



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**CENTRO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**MICHELLE FONTES SOBRAL DE OLIVEIRA**

**Níveis Séricos de Lipopolissacarídeo (LPS) e sCD14 e  
Associação com Gravidade da Leishmaniose Visceral Humana**

**ARACAJU**

**2015**

MICHELLE FONTES SOBRAL DE OLIVEIRA

**Níveis Séricos de Lipopolissacarídeo (LPS) e sCD14 e  
Associação com Gravidade da Leishmaniose Visceral Humana**

Monografia apresentada ao  
Departamento de Medicina como  
requisito parcial para obtenção de  
título de graduado em Medicina pela  
Universidade Federal de Sergipe.

Orientador: PROF. DR. ROQUE  
PACHECO DE ALMEIDA

---

Michelle Fontes Sobral de Oliveira  
Graduanda

---

Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida  
Orientador

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

---

Prof. Dra. Amélia Ribeiro de Jesus  
Examinadora

“Somos o que repetidamente fazemos. A excelência, portanto, não é um feito, mas um hábito”

*Aristóteles*

## DEDICATÓRIA

Dedico com sincero reconhecimento,

A Deus, que guiou meus passos para que o meu maior sonho se concretizasse, me dando forças, quando nem eu mesma achava que tinha, discernimento para ultrapassar todos os obstáculos e paciência para alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, Mércia e Jorge Miguel, por acreditarem em mim quando nem eu mesma acreditei, sonharem meus sonhos, abdicando até dos seus próprios, e por não medirem esforços para me fazer feliz. À minha irmã, Jade, por todo apoio e paciência com meus momentos de estresse. Às minhas avós, Quitéria e Elizete, por toda a torcida. Ao meu avô, José Sobral (in memorian), meu exemplo de médico, que, mesmo não participando diretamente desta conquista, está torcendo por mim no céu. Aos meus tios e tias, especialmente a Tio Sérgio, Tia Clara e Tia Ana, aos meus primos, especialmente, minha afilhada Chintya. Amo vocês, família!

Ao meu amor, Mário, por estar ao meu lado durante todo o curso de medicina, me dando os melhores conselhos e me incentivando a ser cada dia melhor e fazer a diferença, além de me dar muito amor e carinho. Te amo! À dona Noélia, Lipe, Sr. Mário, Anúzia e Pablo, por toda a torcida e amizade.

Aos meus amigos Larissa, Juliana, Diogo e Jéssica, pelo apoio fraternal durante os momentos de estresse com fim de curso e monografia. Aos amigos que a medicina me deu de presente: Benito, Manuela, Gardênia, Daisy e André, juntos fomos mais fortes, pois estivemos unidos até o fim, foi tudo mais divertido e tranquilo com vocês ao meu lado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roque Pacheco, por toda a paciência e zelo, desde a criação da LACMS, passando pelo PIBIC e agora no TCC, muito obrigada por ter me suportado e me ajudado tanto, tenho certeza que ganhei um amigo. A todos os meus professores, em especial, Amélia, Stela, Jerônimo, Thaís, Janicelma, Rosana e Karla Mansilla, pelos exemplos que foram para mim e por me incentivarem a amar cada dia mais a minha futura profissão. À Priscila Lima pela ajuda essencial e incondicional para a conclusão da monografia. Aos que fazem o Laboratório de Biologia Molecular do HU, pelo apoio. Ao CNPQ, pelo financiamento. Aos meus pacientes, principalmente os que acompanhei durante internação no HU para a realização deste trabalho, muito obrigada pela colaboração.

Enfim, médica! Muito obrigada a todos!

## **LISTA DE TABELAS**

### **ARTIGO CIENTÍFICO**

Table 1 - Demographical and clinical characteristics of subjects participant in the study.

Table 2 - Correlation of the sCD14 and clinical, hematologic data and cytokine concentrations.

Table 3 - Serum cytokine correlations between clinical and hematologic data.

## **LISTA DE FIGURAS**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

Figura 1 – Estratificação dos municípios segundo perfil de transmissão de LV, Brasil 2006-2008

Figura 2 – Ciclo de Vida da Leishmaniose Visceral no hospedeiro vertebrado e invertebrado.

Figura 3 - Representação da ligação do LPS com o receptor TLR-4 na membrana do monócito/macrófago.

### **ARTIGO CIENTÍFICO**

Figure 1 - Serum levels of cytokines in VL patients before (n = 25) and after treatment (n = 17) (D0 and D30, respectively), DTH+ (n = 11) and healthy control (n = 07). The molecules were measured by Luminex assay.

