



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**



**MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**LORRANNY SANTANA RODRIGUES**

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE LINFÓCITOS T EM PACIENTES  
COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

**ARACAJU**

**2020**

**Lorranny Santana Rodrigues**

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE LINFÓCITOS T EM PACIENTES  
COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Cristiane Bani Corrêa

**Coorientador:** Prof<sup>º</sup> Dr Roque Pacheco de Almeida

**ARACAJU**

**2020**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE – BISAU  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

R696c Rodrigues, Lorranny Santana  
Caracterização imunofenotípica de linfócitos T em pacientes com leishmaniose visceral / Lorranny Santana Rodrigues ; orientadora Cristiane Bani Corrêa ; coorientador Roque Pacheco de Almeida. – Aracaju, 2020.  
48 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2020.

1. Leishmaniose visceral. 2. Imunidade celular. 3. Imunofenotipagem. 4. Tratamento da leishmaniose. I. Corrêa, Cristiane Bani, orient. II. Almeida, Roque Pacheco de, coorient. III. Título.

CDU 616.993.161

**Lorranny Santana Rodrigues**

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE LINFÓCITOS T EM PACIENTES  
COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências da Saúde.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristiane Bani Corrêa

---

Examinador: Prof. Dr. Ricardo Luís Louzada as Silva

---

Examinador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Renata Grespan

1º

2º

## **Agradecimentos**

Primeiramente, agradeço a Deus, que me proporciona toda força e coragem diariamente para seguir em frente e nunca desistir dos meus sonhos. Aos meus pais Rivanda e Lomanto, agradeço por terem me dado a vida e por me darem toda a base que eu precisava para chegar até aqui, vocês são meu pilar e minha fortaleza! Foi um período de grande aprendizagem para mim, a proposta de fazer um mestrado veio para mim de repente, apesar de estar buscando o curso desde a formatura. Para uma enfermeira de formação, entrar no ambiente laboratorial e na pesquisa básica foi mais que um desafio. Pude aprender muito, com a pesquisa e com a equipe que trabalhei. Só tenho a agradecer pelas pessoas que foram colocadas no meu caminho, sem estas não seria possível terminar esse percurso. Agradeço imensamente a minha orientadora Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Cristiane Bani Corrêa, uma mulher de fibra, sensível e trabalhadora, me ensinou muito e que tenho como referência para a vida. Muito obrigada professora Cris, pelos conselhos e ensinamentos mesmo em situações além da pesquisa. Ao Prof<sup>º</sup> Dr. Roque Pacheco de Almeida, o grande idealizador desta pesquisa, para mim é uma honra ter como coorientador uma pessoa de tanto prestígio na imunologia, além disso admirável como ser humano. Sempre disposto a ajudar seus alunos, pacientes e colegas. Agradeço também à Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Amélia Ribeiro de Jesus pelos conselhos científicos e contribuições valorosas. Aos alunos de iniciação científica que participaram deste projeto na coleta de dados clínicos Mariana, Marcos, Nathalia, Vitória e Sofia, obrigada pelo suporte que foi essencial para realização dessa pesquisa. Enfim, à toda equipe do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LIBM), principalmente a Aline e Lays que contribuíram na condução dos experimentos, mas que todos se sintam homenageados pois nunca esquecerei a forma como fui acolhida nesta família, a Priscila Lima, Marcio Bezerra, Fabrícia Alvisi, Ricardo Louzada, Rodrigo Cazanniga, Lucas, Laís, Camilla, Juliana, Rogério e Tiago. E por falar em família, agradeço a meus familiares e amigos que se fizeram presentes nos momentos mais difíceis para me dar suporte, a Raianny, Daysenha, Tia Nadiege, Tia Rose, Eva, Vovó Iolanda, Lorena, Valéria e outros. Em especial, agradeço a Antonio pelo companheirismo e apoio que me fez sentir que tenho alguém ao meu lado mesmo nas horas mais difíceis! Aos amigos que a vida na pesquisa me deu também agradeço muito pelo suporte, o pessoal do LaBICeL, Professor Ricardo Scher Mari, William, Mona, Jileno, Ramon, João, Rauan, Cristiane, Beatriz e Amanda, obrigada por fazerem daquele ambiente mais leve com a convivência e conversas. Por fim, agradeço aos membros da banca

examinadora pela disponibilidade de tempo e sugestões para melhoria do trabalho. À CAPES, CNPq, FAPITEC/SE e UFS pelo apoio material e financeiro.

### **Resumo**

#### **Caracterização Imunofenotípica de Linfócitos T em Pacientes com Leishmaniose Visceral. Lorranny Santana Rodrigues, 2019.**

A Leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, se diagnosticada incorretamente e não tratada precocemente pode levar à morte. O estabelecimento da forma clínica da LV está intimamente associado à resposta imunológica desencadeada no hospedeiro. A imunidade adaptativa e a modulação do perfil de células T é crucial para o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente contra o parasito. A qualidade da resposta de células T CD4 e TCD8 é baseada na sua capacidade de resposta efetora e de memória e está relacionada principalmente com a produção de três citocinas: IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ . O objetivo do presente estudo foi avaliar a funcionalidade das células T envolvidas na supressão da resposta imune de pacientes com LV e na restauração dessa resposta durante e após o tratamento. Células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LV e controles saudáveis foram cultivados e estimulados *in vitro* com Antígeno de Leishmania Solúvel (SLA) por 18 horas e marcados com anticorpos de superfície: CD3, CD4, CD8, CCR7 e CD45RA e anticorpos intracelulares: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACS Canto II e analisadas no programa Flowjo®. Dessa análise observamos algumas populações de células T CD4 e CD8 funcionais durante o tratamento. Células T CD4 produtoras de IL-2 e TNF- $\alpha$  forma evidentes no início do tratamento, enquanto que as T CD4 produtoras de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram observadas ao longo do tratamento. Células T CD4 multifuncionais produtoras de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  foram observadas no final do tratamento. Já as células TCD8 produtoras de IL2 e TNF- $\alpha$  foi evidente com 21 dias após o tratamento e células produtoras de IL-2 e IFN- $\gamma$ , 30 dias após o tratamento. Células T CD8 multifuncionais que expressam IL-2, TNF- $\alpha$ . e IFN- $\gamma$  foram evidentes 60 e 90 dias após tratamento. Esses resultados mostram a participação de células T funcionais durante o tratamento dos pacientes com LV, o que sugere que a melhora clínica dos pacientes pode estar relacionada com a participação dessas células.

**Palavras-chave:** Imunidade Celular; Imunofenotipagem; Leishmaniose Visceral

## Abstract

### **Immunophenotypic Characterization of T-Lymphocytes in Visceral Leishmaniasis Patients. Lorranny Santana Rodrigues, 2019.**

Visceral Leishmaniasis (VL) is a disease caused by the protozoan of the genus *Leishmania*, if misdiagnosed or not treated early can lead to death. The establishment of the VL clinical form is closely associated with the immune response triggered in the host. Adaptive immunity and modulation of the T cell profile is crucial for the development of an efficient immune response against the parasite. The quality of the response of CD4 and CD8 T cells is based on their capacity of effective response and memory and it is mainly related to the production of three cytokines: IFN- $\gamma$ , IL-2 and TNF- $\alpha$ . The aim of the present study was to evaluate the functionality of T cells involved in suppressing the immune response of patients with VL and in restoring that response during and after treatment. Peripheral blood mononuclear cells from patients with VL and healthy controls were cultured and stimulated in vitro with Soluble Leishmania Antigen (SLA) for 18 hours and marked with surface antibodies: CD3, CD4, CD8, CCR7 and CD45RA and intracellular antibodies: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2. The samples were acquired using the BD FACS Canto II flow cytometer and analyzed using the Flowjo® program. From this analysis, we observed some populations of functional CD4 and CD8 T cells during treatment. IL-2 and TNF- $\alpha$  producing CD4 T cells were evident at the beginning of treatment, while IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  producing CD4 T cells were observed throughout the treatment. Multifunctional CD4 T cells producing IL-2, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  were observed at the end of treatment. IL2 and TNF- $\alpha$ -producing TCD8 cells were evident 21 days after treatment and IL-2 and IFN- $\gamma$ -producing cells 30 days after treatment. Multifunctional CD8 T cells that express IL-2, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  were evident 60 and 90 days after treatment. These results show the participation of functional T cells during the treatment of patients with VL, which suggests that the clinical improvement of patients may be related to the participation of these cells.

**Key-words:** Cellular Immunity, Immunophenotyping, Visceral Leishmaniasis

### Lista de Ilustrações

**Figura 1** – Modelo de diferenciação em células T de memória e efetoras em T CD4 e T CD8 (Adaptada de Seder *et al.* Nature reviews/ Immunology, 2008).

**Figura 2** – Estratégia de definição de janela de identificação (gate) para análise da população de células T multifuncionais utilizando a citometria de fluxo multiparamétrica.

**Figura 3** – Frequência de células T CD3/CD4 de pacientes antes [D0], durante e depois do tratamento [D7-D180], e controles saudáveis.

**Figura 4** – Frequência e iMFI das células T CD4 produtoras de IL-2 ou TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$ .

**Figura 5** – Frequência células T CD4 produtoras das citocinas IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Gráficos de frequências de células T CD4 produtoras de citocinas, fração da resposta total compreendendo células que expressam uma, duas ou três citocinas.

**Figura 6** – Frequência de células T CD3/CD8 de pacientes antes [D0], durante e depois do tratamento [D7-D180], e controles saudáveis.

**Figura 7** - Análise de populações de células T CD8<sup>low</sup> e T CD8<sup>high</sup>. Gráfico em Dot Plot representativo das subpopulações CD8<sup>high</sup> e CD8<sup>low</sup>. Análise da frequência de células T CD8<sup>high</sup> e CD8<sup>low</sup> em relação aos dias de tratamento (D0-D180).

**Figura 8** - Frequência e iMFI das células T CD8 produtoras de IL-2 ou TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$ .

**Figura 9** - Frequência células T CD8 produtoras das citocinas IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Gráficos de frequências de células T CD8 produtoras de citocinas, fração da resposta total compreendendo células que expressam uma, duas ou três citocinas.

## SUMÁRIO

<b>Resumo .....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>iv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>6</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1. Aspectos gerais da Leishmaniose Visceral.....</b>	<b>8</b>
<b>2.2. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral .....</b>	<b>9</b>
<b>2.3. Aspectos imunológicos da Leishmaniose Visceral.....</b>	<b>10</b>
<b>2.3.1. Perfil funcional de células T CD4 e CD8 na Leishmaniose Visceral.....</b>	<b>11</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Objetivo Geral .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>14</b>
<b>4. CASUÍSTICA E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
<b>4.1. Seleção da Amostra .....</b>	<b>15</b>
<b>4.2. Avaliação das células envolvidas na resposta imune por citometria de fluxo .....</b>	<b>15</b>
<b>4.3. Análise de Linfócitos T por Citometria de Fluxo .....</b>	<b>16</b>
<b>4.4. Análise Estatística.....</b>	<b>18</b>
<b>4.5. Considerações Éticas.....</b>	<b>18</b>
<b>4.6. Fonte Financiadora do Projeto .....</b>	<b>18</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>19</b>
<b>5.1. Análise do percentual de células T CD4 .....</b>	<b>19</b>
<b>5.2. Análise das células T CD4 produtoras de IFN-<math>\gamma</math>, TNF-<math>\alpha</math> e IL-2 .....</b>	<b>20</b>
<b>5.3. Análise das células T CD4 funcionais .....</b>	<b>22</b>
<b>5.4. Análise do percentual de células T CD8 .....</b>	<b>24</b>
<b>5.4.1. Análise do percentual de subpopulações T CD8 .....</b>	<b>24</b>
<b>5.5. Análise das células T CD8 funcionais .....</b>	<b>25</b>
<b>5.6. Análise das células T CD8 produtoras de IFN-<math>\gamma</math>, TNF-<math>\alpha</math> e IL-2 .....</b>	<b>27</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>32</b>

<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>33</b>
<b>Referências .....</b>	<b>34</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>42</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

A leishmaniose visceral (LV) representa um espectro de doenças provocadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, do complexo *Leishmania donovani* (Jamal, 2017; WHO, 2019), sendo uma zoonose de caráter mundial que afeta cerca de 200 a 400 mil pessoas todo ano (WHO, 2019). No Brasil, o agente etiológico da LV é representado pela espécie *Leishmania (L.) infantum*, que é transmitida por um inseto flebotomíneo a um hospedeiro mamífero (Medina-Colorado, 2017).

A doença pode se apresentar desde formas subclínicas até a forma sintomática com características clínicas bem definidas como hepatoesplenomegalia, febre prolongada, perda de peso, anemia, pancitopenia, linfadenomegalia e presença de parasitos em abundância em diversos órgãos, como medula óssea, fígado e baço (Araújo-Santos, 2017; WHO, 2019; Ministério da Saúde, 2019).

Os mecanismos imunológicos, assim como a relação entre o sistema imune e as formas clínicas da LV têm sido estudados com base na avaliação do perfil celular e produção de citocinas em diversos tecidos envolvidos na infecção (Costa et al., 2012; Griensven & Viro, 2019). A imunidade à infecção por *Leishmania* ssp. também em modelos experimentais como em humanos é predominantemente mediada por células T CD4 (Burza, Croft & Boelaert, 2018). A resposta do hospedeiro contra o parasito ocorre principalmente através da expressão de citocinas por células T que promovem uma melhor capacidade leishmanicida nas células infectadas (Rodrigues et al., 2016; Pérez-Cabezas et al., 2019).

Na literatura, há uma dicotomia bem definida entre as funções realizadas por células T helper (Th) 1 e Th2 na LV. Na resposta Th1 há a expressão de citocinas que levam a uma melhor atividade leishmanicida do organismo e conseqüentemente a um melhor perfil funcional na infecção. No perfil de resposta Th2 ocorre a indução de citocinas anti-inflamatórias e esse perfil está relacionado a uma maior gravidade da doença (Dayakar et al., 2019; Jawed et al., 2018; Medina-Colorado et al., 2017; Antonelli et al., 2004). Apesar da definição clara das respostas Th1 e Th2, pouco se sabe do perfil funcional das células T CD4 na LV. A qualidade da resposta do tipo Th1 está relacionada com o a produção de citocinas por células T CD4 (De Luca & Macedo, 2016, Seder et al., 2008).

