies of INKT in peripheral blood of healed patients with cutaneous leishmaniasis

infected with *L. major*, although our results demonstrate that this reduction is also observed during the active disease.²⁴ On the other hand, the levels of these cells in cases of AVL remain stable when compared to the other groups, which corroborate the findings of an Indian study in which patients with visceral leishmaniasis show no changes in frequency of INKT cells in blood, before and after resolution of the disease.²⁵ Thus, we suggest that INKT cells in leishmaniasis may have a different role in the early stages of infection in cutaneous and visceral patients, which can influence the prognosis of these diseases.

The activation of INKT cells by glycolipids can enhance resistance in several infectious diseases models,²⁵ and these cells seem to be constantly activated in vivo by endogenous self-ligands.¹¹ Our *ex vivo* analyses of whole blood cells, patients with ACL demonstrated an increase in CD69 expression in INKT cells compared to all study groups, which was independent of TLA stimulation. Interestingly, studies in murine models also demonstrated that this highly activated state in this small subpopulation could be important for the overall immune response against *Leishmania*.¹⁷ Human studies demonstrated that CD8+ CD161+ cells from patients infected by *L. donovani* presented a higher activation in bone marrow cells than in the PBMC and that CD3+ CD161+ PBMC cells did not show activation differences when comparing VL cases and healthy endemic groups.²⁶ This hyperactivation state was not observed in patients with AVL, which presented similar activation profiles compared to the control groups. Therefore, our data indicate that, despite the maintenance of INKT subpopulation rates in patients with ACL, this hyperactivated state can be crucial to the involvement of INKT cells in the immunological profile of these patients.

Activated INKT cells can quickly release large quantities of cytokines, generating a microenvironment essential to the initiation and regulation of immune responses.¹⁹ In leishmaniasis infection, IFN- γ is an important cytokine involved in host protection through macrophage activation and increasing synthesis of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species, a mechanism that is involved in parasite toxicity or inhibition of its growth.^{27–29} Analysing the secretion of IFN- γ , we observed that, in patients with ACL, the TLA induced a significant increase in the production of this cytokine, while in AVL, there was a reduction in secretion of this cytokine. However, it is known that cutaneous leishmaniasis naturally induces a higher expression of IFN- γ by NK cells, which share mechanisms of immunological action with INKT, and justifies the increased expression of this cytokine in the presence of TLA in patients with ACL in this study.³⁰ In relation to patients with AVL, a decrease in IFN- γ production may be explained by increased IL-10 levels in this disease. This may be explained by generation of a favourable

microenvironment to suppression of IL-12 synthesis in other cellular subtypes, called accessory cells, resulting in the inhibition of IFN- γ production in these cells.^{31–34} Thus, our results suggest that INKT may be involved in dual mechanisms in distinct clinical forms of leishmaniasis, triggering an activation and proinflammatory profile in early infection by *L. braziliensis* and an impaired initial immune response to *L. infantum* infection. Moreover, INKT cells may have plasticity, according to specific parasite infection. This has never been suggested to INKT cells, but it is already known for other subsets of T cells, such as the regulatory line and CD4 T cells.³⁵

Another cytokine that contributes to the proinflammatory profile in human infections is IL-17, which acts by stimulation of different immune cells, inducing the production of proinflammatory mediators such as chemokines, IL-1, TNF- α and recruiting neutrophils to the site of infection.³⁶ Although it is established that IL-17 comes mainly from Th17 cells,³⁷ which belong to adaptive immunity, other cell subtypes can also produce this cytokine, such as INKT cells.³⁸ INKT cells can produce and release IL-17, promoting a modulation of the immune response, immediately after infection.³⁹ Our findings demonstrate that patients with ACL had a higher frequency of INKT IL-17-producing cells compared to all other groups, regardless of stimulus, indicating again a proinflammatory profile in early cutaneous leishmaniasis infection. Souza et al observed elevated levels of IL-17 in patients infected with *L. braziliensis* with active disease, corroborating with our results.⁵

Similar results were also obtained by Bacellar et al, whose study demonstrated the presence of IL-17 in infiltrated lesions in patients with ACL infected with *L. braziliensis*.⁴⁰ Another study that also corroborates our results was developed by Novoa et al, which assessed the immune response in individuals with subclinical infection by *L. Braziliensis*, to observe whether infection control was associated with IL-10 and IL-27 or IL-17. Their results showed that the adaptive immune response in these individuals is weak and suggests that this is due to the ability of the innate immune response to rapidly control the parasitic infection due to the presence of IL-17.⁴¹ Taken together, these data suggest that, in cutaneous leishmaniasis, elevated levels of IL-17 may synergize with IFN- γ aiding in a protective profile of this disease.

Regarding visceral leishmaniasis, our findings did not show significant alterations in IL-17 levels in patients with AVL when compared to the other groups regardless of stimulus. Pitta et al evaluated the difference in response between resistant individuals, cured individuals and active patients of *L. donovani* infection and observed that such infection stimulated a differentiation of IL-17-producing Th17 cells and that this cytokine was associated with AVL development.⁴² Another study described the profile of IL-

17 in assessing the therapeutic potential of an immunomodulator against *L. donovani* infection in mice. Such immunomodulator promoted production of Th1 and Th17 profile cytokines, reducing parasite burden in liver and spleen of these animals. In that study, the IL-17 was targeted to host protection against the disease.⁴³ Thus, we observed that IL-17 from INKT in patients with AVL does not seem to act as a modulating mechanism in this disease.

IL-10 is also an important cytokine evaluated in our study, previously described for modulating the immune response by regulating proinflammatory cytokines and controlling the immune response exacerbated in infectious diseases, such as leishmaniasis.⁴⁴ In our results, higher levels of IL-10 from INKT cells were observed in the ACL group compared to the other groups, independent of stimulation.

According to Maspi et al, *L. major* infection requires a balance between the cytokines to control the clinical outcome of the disease. Balance of proinflammatory and regulatory cytokines is important in infectious disease, highlighting the essential role of IL-10 in the proportionality of immune responses generated during cutaneous leishmaniasis.⁴⁵ Oliveira et al described that the modulation of inflammation caused by infection with *L. braziliensis* is associated with increased production of IL-10. The study highlights a modulator and protective role of IL-10 in cutaneous leishmaniasis, through neutralization of IFN- γ and reduction in TNF- α production.

In addition, it has been demonstrated that IL-10 can suppress 85% of the TNF- α production in ACL cases.⁴⁶ Other studies have shown that high levels of proinflammatory cytokines, such as IFN- γ and TNF- α , and reduced levels of IL-10 or IL-10 receptor production, resulting in increased inflammation that is responsible for the development of lesions in patients with ACL.^{44,47} Thus, we can suggest a positive effect related to our findings, as IL-10 from INKT cells is able to modulate the infection in its initial stages.

In visceral leishmaniasis, IL-10 appears to play a central role in the pathogenesis of the disease. Verma et al described elevated IL-10 levels correlated with parasite load in patients with VL, suggesting that IL-10 levels may be correlated with disease severity in human VL.⁴⁸ Murphy et al reports that IL-10 production correlates with the ongoing disease and it has been suggested that the cellular immune depression observed in the active disease may be due to a predominance of IL-10 production rather than a decrease in IFN- γ production, which is essential for optimal macrophages activation and elimination of the parasite.⁴⁹ Patients with AVL evaluated by us indicated no differences in INKT IL-10-producing cells between patients and NEC control group. However, related to NonEC group, patients with AVL presented lower production of this cytokine suggesting an impaired expression of IL-10 by this cell subpopulation in visceral disease.

INKT cells can become activated early in infectious diseases and may contribute to the temporary control of parasite replication by producing cytokines and chemokines as well as directly killing infected cells.³⁰ Therefore, the results presented in this study provide the first evidence that *L. braziliensis* and *L. infantum* infection may modify these effects by interfering with the expression of molecules involved in the activation of INKT and cytokine production by these cells. Hence, activity of INKT, through cytokine production, seems to have an effective participation in immune modulation of patients with ACL, while in AVL disease, it seems to promote an impaired response, leading to fostering of mechanisms that may be used by *L. infantum* to escape an effective initial immune response. Taken altogether, our data suggest that INKT cells may have dual roles, according to parasite infection. This may implicate in cell plasticity, and further studies should comprise this hypothesis.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the Cardiovascular Pharmacology and Cellular and Molecular Biotechnology Laboratories for the use of its facilities.