Figure 2 - Serum levels of cytokines in VL patients before (a; n = 25) and after (b; n = 17) treatment. Diagram of the relationship of the cytokines before (c) and after (d) treatment. a -  $p \leq 0,05$  b -  $p \leq 0,005$  c -  $p \leq 0,0005$

Figure 3 - Serum levels of the IFABP, LPS, sCD14 and MIF in VL patients before (n = 25) and after treatment (n = 17) (D0 and D30, respectively), DTH+ (n = 11) and healthy control (n = 07). The molecules were measured by ELISA assay.

Figure 4 - Serum levels of cytokines in VL patients with classical VL (n = 25) and severe VL (n = 12). The molecules were measured by Luminex assay. Serum levels of the IFABP, LPS, sCD14 and MIF in VL patients with classical VL and severe VL. The molecules were measured by ELISA assay.

## **LISTA DE GRÁFICOS**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

Gráfico 1 – Incidência de LV no estado de Sergipe e no Brasil de acordo com a faixa etária.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVEATURAS

LV – Leishmaniose Visceral

MS – Ministério da Saúde

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

DTH – delayed – type hypersensitivity

LPS – Lipopolissacarídeo

MIF – Macrophage Migration Inhibitory Factor

FABP2 – Fatty Acid-Binding Protein 2

EUA - Estados Unidos da América

OMS – Organização Mundial de Saúde

WHO – World Health Organization

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SUS – Sistema Único de Saúde

IL - Interleucina

INF-  $\gamma$  – Interferon gamma

Th1 – Linfócito T Helper 1

Th2 – Linfócito T Helper 2

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral alfa

LPG – Lipofosfoligano

*L.chagasi* – *Leishmania chagasi*

*L.donovani* – *Leishmania donovani*

*L.infantum* – *Leishmania infantum*

*L.major* – *Leishmania major*



*L. longipalpis* – *Lutzomia longipalpis*

*L. brasiliensis* – *Lutzomia brasiliensis*

*L. cruzi* – *Lutzomia cruzi*

ROI - Intermediários reativos do oxigênio (ROI)

RNI – Intermediários reativos de nitrogênio

O<sup>2-</sup> - Superóxido

NO - Óxido nítrico

NK – Natural *killers*

Ig – Imunoglobulina

IFI – Imunofluorescência Indireta

RIFI – Reação de imunofluorescência Indireta

ELISA – *Enzyme linked immunosorbent assay*

NNN – Meio de Cultura Neal, Novy, Nicolle

TGI- Trato Gastrointestinal

Cels- Células

rK-39 – Antígeno rK-39

Sb- Antimoniato N-metil glucamina

TLR-4 – Receptor Toll-like 4

CCIH – Comissão de Controle de Infecção Hospitalar

## SUMÁRIO

|          |                                                                      |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                               | <b>12</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                    | <b>15</b> |
| 2.1      | Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral.....               | 15        |
| 2.2      | Ciclo evolutivo e transmissão da Leishmaniose Visceral.....          | 18        |
| 2.3      | Aspectos Clínicos da Leishmaniose Visceral.....                      | 20        |
| 2.4      | Diagnóstico da Leishmaniose Visceral.....                            | 23        |
| 2.5      | Resposta imunológica na Leishmaniose Visceral.....                   | 24        |
| 2.6      | O Papel do LPS na Resposta Inflamatória da Leishmaniose Visceral.... | 27        |
| 2.7      | Tratamento da Leishmaniose Visceral.....                             | 29        |
| <b>3</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                               | <b>31</b> |
| <b>4</b> | <b>ARTIGO ORIGINAL.....</b>                                          | <b>41</b> |
|          | Abstract.....                                                        | 42        |
|          | Introduction.....                                                    | 44        |
|          | Methods.....                                                         | 44        |
|          | Results.....                                                         | 46        |
|          | Discussion.....                                                      | 48        |
|          | Conclusions.....                                                     | 51        |
|          | References.....                                                      | 52        |

Tables ..... 57

Figures ..... 60

## 1 INTRODUÇÃO

Leishmaniose Visceral (LV), também chamada de calazar, é uma protozoose endêmica. Ela pode ser caracterizada como uma doença grave e crônica, cuja letalidade pode alcançar 90% quando não instituído o tratamento adequado (SANTOS, 2001; GONTIJO, 2004; AMATO, 2009; BRASIL, 2009). É causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Nas Américas o *L. infantum chagasi* é o agente etiológico da doença e ele é transmitido ao homem através da picada de insetos flebotomíneos. No Brasil, o principal representante é o *Lutzomyia longipalpis*. (MAIA-ELKHOURY, 2008).