Trabalhos com vacinas para LV mostram que o desenvolvimento de uma proteção ou resistência bem sucedida requer a geração de células T CD4 funcionais produtoras de três citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  (Santos, 2017). Células T produtoras de IL-2 ou produtoras de IL-2 e TNF- $\alpha$ , podem ser classificadas como células de longa duração capazes de responder rapidamente a um segundo encontro de antígeno (células de memória). Células T que produzem apenas IFN- $\gamma$  podem ser consideradas como efetoras terminais (De Luca & Macedo, 2016). A produção de determinados tipos de citocinas define a funcionalidade da célula T o que determina a qualidade da resposta Th1. Células T funcionais estão associadas a uma resposta mais efetora e de memória e sua participação pode estar associada a melhora da resposta do paciente durante o tratamento.

Vale ressaltar que a maioria dos trabalhos com LV em humanos mostram o perfil de células T somente antes e depois do tratamento (Hailu et al., 2005; Pérez-Cabezas et al., 2019). O acompanhamento de células T funcionais, antes e durante o tratamento, pode servir para esclarecer a melhora do paciente ao longo do tratamento, podendo até explicar porque alguns desenvolvem a doença de forma mais grave, enquanto que outros pacientes a evolução é mais branda.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Aspectos gerais da Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV) é uma enfermidade parasitária crônica provocada pelo protozoário flagelado do gênero *Leishmania*. O protozoário é da família Trypanosomatidae que possui corpo geralmente alongado, contendo um único flagelo. A leishmania é transmitida ao hospedeiro mamífero através da picada da fêmea de insetos flebotomíneo, *Lutzomyia Longipalpis* conhecido popularmente como mosquito palha (Guimarães-e-Silva et al., 2017).

No Brasil, o principal patógeno circulante é o *Leishmania infantum*. O ciclo da doença ocorre a partir da inoculação de parasitas por mosquitos hematófagos, as formas deste parasito possuem uma morfologia arredondada chamada de amastigotas. No trato gastrointestinal do inseto os parasitos se diferenciam para formas mais alongadas e com flagelo nomeada de formas promastigotas estas conferem uma maior mobilidade dos parasitos (Ministério da Saúde, 2019, Torres-Guerrero et al., 2017).

Os hospedeiros mamíferos da LV, que podem ser seres humanos, cachorros ou raposas, são infectados pelo parasito em suas formas flageladas promastigotas. Os promastigostas atingem o tecido subcutâneo e são fagocitados por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Nessas células, a leishmania se transforma em formas amastigotas, se multiplicam e invadem outros tecidos como fígado, baço e medula óssea (Burza, Croft & Boelaert, 2018; Pace, 2014).

A infecção pode apresentar-se desde formas subclínicas e não sintomáticas até as formas sintomáticas com aparecimento de manifestações clínicas características como febre alta e prolongada, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia e pancitopenia. Se não tratada, a LV é considerada letal em até 95% dos casos (WHO, 2019; Pace, 2014). A *Leishmania* possui mecanismos de evasão que dificultam a morte deste parasito através da resposta imune convencional das células da imunidade inata (Araújo-Santos, et al., 2017; Ministério Da Saúde, 2019).

As drogas de escolha para o tratamento medicamentoso são antimoniato de N-metil glucamina, anfotericina B lipossomal e desoxicolato de anfotericina B. O tratamento para LV tem se mostrado altamente eficiente na reversão das complicações diretas da doença com uma

taxa de sobrevivência de 90 a 97%, entretanto o risco de toxicidade, resistência e os altos custos são empecilhos que devem ser levados em consideração (WHO, 2019; Ministério da Saúde, 2019; Adler-Moore et al., 2019). Dessa forma, vários estudos direcionam a atenção para a necessidade de prevenção da doença com a utilização de metodologias de controle de zoonoses (Prestes-Carneiro et al., 2019) e vacinas (Kumar & Samant, 2016) e o desenvolvimento de novas drogas que possibilitem um melhor custo-benefício.

## **2.2. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral**

No mundo, mais de 90% dos casos da doença estão concentrados principalmente em 10 países: Bangladesh, Brasil, China, Etiópia, Índia, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão. No velho Mundo, o complexo *Leishmania donovani* é o principal agente etiológico, enquanto que o *Leishmania infantum* está presente nos países do Novo Mundo. Esta doença afeta entre 200 a 400 mil pessoas por ano (WHO, 2019; Georgiadou, Makaritsis & Dalekos, 2015).

A LV, no Brasil, é registrada em 23 unidades federativas e em todas as regiões do país, sendo a região Nordeste com o maior número de casos (Ministério da Saúde, 2019). A Organização Mundial da Saúde (OMS) (2019) registrou o aumento de 31,2% no número de casos no Brasil entre os anos de 2016 e 2017 e uma redução de 15,5% em 2018. Já dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) revelam que de 2007 a 2017 foram registrados 41.204 casos confirmados de LV com 2.735 óbitos nesse mesmo período (Ministério da Saúde, 2019). No país, os casos são mais prevalentes em adultos entre 20 e 49 anos e crianças menores que 5 anos de idade, gerando impacto na população economicamente ativa e nas futuras gerações (World Health Organization, 2019).

O Estado de Sergipe é a unidade federativa que apresentou maior índice de letalidade do país (14,5%) em 2018 (Ministério da Saúde, 2019), sendo o sétimo estado com maior coeficiente de incidência por 100.000 mil habitantes no país. Estes dados geram preocupação uma vez que a LV vem se expandindo no país. Os casos de LV em Sergipe estão concentrados principalmente nos municípios de Aracaju e cidades da grande Aracaju como Nossa Senhora do Socorro, São Cristóvão e Barra dos Coqueiros com persistência das notificações entre os anos de 2010 a 2018 (Ministério da Saúde, 2019). Na cidade de Aracaju, os casos apresentam relação endêmica em bairros da zona norte onde os índices socioeconômicos são mais baixos, além disso, também se apresentam em bairros da zona de expansão (Araújo, et al., 2017; Nunes & Campos et al., 2016).

Os fatores que estão ligados a ocorrência dessa doença são de cunho socioambiental, má nutrição, mudanças de comportamento e movimento populacional (World Health Organization, 2019). Embora esta doença seja caracteristicamente de regiões com clima tropical, não há relação entre a presença do vetor infectado e as regiões em que ocorrem mudanças bioclimáticas (Mota et al., 2019). Assim, a migração da população das zonas rurais para as zonas urbanas, que possibilitou uma mudança de perfil das características endêmicas da enfermidade é um dos principais motivos para o aumento da incidência dessa doença. Além disso, condições insalubres de esgotamento sanitário e baixo índice socioeconômico são fatores relacionados a LV (Lemos et al., 2019; Nunes & Campos et al., 2017; Araújo, 2017).

### **2.3. Aspectos imunológicos da Leishmaniose Visceral**

O estabelecimento da forma clínica da LV está intimamente associado à resposta imunológica desencadeada no hospedeiro. Estudos revelam que imunidade adaptativa e a modulação do perfil de células T é crucial para o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente contra o parasito (Roatt, et al., 2014; Rodrigues, et al., 2016).

Em humanos e modelos experimentais a imunidade na infecção por *Leishmania* spp é predominantemente mediada por linfócitos T. Este parasito apresenta uma ampla variedade antigênica que permite a interação com as células do hospedeiro, sendo estas capazes de gerar sinais desencadeadores para liberação de mediadores, ativando células da resposta imune inata na tentativa da eliminação dos parasitos (Jawed, Dutta & Majumdar, 2019).

A expressão de citocinas por células T possibilita a ativação dos macrófagos infectados pelo parasito e posteriormente a eliminação deste. A presença de citocinas pró-inflamatórias como Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) e Tumoral Necrosis Factor-alfa (TNF- $\alpha$ ) aumenta a atividade leishmanicida de macrófagos (Rodrigues, et al., 2016; Rossi e Fasel, 2017). O IFN- $\gamma$  induz ativamente a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS – em inglês) e óxido nítrico (NO – em inglês) pelos macrófagos, e estimula a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 e por outro lado, bloqueia a expressão de IL-10 (Daykar et al., 2019). Já o TNF- $\alpha$  desempenha funções na resposta contra LV como ativação de macrófagos para indução de morte de amastigotas, indução da produção de NO e inibição de visceralização (Singha et al., 2016; Tripathi, Singh & Naik, 2007).

Estudos mostram que em indivíduos infectados que não desenvolvem a doença (assintomáticos), há uma resposta imunológica protetora mediada por citocinas pró-

inflamatórias como INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-2, levando a um padrão de resposta T helper (Th) 1. E mais recentemente IL-17 e IL-22, produzidas por células Th17, que desempenham um papel complementar na proteção contra a LV (Rodrigues et al., 2016; Dayakar et al., 2019; Jawed, Dutta & Majumdar, 2019). Enquanto isso, pacientes sintomáticos desenvolvem um perfil imunológico caracterizado pela expressão de citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 por células Th2 na fase ativa da doença.

Alguns trabalhos apontam que ocorre uma associação entre as subpopulações de células T regulatórias (Treg) e a imunossupressão da atividade antileishmania em LV. Além das células clássicas T CD4 e T CD8, outras células como Th17 e Treg também apresentam importantes funções na progressão da doença. Alguns autores relatam que a células Th17 possuem papel protetor complementar ao perfil Th1 (Terrazas et al., 2017; Nascimento et al., 2015; Banerjee, et al., 2016; Pitta et al., 2009). Já as células Treg agem na supressão da resposta imune, caracterizada pela produção da citocina anti-inflamatória IL-10. A principal função da célula Treg está relacionada à reversão do processo inflamatório uma vez que este pode causar danos teciduais graves se exacerbado (Rai, et al., 2012).

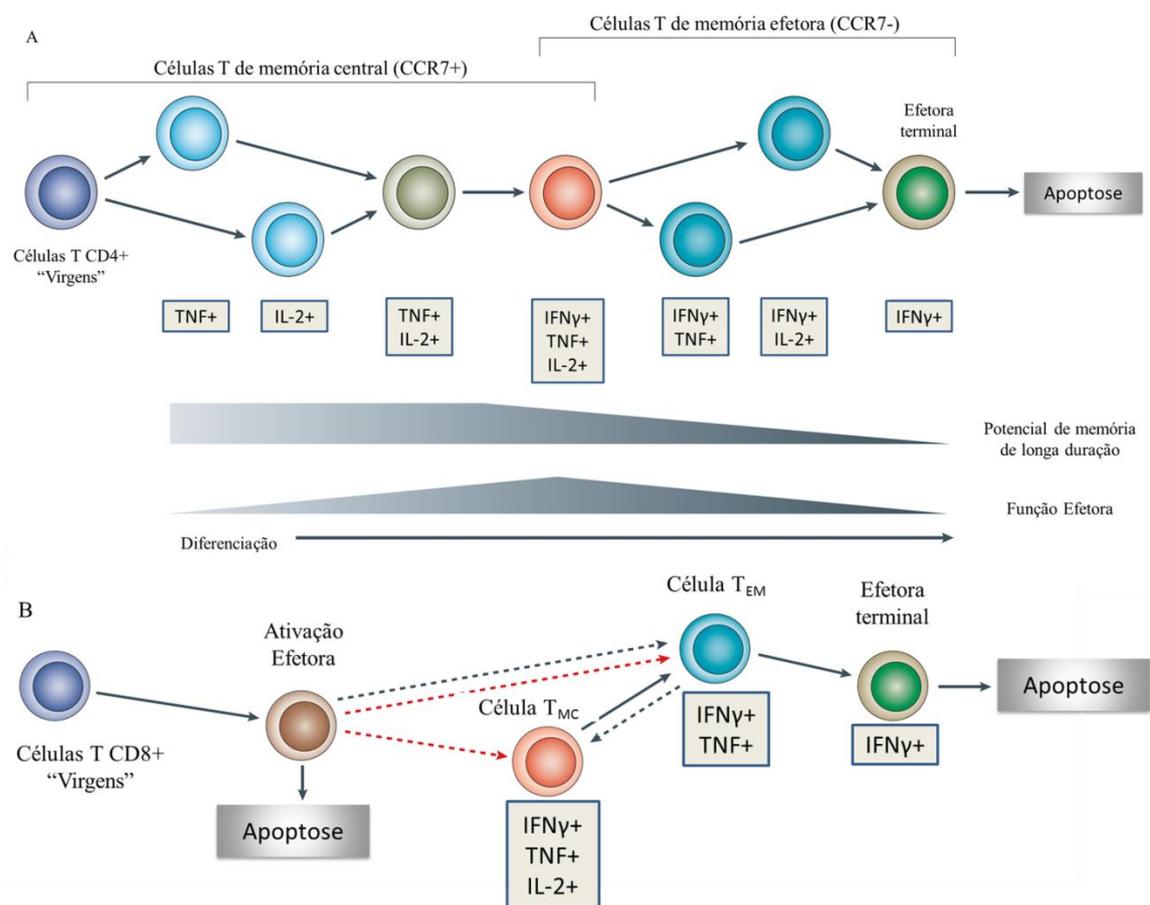
### **2.3.1. Perfil funcional de células T CD4 e CD8 na Leishmaniose Visceral**

Células T CD4 podem se diferenciar em subtipos de células efetoras chamadas de células Th que desempenham diferentes funções a depender da natureza e quantidade do antígeno, do tipo de célula apresentadora de antígeno, e das citocinas presentes no ambiente da estimulação (Egui et al., 2018; Goto & Prianti, 2009). Estes perfis de células podem ser Th1, induzido pela presença da Interleucina 12 (IL-12) e expressão de moléculas pró-inflamatórias como INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Já células Th2 se diferenciam através da presença de IL-4 e Th17 presente a partir da expressão de IL-23 (Antonelli et al., 2004).

Na LV, há uma dicotomia bem definida pela literatura entre as funções realizadas por células Th1 e Th2. As células Th1 desempenham um papel protetor na doença enquanto células Th2 apresentam um papel supressor (Bretscher, 2019; Castellano et al., 2009; Darrah, Pate & De Luca, 2007). Entretanto diversos autores pontuam que a resposta do organismo contra o patógeno é mais complexa que apenas proteção e supressão (Pérez-Cabezas et al., 2019).