ORCID

T. S. L. Keenan  <http://orcid.org/0000-0001-7789-7125>

REFERENCES

- Yang J, Zou Y, Singh RR. Effects of invariant NKT cells on parasite infections and hygiene hypothesis. *J Immunol Res*. 2016;2016:2395645.
- Bendibac A, Savage PB, Beynon L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297–336.
- Huang R, Liu R, Lu Z, et al. NKT cells mediate the recruitment of neutrophils by stimulating epithelial chemokine secretion during colitis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;474:253–258.
- Ahn S, Jeong D, Ahn S, et al. GM-CSF and IL-4 produced by NKT cells inversely regulate IL-1 β production by macrophages. *Immunol Lett*. 2017;182:50–56.
- Copart BM, Chakravarti S, Kyriakouli K, et al. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1-NKT cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:11287–11292.
- Michel ML, Mendes-da-Cruz D, Keller AC, et al. Critical role of ROR-gamma in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:19845–19850.
- Niemeyer M, Dennerle A, Mollenkopf HU, et al. Natural killer T-cell characterization through gene expression profiling: an account of versatility bridging T helper type 1 (Th1), Th2 and Th17 immune responses. *Immunology*. 2008;123:45–56.
- Brunson JF, Brigi M, Brunner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:101–117.
- Duthie MS, Wikinski-Lee M, Smith S, Nakayama T, Taniguchi M, Kahn SJ. During *Trypanosoma cruzi* infection CD1d-restricted NK T cells limit parasitemia and augment the antibody response to a glycosphingolipid-modified surface protein. *Infect Immun*. 2002;70:36–48.
- Ronot C, Darche S, de Moraes ML, et al. NKT cells are critical for the initiation of an inflammatory bowel response against *Trichophyton gondii*. *J Immunol*. 2005;175:899–908.
- Van Kester L, Lan WU, Joyce S. Mechanisms and consequences of antigen presentation by CD1. *Trends Immunol*. 2016;37:738–754.
- de Souza RP, dos Santos YL, de Souza VR, et al. Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* Fc α -Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase (NTPDase-2) as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Acta Trop*. 2013;125:60–66.
- Monge MB, López VR. Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Drugs*. 2013;73:1889–1920.
- Amprey JL, Im JS, Turra SJ, et al. A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. *J Exp Med*. 2004;200:895–904.
- Stanley AC, Zhou Y, Amante RH, et al. Activation of invariant NKT cells exacerbates experimental visceral leishmaniasis. *PLoS Pathog*. 2008;4:e1000028.
- Ishikawa H, Hirasawa H, Taniguchi M, et al. CD4(+) α (14) NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with *Leishmania major*. *Int Immunol*. 2000;12:1267–1274.
- Griewank KG, Lorenz B, Fischer MR, Boon L, Kotke SL, Von SE. Immune modulating effects of NKT cells in a physiologically low dose *Leishmania major* infection model after α GalCer analog PB557 stimulation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8:e2917.
- Mendonça SCF, Russell DG, Coutinho SO. Analysis of the human T cell responsiveness to purified antigens of *Leishmania*: lipophosphoglycan (LPG) and glycoprotein 63 (gp 63). *Clin Exp Immunol*. 1991;83:472–478.
- Ibbotson MN, Ison O, Chaudhri K, et al. The immune microenvironment in cutaneous leishmaniasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29:1170–1179.
- Kozan TSU, Antonelli LRV, Faria DR, et al. CD4⁺ T cells defined by their V β T cell receptor expression are associated with immunoregulatory profiles and lesion size in human leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 2011;165:338–351.
- Malinica S, Jovanović S, Dudić I, Milić B, Lukićević N, Rakićević B. Epidemiological surveillance of Leishmaniasis in Montenegro, 1992–2013. *Sep Arh Celok Lek*. 2015;143:707–711.
- Montoya CJ, Pollock D, Martinson J, et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-donotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology*. 2007;122:1–14.
- Fereidouni M, Azad FI, Mahmoudi M, et al. Comparison of two flow cytometric methods for detection of human invariant natural killer T Cells (iNKT). *Iran J Immunol*. 2010;7:1–7.
- Lalith-Narasim I, Slike BM, Aronson NE, Marovich MA. The immunology of a healing response in cutaneous leishmaniasis

- treated with localized heat or systemic antimonial therapy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e0004178.
25. Berish VV, Wilson MT, Van KL. iNKT-cell responses to glycolipids. *Crit Rev Immunol*. 2005;25:183-213.
 26. Rai AK, Thakur CP, Seth T, Mitra DK. Early activated Th-1 type and dominantly diverse natural killer T (CD8(+)/CD161(+)/Valpha24(-)) cells in bone marrow among visceral leishmaniasis patients. *Int J Parasitol*. 2011;41:1069-1077.
 27. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med*. 1983;158:670-689.
 28. Liaw FY. Regulation of nitric oxide synthesis in infectious and autoimmune diseases. *Immunol Lett*. 1994;43:95-98.
 29. Barata-Masini A, Teixeira-Carvalho A, Malaspina LC, Mayrink W, Martins-Filho OA, Correa-Oliveira R. Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. *Front Biosci*. 2007;12:839-849.
 30. Linke T, Nylén S, Eidebo L, Schmitz C, Berg L, Akuffo H. The interplay between *Leishmania* promastigotes and human Natural Killer cells in vitro leads to direct lysis of *Leishmania* by NK cells and modulation of NK cell activity by *Leishmania* promastigotes. *Parasitology*. 2011;138:1898-1909.
 31. Petrucio-Magalhães V, Martins-Filho ODA, Frata A, et al. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. *Scand J Immunol*. 2005;62:487-495.
 32. Ohashi HW, Piuzezan MR, Shekly YA, et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J Clin Invest*. 1993;92:324-329.
 33. Bacellar O, D'oliveira A Jr, Jesuino S, Carvalho EM. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine*. 2000;12:1228-1231.
 34. Bhattacharyya S, Ghosh S, Thomson PL, Bhattacharyya SK, Majumdar S. Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events. *Infect Immun*. 2001;69:1499-1507.
 35. Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Microbes Infect*. 2013;2:e60.
 36. Michel ML, Keller AC, Paget C, et al. Identification of an IL-17-producing NK1.1⁺ iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med*. 2007;204:995-1001.
 37. DuPage M, Blumens JA. Harnessing the plasticity of CD4⁺ T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol*. 2016;16:149-163.
 38. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485-517.
 39. Cox DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:479-489.
 40. Souza MA, Castro MCAB, Oliveira AP, et al. American tegumentary leishmaniasis: cytokines and nitric oxide in active disease and after clinical cure, with or without chemotherapy. *Scand J Immunol*. 2012;76:175-180.
 41. Bacellar O, Peria D, Nascimento M, et al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2009;200:75-78.
 42. Novoa R, Bacellar O, Nascimento M, et al. IL-17 and regulatory cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. brasiliensis* infection. *Parasite Immunol*. 2011;33:132-136.
 43. Pitts MG, Romano A, Cabanero S, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest*. 2009;119:2379-2387.
 44. Ghosh K, Sharma G, Saha A, Kar S, Das PK, Ukil A. Successful therapy of visceral leishmaniasis with curcumin involves T-helper 17 cytokines. *J Infect Dis*. 2013;207:1016-1025.
 45. Faria DR, Gollob KI, Barbosa I, et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun*. 2005;73:7853-7859.
 46. Maqui N, Abdoli A, Chaffariz F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathog Glob Health*. 2016;110:247-260.
 47. Oliveira WN, Ribeiro LE, Schieffler A, Machado P, Carvalho EM, Bacellar O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine*. 2014;66:127-132.
 48. Oliveira P, Balica A, Rosato AB, et al. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85:70-73.
 49. Verma S, Kumar R, Kataria GK, et al. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. *PLoS ONE*. 2010;5:e10107.
 50. Murphy ML, Wille U, Vilagras EN, Hunter CA, Farrell JP. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol*. 2001;31:2848-2856.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: de Góes Macêdo B, Peixoto RF, Maciel BIL, et al. Dual immune effect of iNKT cells considering human cutaneous and visceral leishmaniasis: An example of cell plasticity according to different disease scenarios. *Scand J Immunol*. 2018;87:e12668. <https://doi.org/10.1111/sji.12668>

APÊNDICE B



Rev Soc Bras Med Trop 50(1):19-26, January-February, 2017
doi: 10.1590/0037-8682-0419-2016

Major Article

Molecular and clinical epidemiological surveillance of dengue virus in Paraíba, Northeast Brazil

Isabel Cristina Guerra-Gomes^[1,12], Bruna Macêdo Gois^[1], Rephany Fonseca Peixoto^[1],
Camila Alves Oliveira^[2], Bruna Leal Lima Maciel^[4], Maria Isabel Ferreira Sarmiento^[5],
Anna Stella Cysneiros Pachá^[5], Josélio Maria Galvão Araújo^[3], Ian Porto Gurgel Amaral^[2]
and Tatjana Souza Lima Keesen^[1,12,13]

[1]. Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil. [2]. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil. [3]. Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil. [4]. Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil. [5]. Secretaria de Estado da Saúde da Paraíba, PB, Brasil.