A LV é mais frequente na Ásia, Oriente Médio, África e América Latina (GÓES et. al., 2012; DESJEUX, 2004). É estimado que ocorra 500.000 novos casos e mais de 50.000 óbitos causados pela doença por ano em todo o mundo, porém ainda é subnotificada principalmente nos locais endêmicos (CHAPPUIS, 2007). No Brasil, a LV é considerada uma endemia rural e tem sofrido processo de urbanização causado pelo desmatamento, expansão urbana desordenada e adaptação do vetor ao peridomicílio dessas regiões (AMATO, 2009).

É uma doença espectral, cuja apresentação clínica varia de formas assintomáticas até o quadro clássico. Os pacientes com LV podem apresentar sinais e sintomas de uma infecção sistêmica generalizada, com manifestações como febre, fadiga, perda de apetite, fraqueza e perda de peso. Ocorre, também, invasão do parasita no sistema reticuloendotelial, podendo manifestar ainda linfonodomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia e desordens hematológicas como anemia, plaquetopenia e leucopenia (CHAPPUIS, 2007; OLIVEIRA, 2010).

Segundo o Ministério da Saúde, deve ser considerado grave todo paciente de LV com idade inferior a 6 meses ou superior a 65 anos, desnutrido grave, com comorbidades ou uma das seguintes manifestações clínicas: icterícia, fenômenos hemorrágicos, edema generalizado, sinais de toxemia (letargia, má perfusão, cianose, taquicardia, bradicardia, hipo/hiperventilação e instabilidade hemodinâmica) (BRASIL, 2006). Um recente estudo propôs um escore prognóstico composto por preditores independentes de risco de morte em pacientes com LV: mucosas hipocoradas, dispneia, icterícia, suspeita ou confirmação de infecção bacteriana,

neutropenia e trombocitopenia, considerando-se grave o paciente que tiver 3 ou mais pontos no escore (SAMPAIO et al., 2010).

A doença é caracterizada por alteração da resposta imune celular, especificamente de células T- CD4<sup>+</sup>, contra antígenos do protozoário, gerando uma imunossupressão específica contra a *Leishmania*. Apesar desta imunossupressão, os linfócitos do sangue periférico de pacientes com LV são incapazes de produzir interleucinas de padrão Th1 (INF-  $\gamma$  e IL-12) e produzem elevadas quantidades de interleucinas padrão Th2 (IL-4 e IL-13). Também ocorre ativação policlonal de linfócitos B, expressa pela grande elevação policlonal de globulinas e pela presença de complexos circulantes (CALDAS et.al., 2005; AMATO, 2009). Além disso, na doença ativa há uma quebra da barreira imunológica da mucosa intestinal, facilitando a entrada de bactérias Gram-negativas, produtoras de lipopolissacarídeo (LPS), na circulação (SANTOS-OLIVEIRA et.al., 2011; BRENCHLEY et. al., 2004; MEHANDRU et. al., 2004).

A presença do LPS no soro de pacientes com LV foi associada à gravidade da doença por elevar a expressão de sCD14, MIF (macrophage Migration Inhibitory Factor), FABP2 (Fatty Acid-Binding Protein 2) e aumentar a ativação de células T, todavia a pesquisa foi realizada com um pequeno número de pacientes, necessitando de uma confirmação dos dados com amostra significativa (SANTOS OLIVEIRA et al., 2011).

O LPS induz a ativação das células mononucleares via receptor TLR-4 e promove a secreção de uma variedade de fatores inflamatórios como INF- $\gamma$ , IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , sCD14 e do fator inibidor de migração dos macrófagos (MIF). O CD14, cuja porção solúvel é sCD14, é uma glicoproteína que auxilia no reconhecimento de agentes patogênicos e que são capazes de ativar as células para a produção de citocinas inflamatórias e moduladores de circulação ( SANTOS-OLIVEIRA, 2011).

Preditores específicos e confiáveis de evolução desfavorável ou morte em pacientes portadores de LV são poucos estudados. O presente estudo relaciona os níveis séricos de LPS e sCD14, com a gravidade de pacientes que desenvolveram as variadas formas clínicas de LV. A pesquisa e a identificação de potenciais

biomarcadores que predigam a gravidade da doença poderia favorecer o desenvolvimento de uma terapia alvo e um manejo clínico mais apropriado.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral

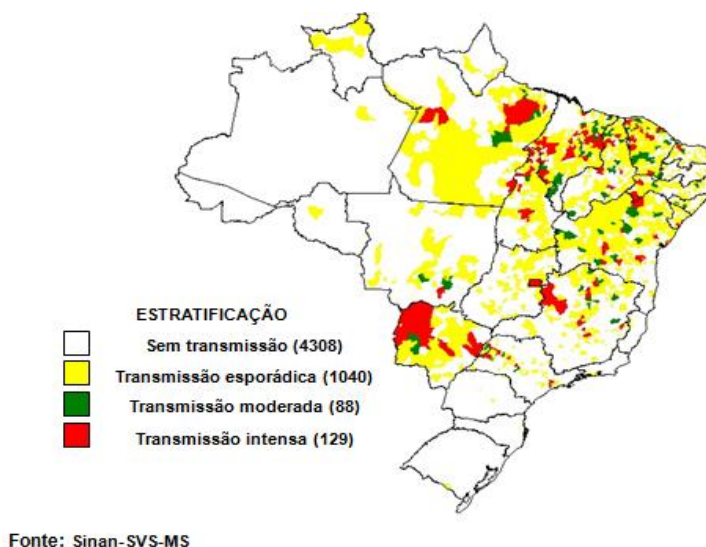
Leishmaniose Visceral é considerada uma doença com distribuição focal e em locais remotos e com dificuldade de exploração dos dados. Dentre os países mais produtivos em pesquisa para LV estão o Brasil, EUA, Reino Unido e Índia. Cerca de 20% dos artigos relacionados ao tema são resultados da interação entre EUA e Brasil (ANTINORI et al., 2011).

A LV é amplamente distribuída pelo mundo, apresentando diferenças em aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos, decorrentes dos diversos ecossistemas. Daí resulta a caracterização da LV em 5 tipos: indiano, mediterrâneo, neotropical ou americano, sudanês e da Ásia central. Segundo a OMS, 90% dos casos então concentrados na Índia, Bangladesh, Brasil, Nepal, Etiópia e Sudão (AMATO, 2009; WHO, 2010; ANTINORI et al., 2011; GÓES et al., 2012; TELES et al., 2013). Sabe-se que a LV tem sua verdadeira incidência subestimada, principalmente nas regiões hiperendêmicas, por múltiplos motivos (crescente prevalência da doença, casos não notificados e aumento de áreas endêmicas) (ANTINORI et al., 2011).

A LV americana (Novo Mundo) é causada pela *Leishmania (L.) chagasi* ou *Leishmania chagasi*, enquanto a leishmaniose do velho mundo é pela *L. donovani* (Índia) ou *L. infantum* (no Mediterrâneo). O agente etiológico da LV no Brasil foi denominado *Leishmania chagasi* em 1937 e é muito semelhante ao *L. infantum*, que causa a LV que ocorre nos países banhados pelo mar Mediterrâneo (AMATO, 2009; BRASIL, 2009; WHO, 2010; DUTHIE et al., 2013). Alguns estudos consideram que *L. infantum* e *L. chagasi* são a mesma espécie, considerando a morfologia, o genótipo do parasito e as doenças a eles atribuídas, surgindo, assim a denominação *L. infantum chagasi* (MAURICIO et al., 2000; GANTT et al., 2001; LUKES et al., 2007).

Na América Latina, o Brasil é o país com maior número de casos notificados de LV, com incidência crescente de 0,8/100.000 casos em 1986 com aumento para 12,3/100.000 casos em 2001 (DANTAS-TORRES, 2006a; ANTINORI et al., 2011). A distribuição geográfica da leishmaniose visceral no país coincide com a do inseto vetor. É uma endemia rural brasileira, embora nas duas últimas décadas a doença

tenha apresentado uma mudança de perfil epidemiológico, representada por um fenômeno de urbanização da doença. Assim, está aumentando a descrição de casos nas cidades e na região periurbana, incluindo as regiões metropolitanas, demonstrando que a doença encontra-se em franca expansão para grandes centros, como mostrado na figura 1, que representa a estratificação da doença por municípios segundo o perfil de transmissão, no período de 2006 a 2008 (DANTAS-TORRES, 2006a; BRASIL, 2009;SVS, 2010; AMATO, 2009; GÓES et al., 2012).



**Figura1: Estratificação dos municípios segundo perfil de transmissão de LV – Brasil 2006 - 2008**

No Brasil, a LV é amplamente distribuída nas 5 regiões, porém o nordeste é o local onde a doença está estabelecida endemicamente há décadas, apresentando 66% dos casos de LV humana (GÓES et al., 2012). A doença está em franca expansão. Não obstante, a análise da série histórica do Nordeste indica redução dos casos na região: passou de 83% (4.029/4.858) do total de confirmados em 2000, para 48% (1.754/3.693) em 2009 (AMATO, 2009; BRASIL, 2009; MS, 2011; ANTIMORI et al., 2011). Segundo o SINAN, que realizou uma análise de distribuição de casos confirmados por unidade federada de 1980 a 2005, observou-se um crescimento de casos notificados de LV no Brasil (164 em 1980 e 3.203 em 2005), e a região Nordeste é a que possui maioria dos casos notificados (152 em 1980 e 1.778 em 2005) (AMATO, 2009).