Apesar da definição clara de perfis celulares, pouco se sabe do perfil funcional das células T CD4 durante a disseminação da LV. A qualidade da resposta do tipo Th1 está relacionada com o tipo de citocinas que a células T CD4 podem produzir. A funcionalidade das

células T CD4 é baseada na sua capacidade efetora e de memória e está relacionada com a produção de três citocinas: IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ . Inicialmente a ativação de células T leva a produção de IL-2 ou produção de IL-2 e TNF- $\alpha$ . Associadas a expressão de CCR7 essas células são classificadas como células de memória central, por serem consideradas de longa duração, capazes de responder rapidamente a um segundo encontro com o antígeno. Já as células T CD4 que expressam IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  são consideradas como multifuncionais por serem células de memória com uma alta capacidade efetora (De Luca & Macedo, 2016, Seder et al., 2008). Por fim, as células T efectoras terminais produzem somente IFN- $\gamma$  e são levadas à perda de funcionalidade e potencial de memória caracterizadas como células de vida curta (Figura 1A) (Valian et al., 2013; Seder et al., 2008).



**Figura 1:** Modelo de diferenciação em células T de memória e efectoras em T CD4 e T CD8 (Adaptada de Seder *et al.* Nature reviews/ Immunology, 2008).

Trabalhos com infecções por micro-organismos e parasitárias já apontam a participação das células T funcionais para a melhora da doença, inclusive na Leishmaniose. Um estudo com leishmaniose tegumentar, mostrou que células de PBMC de pacientes com leishmaniose

cutânea produzem células T CD4 multifuncionais produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  quando estimulados com antígeno bruto de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. (Macedo et al., 2012). Em trabalho com vacinas para a LV mostrou que epítomos de *L. donovani* foram capazes de induzir uma resposta imune do tipo Th1. Nesse estudo observou que o PBMC de pacientes curados, estimulados com esses epítomos apresentaram células TCD4 funcionais produtoras de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 (Santos, et al., 2017).

Além das células T CD4 outra importante célula para o estudo da funcionalidade é a célula TCD8. As células T CD8, quando ativadas por IFN- $\gamma$  diferenciam-se rapidamente em diversos perfis funcionais de acordo com sua ação citotóxica e produção de citocinas. As células T CD8 de memória central são altamente funcionais com produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2. Já as células T CD8 de memória efetora expressam IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e células T CD8 efetoras terminais são levadas à apoptose com uma menor capacidade funcional (Seder et al., 2008) (Figura 1). Embora pouco abordadas em infecções por leishmania, as células T CD8 multifuncionais tem grande importância em infecções não virais como malária e esquistossomose (Heide et al., 2019; Adachi et al., 2013).

Células T funcionais estão associadas a uma resposta mais efetora e de memória e sua participação pode estar associada a melhora da resposta do paciente durante o tratamento. Por isso é de grande relevância a investigação do aparecimento de células T de memória e células T de memória funcionais antes, durante e após o tratamento. A maior parte dos trabalhos com LV mostram a participação de células funcionais na resposta a vacina, somente antes e depois do tratamento. A descoberta de células T funcionais durante o tratamento dos pacientes poderá esclarecer por que alguns pacientes desenvolvem a doença de forma mais grave, enquanto outros pacientes a LV evolui de forma mais branda.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar funcionalidade de células T CD4 e T CD8 envolvidas na supressão da resposta imunológica de pacientes com LV e a restauração desta resposta durante e após o tratamento.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar os dados clínicos e laboratoriais de pacientes com LV antes, durante e após o tratamento.
- Avaliar o perfil fenotípico das células T CD4 e T CD8 através da expressão de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 de pacientes com LV antes, durante e após o tratamento.
- Avaliar o perfil fenotípico das células T CD4 e T CD8 através da análise combinada das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 de pacientes com LV antes, durante e após o tratamento.

## 4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 4.1. Seleção da Amostra

Foram selecionados 13 pacientes com LV clássica sintomáticos (5 indivíduos do sexo feminino e 8 do sexo masculino), também foi coletado o sangue periférico e realizada a avaliação dados clínicos e laboratoriais dos pacientes LV (Tabela 1) nos períodos antes, durante e após o tratamento (dias 0, 7, 14, 21, 30, 60, 90 e 180), o sangue periférico foi utilizado para separação de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC – em inglês). Os pacientes apresentavam idades entre 20 e 59 anos com média de idade de 39,8 anos. Quanto ao tratamento da LV, 5 pacientes fizeram uso de Antimoniato de Meglumina (Glucantime®) por 21 dias e 8 pacientes fizeram uso de Anfotericina B Lipossomal por 7 dias. **Os critérios de diagnósticos:** Quadro clínico compatível com LV (febre, hepatoesplenomegalia, anemia), com sorologia positiva para Calazar ou teste rápido rK39 positivo, ou ainda mielograma ou cultura para Leishmania do aspirado de medula óssea positivos. O sangue foi cedido pelos pacientes sintomáticos atendidos no Hospital Universitário-HU/UFS pelo Dr. Roque Pacheco de Almeida. As técnicas para aferição dos tamanhos de baço e fígado para caracterizar a presença de hepatoesplenomegalia foram utilizadas de acordo com a descrição de Porto & Porto (2013). O fígado foi medido da sua borda palpada até o rebordo costal direito, posicionando a fita métrica na linha mamilar enquanto o baço é medido da sua borda até o rebordo costal esquerdo, posicionando a fita métrica na linha mamilar

Foram adotados os seguintes **critérios de seleção:**

**Sintomáticos:** Indivíduos de idade entre 20 e 60 anos, clinicamente caracterizados como portadores de LV clássica por apresentarem a tríade característica da LV, isto é, febre, hepatoesplenomegalia e pancitopenia. Além disso, a positividade do teste rápido rK 39, ou do mielograma do aspirado de medula óssea.

**Curados:** Indivíduos que após 180 dias de tratamento foram considerados curados.

Os **critérios de exclusão** foram: Presença de doenças associadas agudas ou crônicas, como o uso de imunossupressores e AIDS.

Para o grupo de indivíduos controles saudáveis foram selecionadas pessoas de idades entre 20 e 60 anos moradores de regiões endêmicas que não possuíam histórico de doenças infecciosas e tratamentos com imunossupressores no momento da coleta. Esse grupo foi submetido ao teste de reação de Montenegro e todos obtiveram resultado negativo (DTH<sup>-</sup>).

#### **4.2. Avaliação das células envolvidas na resposta imune por citometria de fluxo**

PBMC de pacientes sintomáticos (n=13) foram separados por centrifugação em gradiente de Fycoll-Hipaque 1077 (Pharmacia AB, Upsalla, Sweden) nos dias 0, 7, 14, 21, 30, 60, 90 e 180 após o tratamento. As amostras de PBMC foram suspensas em meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, New York, USA) e colocadas em placas de 48 poços (1 x 10<sup>6</sup> células/poço). As células foram centrifugadas e imediatamente transferidas para meio RPMI 1640 (Sigma) gelado contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/streptomicina e mantidas a 4 °C até o uso. Células foram mantidas em meio RPMI ou estimuladas com Antígeno Solúvel de Leishmania (SLA – em inglês) por 18 horas em estufa em condições de 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Durante o período de estimulação, foram adicionados às células o Kit de permeabilização e fixação de citocinas GolgiPlug® (BD Biosciences). Após este processo, as células foram incubadas com 100 µl de solução de bloqueio de receptores FC (RPMI contendo 2% de soro de carneiro inativado e 2% de SFB) por 20 minutos a 4 °C. Após lavagem e centrifugação de 1500 rpm por 5 minutos, as células foram marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos que identificam os marcadores de superfície: CD3 PeCy7, CD4 V500, CD8 Pe-Cy5, CD45 APCCy7 e CCR7 PE. As células foram incubadas com esses anticorpos por 30 minutos e em seguida, lavadas e centrifugadas. Após esse processo foi adicionado 50 ul/poço do kit de permeabilização Citofix/Citoperm® (BD Biosciences) para a marcação dos anticorpos intracelulares. Após a fixação as células foram incubadas com os anticorpos: IFN-γ Alexa Fluor 488, TNF-α Alexa Fluor 647, IL-2 BV42 por 30 min. Após esse período, as células foram lavadas, centrifugadas e aquisição foi realizada em Citômetro de Fluxo BD FACSCanto II® pelo software FACSDiva.

#### **4.3. Análise de Linfócitos T por Citometria de Fluxo**

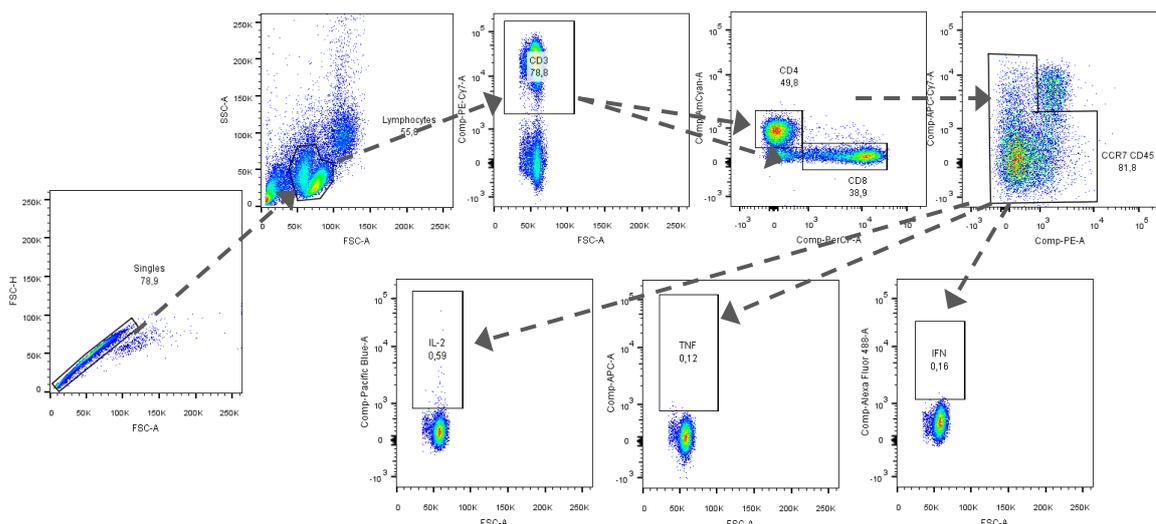
Para analisar os dados obtidos por citometria de fluxo, foi utilizado o *software* FlowJo (Flow Cytometry Analyses Software, BD Biosciences, EUA). A população de linfócitos foi definida a partir da criação de uma região em gráfico de *dot plot* baseado no tamanho do eixo “x” (FSC: *foward scatter*) versus granulosidade das células (SSC: *side-scatter*) no eixo “y”. Dentro dessa região, foram analisados linfócitos T (CD3/CD4 e CD3/CD8).

Com a utilização dos marcadores CCR7 e CD45RA é possível identificar células T virgens (CCR7+/CD45+), células T de memória central (CCR7+/CD45-), células T de memória efetora (CCR7-/CD45-) e células T de memória terminal (CCR7-/CD45+). Assim, para essa análise excluímos as células T virgens, sendo selecionadas para as análises das citocinas as células de memória e efetora.

Após a seleção das células T de memória e efetora foi realizada a análise referente a produção de citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2. Separando as regiões positivas para TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2, foi feita uma análise combinatória onde se pode identificar células T produtoras de uma, duas ou três citocinas simultaneamente, visando identificar as células multifuncionais.

Para este estudo foram analisadas as frequências das populações (%) e a Média de Intensidade e Fluorescência Integrada (iMFI) de células produtoras de cada citocina. A iMFI é um parâmetro muito utilizado que reflete a multiplicação da frequência de células pela Média de Intensidade e Fluorescência (MFI). A MFI representa a produção direta de citocinas por cada célula.

Para a análise das frequências das populações (%) e do iMFI, foi subtraído a amostra que não recebeu estímulo com SLA do mesmo paciente (considerado controle basal).



### Análise de múltiplas citocinas produzidas por células T CD4 e T CD8 – Painel 1

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	+	+	+	-	+	-	-
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	+	+	-	+	-	+	-
<b>IL-2</b>	+	-	+	+	-	-	+
<b>Produção</b>	<b>Tripla</b>	<b>Dupla</b>		<b>Única</b>			

**Figura 2:** Estratégia de definição de janela de identificação (gate) para análise da população de células T multifuncionais utilizando a citometria de fluxo multiparamétrica. Os linfócitos foram selecionados no FSC-A versus SSC-A seguido por marcação de CD3<sup>+</sup> e subsequentemente, em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Após foram excluídas as populações de células T virgens (CCR7<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>). Para cada tipo de célula T foi avaliado as citocinas: TNF- $\alpha$ , IL-2 e IFN- $\gamma$ . Boolean gate foi realizado para gerar as combinações entre a expressão de citocinas e os tipos de linfócitos. Pode-se observar diferentes fenótipos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> quanto a expressão das citocinas. Essa análise foi realizada utilizando o software FlowJo.

#### **4.4. Análise Estatística**

Os dados foram avaliados quanto às diferenças estatísticas, utilizando diferentes testes a depender dos resultados obtidos. Para múltiplas comparações foi utilizado o teste ANOVA, caso os dados tenham distribuição normal, ou de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. Intervalos de confiança de 95% foram calculados, e valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises dos dados foram realizadas utilizando o programa estatístico Graph Pad Prism versão 7.

#### **4.5. Considerações Éticas**

Este projeto envolve pesquisa com seres humanos, desta forma, todos os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1), confirmando a sua participação. O uso destas células foi aprovado pelo comitê de ética do HU/UFS sob o protocolo CAAE-0123.0.107.000-11 (Anexo 2).

#### **4.6. Fonte Financiadora do Projeto**

Os recursos financeiros para realização desta pesquisa estão inclusos no orçamento de projeto financiado pelo CNPq, sob coordenação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Amélia Maria Ribeiro de Jesus e do Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida.