Abstract

Introduction: Despite being the most prevalent arboviral disease worldwide, dengue has been neglected lately. However, recent epidemics of arboviruses such as Zika and chikungunya in locations throughout the world have alerted health authorities to these diseases. This study evaluated the incidence pattern of dengue, its clinical characteristics, and co-circulation of serotypes from 2007 to 2015 in Paraíba State, Northeast Brazil. **Methods:** Data on dengue cases from 2007 to 2015 were extracted from clinical reports of the National System for Notifiable Diseases [Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN)] of Brazil provided by the Paraíba Health Department. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assays for dengue serotypes were carried out on plasma samples obtained from patients with suspected dengue. The data were analysed using descriptive statistics. **Results:** According to clinical features, dengue fever [$n = 39,083$ (70.2%)] and dengue without warning signs [$n = 15,365$ (27.7%)] were the most common classifications of dengue. On RT-PCR, DENV 1 was the most commonly identified serotype (80.5%) in all years studied. Co-circulation of all four DENV serotypes was observed in 2013 and 2014. Furthermore, we observed an increase in dengue notifications in 2015, possibly due to the rise of Zika and chikungunya. **Conclusions:** Our findings support the hypothesis that co-circulation of the four DENV serotypes may be a reason for the increased prevalence of severe forms of dengue in the years studied. This study may contribute to directing research, health policy, and financial resources toward reducing poorly controlled epidemic diseases.

Keywords: DENV serotypes. Molecular epidemiology. Arboviruses.

INTRODUCTION

Dengue has been an endemic disease in Brazil for many decades¹; however, an unparalleled epidemic of diverse arboviruses, such as Zika and chikungunya, emerged as a new public health risk in 2015. Even though these arboviruses have some unique characteristics, they also share several clinical features that make them difficult to diagnose².

Among Brazilian states, Paraíba has a high prevalence of these arboviruses. Until 2015, there were no notification systems able to distinguish dengue from Zika and chikungunya cases. Currently, all cases are notified as suspected dengue and are only correctly classified after laboratory tests³. Molecular surveillance to differentiate these arboviruses is therefore

essential and should result in infections being correctly classified and assessment of the effectiveness of public health approaches, especially towards post-infection clinical outcomes.

Dengue virus (DENV) is one of the most common cause of morbidity and mortality⁴ and the most prevalent viral hemorrhagic fever in many tropical countries. It infects approximately 100 million people annually, causing epidemics in urban and peri-urban areas⁵. Southeast Asia has a particularly high disease burden; however, in the last two decades, Latin America and the Caribbean have also seen considerable expansion in case numbers⁶.

Dengue virus is a mosquito-borne virus of the Flaviviridae family and *Flavivirus* genus⁷. Its major vectors are *Aedes aegypti*, which prefers resting in sheltered dark areas inside houses⁸, and *Aedes albopictus*, which is not as well adapted to urban domestic environments, preferring the natural environment⁹.

The illness can be caused by any of the four DENV serotypes, DENV 1, DENV 2, DENV 3, and DENV 4⁷, and presents as

Corresponding author: Dra. Tatjana Souza Lima Keesen.
e-mail: tat.keesen@cbiotec.ufpb.br
Received 12 October 2016
Accepted 16 January 2017

various clinical forms with irregular clinical pathogenesis and outcomes. Moreover, some symptoms, including fever, skin rashes, conjunctivitis, and muscle and joint pain, may be easily confused with those of other arboviral infections¹⁸.

In order to categorize the most common manifestations of dengue, the World Health Organization (WHO) developed a classification system, which grouped dengue disease as dengue fever (DF), dengue hemorrhagic fever (DHF), and dengue shock syndrome (DSS)¹⁹. As using this classification in endemic areas was impractical, a new classification was proposed in 2009: dengue without warning signs (DwWS), dengue with warning signs (DWS), and severe dengue (SD). This new classification, based on degrees of severity, facilitates clinical care by determining how intensively patients should be observed and treated²⁰.

Between 2001 and 2007, nearly 4 million dengue cases were notified in the Americas, over 75% of which were reported in Brazil²¹. Northeast Brazil has one of the highest prevalences of dengue cases, due to favorable socioeconomic and environmental conditions²².

A cross-sectional serological survey of the epidemic conducted in 2006 in Recife, Pernambuco, a State of Northeast Brazil, showed the overall prevalence of DENV immunoglobulin G to be 80%, demonstrating that the majority of inhabitants had been infected at least once by the DENV²³. Between 1997 and 2012, 229,922 dengue cases were notified in Paraíba, 33 of which were fatal²⁴. In 2014, the majority of cases notified in Paraíba occurred in the Cities of João Pessoa, Campina Grande, Patos, Monteiro, Juazeirinho, Guarabira, Cabedelo, Arara, and Alhandra²⁵.

Paraíba has a large number of individuals infected with or at risk of DENV infection and other emergent arboviruses such as Zika and chikungunya. Few studies have described the epidemiology of these diseases. Therefore, the aim of this study was to provide the first description of incidence of dengue disease, its seroprevalence, serotype distribution, and other relevant epidemiological data in Paraíba between 2007 and 2015.

METHODS

Study area and population

Paraíba is located in the east of the Northeast region of Brazil, bordering the States of Rio Grande do Norte, Pernambuco, Ceará, and the Atlantic Ocean. According to the 2010 census of the *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*²⁶, Paraíba has a territory of 564,697.44km² divided into 223 municipalities and a population of 3,766,328 inhabitants with a population density of 69.32 inhabitants per square kilometer. The capital, João Pessoa, has 723,315 inhabitants, according to the 2010 census, being the eighth most populous city in the Northeast region.

Data collection

In Brazil, dengue is a disease of compulsory notification according to Ordinance no. 104 of the Brazilian Ministry of Health. Thus, medical reports of suspected dengue cases are

mandatorily filed with the National System for Notifiable Diseases [*Sistema Nacional de Agravos de Notificação* (SINAN)]. The files of dengue reports from Paraíba from January 2007 to December 2015 were provided to the study group by the Paraíba Health Department.

Eligibility criteria for suspected and confirmed cases

Inclusion criteria for the study were confirmed and suspected cases notified to SINAN; suspected cases included people who had lived in or traveled to endemic dengue areas and, within a 14-day period, developed clinical symptoms, such as fever, with two or more of the following manifestations: nausea, vomiting, skin erythema, generalized body ache, myalgia, arthralgia, petechiae, thrombocytopenia, or a positive tourniquet test.

Confirmed cases were selected for each year based on laboratory confirmation by serology, nonstructural protein 1 (NS1), or polymerase chain reaction (PCR) tests (detection of genotype in samples of acute serum).

During the study period, there was a change in SINAN descriptors, e.g., nomenclature of dengue classifications, and removal of descriptors, e.g., hemorrhagic manifestations, plasma leakage, and plaques.

Data sources

The data on reported dengue cases were collected from private and public health services included in the SINAN. Until 2013, the system adopted the WHO's traditional classification, where cases were classified as dengue fever (DF), dengue hemorrhagic fever (DHF), or dengue shock syndrome (DSS). However, due to difficulties in classifying severe cases, such as those with clinical outcomes that did not completely meet the traditional criteria for DHF, an intermediate classification called dengue with complications [*dengue com complicações* (DWC)] was adopted in Brazil and is used in SINAN reports.

Although the WHO adopted new terminology for dengue classification in 2009 (DWS, DwWS, and SD), this was only introduced into the Brazilian Health System in 2014. Therefore, in the present study, both WHO systems of nomenclature were used in the data analysis.

Nested reverse transcriptase PCR assay

Dengue ribonucleic acid (RNA) was extracted, if present, from plasma samples obtained from patients with suspected dengue fever. All four DENV serotypes were detected and genotyped using the methodology described by Lanciotti et al.²⁷. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) tests were performed using the QIAamp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, USA) at the Central Public Health Laboratory (LACEN) of Pernambuco between 2007 to 2012 and, from 2013 to 2015, at the Molecular Biology of Cancer and Infectious Diseases Laboratory of the Federal University of Rio Grande do Norte.