Com relação a letalidade, uma análise de 2004, pelo Ministério da Saúde, demonstrou um aumento de 26% em relação ao ano de 1994 (BRASIL, 2014). Entre os anos de 2000 e 2012, dentre os 42.067 registros de doentes, ocorreram 2.704

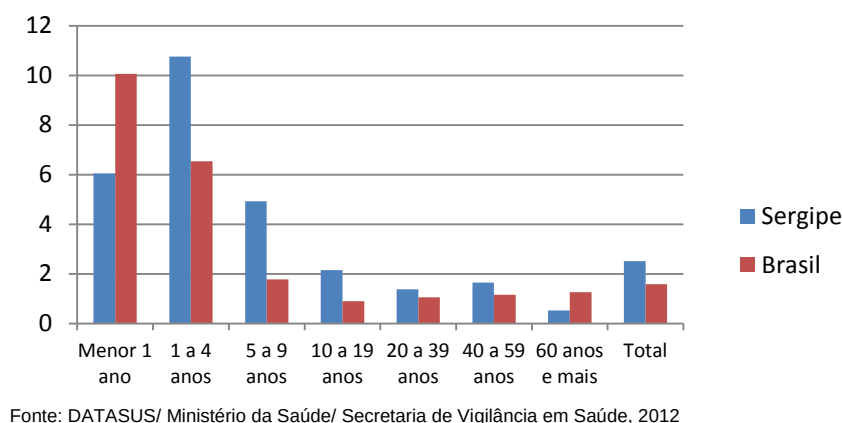


óbitos, resultando em uma incidência de 1,92 casos/100.000 habitantes (DATASUS, 2012).

No estado de Sergipe, a primeira descrição de caso humano de LV foi realizada por Evandro Chagas em 1936 (TAVARES et al., 1999). No período de 1972 a 1998, 1874 casos foram constatados, enquanto que entre 1999 e 2006, 433 novos casos foram relatados. Neste último período, até o ano de 2003, ocorreu uma queda no número de casos, porém, logo depois a incidência voltou a aumentar (GÓES et al., 2012). Em última pesquisa realizada pelo SINAN em 2012, a taxa de incidência de LV no estado foi de 2,51casos/100.000 habitantes.

Aracaju é um local em intensa expansão urbana com média anual de 19,2 casos e é classificada como município de transmissão intensa de LV (GÓES et al., 2012). No período de 1999 a 2008, o coeficiente de incidência anual do município variou de 1,1 a 9,0 casos por 100.000 habitantes e manteve-se mais elevado que a que a média brasileira que é de 2 casos para cada 100.000 habitantes (MAYA-ELKHOURY et al., 2008; GÓES et al., 2012; TELES et al., 2013).

A faixa etária mais predisposta a desenvolver LV são os menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em menores de 5 anos. A explicação para esta maior susceptibilidade é pelo fato de que as crianças apresentam uma maior imaturidade imunológica celular, muitas vezes agravada pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas (COSTA et al., 2005; TELES et al., 2013). O gênero masculino é proporcionalmente o mais afetado (60%), pela maior exposição ao vetor no peridomicílio para realização de atividades laborais e talvez por influência de fatores hormonais, visto que há maior replicação do parasita quando exposto à testosterona (TRAVI et al., 2002; COSTA et al., 2005; LIU et al., 2006). Em Sergipe, a maior incidência foi demonstrada na faixa etária de 1 a 4 anos de idade (10,76 casos/100.000 habitantes) (DATASUS, 2012). O gráfico 1, representa a incidência da LV no Brasil e em Sergipe de acordo com a faixa etária.



**Gráfico 1 - Incidência de LV no estado de Sergipe e no Brasil de acordo com a faixa etária (2012)**

Nos últimos anos, ocorreu um aumento de casos da LV em pacientes imunocomprometidos, transplantados e em uso de quimioterápicos (ANTINORI et al., 2011). Com a disseminação mundial da infecção pelo HIV, a OMS estima que 40 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HIV e que um terço delas vivem em áreas endêmicas de leishmaniose visceral. Dois a 9% de todos os pacientes infectados pelo HIV que vivem em regiões endêmicas desenvolvem LV (ALVAR et al., 2012). Outra categoria de pacientes que apresentam alto risco de desenvolver a doença são os portadores de diversos tipos de câncer. (ANTINORI et al., 2011)

## **2.2 Ciclo evolutivo e transmissão da leishmaniose visceral**

*Leishmania sp.* são parasitas unicelulares, que apresentam uma forma flagelada ou promastigota e outra não flagelada ou amastigota, constituindo um ciclo digenético extracelular (GANTT et al., 2001).