## 5. RESULTADOS

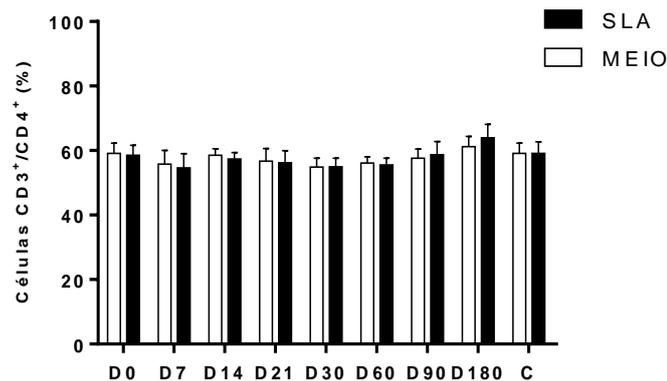
Todos os pacientes tiveram o diagnóstico de LV confirmado através do teste rápido rK39. A análise de dados laboratoriais obtidos mediante ao acompanhamento clínico estão descritos na Tabela 1. No D0 os pacientes apresentaram sinais típicos de esplenomegalia, hepatomegalia, plaquetopenia, neutropenia, linfopenia e valores diminuídos de hematócrito e hemoglobina. Já no período inicial de tratamento (D7-D30), permaneceu o aumento do fígado e baço. Após o período de tratamento medicamentoso (D60-D180) os pacientes se recuperaram ou mostraram sinais de recuperação desses parâmetros, observou-se um aumento significativo (D0 com D60 –  $p=0,043$ ; D0 com D90 –  $p=0,014$ ; D0 com D180 –  $p=0,0385$ ) em relação as médias de todos os parâmetros clínicos avaliados.

<i>Achados clínicos</i>	<i>D0</i>	<i>D7</i>	<i>D14</i>	<i>D21</i>	<i>D30</i>	<i>D60</i>	<i>D90</i>	<i>D180</i>
	Média ± SD							
<i>Baço (cm)</i>	4,8 ± 4,9	3,6 ± 4,3	2 ± 3,4	2,4 ± 3,3	1,6 ± 2,9	0,45 ± 1,5	0,45 ± 1,5	0 ± 0
<i>Fígado (cm)</i>	3,7 ± 3,1	2,2 ± 2,4	1,5 ± 2,2	2,6 ± 3,2	2,9 ± 3,2	2,1 ± 3,0	0,27 ± 0,9	0,1 ± 0,3
<i>Hemoglobina (gr/dl)</i>	8,7 ± 1,4	8,7 ± 1,5	10 ± 1,3	10,2 ± 1,8	11,5 ± 1,7	13,5 ± 0,8	13,8 ± 1,6	14,0 ± 1,0
<i>Hematócrito (%)</i>	25,6 ± 3,4	26,8 ± 4,2	30,5 ± 4,1	31,8 ± 5,0	34,9 ± 5,9	40,3 ± 2,0	41,6 ± 5,0	42,9 ± 2,9
<i>Leucócitos /mm<sup>3</sup></i>	2266 ± 1087	2873 ± 1560	5123 ± 2490	5426 ± 3258	6239 ± 1129	6441 ± 1407	6996 ± 2189	6539 ± 1522
<i>Neutrófilos /mm<sup>3</sup></i>	1369 ± 1374	2127 ± 2110	2824 ± 2467	2919 ± 2801	3601 ± 1227	3385 ± 970	4072 ± 1467	3508 ± 1124
<i>Eosinófilos /mm<sup>3</sup></i>	29,1 ± 41,1	76,8 ± 79,2	202,8 ± 204,3	237 ± 347,2	429,9 ± 545,6	388 ± 388,8	320,6 ± 334,7	308,8 ± 223,7
<i>Linfócitos /mm<sup>3</sup></i>	872,7 ± 398,5	1073 ± 481,7	1453 ± 509,2	1650 ± 474,2	1738 ± 587,3	2212 ± 870,1	2062 ± 892,9	2144 ± 838
<i>Monócitos /mm<sup>3</sup></i>	280,2 ± 161,2	443,8 ± 465,3	523 ± 219,6	554,3 ± 315,9	458,2 ± 191,1	491,7 ± 140,6	492,5 ± 121,7	527,2 ± 148
<i>Plaquetas x10<sup>3</sup>/μl</i>	102,2 ± 47,0	180,1 ± 109,9	196,4 ± 86,5	218,6 ± 112,8	260,0 ± 89,1	260,6 ± 89,1	262,3 ± 78,1	258,6 ± 63,1

**Tabela 1:** Dados clínicos e laboratoriais de pacientes com LV, Aracaju, 2019

### 5.1. Análise do percentual de células T CD4

A figura 3 mostra o percentual de células T CD4 dos pacientes antes, durante e após o tratamento com e sem estímulo. Podemos observar que não houve alteração do percentual de células T CD4 ao longo do tratamento, e que o percentual dessas células foi semelhante em indivíduos saudáveis.



**Figura 3:** Frequência de células T CD3/CD4 de pacientes (n=13) antes [D0], durante e depois do tratamento [D7-D180], e controles saudáveis (n=12).

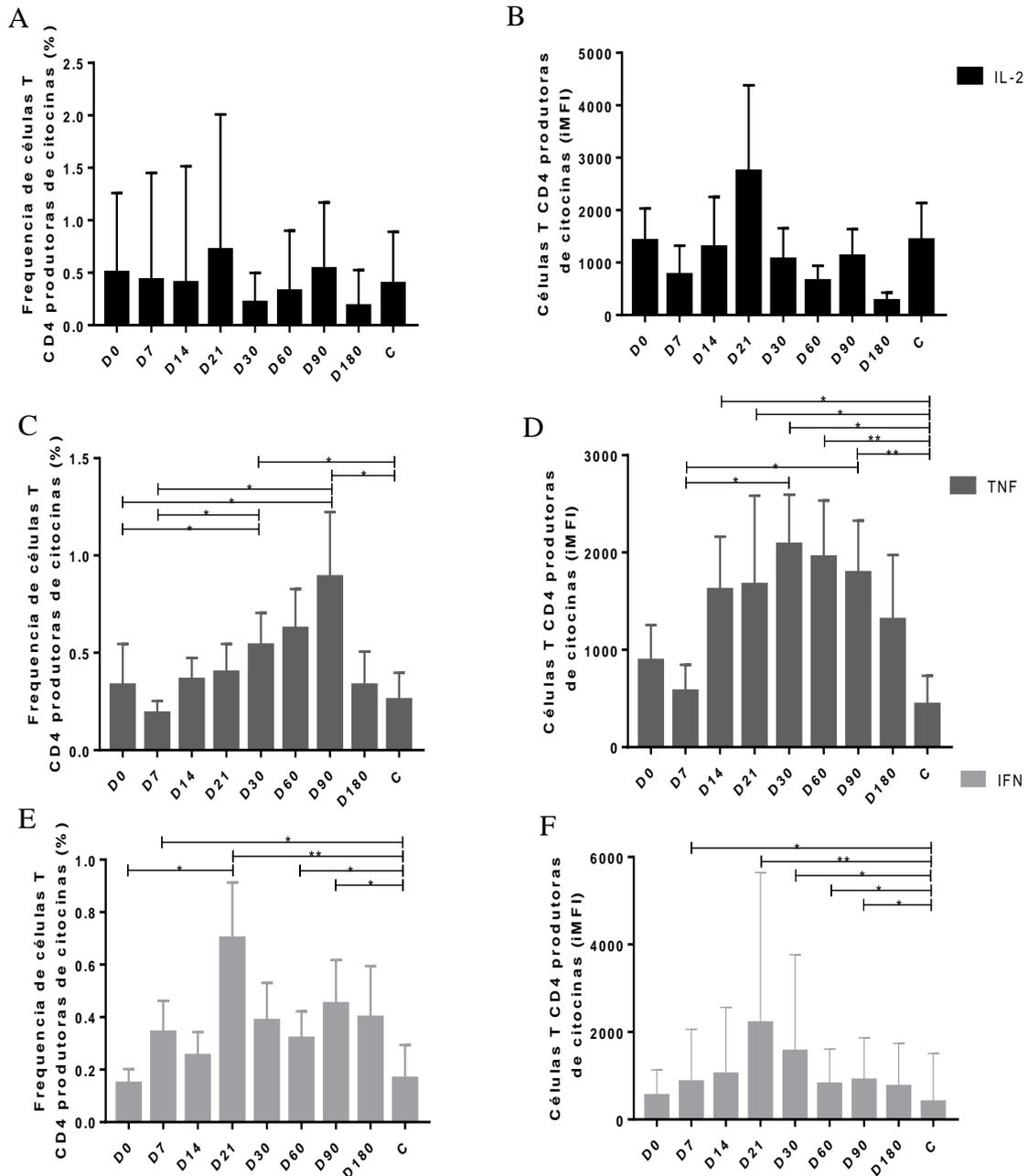
## 5.2. Análise das células T CD4 produtoras de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ e IL-2

Após a análise do percentual de células T CD4 foi avaliada a frequência de células T quanto a produção das citocinas IL-2 ou TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$ . Na figura 4A é possível observar uma variação da frequência de células T CD4 que produzem IL-2 ao longo do tratamento, porém os dados não foram significativos. Observamos um aumento gradual dessas células até o dia 21 após o tratamento (D21), seguido de uma diminuição desse percentual 180 dias após o tratamento (D180). Resultados semelhantes foram encontrados da análise do iMFI (Figura 4B) das células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-2. Observamos um aumento no D21 e uma diminuição até o D180.

Na análise da frequência das células TCD4 produtoras de TNF- $\alpha$  observamos que houve um aumento estatisticamente significativo dessas células ao longo do tratamento. Esse aumento foi gradual do sétimo dia (D7) até noventa dias após o tratamento (D90). Houve uma redução da frequência dessas células no D180, onde nessa fase os indivíduos são considerados curados (Figura 4C). Quanto ao gráfico do iMFI observamos pouca intensidade de brilho até o D7. Entretanto o aumento foi evidente no primeiro mês de tratamento (D30), o qual era 2,8 vezes maior que o D7 ( $p=0,0435$ ) e 2 vezes maior se comparado ao grupo controle ( $p=0,0341$ ). Houve também uma posterior redução do iMFI estatisticamente relevante em comparação com o controle (Figura 4D).

Na frequência de células T CD4 produtoras de INF- $\gamma$  observamos um aumento após o início do tratamento (D0) com um alto percentual no D21. A frequência de células T CD4 produtoras de INF- $\gamma$  no D21 foi 4,7 vezes maior em comparação com o D0 ( $p=0,0183$ ) e 4,2 vezes em relação aos controles saudáveis ( $p=0,0019$ ) (Figura 4E). Na análise do iMFI,

observou-se um aumento gradativo da intensidade de fluorescência das células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  até o D21, logo após houve uma diminuição até o D180 (Figura 5F).



**Figura 4:** Frequência (A, B e C) e iMFI (D, E e F) das células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-2 ou TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$  (pacientes: n=13, controles: n=12). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Asteriscos e linhas horizontais indicam diferenças significativas entre os grupos determinadas pelo teste estatístico Kruskal-Wallis (\* $P$ <0,05; \*\* $P$ <0,005).

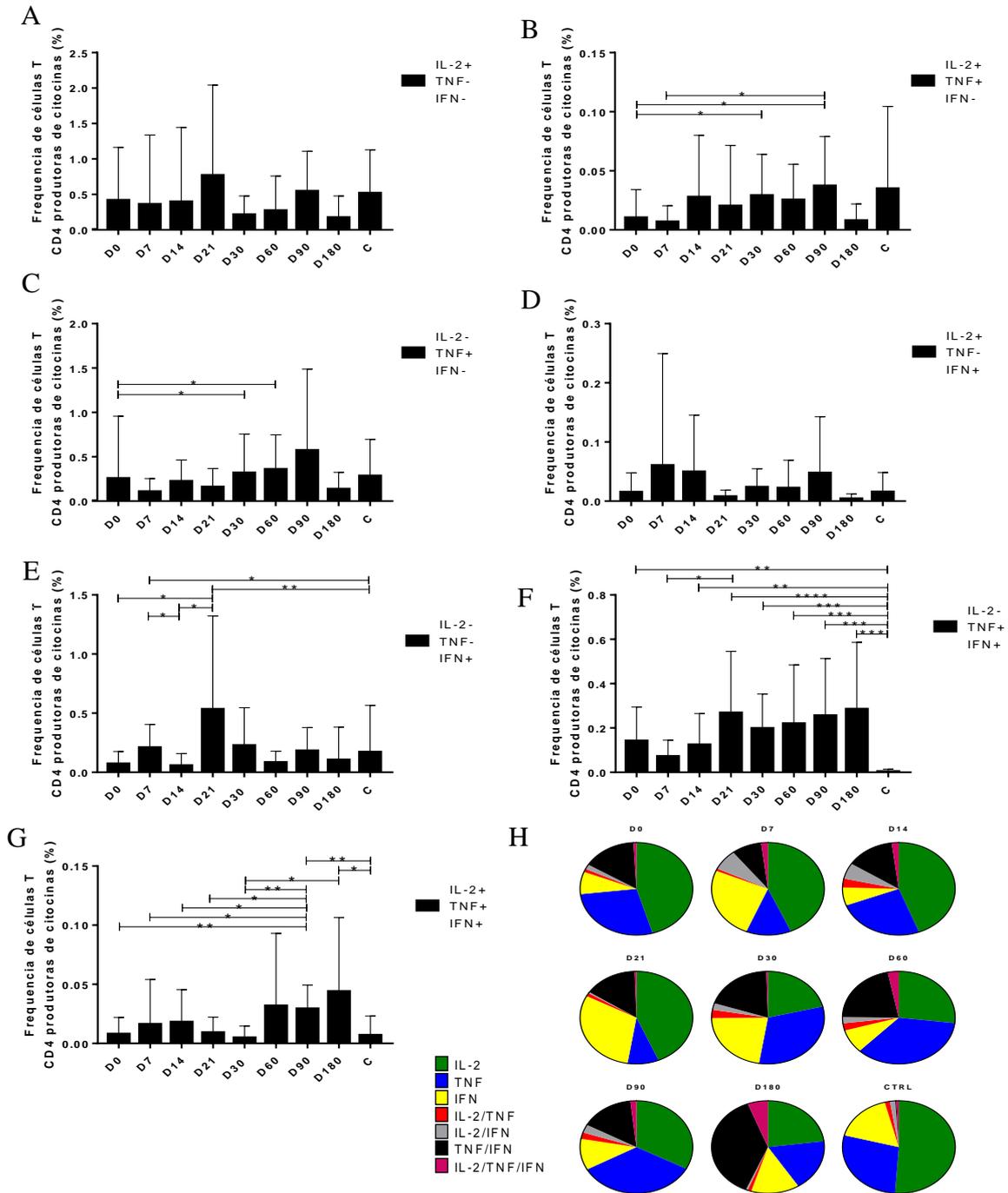
### 5.3. Análise das células T CD4 funcionais

Através da análise combinatória de células T CD4 produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  podemos observar diferentes populações celulares. Através dessa análise podemos ter a frequência de células T CD4 produtoras de uma citocina: IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$  ou IL-2, células produtoras de duas citocinas: IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$ /IL-2 ou TNF- $\alpha$ /IL-2 e células produtoras de três citocinas (multifuncionais): IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ /IL-2 (Figura 5).