Statistical analysis

Microsoft Excel® software (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) was used to enter data and generate all

graphs and tables. Statistical analysis was performed using SPSS® 13.0 statistical software (IBM Corporation, Armonk, NY, USA), and a 5% significance level was used in cross-tabulation chi-square analysis.

Ethical considerations

This study was approved by the Ethics Committee on Human Research of the Federal University of Paraíba (*Universidade Federal da Paraíba - UFPB*) (Certificate of presentation to the ethics committee – CAAE: 363224/14.2.0000.5183) and was conducted according to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki. The requirement for informed written consent was waived by the ethics committee because the study was retrospective. The study was carried out in partnership with the Health Department of the State of Paraíba.

RESULTS

Suspected cases, confirmed cases, and incidence

Between January 2007 and December 2015, there were 118,179 reports of suspected dengue cases as follows: 2007, $n=12,687$ (10.7%); 2008, $n=11,179$ (9.5%); 2009, $n=1,394$ (1.4%); 2010 $n= 8,611$ (7.3%); 2011 $n= 16,180$ (15.4%); 2012, $n=11,440$ (9.7%); 2013, $n= 17,999$ (15.2%); 2014, $n= 7,262$ (6.1%); and 2015, $n=29,227$ (24.7%).

In Paraíba, except for a sharp decline in 2009 when only 309 (0.9%) cases were reported and a slight decrease in 2014 [$n=3,620$ (6.3%)], the number of dengue cases was consistent in 2007 [$n=5,131$ (9.3%)], 2008 [$n=4,423$ (7.6%)], and 2010 [$n=4,405$ (7.9%)]. A considerable increase in confirmed cases was seen in 2011, 2012, and 2013, with 8,667 (15.6%), 6,869 (12.4%), and 8,640 (15.6%) cases, respectively. Interestingly, in 2015 [$n=13,416$ (24.2%)], a large increase in cases was observed (Figure 1A). The fluctuation in incidence in João Pessoa was similar to that observed in the entire state, except for 2013, which had a lower number of confirmed cases (Figure 1B).

The years with the highest incidence in Paraíba were 2015 (337.74/100,000 inhabitants/year) and 2013 (220.72/100,000 inhabitants/year) (Figure 1A) and, in João Pessoa, 2012 (315.43/100,000 inhabitants/year) and 2015 (496.69/100,000 inhabitants/year) (Figure 1B). An incidence threshold of 90.00/100,000 inhabitants/year was observed, except for 2009, when the incidence rate was 13.50/100,000 inhabitants/year for Paraíba and 16.09/100,000 inhabitants/year for João Pessoa (Figure 1).

Clinical features

Of the confirmed cases, 39,083 (70.2%) patients were diagnosed with DF using the following clinical and epidemiological classifications: 15,365 (27.7%) cases of DwWS; 329 (0.6%) cases of DF; 504 (0.9%) cases of DWC; 281 (0.5%) cases of DWS; 26 (0.04%) cases of DSS; and 25 (0.04%) cases of SD. Even though there were low numbers of DWC, DWS, and DHF, a slight increase was observed from 2010. Of all outcomes, *cured* [$n=49,969$ (90.1%)] was the most frequent in all years.

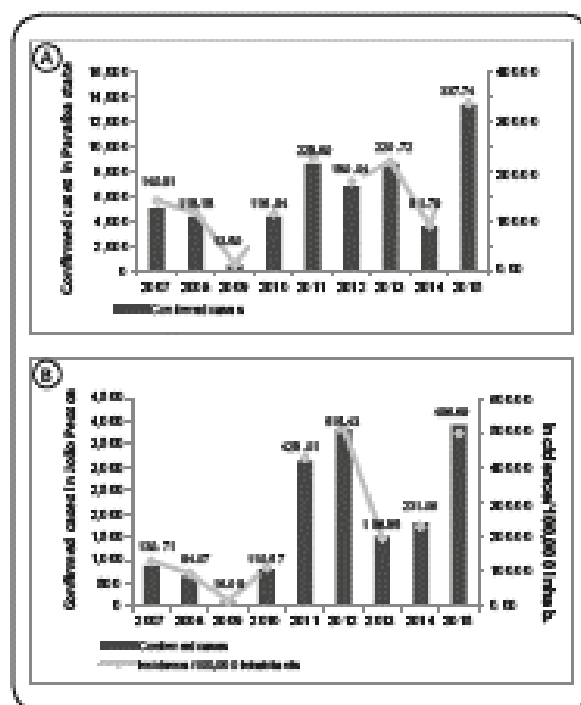


FIGURE 1 - Dengue incidence and confirmed cases from 2007 to 2015. (A) Dengue incidence in Paraíba and confirmed cases from January 2007 to December 2015; (B) Dengue incidence in João Pessoa and confirmed cases from January 2007 to December 2015.

The study population was characterized according to distribution of age and sex (Figure 2). The mean age of confirmed cases was 30 years. Females had the highest prevalence among the age groups 20-24 [$n=3,230$ (33%)], 25-29 [$n=3,378$ (34.5%)], and 30-34 years [$n=3,189$ (32.6%)]. Among males, peaks were observed at 15-19 years old [$n=2,302$ (32.3%)], 20-24 years old [$n=2,469$ (34.7%)], and 25-29 years old [$n=2,348$ (33%)]. When considering only sex as a factor, prevalence was highest among females, comprising 58.8% of all cases ($p=0.0001$).

Hospital admissions

Although the number of admissions to public and private hospitals was only 3.9% ($n=2,164$) of all confirmed dengue cases, the number of admissions was as high as 81% for some severity classifications in this study (e.g., DWC and DHF). Of the 1,166 patients who presented with severe symptoms, 737 were hospitalized. Hospitalization rates in other classifications were as follows: DWC, 410/504 (81.3%) cases; DWS, 17/281 (6%) cases; DHF, 289/339 (85.3%) cases; DSS, 14/26 (53.8%) cases; and SD, 8/25 (32%) cases. The mean age of confirmed dengue patients treated in hospital was 29 years. There was no significant difference in autochthony of patients admitted to hospital with dengue (Table 1).

It is important to emphasize that, of all notified cases of pregnant women with dengue ($n=137$), only 18 (13.1%) were

TABLE 1
Characteristics of hospital admitted patients with confirmed dengue in Paraíba from 2007 to 2015.

Hospitalization parameters	Yes	No	Total	P value
Mean age	29.30	28.92	29.97	
Pregnancy				0.001
yes	18	119	137	
no	634	3,527	4,161	
Autochthonous				0.0001
yes	1,251	11,840	13,091	
no	933	2,567	3,500	
Classification				<0.0001
DF	1,334	12,128	13,462	
DwWS	92	2,054	2,146	
DHF	289	11	300	
DWC	410	43	453	
DWS	17	151	168	
DSS	13	4	17	
SD	25	3	28	

DF: dengue fever; DwWS: dengue without warning signs; DHF: dengue hemorrhagic fever; DWC: dengue with complications; DWS: dengue with warning signs; DSS: dengue shock syndrome; SD: severe dengue.

referred to hospital (Table 1) and one pregnant patient died. Not all patients with dengue made a full recovery: 64 patients died, of whom 50 were admitted to hospital and were categorized as DWC [24 (48%) cases], DWS [1 case (2%)], DHF [12 (24%) cases], DSS [7 (14%) cases], and SD [6 (12%) cases].

Serotype presentation by year, age, and sex

Between 2007 and 2015, RNA sequencing of DENV was performed and confirmed by RT-PCR. The main serotype identified was DENV 1 [$n=396$ (80.3%)], which was prevalent during the whole study period, followed by DENV 4 [$n=67$ (13.6%)], DENV 2 [$n=17$ (3.5%)], and DENV 3 [$n=12$ (2.4%)]. DENV 1 prevalence persisted throughout the years analyzed as follows: 2007, $n=41$ (89.1%); 2008, $n=77$ (90.6%); 2009, $n=3$ (60%); 2010, $n=60$ (81.1%); 2011, $n=107$ (92.2%); 2012, $n=31$ (77.5%); 2013, $n=52$ (63.4%); 2014, $n=13$ (41.9%); and 2015, $n=12$ (92.3%). Co-circulation of the four serotypes was observed only from 2013; DENV 2 was absent in 2008, 2011, and 2015, and DENV 3 and DENV 4 in 2012 and 2009 (Figure 3). The infection was more prevalent among females than males, among all serotypes. The largest difference between the sexes was of DENV 4 (1:1.91), while the seroprevalences of DENV 1 (1:1.73), DENV 2 (1:1.42), and DENV 3 (1:1.4) had disproportional sex ratios.