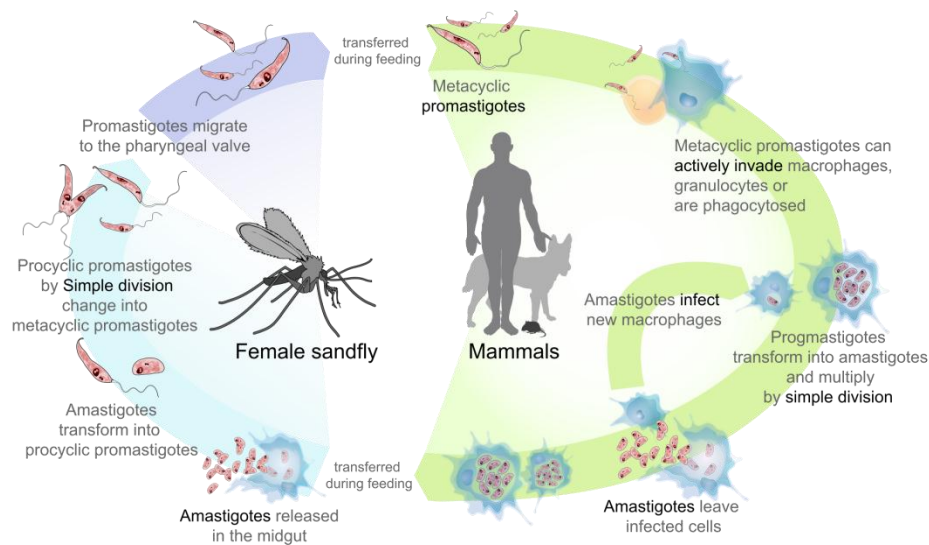
Ao realizar o repasto sanguíneo, a fêmea de flebotomíneos infectada inocula na pele de hospedeiros promastigotas metacíclicas, formas infectivas (CHAPPUIS et al., 2007; STUART et al., 2008).

A inoculação do protozoário na pele do hospedeiro vertebrado através da picada do vetor infectado provoca uma reação inflamatória local, com recrutamento de células do sistema fagocítico (AWASTHI et al., 2004). Embora o parasitismo de promastigotas de *Leishmania sp.* pode ser verificado em todos os fagócitos, elas sobrevivem apenas em macrófagos e monócitos imaturos. A fagocitose do parasita é mediada por interações entre as moléculas presentes na membrana dos

protozoários com os receptores de membrana do fagócito. A mais abundante molécula de superfície de parasitos *Leishmania* é uma glicoproteína denominada gp63. A interação de gp63 com receptores de macrófagos é mais efetiva na presença de proteínas do complemento (ALEXANDER E RUSSEL, 1992; BRITTINGHAM et al., 1999). Outro ligante encontrado na membrana desses parasitos é o glicolípido lipofosfoglicano (LPG), que interage com os receptores CR3 e p150/95. (TUON et al., 2012).

Quando internalizada, a *Leishmania* reside em fagossomos, que se fundem com organelas endocíticas formando o vacúolo parasitóforo. Nesses vacúolos, as promastigotas se diferenciam em amastigotas e se replicam por divisão binária até promoverem a ruptura da membrana celular, sendo liberadas para infectar novos macrófagos, propagando a infecção no hospedeiro vertebrado (SACKS E KAMHAWI, 2001). A inibição da biogênese fagolisossômica e a localização em vacúolos parasitóforos podem representar uma estratégia de sobrevivência utilizada pelos promastigotas, durante a sua transformação em amastigotas (DESJARDINS E DESCOTEAUX, 1997).

A transmissão para o hospedeiro invertebrado ocorre quando a fêmea do flebótomo se alimenta em um hospedeiro infectado e ingere as formas amastigotas. As células infectadas se rompem e liberam as amastigotas que se diferenciam, no interior do intestino do flebótomo, em promastigotas. As promastigotas se multiplicam por divisão binária e migram para o aparelho bucal do vetor onde se acumulam até que o flebótomo faça um novo repasto sanguíneo (SACKS E KAMHAWI, 2001). A figura 2, esquematiza o ciclo biológico da *Leishmania* no hospedeiro vertebrado e invertebrado.