As células T efetoras produtoras de IL-2 e TNF- $\alpha$  tem um perfil de resposta efetora eficiente no início da infecção. Observamos um aumento dessas células desde o início do tratamento (D0) até o terceiro mês de acompanhamento clínico (D90) (Figura 5B). Quanto a frequência de células T produtoras de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  observamos um alto percentual dessas células ao longo do tratamento (D0 a D180) quando comparado aos controles (Figura 5F). Os pacientes com LV nos dias de acompanhamento apresentaram um aumento médio estatisticamente significativo de 56,7 vezes ( $p=0,0007$ ) em relação ao grupo controle.

Na análise da frequência das células T multifuncionais observamos um aumento da produção de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  um mês após o tratamento (30) até a cura do paciente (D180). Em comparação ao grupo controle, houve diferenças estatísticas quando comparado aos pacientes nos dias 90 e 180 após tratamento. No dia D180 a frequência de células T funcionais foi 63 vezes maior quando comparado ao controle (Figura 5G).

Quanto a fração da resposta total compreendendo células que expressam uma, duas ou três citocinas podemos observar o aumento da qualidade da resposta Th1, com o aumento de fenótipos de células T funcionais durante a evolução do tratamento (Figura 5H).

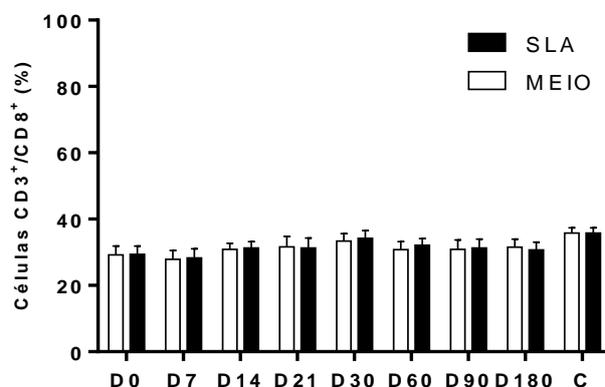


**Figura 5:** Frequência células T CD4 produtoras das citocinas IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Gráficos de frequências de células T CD4 produtoras de citocinas (A-G), fração da resposta total compreendendo células que expressam uma, duas ou três citocinas (H) (pacientes: n=13, controles: n=12). As frequências de cada fenótipo de expressão de citocinas foram registradas após a subtração de células incubadas sem antígeno. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Asteriscos e linhas horizontais indicam diferenças significantes entre os grupos

determinadas pelo teste estatístico Kruskal-Wallis (\*) $P < 0,05$ ; (\*\*) $P < 0,005$ ; (\*\*\*)  $P < 0,0005$ ; (\*\*\*\*) $P < 0,0001$ .

#### 5.4. Análise do percentual de células T CD8

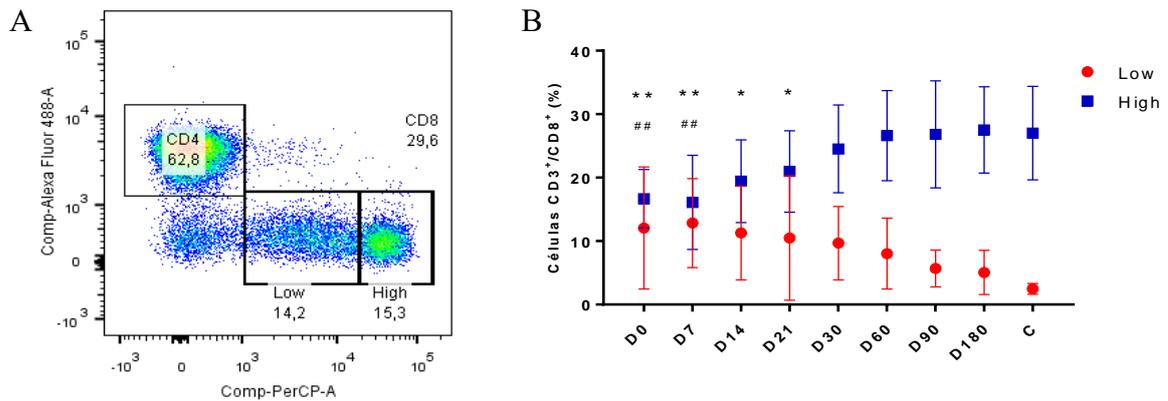
A figura 6 mostra o percentual de células T CD8 dos pacientes antes, durante e após o tratamento. Podemos observar que ao longo do tratamento não houve variação do percentual dessas células, mantendo o mesmo padrão dos controles saudáveis.



**Figura 6:** Frequência de células T CD3/CD8 de pacientes (n=13) antes [D0], durante e depois do tratamento [D7-D180], e controles saudáveis [C] (n=12).

##### 5.4.1. Análise do percentual de subpopulações T CD8

Durante a análise de citometria de fluxo, foram identificadas duas subpopulações de células T CD8, através da intensidade de fluorescência. Células com uma alta expressão da moléculas CD8 foram classificadas como  $CD8^{high}$  e com baixa expressão de CD8 como  $CD8^{low}$  (Figura 7A). Essas populações apresentaram-se com padrões quantitativos diferentes após o início do tratamento na qual a população de células T  $CD8^{low}$  são quantitativamente semelhantes a células T  $CD8^{high}$  no D0 e D7. No decorrer do tratamento (D14-D180) houve um aumento da frequência de células T  $CD8^{high}$  e uma diminuição das células T  $CD8^{low}$  (Figura 7B).



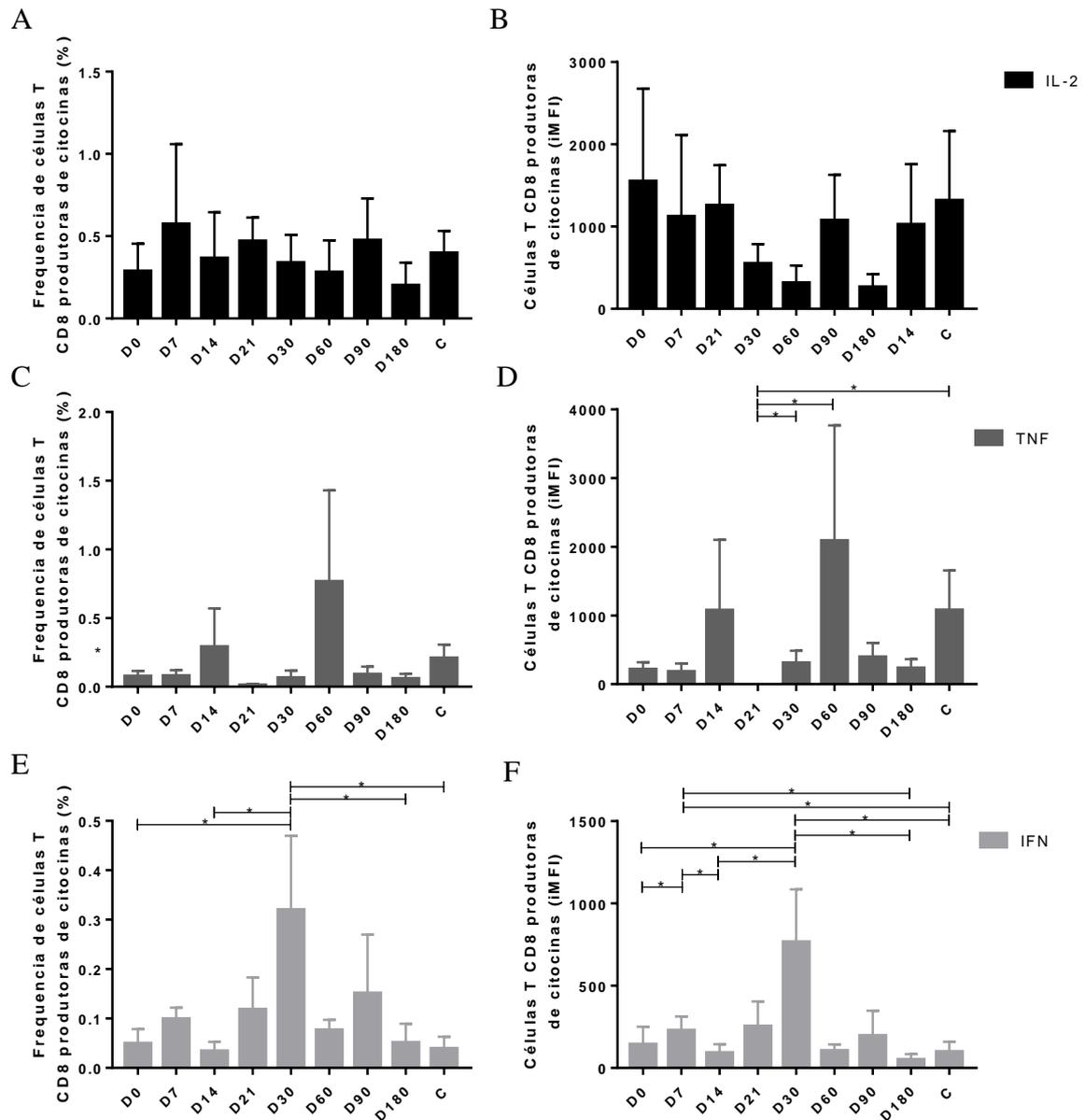
**Figura 7:** Análise de populações de células T CD8<sup>low</sup> e T CD8<sup>high</sup>. Gráfico em Dot Plot representativo das subpopulações CD8<sup>high</sup> e CD8<sup>low</sup> (A). Análise da frequência de células T CD8<sup>high</sup> e CD8<sup>low</sup> em relação aos dias de tratamento (D0-D180) (B). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Asteriscos [\*] e cerquilhas [#] indicam diferenças significativas entre os grupos Low e High respectivamente, determinados pelo teste estatístico Kruskal-Wallis (\* $p < 0,05$ ; (\*\* / ##) $p < 0,005$ .

### 5.5. Análise das células T CD8 funcionais

Para a análise das células T CD8 funcionais foi considerado as células totais (células T CD8<sup>high</sup> e CD8<sup>low</sup>). A figura 8 demonstra o perfil das células T CD8 funcionais quanto a expressão das citocinas IL-2 ou TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$ . Não foi observado diferença estatística na frequência de células T CD8 produtoras de IL-2 ao longo do tratamento (Figura 8A). Na análise do iMFI de células T CD8 produtoras de IL-2 podemos observar um padrão semelhante. Houve uma variação na intensidade de brilho das células durante o tratamento (Figura 8B).

Na análise de frequência de células T CD8 produtoras de TNF- $\alpha$  também não observamos diferença estatística, mas observamos um alto percentual dessas células 60 dias após o tratamento (D60) (Figura 8D). Na análise do iMFI observamos um alto brilho dessas células no D60 que foi significativo quando comparado o D21 e entre o D21 e o controle (Figura 8D).

Quanto a frequência de células T CD8 produtoras de IFN- $\gamma$  observamos um aumento durante o tratamento. Esse aumento foi mais evidente no D30 (8,18 vezes maior comprado ao controle –  $p=0,032$ ) (Figura 8E). O mesmo padrão de observação no iMFI onde no D30 as células possuem uma alta intensidade de brilho (Figura 8F).



**Figura 8:** Frequência (A, C e E) e iMFI (B, D e F) das células T CD8 produtoras de IL-2 ou TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$  (pacientes: n=13, controles: n=12). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Asteriscos e linhas horizontais indicam diferenças significantes entre os grupos determinadas pelo teste estatístico Kruskal-Wallis (\*) $P<0,05$ ; (\*\*) $P<0,005$ .