The relationships between dengue serotypes and age, hospitalization, severity, and outcomes are presented in Table 2. The mean age of patients for all serotypes was 30.73 years. Furthermore, the lowest severity forms, DF and DwWS,

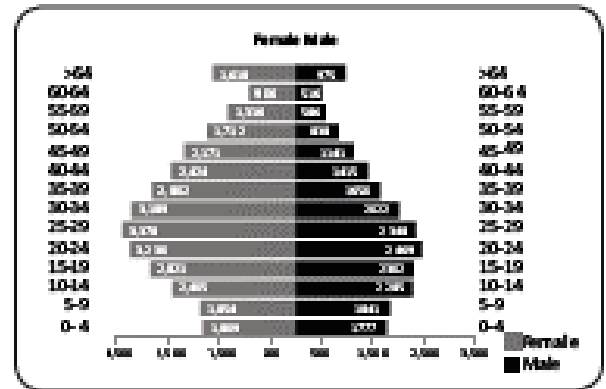


FIGURE 2 - Age and sex distribution of dengue cases in Paraíba, Brazil, from 2007 to 2015. Ignored ages are not included in this graph. ($p=0.0001$).

were associated with DENV 1 ($n=358$), although hospitalization of patients [$n=22$ (3.3%)] was more likely with this serotype. Although 40 people from our study died from dengue, only three of these patients were serologically classified [DENV 1 ($n=2$) and DENV 4 ($n=1$)].

Diagnostic assays

From 2007-2015, among confirmed patients, 18,220 diagnostic assays were performed; the most used assays

TABLE 2
Association of dengue patients' clinical patterns with DENV serotype in Paraíba, from 2007 to 2015.

Parameters/serotype	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	Total	P value
Mean age	29.85	36	29.5	30.15	30.73	
Hospitalization						NS
yes	22	2	2	7	33	
no	87	4	1	24	116	
Classification						<0.0001
DF	249	9	3	32	293	
DwWS	9	1	2	4	16	
DHF	1	2	2	2	7	
DWC	1	0	1	3	5	
DWS	1	0	0	0	1	
DSS	2	0	0	0	2	
SD	0	0	0	1	1	
Deaths for dengue	2	0	0	1	3	NS

DENV: dengue virus; DF: dengue fever; DwWS: dengue without warning signs; DHF: dengue hemorrhagic fever; DWC: dengue with complications; DWS: dengue with warning signs; DSS: dengue shock syndrome; SD: severe dengue; NS: not significant.

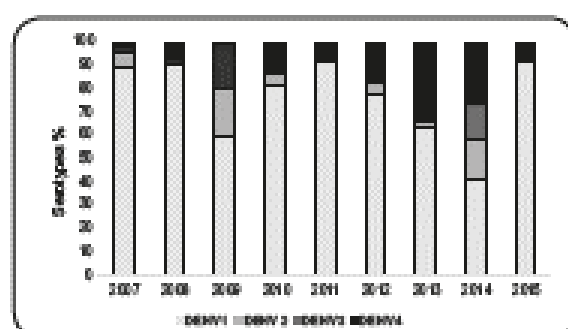


FIGURE 3 - Seroprevalence rates per year of dengue confirmed cases in Paraíba from 2007 to 2015. DENV: dengue virus.

in all years were serology tests [15,873 (87.1%) assays], followed by viral isolation [532 (2.9%) assays], NS1 tests [529 (2.9%) assays], histopathology tests [472 (2.6%) assays], immunohistochemistry [453 (2.5%) assays], and RT-PCR tests [361 (2%) assays]. Numbers of diagnostic tests performed in 2009 reflected the profile of confirmed cases in that the lowest total number of tests was performed of all years ($n=201$ (91.1%)). However, in terms of relative numbers of tests (performed tests/confirmed cases), the lowest rates were in 2011 (3,804/8,667) and 2014 (868/3,620). The NS1 test was first introduced in 2010 when only one test was performed, although this number

increased in subsequent years: 2011 ($n=163$), 2012 ($n=91$), 2013 ($n=115$), 2014 ($n=55$), and 2015 ($n=104$).

Symptoms associated with severity

During the study, patients with confirmed disease presented with various hemorrhagic manifestations ($n=599$). Research files revealed only one patient presenting with hemorrhagic manifestations in 2014 and 2015. Another clinical sign associated with dengue severity is plasma leakage ($n=703$), which was observed from 2007 to 2013 in patients, respectively.

DISCUSSION

The main aim of this study was to evaluate the status of dengue in Paraíba, Northeast Brazil. This analysis is important as there is huge concern in Paraíba about other emergent arboviruses, such as Zika and chikungunya, and their clinical similarities to dengue²⁶. Peaks in incidence of these diseases correspond with peaks of confirmed dengue cases, with the highest numbers in 2015, 2011, and 2013 in Paraíba. These peaks are probably associated with the life cycle of the disease vector, *Aedes aegypti*²¹. Researchers have demonstrated that the prevalence of confirmed cases occurred in months with the highest pluviometer readings and appearance of vectors²⁶⁻²⁸, as well as surges in urbanization and increases in population density, factors that also favor the development of *Aedes aegypti*.²⁹

Interestingly, a huge increase in suspected and confirmed dengue cases was observed in 2015, overlapping with the appearance of Zika and its repercussions²⁶. The appearance

of newborns with microcephaly due to infection with Zika²⁶, especially in Paraíba, may be a possible explanation for this increase in notifications, demonstrating that anxiety generated from an epidemic may be responsible for a drastic change in disease scenery. Despite the increase in notifications in 2015, cases were still rarely confirmed by molecular diagnostic techniques, probably due to low government investment, demonstrating the challenges in identifying circulating serotypes in Paraíba^{21,28}.

Most of the confirmed cases were classified as DF (70.2%) and Dw/S (27.7%), a prevalence profile similar to that in other states of Northeast Brazil²⁷. Although there were low numbers of DCC, DWS, and DHF, there was a slight increase in the proportion of these cases from 2010. The increase in severe dengue cases may have been associated with the reintroduction of a different serotype²⁸.

Most of the cases in this study were cured. In 2007, there was no registered death from dengue, and in 2009, there was only one death. These data may be a consequence of larger numbers of Dw/S and DF in Paraíba, and low rates of DCC, DWS, DHF, DSS, and SD, which are commonly associated with high mortality, as observed in Recife-PE²⁹.

Prevalence of dengue was higher in females [31,635 (58.8%)] than males [22,165 (41.2%)], corroborating the results found in Recife-PE, Teresina-PI, and São Luís-MA^{29,30}. Authors commonly attribute this to the higher tendency of women to seek hospital treatment³¹, thereby increasing the number of notified cases among women, and, consequently, increasing the number of confirmed female cases. Other studies in dengue epidemiology have demonstrated no significant difference in numbers of male and female patients³².

There was increased prevalence in the 15-34 year old age group ($n=21,759$). This data is in accordance with other Brazilian studies that have shown that the largest number of cases occurs in adult age groups³³. Nevertheless, in the present study, peaks of dengue in the elderly (>64) of both sexes were observed. The mean age (30 years) of confirmed dengue cases in this study was lower than that found in Rio de Janeiro (32.8 years), evidencing the high number of cases in younger aged groups in our study³⁴.

In other studies, there was higher mortality among elderly patients, which may be related to a high frequency of comorbidities. However, data on comorbidities are not included in the SINAN, and can only be obtained through investigation of fatal dengue cases^{35,36}.

In this study, 2,164 (3.9%) patients with confirmed dengue were admitted to public and private hospitals. The number of hospital admissions was as high as 81% for some severity classifications in this study. Trends in hospitalization rates reflect severe dengue cases³⁷, as cases characteristic of DCC, DWS, DHF, DSS, and SD sometimes require hospital admission and are frequently fatal³⁷.