Fonte: [Leishmaniasis life cycle diagram en.svg](#): [LadyofHats](#) Mariana Ruiz Villarreal derivative work: Osado - [Leishmaniasis life cycle diagram en.svg](#)

**Figura 2. Ciclo de vida da Leishmaniose visceral no hospedeiro vertebrado e invertebrado**

No Brasil, a Leishmaniose visceral é uma zoonose de canídeos, que é a principal fonte de infecção. A enzootia canina é mais prevalente que no homem (DANTAS-TORRES, 2006a; BRASIL, 2009). A doença é transmitida ao homem e demais hospedeiros vertebrados pela picada do mosquito vetor (hospedeiro intermediário), cuja espécie principal é *Lutzomia longipalpis*. A distribuição do *L. longipalpis* é ampla e essa espécie é encontrada nas cinco regiões do país. O vetor se adapta facilmente ao peridomicílio e a variadas temperaturas, podendo ser encontrado no domicílio e em abrigo de animais domésticos. Há indícios de que a maior transmissão da doença ocorra logo após a estação chuvosa, pois é nessa época que aumenta a população do vetor (DANTAS-TORRES, 2006a; BRASIL, 2009). Existem, ainda, formas raras de transmissão da LV, como a congênita, via transplacentária (AMATO, 2009).

### 2.3 Aspectos clínicos da Leishmaniose Visceral

O período de incubação da LV é variável, tem geralmente a duração de 10 dias a 24 meses, com média entre 2 a 6 meses. Esse dado é, muitas vezes, difícil de ser obtido e avaliado, pois o início da sintomatologia é, em geral, insidiosa (AMATO, 2009; BRASIL, 2009).

No Brasil, a LV caracteriza-se por três formas clínicas distintas clássicas: assintomática, oligossintomática e clássica. Existe, ainda, a forma grave, com grande risco de morte se não for constituído o tratamento adequado.

Quando geralmente não há evidência de infecção clínica, estamos diante da forma inaparente ou assintomática. Ocorre em 5 de cada 6 indivíduos infectados com a doença (BADARÓ et al., 1986). É detectada em indivíduos sem manifestação clínicas em inquéritos epidemiológicos ou em áreas de transmissão, pela coleta de sangue para exames sorológicos (imunofluorescência indireta/IFI ou *enzyme linked immunosorbent assay*/ ELISA) ou pela positividade da intradermorreação de Montenegro - reatividade cutânea de hipersensibilidade tardia (DTH) positiva - ou seja, o aparato imunológico do paciente controlou a infecção (BADARO et al., 1986; BACELAR et al., 2005). Pacientes encontrados nesse estágio não devem ser tratados nem devem ser notificados, porém deve haver uma vigilância em relação à evolução da doença, pois se houver febre e esplenomegalia, pode-se fazer a suspeita clínica (AMATO, 2009; BRASIL, 2009).

A forma oligossintomática, pode passar despercebida ou ser confundida com outras doenças infecciosas sistêmicas, pois pode ser apenas a manifestação inicial da doença. O paciente, em geral, apresenta discreto comprometimento do estado geral. A suspeita clínica baseia-se na história de febre, fadiga, perda de apetite, discreta anemia, diarreia e emagrecimento. A hepatomegalia normalmente está presente e não ultrapassa 5 cm, e a esplenomegalia, ao contrário da forma de apresentação clínica clássica da LV, é discreta e pode estar ausente (BADARO et al., 1986; BACELAR et al., 2005; AMATO, 2009).

A forma clássica é a doença plenamente manifesta. O **período inicial** também é denominado período agudo, na maioria das vezes se caracteriza por febre diária com duração inferior a 4 semanas e estado geral preservado; frequentemente evidenciam hepatomegalia e esplenomegalia discretas. O **período de estado** é caracterizado pela febre, geralmente alta e irregular, apresentando dois ou três picos diários. Progressivamente, apresenta anorexia, fadiga, palidez cutânea e emagrecimento, surgindo sinais clínicos de desnutrição grave. Ocorre aumento gradativo do tamanho do fígado e sobretudo do baço. No **período final**, a forma de apresentação clássica pode evoluir para uma forma mais grave, chegando a esplenomegalia de grande monta, caquexia pronunciada e anemia intensa. Alguns pacientes podem relatar manifestações hemorrágicas (epistaxe, gengivorragia e

petéquias) e gastrintestinais, como a diarreia. Outro sintoma que pode ser relatado com certa frequência é a tosse seca (relacionada à pneumonite intersticial da LV). Podem ocorrer complicações determinantes de óbitos como hemorragias, ascite e icterícia ou infecções bacterianas (PASTORINO et al., 2002; AMATO, 2009; BRASIL, 2009; COSTA et al., 2013; TELES et al., 2013).

A tríade clássica - febre, hepatoesplenomegalia e pancitopenia- se manifesta em 75% dos casos. Outros sinais e sintomas comuns são astenia, emagrecimento e adenomegalias (ANTINORI et al., 2011).

A desnutrição tem sido considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da forma sintomática da doença, pois a deficiência nutricional afeta particularmente a função fagocítica, produção de anticorpos e citocinas, o que aumentaria a chance de evolução desfavorável para a doença (OLIVEIRA et al., 2010).