## 5.6. Análise das células T CD8 produtoras de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ e IL-2

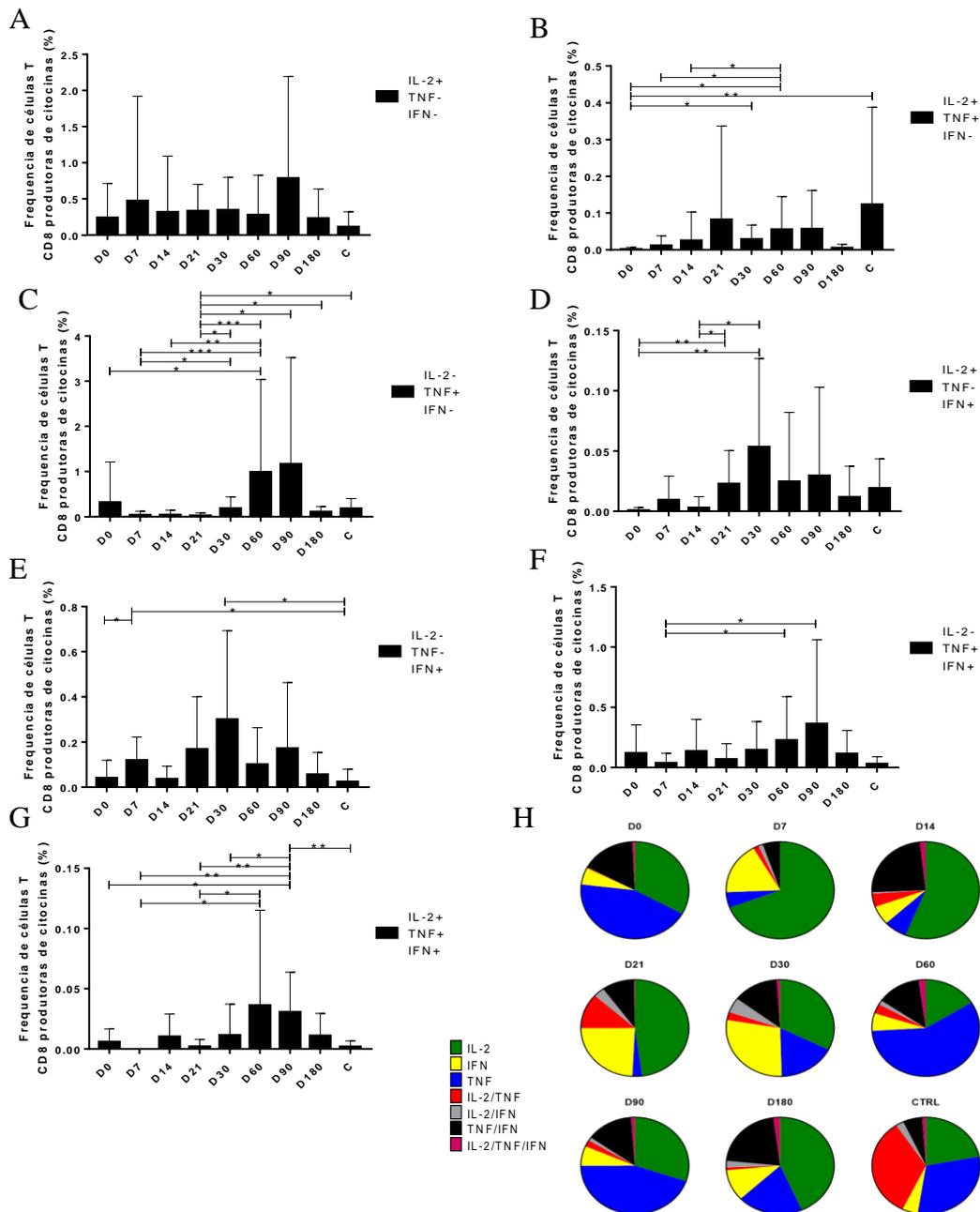
Subsequentemente, também foram analisadas as diferentes combinações as citocinas IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em células T CD8. Em relação as células T CD8 produtoras de uma citocina observamos uma diferença de populações desde o D0 até a cura do paciente (D180). Células T CD8 produtoras de TNF- $\alpha$  apresentaram uma alta frequência entre o D60 e D90 diminuindo significativamente no D180 (Figura 9C). Já as Células T CD8 produtoras de IFN- $\gamma$  observamos uma alta frequência no D30, que quando comparado ao grupo controle apresenta uma frequência 12,7 vezes maior ( $p=0,0380$ ) (Figura 9E).

Na avaliação das células TCD8 produtoras de duas citocinas também encontramos uma variação ao longo do tratamento. Indivíduos controles apresentam T CD8 produtoras de IL-2 e TNF- $\alpha$ , porém pacientes do D0 apresentam uma baixa frequência dessas células. Contudo, com 21 dias após o tratamento observamos a presença dessas células (Figura 9B).

Células T CD8 produtoras de IL-2 e IFN- $\gamma$  apresentam uma baixa frequência do D0 com um aumento significativo no D30 (Figura 9D). Já as células T CD8 produtoras TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  apresentam uma baixa frequência no início do tratamento aumentando significativamente uma alta no D90 (Figura 9F).

Na análise células T CD8 multifuncionais que expressam IL-2 TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , observamos um aumento significativo das frequências dessas células no D60 e D90, com posterior redução ao final do acompanhamento (D180) (Figura 9G).

Quanto a análise da contribuição de cada fenótipo de células T CD8 funcionais observamos uma variação de células expressando uma, duas ou três citocinas durante a evolução do tratamento (Figura 9H).



**Figura 9:** Frequência células T CD8 produtoras das citocinas IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Gráficos de frequências de células T CD8 produtoras de citocinas (A-G), fração da resposta total compreendendo células que expressam uma, duas ou três citocinas (H) (pacientes: n=13, controles: n=12). As frequências de cada fenótipo de expressão de citocinas foram registradas após a subtração de células incubadas sem antígeno. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Asteriscos e linhas horizontais indicam diferenças significantes entre os grupos determinadas pelo teste estatístico Kruskal-Wallis (\*) $P < 0,05$ ; (\*\*)  $P < 0,005$ ; (\*\*\*)  $P < 0,0005$ .

## 6. DISCUSSÃO

Dados da literatura demonstram que na LV as células Th1 desempenham um papel protetor na doença (Bretscher, 2019; Castellano et al., 2009; Darrah, Pate & De Luca, 2007). Apesar da definição clara de perfis celulares, pouco se sabe como o perfil funcional das células T CD4 na LV que efetivamente apresentam um papel protetor. Para o entendimento do perfil funcional das células T CD4 é necessário analisar a produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  que definem a qualidade da resposta do tipo Th1. Essa funcionalidade define o papel efetor ou de memória da célula T CD4 (Valian et al., 2013; Seder et al., 2008).

Células T CD4 produtoras de IL-2 ou IL-2 e TNF- $\alpha$ , podem ser classificadas como células de longa duração capazes de responder rapidamente a um segundo encontro de antígeno. Já as células T produtoras de IFN- $\gamma$  são consideradas como efetoras terminais. Células T CD4 que expressam IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  são consideradas como multifuncionais por serem células de memória com alta capacidade efetora (De Luca & Macedo, 2016, Seder et al., 2008). Semelhante às células T CD4, células T CD8 quando ativadas podem se diferenciar em diversos perfis funcionais. Células T CD8 de memória central são altamente funcionais com produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2. Células T CD8 de memória efetora expressam IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Seder et al., 2008).

Nesse trabalho identificamos que ao longo do tratamento os pacientes adquiriram células T CD4 de memória efetora de longa duração que pode estar relacionada com um papel protetor de uma reexposição ao parasita. Células T CD4 de memória produtoras de IL-2 e TNF- $\alpha$  foram evidentes no início do tratamento. Outra célula muito importante e que também tem uma resposta de memória de longa duração são as células T multifuncionais que expressam IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Essas células foram mais presentes no final do tratamento.

Diversos trabalhos apontam a participação de linfócitos T CD4 e CD8 na LV, contudo a avaliação do papel funcional dessas células ainda é pouco estudada. O presente trabalho é o primeiro a descrever o perfil funcional de células T CD4 e CD8 quanto a produção das citocinas IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  antes, durante e após o tratamento de pacientes com LV.

A participação de células T CD4 em LV tem sido amplamente abordada já que estas estão mais associadas a resistência à infecção. Estas células podem produzir diferentes tipos de citocinas ligadas ao perfil de células Th1, Th2 ou Th17 (Mesquita et al., 2018; Rodrigues et al., 2016; Santos, dos et al., 2016; Goto et al., 2009). Nesse trabalho, observamos um aumento da

frequência células T CD4 funcionais produtoras TNF- $\alpha$  ao longo do tratamento. A citocina TNF- $\alpha$  é uma das principais moléculas envolvidas na proteção contra a LV, entretanto, quando aumentada pode induzir a lesão tecidual (Kaye et al., 2004; Peruhype-Magalhães et al., 2005). Já a célula T CD4 produtora de IFN- $\gamma$  é uma das principais células funcionais durante a infecção por *Leishmania* (Kumar et al., 2019; Singh & Sundar, 2018). O IFN- $\gamma$  promove a estimulação de macrófagos e a inibição de células Th2, por isso, quando aumentada, a resposta imune do paciente pode ser mais efetiva contra o parasito (Rodrigues, et al., 2016).

Com base na produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL- 2 e TNF- $\alpha$ , as células T CD4 podem desenvolver células efetoras e de memória, e a qualidade da resposta imune Th1 pode estar relacionada com a diferenciação de células produtoras dessas citocinas (De Luca & Macedo, 2016). Nesse trabalho observamos a diferenciação de células T efetoras produtoras de IL-2 e TNF- $\alpha$  presentes 30 dias após o tratamento. A presença dessas demonstra um papel efetor eficiente no início da infecção. Outra célula T CD4 efetora que parece estar relacionada com o controle da infecção e conseqüentemente com a melhora clínica do paciente, é a célula produtora de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Nesse trabalho observamos um alto percentual dessas células ao longo do tratamento (D0 a D180) quando comparado aos controles.

A análise de células T funcionais é amplamente utilizado para a testagem de antígenos, desenvolvimentos de vacinas e de novas drogas para o tratamento da doença. Em estudo de vacina que avaliou a resposta aos epítomos do composto Nucleoside Hidrolase 36 (NH36) em PBMC de pacientes LV positivos, mostrou a presença de células T multifuncionais produtoras de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Santos et al., 2017). Nesse estudo observou -se que essas células são mais frequentes em pacientes com LV curados em relação a pacientes antes do tratamento o que pode demonstrar um melhor perfil efetor contra o parasito.

Diversos trabalhos apontam que o processo de saúde e doença depende de respostas dinâmicas que alteram a frequência e a qualidade de células T antígeno específicas (Goto, et al., 2011; Nico et al., 2014; Sabur et al., 2018). Um ensaio clínico realizado com cães infectados com *Leishmania infantum* também mostrou que as células T CD4 multifuncionais apresentam melhor resposta durante a doença (Brito, De et al., 2019).

Neste estudo, duas subpopulações de células T CD8, foram classificadas como T CD8<sup>high</sup> e T CD8<sup>low</sup>. Observamos um aumento da célula T CD8<sup>high</sup> associado a uma diminuição de células T CD8<sup>low</sup> ao longo do tratamento dos pacientes com LV. Interessante observar que a medida que o paciente melhora da LV acontece um aumento de células T CD8<sup>high</sup>. O aumento

das células T CD8<sup>high</sup> pode estar diretamente relacionada com a melhora do paciente durante o tratamento. Novos experimentos precisam ser realizados para analisarmos a funcionalidade das células CD8<sup>high</sup> e T CD8<sup>low</sup>, mas em outras patologias já foi evidenciado que a presença alta de células T CD8<sup>low</sup> pode estar relacionada com a má progressão da doença.

Em doenças como HIV, Hepatite B e Esclerose Múltipla, as células T CD8<sup>low</sup> estão relacionadas com a piora dos parâmetros clínicos (Ding, et al., 2019; Eller, et al., 2016; Favre et al., 2016; Ouyang et al., 2013; Izad, et al., 2013). Outros estudos também relatam que estas células podem desempenhar funções características de células da resposta imune inata, expressando Granzima B e moléculas Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) (Kumari et al., 2018; Falanga et al., 2017; Trautmann et al., 2003).

A importância da qualidade das células T CD8 para proteção também tem sido investigado em infecções virais como no HIV (Seder, 2008). Poucos trabalhos investigam o papel de células T CD8<sup>+</sup> funcionais na LV. Neste trabalho, observamos uma população de células T CD8 produtoras de IFN- $\gamma$  que se apresentou predominantemente 30 dias após o início do tratamento, um aumento durante o tratamento. Em estudos de infecções parasitárias com modelos murinos e desenvolvimentos de vacinas a partir de novos antígenos que atuam com base na ativação de células T CD8<sup>+</sup>, a produção de IFN- $\gamma$  por estas células é apreciada assim como sua atividade citotóxica relacionada a produção de Granzima B e Perforina (Tsagozis, et al., 2003; Osman et al., 2017; Amit et al., 2017; Dias et al., 2018).

A existência das células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  podem representar um perfil de resposta terminal, uma vez que as células T de memória terminais apresentam uma pior resposta qualitativa se comparadas com células T de memória efetoras e centrais. Egui et al. (2018) descreve em leishmaniose cutânea que a parcela de células T CD8 produtoras de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  é maior entre os pacientes com LV ativas. No nosso trabalho, T CD8 produtoras IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  apresentam uma baixa frequência no início do tratamento e só aumenta 90 dias após o início do tratamento.

Na leishmaniose cutânea as células T CD8 multifuncionais são mais frequentes em pacientes curados e tendem a expressar Granzima B (Egui et al., 2018). Nossos dados mostram um grande percentual de células T CD8 multifuncionais que expressam IL-2, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , no D60 e D90, com posterior redução ao final do acompanhamento (D180).

## 7. CONCLUSÃO

Ao longo do tratamento observa-se um aumento de células T CD4 e CD8 funcionais que pode estar relacionado com a melhora do paciente.

O aumento da população de células T CD8<sup>high</sup> concomitante com a diminuição das células T CD8<sup>low</sup> durante o tratamento pode estar relacionado com a melhora clínica dos pacientes com LV. Isso evidencia a participação das células T CD8 na LV.

O aparecimento de células T CD4 de memória produtoras de IL-2 e TNF- $\alpha$  ou IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  ao longo do tratamento pode estar relacionada com um papel protetor a uma reexposição ao parasita.

A presença de células T CD8 funcionais produtoras de IL-2 e IFN- $\gamma$  ou IL-2, TNF- $\alpha$  durante o tratamento sugere a participação dessas células durante o tratamento dos pacientes com LV.

## 8. PERSPECTIVAS

- Avaliação de populações de células T CD4 e CD8 produtoras de citocinas de perfil Th2 e Th17.
- Avaliação das citocinas IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em células T CD4 separadas em fenótipos de memória: Células T de Memória Efetora, Memória Central, Memória Efetora Terminal e Naive, a partir da utilização dos marcadores CCR7 e CD45ra.
- Avaliação do perfil funcional de células T CD8<sup>high</sup> e CD8<sup>low</sup> quanto a expressão de marcadores ligados a imunossenescência e exaustão de células T.