Despite pregnancy being associated with higher disease severity³⁸, only a small number of pregnant women in our study were referred to hospital. This may explain why only one

case was fatal. The possibility of dengue was not considered during medical assessment in a case report of two parturients with dengue, who exhibited signs and symptoms and lived in an endemic area³⁹, even though several complications, such as vaginal bleeding, maternal death, prematurity, and spontaneous abortion, are associated with dengue during pregnancy⁴⁰. These complications reflect the need for precise clinical management of potential health risks during pregnancy. In order to confirm dengue cases, Brazilian public and private facilities perform various tests, besides using the WHO clinical classifications. A total of 18,220 tests were performed on patients suspected of having dengue. Of these, 15,873 (87.1%) cases were serologically confirmed, while RT-PCR tests were used in only two cases. Until 2008, Brazil diagnosed most dengue cases using clinical and epidemiological criteria, as isolation and identification of DENV by PCR was rare⁴¹. Viral RNA detection assays provide a sensitive and rapid diagnosis. However, this approach requires specialized equipment and technicians, which are limitations in developing countries due to costs⁴², thus explaining the prevalence of the immunoglobulin M antibody capture technique.

The introduction of DENV to previously unaffected populations has the potential to produce explosive epidemics. The introduction of a new serotype can cause a new epidemic, since each serotype produces only permanent immunity to itself⁴³, and the sequence of introduction and co-circulation of specific serotypes has been implicated in the increase of clinically severe cases⁴⁴.

Thus, serotype distribution explains disease patterns, with specific serotype predominance determining changes in the epidemiological profile of dengue. Our analysis revealed that the co-circulation of all four serotypes in 2013 and 2014 may be explained by the large number of cases in 2011 and 2012. Despite the emergence and re-emergence of DENV 2, DENV 3, and DENV 4 throughout the years of the study, DENV 1 remained dominant in the State of Paraíba.

An epidemiological survey in Brazil, comprising a series of DENV isolations from 2000 to 2008, was performed by the Brazilian Ministry of Health. At the beginning of the decade, DENV 1 had the highest incidence, then DENV 3 became predominant from 2003, and DENV 2 from 2007⁴⁵. Geographical distributions of serotypes from different states, such as Pernambuco, Goiás, and Ceará⁴⁶ revealed a similar trend to national trends. Our epidemiological results, however, did not corroborate this evolution of the DENV serotype, even though they revealed diverse co-circulation: DENV 1 remained the most predominant DENV serotype in Paraíba from 2007 to 2015.

Although DENV 1 is associated with the least severe disease, we found a strong correlation between DENV 1 with a severe outcome and hospitalization compared with other serotypes. Yung et al.⁴⁴ found that more severe cases were associated with DENV 1 in Singapore. However, other reports suggest a more significant correlation between greater disease severity and DENV 2⁴⁷. These differences may be attributable to variations in plasma viral RNA levels among serotypes. Nevertheless, we

were unable to fully determine this in our study since data on serotypes was absent in many confirmed cases.

This study was the first to evaluate characteristics of dengue and problems with notification of the disease in Paraíba, Northeast Brazil. Our findings support the hypothesis that co-circulation of the four DENV serotypes may a reason for the increase in severe forms of dengue. Accurate estimates of dengue cases are important, not only to determine risk factors associated with severity, but also to inform policy decisions, and thereby identify research priorities and increase dengue awareness in all levels of society. This study may help prioritize research, health policy, and financial resources toward reducing this poorly controlled disease and other emergent arboviruses.

Acknowledgements

We thank the Cancer and Infectious Disease Molecular Biology Laboratory of UFPA and the State Health Department of Paraíba/Government of Paraíba, PB, for their contributions to this work.

Conflict of interest

The authors declare that are no conflict of interests.

Financial support

This work was supported by grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brazil (#44315/2014-1).

REFERENCES

1. Teixeira MG, Costa MCN, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2009;25(Suppl 1):S7-S18.
2. Meunier E, Selby K, Cherpillod P, Kaiser L, Boillet-Blanco N. Simultaneous outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections: diagnosis challenge in a returning traveller with nonspecific febrile illness. *New Microbes New Infect*. 2016;11:6-7.
3. Ministério da Saúde. Protocolo de Vigilância e Resposta à Ocorrência de Microcefalia Relacionada À Infecção Pelo Vírus Zika. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2015. p. 1-70. Disponível em: <http://portal.saude.sa.gov.br/images/pdf/2015/desembo/09/Microcefalia-Protocolo-de-vigil-ncia-e-resposta-vers-o-1-09dez2015-3h.pdf>. Accessed Dec 12, 2016.
4. Endy TP. Human immune responses to dengue virus infection: lessons learned from prospective cohort studies. *Front Immunol*. 2014;5:183.
5. Guzman MG, Halstead SB, Artob H, Bachy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(Suppl 12):S7-S16.
6. World Health Organization. Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO; 1997. Available at: <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublications/en/>. Accessed Dec 12, 2016.
7. Gubler SJ, Schimmer B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol*. 2005;2(1):1.
8. Higa Y. Dengue vectors and their spatial distribution. *Trop Med Health*. 2011;39(Suppl 4):17-27.
9. Ibanez-Bernal S, Briseno B, Mateki JP, Argot E, Rodriguez O, Martinez Campos C, et al. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Med Vet Internet*. 1997;11(4):305-9.
10. World Health Organization. Zika virus, 2016. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/en/>. Accessed Dec 12, 2016.
11. Yacoub S, Wills B. Dengue: an update for clinicians working in non-endemic areas. *Clin Med*. 2015;15(1):82-5.
12. World Health Organization. Dengue: Guidelines For Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. 2009; Geneva: WHO. Available at: http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue_9789241547871/en/. Accessed: Dec 12, 2016.
13. Teixeira MG, Siqueira Jr JB, Ferreira GL, Bricks L, Joint O. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2009): a systematic literature search and analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(12):e2520.
14. Rodrigues NCP, Lino VTS, Damasc RP, de Noronha Andrade MK, O'Dwyer G, Monteiro DLM, et al. Temporal and Spatial Evolution of Dengue Incidence in Brazil, 2001-2012. *PLoS One*. 2016;11(11):e0163945.
15. Rodriguez-Barraquer I, Cordeiro MT, Braga C, de Souza WV, Marques ET, Cummings DA. From re-emergence to hyperendemicity: the natural history of the dengue epidemic in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(1):e935.
16. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2014. p. 1-812. Disponível em: http://portalonline.ensp.fiocruz.br/sites/default/files/arquivos/recursos/guia_vigilancia_saude_completo.pdf. Accessed Dec 14, 2016.
17. Secretaria de Saúde de Paraíba. Boletim epidemiológico da dengue, 2014. João Pessoa. Disponível em: <http://statistica.parabiba.pb.gov.br/2015/00/Boletim-Epidemiologico-BB-e76C276BA-12.pdf>. Accessed Dec 15, 2016.
18. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Homepage]. Brasília: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão; 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>. Accessed Sep 15, 2015.
19. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorland AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992;30(3):345-51.
20. Galindo-Fraga A, Ochoa-Hain E, Sifuentes-Osorio J, Ruiz-Palacios G. Zika Virus: A new epidemic on our doorstep. *Rev Invest Clin*. 2015;67(8):329-32.
21. Tsai TL. Aspectos críticos do controle da dengue no Brasil. *Cad Saude Publica*. 2002;18(3):367-71.
22. Gonçalves NV, Rebelo JM. Epidemiological characteristics of dengue in the Municipality of São Luís, Maranhão, Brazil, 1997-2002. *Cad Saude Publica*. 2004;20(5):1424-31.
23. Nagov M, Paz S, Clermont A, Pri-Or NO, Shalom U, Yeger T, et al. Impacts of Climate Change on Vector Borne Diseases in the Mediterranean Basin - Implications for Preparedness and Adaptation Policy. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(6):6745-70.
24. Hsi YL, Roddick J, Ng N, Tang CS, Pang FY, Sauerborn R. Climate variability and increase in intensity and magnitude of dengue incidence in Singapore. *Glob Health Action*. 2009;2. doi: 10.3402/gha.v2i0.2006.
25. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(2):480-96.
26. Braga JCD, Silva LC, Tibírcio JD, Silva MA, Pereira LHS, Dutra ER, et al. Clinical, Molecular, and Epidemiological Analysis of