## Referências

- ADACHI, K.; OSADA, Y.; NAKAMURA, R.; TAMADA, K.; HAMANO, S. Unique T cells with unconventional cytokine profiles induced in the livers of mice during *Schistosoma mansoni* infection. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, p. 1–10, 2013.
- ADEM, E.; TAJEBE, F.; GETAHUN, M.; et al. Successful Treatment of Human Visceral Leishmaniasis Restores Antigen-Specific IFN- $\gamma$ , but not IL-10 Production. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2016.
- ADLER-MOORE, J.; LEWIS, R. E.; BRÜGGEMANN, R. J. M.; RIJNDERS, B. J. A.; GROLL, A. H.; WALSH, T. J. Preclinical Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Antifungal Activity of Liposomal Amphotericin B. *Clinical Infectious Diseases*, v. 68, n. Supplement\_4, p. S244–S259, 2 maio 2019.
- AGUIAR, P. F.; RODRIGUES, R. K. Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão. *Unimontes Científica*, v. 19, n. 1, p. 191–204, 2017.
- AMIT, A. DIKHIT, M. R.; MAHANTESH, V.; et al. Immunomodulation mediated through *Leishmania donovani* protein disulfide isomerase by eliciting CD8<sup>+</sup> T-cell in cured visceral leishmaniasis subjects and identification of its possible HLA class-1 restricted T-cell epitopes. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 35, n. 1, p. 128–140, 2017.
- ANTONELLI, L. R. V.; DUTRA, W. O.; ALMEIDA, R. P.; BACELLAR, O.; GOLLOB, K. J. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 136, n. 2, p. 341–348, 2004.
- ARAÚJO, D. D. C. Análise Espacial Dos Casos Humanos De Leishmaniose Visceral. *Arquivos de Ciências da Saúde*, v. 24, n. 2, p. 71, 2017.
- ARAÚJO-SANTOS, T.; ANDRADE, B. B.; GIL-SANTANA, L.; et al. Anti-parasite therapy drives changes in human visceral leishmaniasis-associated inflammatory balance. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.
- BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Barcellar & Carvalho 2005 - Imunopatogênese da leishmaniose visceral.pdf. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 75, n. 1, p. 24–34, 2005.
- BANERJEE, A.; BHATTACHARYA, P.; JOSHI, A. B.; ISMAIL, N.; DEY, R.; NAKHASI, H. L. 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.
- BHOWMICK, S.; RAVINDRAN, R.; ALI, N. IL-4 contributes to failure, and colludes with IL-10 to exacerbate *Leishmania donovani* infection following administration of a subcutaneous leishmanial antigen vaccine. *BMC Microbiology*, v. 14, n. 1, 2014.
- BRETSCHER, P. On Analyzing How the Th1/Th2 Phenotype of an Immune Response Is Determined: Classical Observations Must Not Be Ignored. *Frontiers in immunology*, v. 10, n. June, p. 1234, 2019.
- BRITO, R. C. F. DE; OLIVEIRA CARDOSO, J. M. DE; REIS, L. E. S.; MATHIAS, F. A. S.; AGUIAR-SOARES, R. D. D. O.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ROATT, B. M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; RUIZ, J. C.; RESENDE, D. D. M.; REIS, A. B. Synthetic peptides elicit

strong cellular immunity in visceral leishmaniasis natural reservoir and contribute to long-lasting polyfunctional T-cells in BALB/c mice. *Vaccines*, v. 7, n. 4, p. 1–18, 2019.

BUNN, P. T.; MONTES DE OCA, M.; DE LABASTIDA RIVERA, F.; et al. Distinct Roles for CD4 + Foxp3 + Regulatory T Cells and IL-10–Mediated Immunoregulatory Mechanisms during Experimental Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania donovani*. *The Journal of Immunology*, v. 201, n. 11, p. 3362–3372, 2018.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. *The Lancet*, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CASTELLANO, L. R.; FILHO, D. C.; ARGIRO, L.; DESSEIN, H.; PRATA, A.; DESSEIN, A.; RODRIGUES, V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- $\gamma$  production. *Human Immunology*, v. 70, n. 6, p. 383–390, 2009.

COSTA, A. S. A.; COSTA, G. C.; AQUINO, D. M. C. DE; MENDONÇA, V. R. R. DE; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; CALDAS, A. DE J. M. Cytokines and visceral leishmaniasis: A comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 6, p. 735–739, 2012.

DARRAH, P. A.; HEGDE, S. T.; PATEL, D. T.; LINDSAY, R. W. B.; CHEN, L.; ROEDERER, M.; SEDER, R. A. IL-10 production differentially influences the magnitude, quality, and protective capacity of Th1 responses depending on the vaccine platform. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 207, n. 7, p. 1421–1433, 2010.

DARRAH, P. A.; PATEL, D. T.; DE LUCA, P. M.; et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nature Medicine*, v. 13, n. 7, p. 843–850, 10 jul. 2007.

DAYAKAR, A.; CHANDRASEKARAN, S.; KUCHIPUDI, S. V.; KALANGI, S. K. Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 670, 2019.

DE LUCA, P. M.; MACEDO, A. B. B. Cutaneous leishmaniasis vaccination: A matter of quality. *Frontiers in Immunology*, v. 7, n. APR, p. 1–8, 2016.

DIAS, D. S. et al. Vaccination with a CD4 + and CD8 + T-cell epitopes-based recombinant chimeric protein derived from *Leishmania infantum* proteins confers protective immunity against visceral leishmaniasis. *Translational Research*, v. 200, p. 18–34, 2018.

DING, Z.-D.; ZHENG, J.-F.; SONG, C.-B.; FU, Y.-J.; XU, J.-J.; JIANG, Y.-J.; SHANG, H.; ZHANG, Z.-N. Decreased CD4+CD8low T cells in early HIV infection are associated with rapid disease progression. *Cytokine*, v. 125, n. 2020, p. 1–7, 2019.

EGUI, A.; LEDESMA, D.; PÉREZ-ANTÓN, E.; MONTROYA, A.; GÓMEZ, I.; ROBLEDO, S. M.; INFANTE, J. J.; VÉLEZ, I. D.; LÓPEZ, M. C.; THOMAS, M. C. Phenotypic and Functional Profiles of Antigen-Specific CD4+ and CD8+ T Cells Associated With Infection Control in Patients With Cutaneous Leishmaniasis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 8, p. 393, 2018.

- ELLER, M. A.; GOONETILLEKE, N.; TASSANEETRITHEP, B.; et al. Expansion of Inefficient HIV-Specific CD8 T Cells during Acute Infection. *Journal of Virology*, v. 90, n. 8, p. 4005–4016, 2016.
- FALANGA, Y. T.; FRASCOLI, M.; KAYMAZ, Y.; FORCONI, C.; ONG'ECHA, J. M.; BAILEY, J. A.; BERG, L. J.; MOORMANN, A. M. High pathogen burden in childhood promotes the development of unconventional innate-like CD8<sup>+</sup> T cells. *JCI insight*, v. 2, n. 15, 2017.
- FALEIRO, R. J.; KUMAR, R.; HAFNER, L. M.; ENGWERDA, C. R. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 7, 2014.
- FAVRE, D.; STODDART, C. A.; EMU, B.; HOH, R.; MARTIN, J. N.; HECHT, F. M.; DEEKS, S. G.; MCCUNE, J. M. IMMUNOBIOLOGY HIV disease progression correlates with the generation of dysfunctional naive. *Blood*, v. 117, n. 7, p. 2189–2199, 2011.
- FLORES-GARCÍA, Y.; ROSALES-ENCINA, J. L.; SATOSKAR, A. R.; TALAMÁS-ROHANA, P. IL-10-IFN- $\gamma$  double producers CD4<sup>+</sup> T cells are induced by immunization with an amastigote stage specific derived recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Biological Sciences*, v. 7, n. 7, p. 1093–1100, 2011.
- FREITAS, J.; PINHEIRO, D. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp Cellular and molecular aspects of immune response to *Leishmania* spp. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 109, n. 55, p. 11–20, 2010.
- GEORGIADOU, S. P.; MAKARITSIS, K. P.; DALEKOS, G. N. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. *Journal of Translational Internal Medicine*, v. 3, n. 2, p. 43–50, 2016.
- GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. DA C.; PESSOA-E-SILVA, R.; TRAJANO-SILVA, L. A. M.; et al. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. OCT, 2017.
- GOTO, H.; PRIANTI, M. D. G. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 51, n. 5, p. 241–246, 2009.
- GRIENSVEN, J. VAN; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 33, n. 1, p. 79–99, 2019.
- GRIFFITHS, A. J. F. *Introdução à genética*. 10. ed. [s.l.: s.n.].
- GUIMARÃES-E-SILVA, A. S.; OLIVEIRA SILVA, S. DE; SILVA, R. C. R. DA; PINHEIRO, V. C. S.; REBÊLO, J. M. M.; MELO, M. N. *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. 1–19, 2017.
- HAILU, A.; BAARLE, D. VAN; KNOL, G. J.; BERHE, N.; MIEDEMA, F.; KAGER, P. A. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. *Clinical Immunology*, v. 117, n. 2, p. 182–191, 2005.

- HEIDE, J.; VAUGHAN, K. C.; SETTE, A.; JACOBS, T.; WIESCH, J. S. ZUR. Comprehensive review of human plasmodium falciparum-specific CD8<sup>+</sup> T cell epitopes. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. MAR, p. 1–23, 2019.
- HOSEIN, S.; BLAKE, D. P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. *Parasitology*, v. 144, n. 1, p. 95–115, 2017.
- IBARRA-MENESES, A. V.; GHOSH, P.; HOSSAIN, F.; CHOWDHURY, R.; MONDAL, D.; ALVAR, J.; MORENO, J.; CARRILLO, E. IFN- $\gamma$ , IL-2, IP-10, and MIG as biomarkers of exposure to *Leishmania* spp., and of cure in human visceral leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, n. MAY, p. 1–8, 2017.
- IZAD, M.; HARIRCHIAN, M. H.; AMIRI, H.; NAJAFI, F.; GHAFLATI, Z.; SALEHI, Z. Low and high CD8 positive T cells in multiple sclerosis patients. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, v. 12, n. 3, p. 276–280, 2013.
- JAMAL, F. et al. Identification of *Leishmania donovani* antigen in circulating immune complexes of visceral leishmaniasis subjects for diagnosis. *PLoS ONE*, v. 12, n. 8, p. 1–22, 2017.
- JAWED, J. J.; DUTTA, S.; MAJUMDAR, S. Functional aspects of T cell diversity in visceral leishmaniasis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 117, n. December 2018, p. 109098, 2019.
- KAYE, P. M.; SVENSSON, M.; ATO, M.; MAROOF, A.; POLLEY, R.; STAGER, S.; ZUBAIRI, S.; ENGWERDA, C. R. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunological Reviews*, v. 201, p. 239–253, 2004.
- KEMP, K.; KEMP, M.; KHARAZMI, A.; ISMAIL, A.; KURTZHALS, J. A. L.; HVIID, L.; THEANDER, T. G. *Leishmania*-specific T cells expressing interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and IL-10 upon activation are expanded in individuals cured of visceral leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 116, n. 3, p. 500–504, 1999.
- KUMAR, A.; SAMANT, M. DNA vaccine against visceral leishmaniasis: A promising approach for prevention and control. *Parasite Immunology*, v. 38, n. 5, p. 273–281, 2016.
- KUMAR, P.; MISRA, P.; YADAV, N. K.; JOSHI, S.; SAHASRABUDDHE, A. A.; DUBE, A.; RISHI, N.; MITRA, D. K. Prophylactic interferon- $\gamma$  and interleukin-17 facilitate parasite clearance in experimental visceral leishmaniasis. *Tropical Parasitology*, v. 9, n. 1, p. 30–35, 2019.
- KUMAR, R.; SINGH, N.; GAUTAM, S.; SINGH, O. P.; GIDWANI, K.; RAI, M.; SACKS, D.; SUNDAR, S.; NYLÉN, S. *Leishmania* Specific CD4 T Cells Release IFN $\gamma$  That Limits Parasite Replication in Patients with Visceral Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 10, 2014.
- KUMARI, S.; SHIVAM, P.; HANSA, J.; JAMAL, F.; SINGH, M. K.; BIMAL, S.; NARAYAN, S.; PANDEY, K.; DAS, V. N. R.; DAS, P.; SINGH, S. K. CD8<sup>dim</sup> but not CD8<sup>bright</sup> cells positive to CD56 dominantly express KIR and are cytotoxic during visceral leishmaniasis. *Human Immunology*, v. 79, n. 8, p. 616–620, 2018.
- LEE, H.-G.; LEE, J.-U.; KIM, D.-H.; LIM, S.; KANG, I.; CHOI, J.-M. Pathogenic function of bystander-activated memory-like CD4<sup>+</sup> T cells in autoimmune encephalomyelitis. *Nature communications*, v. 10, n. 1, p. 709, 2019.

- LEMOS, M. D. A.; SOUSA, O. H. DE; SILVA, Z. DO S. S. B. DA. PERFIL DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL : UMA REVISÃO. *Facit Business and Technology Journal*, v. 9, n. 1, p. 93–114, 2019.
- MACEDO, A. B. B.; SÁNCHEZ-ARCILA, J. C.; SCHUBACH, A. O.; MENDONÇA, S. C. F.; MARINS-DOS-SANTOS, A.; FATIMA MADEIRA, M. DE; GAGINI, T.; PIMENTEL, M. I. F.; LUCA, P. M. DE. Multifunctional CD4+T cells in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 167, n. 3, p. 505–513, 2012.
- MATRALIS, D.; PAPADOGIANNAKIS, E.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, E.; KTENAS, E.; KOUTINAS, A. Detection of intracellular IFN- $\gamma$  and IL-4 cytokines in CD4+ and CD8+ T cells in the peripheral blood of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Parasite Immunology*, v. 38, n. 8, p. 510–515, 2016.
- MAYRINGER, I.; REINDL, M.; BERGER, T. A critical comparison of frequently used methods for the analysis of tumor necrosis factor- $\alpha$  expression by human immune cells. *Journal of Immunological Methods*, v. 235, n. 1–2, p. 33–40, 2000.
- MEDINA-COLORADO, A.A.; OSORIO, E.Y.; SALDARRIAGA, O.A.; TRAVI, B.L.; KONG, F.; SPRATT, H.; SOONG, L. Splenic CD4+ T cells in progressive visceral leishmaniasis show a mixed effector-regulatory phenotype and impair macrophage effector function through inhibitory receptor expression, *PLoS One*, v. 12, 2017.
- MESQUITA, I. et al. The impact of IL-10 dynamic modulation on host immune response against visceral leishmaniasis. *Cytokine*, n. March, p. 0–1, 2018.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, (BRASIL). Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2013. p. 2013, 2019.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância em Saúde. 3a edição ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose visceral 2017. 2017.
- MOTA, T. F.; SOUSA, O. M. F. DE; SILVA, Y. DE J.; BORJA, L. S.; LEITE, B. M. M.; SOLCÀ, M. DA S.; MELO, D. A. DE; BRODSKYN, C. I.; DIAS, E. S.; VERAS, P. S. T.; FRAGA, D. B. M. Natural infection by *Leishmania infantum* in the *Lutzomyia longipalpis* population of an endemic coastal area to visceral leishmaniasis in Brazil is not associated with bioclimatic factors. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 8, p. e0007626, 2019.
- NASCIMENTO, M. S. L.; CARREGARO, V.; LIMA-JÚNIOR, D. S.; COSTA, D. L.; RYFFEL, B.; DUTHIE, M. S.; JESUS, A. DE; ALMEIDA, R. P. DE; SILVA, J. S. DA. Interleukin 17A acts synergistically with interferon  $\gamma$  to promote protection against leishmania infantum infection. *Journal of Infectious Diseases*, v. 211, n. 6, p. 1015–1026, 2015.
- NICO, D.; GOMES, D. C.; PALATNIK-DE-SOUSA, I.; MORROT, A.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. *Leishmania donovani* nucleoside hydrolase terminal domains in cross-protective immunotherapy against *Leishmania amazonensis* murine infection. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. JUN, p. 1–12, 2014.
- NUNES, R.; CAMPOS, D. E. S. Universidade Federal de Sergipe Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa Doutorado em Ciências da Saúde ROSEANE NUNES DE SANTANA CAMPOS ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM

SERGIPE E LIBERAÇÃO DE REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EM HUMANA. 2016.