- Dengue Cases during a Major Outbreak in the Midwest Region of Minas Gerais, Brazil. *J Trop Med*. 2014;2014 ID 276912.
27. World Health Organization. Dengue and severe dengue. Fact sheet number 117. Geneva: 2012. (Revised January 2012). Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>. Accessed: April 01, 2016.
 28. Gibson O, Souza-Santos R, Homério NA, Pacheco AQ, Moraes MO, Kubacki C, et al. Conditions of the household and peridomicile and severe dengue: a case-control study in Brazil. *Infect Biol Epidemiol*. 2014;4: doi: 10.3402/inbev.22110.
 29. Montenegro D, Lucinda HR, Lima TM, Oliveira DSCD, Lima AAFD, Guimarães MJB, et al. Clinical and epidemiological aspects of the dengue epidemic in Recife, PE, 2002. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(1):9-13.
 30. Evangelista LSM, Oliveira FLI, Gonçalves LMF. Aspectos epidemiológicos de dengue no município de Teresina, Piauí. *BEPA*. 2012;9(10):32-9.
 31. Tavares C, Viacava F, Pinheiro R, Brito A. Utilização dos serviços de saúde no Brasil: gênero, características familiares e condição social. *Rev Panam Salud Publica*. 2002; 11(5-6):365-73.
 32. Cavalcanti LPDG, Coelho JCB, Vilar DCLF, Holanda SGB, Barçosa KNFD, Souza-Santos R. Clinical and epidemiological characterization of dengue haemorrhagic fever cases in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(4):355-8.
 33. Cavalcanti LPD, Braga DNM, Pompeu MML, Lima AAB, Silva LMA, Aguiar MG, Castiglioni M, et al. Evaluation of the World Health Organization 2009 classification of dengue severity in autopsied individuals, during the epidemics of 2011 and 2012 in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015. 48(6):658-64.
 34. Moraes GH, Duarte EF, Duarte EC. Determinants of mortality from severe dengue in Brazil: a population-based case-control study. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88(4):670-6.
 35. Lye DC, Lee VI, Sun Y, Leo YS. The benign nature of acute dengue infection in hospitalized older adults in Singapore. *Int J Infect Dis*. 2002;14(5):410-3.
 36. Thain TL, Leo YS, Fisher DA, Low JG, Oh HML, Gan VC et al. Risk factors for fatality among confirmed adult dengue inpatients in Singapore: a matched case-control study. *PLoS One*. 2013;8(11):e61060.
 37. Leo YS, Gan VC, Ng EL, Hoo Y, Ng LC, Poh KY, et al. Utility of warning signs in guiding admission and predicting severe disease in adult dengue. *BMC Infect Dis*. 2013;13:498. doi: 10.1186/1471-2334-13-498.
 38. Machado CR, Machado BS, Rohloff RD, Azevedo M, Campos DP, de Oliveira, RR, et al. Is pregnancy associated with severe dengue? A review of data from the Rio de Janeiro surveillance information system. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(5):e2217.
 39. Souza AI, Ferreira ALCG, Azman MA, Moura BM, Braga MC. Dengue as a cause of fever during pregnancy: a report of two cases. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(3):360-2.
 40. Alvaranga CF, Silami VO, Brault R, Bochet MEH, Coelho J, Nogueira RMR. Dengue during pregnancy: a study of thirteen cases. *Am J Infect Dis*. 2009;5(4):288-93.
 41. Ho D, Di B, Ding X, Wang Y, Chen Y, Pan Y, et al. Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection. *Viral J*. 2011;8(1):47.
 42. Halstead SB. Dengue. Tropical Medicine: Science and Practice. 1st edition. London: Imperial College Press. 2008;370:1644-52.
 43. Cavalcanti LP, Vilar D, Souza-Santos R, Teixeira MG. Change in age pattern of persons with dengue, northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(1):132-4.
 44. Yung CF, Leo KS, Thain TL, Tan LK, Gan VC, Wong JO, et al. Dengue serotype-specific differences in clinical manifestation, laboratory parameters and risk of severe disease in adults, Singapore. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;92(5):999-1005.
 45. Chen RF, Yang KD, Wang L, Liu JW, Chiu CC, Cheng JT. Different clinical and laboratory manifestations between dengue haemorrhagic fever and dengue fever with bleeding tendency. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007;101(11):1166-73.

APÊNDICE C

Correspondence

hospitals from September, 2011, to August, 2014. As the authors wrote, 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) became commercially available for Japanese children in February 2010, and it was incorporated into the routine immunisation schedule for children in April, 2013. Subsequently, 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) has replaced PCV7 since November, 2013.

We are concerned whether serotype replacement had been chronologically observed during the study period. Actually, based on the systematic literature review and pooled data analysis, the authors' group reported that serotype replacement occurred in adult pneumococcal pneumonia cases following the vaccination of children with PCV7 in Japan, although there was a significant decrease (-18.1%, 95% CI -24.6 to -11.5, $p < 0.001$) in the proportion of the PCV7-covered serotypes, there were significant increases in the proportions of serotypes covered by PCV13 but not by PCV7 (+9.9%, 3.3-16.4, $p = 0.003$) and serotypes covered by PPV23 but not by PCV7 (+9.4%, 2.6-16.2, $p = 0.007$).

It should be noted that, since June, 2014, the use of PCV13 for adults aged 65 years or older has been approved in Japan. Concerning the use of PCV13, the US Advisory Committee on Immunization Practices has recommended a dose of PCV13 followed by a dose of PPV23 with more than 1-year intervals between PCV13 and PPV23 for adults aged 65 years or older.^{4,5} However, Japanese authorities of infectious diseases have not yet adopted this strategy and only the use of PPV23 is recommended, since the introduction of PCV7 and PCV13 in Japan was later than that of the USA and other countries.⁶ If chronological serotype replacement in Japan can be predicted to occur in a similar way as with other countries, the Japanese vaccine policy might be amended in the near future. We would be grateful if the authors could provide comments on how PCV13 should be incorporated

into the routine immunisation programme on the basis of their study results, since such an insight might also be useful for other countries.

UK reports personal fees from Daiichi Sankyo outside the submitted work. All other authors declare no competing interests.

*Tetsuya Tanimoto, Eiji Kurumi,
Kazutaka Hosoda, Tamae Hamaki,
Kenzo Takahashi
tatanimoto@yahoo.co.jp

Nervus Clinic, Tokyo, Japan (TT, EK, KH, KT); and
Teikyo University Graduate School of Public Health,
Tokyo, Japan (KT)

- 1 Suzuki M, Shrobbadi G, Hultaj T, et al. Serotype-specific effectiveness of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine against pneumococcal pneumonia in adults aged 65 years or older: a multicentre, prospective, one-negative design study. *Lancet Infect Dis* 2017; 17: 313-21.
- 2 Kuroki S, Suzuki M, Arjoshi K, Morimoto K. Serotype replacement in adult pneumococcal pneumonia after the introduction of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine for children in Japan: a systematic literature review and pooled data analysis. *Jpn J Infect Dis* 2017; published online Mar 28. DOI: 10.1093/jcid/ciw036
- 3 Tomaszek S, Bennett NM, Stoecken C, et al. Use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine among adults aged ≥65 years: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2014; 63: 822-25.
- 4 Kobayashi M, Bennett NM, Glebe R, et al. Intervals between PCV13 and PPV23 vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015; 64: 944-47.
- 5 The Japanese Association for Infectious Diseases. The Guideline for pneumococcal vaccination in adults aged 65 years or older (Japanese). 2015. <http://www.jais.or.jp/guideline/b65jiken/> (accessed April 7, 2017).

Guillain-Barré syndrome and arboviral infection in Brazil

Among the clinical manifestations associated with the recent Zika infection outbreak in South America and elsewhere are rash, conjunctivitis, Guillain-Barré syndrome (GBS) in exposed adults, and in the newborn so-called congenital Zika syndrome, especially microcephaly.¹ After accumulating epidemiological data

from the French Polynesia² outbreak, attention has now focused on Zika infection as a trigger of GBS. The case for a specific, causal association between acute Zika infection and subsequent GBS was strongly made: 42 individuals were diagnosed with GBS, of whom all had Zika neutralising antibodies.

Annelies Wilder-Smith and colleagues³ correctly highlight the public health threat posed by arboviral disease transmission beyond just Zika infection: South America shows co-circulation of several aedes mosquito-transmitted diseases, often with overlapping symptoms. In 2016, the National International Health Regulations Focal Point of Brazil notified PAHO and WHO of increased GBS, with 1708 cases registered during 2015. In the context of increased GBS cases in Brazil over the past 18 months, attention has focused on Zika as the driving infection.⁴ However, in a country with at least nine circulating pathogenic arboviruses, other viral infections could also be implicated. Previous case reports describe GBS following acute dengue infection.⁵ In the Paraíba region, we noted that most neurology-referred GBS cases during the height of the Zika virus crisis of 2016 did not necessarily follow acute Zika infections (table). During 2016, Paraíba experienced 9479 chikungunya and 1223 Zika acute cases, which were clinically notified and PCR-verified. Over this same period, there were 13 characterised GBS cases in the region, ten after chikungunya infection, two after dengue infection, and one after Zika infection. Chikungunya cases tended to show respiratory muscle involvement. Meanwhile in the Sergipe region, neurology referrals included a 72-year-old man with GBS who was diagnosed with acute chikungunya by PCR as well as a 22-year-old man who was PCR-positive for both chikungunya and Zika viruses and presented with ascending flaccid paralysis with encephalitis, sleepiness, and disorientation, with

Correspondence

Sex	Signs and symptoms during viral infection	Decrease in muscle power	Decreased muscle tone	Respiratory muscle involvement	Facial muscle involvement	Hospitalization	ZIKV PCR	Serology, CHIKV, DENV	Diagnosis	Outcome	
34	M	Fever, pain, exanthema, arthralgia	YES	YES	NO	NO	YES	NEG	CHIKV IgM	GBS	Recovered
65	M	Fever, pain, exanthema, arthralgia	YES	YES	YES	YES	YES	NEG	CHIKV IgM	GBS	Died
31	M	Fever, myalgia, chorioretinitis	YES	YES	YES	YES	YES	POS	NEG	GBS	Recovered
37	M	Fever, pain, exanthema, arthralgia	YES	YES	YES	YES	YES	NEG	CHIKV IgM	GBS	Recovered
58	F	Fever, myalgia, pain, exanthema, arthralgia	YES	YES	NO	NO	YES	NEG	DENV IgM	GBS	Died
7	F	Fever, headache, vomiting	YES	YES	NO	NO	YES	NEG	CHIKV IgG	GBS	Recovered
27	F	—	YES	YES	YES	NO	NO	NEG	CHIKV Ig*	GBS	Recovered
26	F	Headache, vomiting, backpain	YES	YES	NO	NO	NO	NEG	DENV IgM	GBS	Recovered
58	F	Fever, myalgia, exanthema, arthralgia	YES	YES	YES	NO	YES	NEG	CHIKV Ig*	GBS	Recovered
26	F	Headache, vomiting, backpain	YES	YES	NO	NO	YES	NEG	CHIKV Ig*	GBS	Recovered
73	F	Myalgia, arthralgia	YES	YES	NO	YES	NO	NEG	CHIKV Ig*	GBS	Recovered
67	F	Fever, pain, exanthema, arthralgia	YES	YES	YES	NO	NO	NEG	CHIKV Ig*	GBS	Recovered

Note: case GBS cases follow chikungunya (CHIKV), dengue (DENV), or Zika (ZIKV) infection. Chikungunya causes GBS after febrile respiratory muscle involvement. The first case was acute infection and GBS was longer and more severe following CHIKV than subsequent cases for ZIKV. *Cable records do not indicate whether GBSA infection was IgM or IgG. GBS = Guillain-Barre syndrome.

Table. GBS cases in Paraíba, Brazil, after acute arboviral infection, by age/sex/year

Note: case GBS could follow chikungunya (CHIKV), dengue (DENV), or Zika (ZIKV) infection. Chikungunya causes GBS often includes respiratory muscle involvement. The time between acute infection and GBS was longer and more variable following CHIKV than narrower windows for ZIKV. *Crisis: no cases; none; indicates no/very low GSA detection was IgM or IgG. GBS: Guillain-Barré syndrome.

Table. GBS cases in Paraíba, Brazil, after acute arboviral infection, by age in years

MRI revealing a hypodense left parietal lesion.

The prevalent model of GBS aetiology is that the initial host antimicrobial response is through an innate, T cell-independent antibody repertoire recognising the glycans on lipopolysaccharides—these antibodies then bind to the glycans on nerve gangliosides, especially GM1 and GD1a gangliosides. Many unknowns remain in elucidating the differential pathobiology of GBS driven by different pathogens. Disease in this setting offers a window for characterisation of the association between different arbovirus triggers, different cross-reactive targets, and differential patterns of disease.

We declare no competing interests.

Tatjana Souza Lima Keesen,
Rogério P de Almeida,
Bruna Macêdo Gals,
Raphany Fonseca Petróia,
Anna Stella Cysneiros Pachá,
Fernanda Carolina Fernandes Vieira,
Marcelo Paes da Silva,
Rodrigo Cazzaniga,
Rosemary J Boyton,
Daniel M Altmann
daltmann@imperial.ac.uk

Immunology of Infectious Diseases Laboratory,
Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba,
Brazil (TSLK, BMG, RFP); Laboratório de Biologia

Molecular, Hospital Universitário, Universidade
Federal de Seropó, Acaiaçu, Brasília (RPA, M P, RC);
Secretary of Health of Paraíba State, João Pessoa,
Paraíba, Brazil (AGC, RCV); and Department of
Medicine, Imperial College, St James's Hospital,
London W2 1NY, UK (DJ, DMA)

1. Peonias, LG, Jamison, DJ, Rowley, AM, et al. Zikavirus. *N Engl J Med* 2016; **374**: 1557–63.
2. Cao-Lormeau VM, Blake A, Moss S, et al. Guillain-Barré syndrome outbreak associated with Zikavirus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* 2016; **387**: 3529–35.
3. Wilder-Smith A, Gubler DJ, Wriener SC, et al. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. *Lancet Infect Dis* 2017; **17**: e101–06.
4. Araújo AQ, Silva MT, Araújo AP. Zikavirus-associated neurological disorders: a review. *Brain* 2016; **139**: 2123–30.
5. Fragoso YD, Gomes S, Brooks J, et al. Guillain-Barré syndrome incidence: first report on ten new cases in Brazil. *Arb Epidemiol* 2016; **74**: 1039–40.

HPV control and resistance in the Middle East and north Africa

We thank Murat Gütekin and Baki Akgül, and we agree wholeheartedly with the fact that Islamic countries, and countries with more conservative sexual views based on religion in general,

should implement educational projects in government-organised programmes. As we mentioned in our original Correspondence,¹ the organisation of intervention policies based on awareness campaigns can be a very effective first step in the control of cervical cancer caused by HPV. However, a point that we would like to stress once more is that acceptance and implementation of these programmes, and in effect also vaccines, can be faced with difficulties because of stigmatisation that is based on religious and traditional values. One fact to keep in mind, is that using Turkey as a success story and example for the Middle East and north Africa (MENA) region at large can be difficult. For one, Turkey is not a traditional Islamic country, as was described in the letter by Gütekin and Akgül, but rather a secular and stable progressive state in which HPV and its vaccination are becoming a hot medical topic² among the younger generation. However, the MENA region is very politically, culturally, and economically diverse and houses countries with the highest per capita incomes in the world while also being home to some of the most severely poverty-stricken

APÊNDICE D

Home Congress ▾ Program ▾ Speakers Registration ▾ Abstract ▾ Travel Awards Awards ▾ Sponsor Accommodation Contact 

TRAVEL AWARDS

[Travel Award Winners - Click Here](#)

It is a pleasure to announce the winners of the first SBI Travel Awards:

- 1) Tamires Lopes Silva (Universidade Federal Uberlândia)
- 2) Rodrigo Arcoverde Cerveira (Universidade Federal do Pará)
- 3) Gabrielle Brum Lopes da Silva (Instituto Brasileiro de Medicina de Reabilitação (IBMR))
- 4) Maria Cecília Campos Canesso (UFMG)
- 5) Airton Pereira e Silva (Universidade Federal Fluminense)
- 6) Anna Carolina Nitzsche Teixeira Fernandes Corrêa (UFRJ)
- 7) Érika Bertozzi de Aquino Mattos (Universidade Federal Fluminense)
- 8) Felipe de Souza Araujo (UFPE)
- 9) Gregório Grama Cavalcante (UFMG)
- 10) Ágata Lopes Ribeiro (UFMG)
- 11) Luís Henrique Costa Correa Neto (UNB)
- 12) Isabelle Mazza Guimarães (Universidade Federal Fluminense)
- 13) Bárbara Vieira (INCA)
- 14) Ágata Lopes Ribeiro (IRR-Fiocruz-MG)
- 15) Marcella Rungue Oliveira (UFMG)
- 16) Rephany Fonseca Peixoto (UF Paraíba)
- 17) Wanessa Veras Martins (UFAL)
- 18) Elane Conceição dos Santos (UFAL)
- 19) Ithallo Sathio Bessoni Tanabe (UFAL)
- 20) Danila Malheiros Souza (UFTM)