NYLÉN, S.; MAURYA, R.; EIDSMO, L.; MANANDHAR, K. DAS; SUNDAR, S.; SACKS, D. 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.

OSMAN, M. et al. A third generation vaccine for human visceral leishmaniasis and post kala azar dermal leishmaniasis: First-in-human trial of ChAd63-KH. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 5, p. 1–24, 2017.

OUYANG, L.; LI, X.; LIANG, Z.; YANG, D.; GONG, F.; SHEN, G.; WENG, X.; WU, X. CD8low T-cell subpopulation is increased in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Molecular Immunology*, v. 56, n. 4, p. 698–704, 2013.

PACE, D. Leishmaniasis. *Journal of Infection*, v. 69, n. S1, p. S10–S18, 2014.

PÉREZ-CABEZAS, B; CECÍLIO, P.; GASPARGAS, T.B.; GÄRTNER, F.; VASCONCELLOS, R.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Understanding Resistance vs. Susceptibility in Visceral Leishmaniasis Using Mouse Models of *Leishmania infantum* Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* | www.frontiersin.org, v. 1, p. 30, 2019.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; MARTINS-FILHO, O. A.; PRATA, A.; SILVA, L. D. A.; RABELLO, A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; FIGUEIREDO, R. M.; GUIMARÃES-CARVALHO, S. F.; FERRARI, T. C. A.; CORREA-OLIVEIRA, R. Immune response in human visceral leishmaniasis: Analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 62, n. 5, p. 487–495, 2005.

PITTA, M. G. R. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *Journal of Clinical Investigation*, v. 119, n. 8, p. 2379–2387, 2009.

PORTO, C. C.; PORTO, A. L. (Ed.). *Exame clínico: Porto & Porto*. 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2013.

PRESTES-CARNEIRO, L. E.; DANIEL, L. A. F.; ALMEIDA, L. C.; D'ANDREA, L. Z.; VIEIRA, A. G.; ANJOLETE, I. R.; ANDRÉ, L.; FLORES, E. F. Spatiotemporal analysis and environmental risk factors of visceral leishmaniasis in an urban setting in São Paulo State, Brazil. *Parasites and Vectors*, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2019.

RAI, A. K.; THAKUR, C. P.; SINGH, A.; SETH, T.; SRIVASTAVA, S. K.; SINGH, P.; MITRA, D. K. Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic site of human visceral leishmaniasis. *PLoS ONE*, v. 7, n. 2, 2012.

ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. DE O.; COURA-VITAL, W.; KER, H. G.; MOREIRA, N. DAS D.; VITORIANO-SOUZA, J.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B. Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: Promising treatments for this neglected disease. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. JUN, p. 1–12, 2014.

- RODRIGUES, V.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; LAFORGE, M.; SILVESTRE, R.; ESTAQUIER, J. Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. *Parasites and Vectors*, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2016.
- SABUR, A.; BHOWMICK, S.; CHHAJER, R.; EJAZI, S. A.; DIDWANIA, N.; ASAD, M.; BHATTACHARYYA, A.; SINHA, U.; ALI, N. Liposomal elongation factor-1 $\alpha$  triggers effector CD4 and CD8 T cells for induction of long-lasting protective immunity against visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. JAN, p. 1–15, 2018.
- SAHA, S. et al. IL-10- and TGF- $\beta$ -Mediated Susceptibility in Kala-azar and Post-kala-azar Dermal Leishmaniasis: The Significance of Amphotericin B in the Control of Leishmania donovani Infection in India . *The Journal of Immunology*, v. 179, n. 8, p. 5592–5603, 2007.
- SANTOS, M. L. B.; NICO, D.; DE OLIVEIRA, F.A.; et al. Leishmania donovani nucleoside Hydrolase (NH36) domains induce T-cell cytokine responses in human visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. MAR, 2017.
- SANTOS, P. L. DOS; DE OLIVEIRA, F. A.; SANTOS, M. L. B.; et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2016.
- SEDER, R. A.; DARRAH, P. A.; ROEDERER, M. T-cell quality in memory and protection: Implications for vaccine design. *Nature Reviews Immunology*, v. 8, n. 4, p. 247–258, 2008.
- SINGH, O. P.; SUNDAR, S. Whole blood assay and visceral leishmaniasis: Challenges and promises. *Immunobiology*, v. 219, n. 4, p. 323–328, 2014.
- SINGHA, N.; KUMARB, R.; ENGWERDAC, C.; SACKSD, D.; NYLENE, S.; SUNDAR, S. Tumor Necrosis Factor Alpha neutralization has no direct effect on parasite burden, but causes impaired IFN- $\gamma$  production by spleen cells from human visceral leishmaniasis patients Neetu. *Cytokine*, v. 85, p. 184–190, 2016.
- STÄGER, S.; RAFATI, S. CD8+ T cells in Leishmania infections: Friends or foes? *Frontiers in Immunology*, v. 3, n. JAN, p. 1–8, 2012.
- TERRAZAS, C.; VARIKUTI, S.; KIMBLE, J.; MORETTI, E.; BOYAKA, P. N.; SATOSKAR, A. R. IL-17A promotes susceptibility during experimental visceral leishmaniasis caused by Leishmania donovani. *FASEB Journal*, v. 30, n. 3, p. 1135–1143, 2016.
- TIAN, Y.; BABOR, M.; LANE, J.; et al. Unique phenotypes and clonal expansions of human CD4 effector memory T cells re-expressing CD45RA. *Nature Communications*, v. 8, n. 1, 2017.
- TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, v. 6, p. 750, 26 maio 2017.
- TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: Paradox rather than paradigm. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 51, n. 2, p. 229–242, 2007.
- TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. CD8+ T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v. 25, n. 11–12, p. 569–579, 2003.

- VALIAN, H. K.; ROSTAMI, M. N.; KHAMESIPOUR, A. CCR7 + Central and CCR7 – Effector Memory CD4 + T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. *J Clin Immunol*, v. 33, p. 220–234, 2013.
- VILLEGAS-MENDEZ, A.; INKSON, C. A.; SHAW, T. N.; STRANGWARD, P.; COUPER, K. N. Long-Lived CD4 + IFN- $\gamma$  + T Cells rather than Short-Lived CD4 + IFN- $\gamma$  + IL-10 + T Cells Initiate Rapid IL-10 Production To Suppress Anamnestic T Cell Responses during Secondary Malaria Infection. *The Journal of Immunology*, v. 197, n. 8, p. 3152–3164, 2016.
- WANG, A. J.; HASAN, M. T.; SEBASTIAN, H.; WANG, J. IL-2 is an upstream regulator of CD4+ T cells from visceral leishmaniasis patients with therapeutic potential. *the journal of infectious diseases*, v. 220, n. 1, p. 163–173, 2019.
- WEIRATHER, J. L.; DUGGAL, P.; NASCIMENTO, E. L.; MONTEIRO, G. R.; MARTINS, D. R.; LACERDA, H. G.; FAKIOLA, M.; BLACKWELL, J. M.; JERONIMO, S. M. B.; WILSON, M. E. Comprehensive candidate gene analysis for symptomatic or asymptomatic outcomes of *Leishmania infantum* infection in Brazil. *Ann Hum Genet.*, v. 81, n. 1, p. 41–48, 2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO [homepage na Internet]. WHO; 2019 [acesso em 04 set 2019] <<https://www.who.int/leishmaniasis/en/>>

**Anexos**

## ANEXO I

Universidade Federal de Sergipe

HOSPITAL UNIVERSITARIO

COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

CAMPUS DA SAÚDE PROF. JOÃO NASCIMENTO JR.

Rua Cláudio Batista s/n, Didática V, Bairro Sanatório

CEP: 49060-100 Aracaju/SE

Fone: (79) 3218-1805

E-mail: cephu@ufs.br

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do Projeto: Interação entre os Agentes Infecciosos e Hospedeiros na Patogênese

Da Leishmaniose Visceral

NOME DO PACIENTE: \_\_\_\_\_

Nº do Projeto: \_\_\_\_\_

**Investigador Principal:** Roque Pacheco de Almeida, Hospital Universitário da UFS,

Aracaju - Sergipe -Brasil.

Este documento explica um estudo de pesquisa e pede a sua permissão para o(a) senhor(a) ou seu (sua) filho(a) participar desta pesquisa. Se o(a) senhor(a) for pai/mãe ou guardião da criança abaixo de 18 anos, que foi convidado a participar desta pesquisa, a palavra "você" neste documento se refere ao seu filho. Ao final da explicação, pediremos ao senhor(a) para assinar este documento, caso concorde em participar desta pesquisa.

**Convite e Objetivo:**

Você está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é identificar pessoas que têm leishmaniose na medula óssea ou no baço para estudar a doença chamada calazar ou leishmaniose visceral. Após lhe ser explicado o que contem neste documento, você pode perguntar tudo sobre a pesquisa ao seu médico. Todos os pacientes com leishmaniose visceral diagnosticados no Hospital Universitário serão convidados a participar do estudo. Caso decida participar do estudo, você será solicitado a assinar este consentimento.

Aproximadamente 100 pessoas participarão deste estudo.

**Participação voluntária:**

Sua participação é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir da participação no estudo a qualquer momento. Sua recusa em participar ou desistir em participar do estudo não afetará de modo algum qualquer tratamento que você estiver recebendo no Hospital Universitário.

**Finalidade do Estudo:** Este estudo visa determinar se o estudo da resposta imune do paciente ao parasita e identificar fatores envolvidos na resistência de algum paciente ao tratamento com o antimonial (Glucantime®) ou anfotericina B.

**Procedimentos:** Caso você aceite participar do estudo, um questionário será feito para saber onde você mora, sua ocupação e seus hábitos. O médico o examinará para ver as características de sua doença. Você realizará os exames que já são utilizados de rotina para diagnósticos de doença, como exame de sangue (sorológico), teste cutâneo e aspiração da medula óssea e/ou baço com seringa e agulha para cultura do parasita que causa a doença. Além disso, seu sangue

será utilizado para avaliar a resposta imune frente a antígenos do parasito, avaliar se o parasito isolado da medula óssea resiste aos medicamentos ou ao óxido nítrico e também silenciar RNA/DNA de suas células a fim de identificar possíveis marcadores genéticos que são responsáveis pelo surgimento da doença. A participação nesta pesquisa não impede você de participar de outras pesquisas, contanto que não mude o tratamento que vai receber.

**Confidencialidade:** Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial, sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe médica do comitê de ética do Hospital Universitário. Embora os resultados obtidos neste estudo sejam publicados não haverá, na apresentação destes resultados, meios que possam identificar os participantes. Suas fichas clínicas e os resultados dos seus exames poderão ser também vistos pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário. Fotos suas poderão ser mostradas em público sem identificar você e protegendo partes íntimas.

**Análise de riscos e benefícios:** Todos os exames coletados são partes da rotina utilizada para o diagnóstico de leishmaniose, os quais você faria mesmo se não participasse do estudo, exceto o sangue obtido ao mesmo momento que será utilizado para os estudos da resposta imune, porém não trará novos riscos para você como o previsto para retirada. A retirada de sangue pode causar dor no local da punção com a agulha e raramente pode ocorrer sangramento ou formação de hematoma. O exame da medula óssea é também de rotina e não causam riscos iminentes. Porém, ocorrendo complicações, os médicos do projeto e do hospital cuidarão de você após o diagnóstico da doença, você será tratado com antimônio (Glucantime®). Este tratamento será acompanhado no Hospital Universitário.

**Retorno do benefício para o sujeito e para a sociedade:** O melhor conhecimento sobre o tratamento da leishmaniose visceral e da resposta imune poderá contribuir no futuro para medidas de controle da doença.

**Custos:** Você não terá custos com a participação no estudo e, caso necessite de tratamento para leishmaniose, a medicação lhe será fornecida gratuitamente. Você não receberá nenhum

pagamento para participar desta pesquisa. Poderemos apenas contribuir com seu transporte para comparecer as visitas no ambulatório após a alta do hospital.

**Esclarecimentos:** Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode ligar para Dr. Roque Pacheco de Almeida (Tel.: (79) 9 8823-7244). Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho, como paciente, você pode procurar o comitê de ética do Hospital Universitário, cujo endereço conta no início deste consentimento.

**Consentimento:** Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. Uma cópia deste consentimento lhe será entregue. Favor assinalar um dos quadros abaixo para indicar se deseja ou não ter o parasita que causa esta doença armazenado para estudos futuros aprovados sobre a leishmaniose.

**ACEITO** que o parasito que causa esta doença seja armazenado para estudos futuros aprovados sobre a leishmaniose.

**NÃO ACEITO** que o parasito que causa esta doença seja armazenado para estudos futuros aprovados sobre a leishmaniose.

_____	_____	_____
Assinatura ou impressão do participante	Data	Hora
_____	_____	_____
Nome/Assinatura do pesquisador	Data	Hora
_____	_____	_____
Nome/Assinatura da testemunha	Data	Hora