Segundo o Ministério da Saúde, a LV grave é a que se apresenta em pacientes com menos de 6 anos de idade ou mais de 65 anos, desnutrição grave, comorbidades ou uma das seguintes manifestações clínicas: icterícia, fenômenos hemorrágicos (exceto epistaxe), edema generalizado, sinais de toxemia (letargia, má perfusão, cianose, taquicardia ou bradicardia, hipo/hiperventilação e instabilidade hemodinâmica) (BRASIL, 2014, AMATO, 2009).

Segundo um estudo realizado com crianças e adolescentes menores de 15 anos internados por LV, foi definido um score para risco de morte que utiliza como parâmetros quatro variáveis clínicas (sangramento de mucosas – 2 pontos, icterícia – 2 pontos, dispneia – 1 ponto, suspeita de co-infecção bacteriana – 1 ponto ) e duas variáveis laboratoriais (neutropenia  $< 500 \text{ cels/mm}^3$  – 1 ponto, trombocitopenia  $< 50.000 \text{ cels/mm}^3$  – 3 pontos) como preditores independentes de risco, sendo considerado grave o paciente que somar 3 ou mais pontos no score (SAMPAIO et al., 2010).

As principais complicações da doença são de natureza infecciosa bacteriana. Dentre elas, as principais são: otite média aguda, piodermites, infecções do trato urinário e respiratório, causadas principalmente por germes encapsulados como o *Streptococcus pneumoniae*. A frequência de infecções bacterianas na LV varia de 11% (QUEIROZ et al., 2004) a 60% (ANDRADE et al., 1990) nos relatos nacionais publicados e podem ser a primeira manifestação da LV (GARCÉS et al., 1990). Caso as complicações infecciosas não sejam devidamente tratadas com antimicrobianos,

o paciente corre o risco de desenvolver um quadro séptico com evolução fatal. As hemorragias são geralmente secundárias à plaquetopenia, e quando se apresenta sob forma de hemorragia digestiva, denota maior gravidade do caso (BRASIL, 2014; COSTA et al., 2013)

No diagnóstico diferencial devem ser consideradas as doenças de curso crônico que apresentam febre e esplenomegalia, como a histoplasmosse, a esquistossomose, a tuberculose miliar, a toxoplasmose, a endocardite bacteriana, a febre tifoide e a malária crônica. Deve-se incluir as doenças não transmissíveis como mieloma múltiplo, linfomas e leucemias, especialmente a mielóide crônica e as collagenoses (AMATO, 2009; BRASIL, 2009).

## **2.4 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral**

Nos casos humanos, a suspeita diagnóstica é rotineiramente baseada nos dados epidemiológicos e nos achados clínicos e laboratoriais, mas o diagnóstico só pode ser formado através do encontro do parasita em tecido infectado (PASTORINO et al., 2002).

O diagnóstico parasitológico geralmente é feito pelo encontro de formas promastigotas de *Leishmania* em esfregaços corados pela coloração de Leishman ou Giemsa obtidos por material biológico através de punção de medula óssea (mielograma) com sensibilidade de cerca de 80- 85% ou punção esplênica com sensibilidade de cerca de 95% (mielocultura). Apesar de ser o método de maior sensibilidade, a punção esplênica não é muito realizada pelo alto risco de sangramento e por necessitar de internação hospitalar para sua realização (PASSOS et al., 2009). A preferência da maioria dos autores é a punção esternal em adultos e a punção de crista ilíaca em crianças. Após a punção, o material deve ser corado e cultivado em meio NNN. As culturas devem ser observadas em microscopia óptica comum ou invertida, semanalmente até 4 semanas. A visualização de formas promastigotas nas culturas positivas fecha o diagnóstico (BRASIL, 2009).

O diagnóstico sorológico é realizado através da pesquisa de anticorpos específicos, utilizando-se antígenos de promastigotas e é muito importante para o diagnóstico de *Leishmania*. As técnicas mais utilizadas são a imunofluorescência indireta (RIFI) e a reação imunoenzimática (ELISA) (ROBERTS et al., 2006; AMATO,

2009; BRASIL, 2009). Esses testes são pouco precisos na detecção de casos subclínicos, assintomáticos e em imunocomprometidos e não negativam após a cura (PASSOS et al., 2005). O diagnóstico sorológico pode ser útil nos casos em que não se encontram parasitas nos esfregaços corados ou nas culturas (SUNDAR et al., 2002).

Uma nova preparação antigênica, o antígeno rK-39, utilizado para o teste rápido e ELISA, mostrou 95% a 100% de positividade na detecção dos casos de LV clássica, sendo bastante utilizado para detecção de doença aguda, além de ter um custo mais acessível que RIFI e ELISA. A desvantagem do rK-39 é que pode-se apresentar positivo, por reação cruzada, na vigência de outras doenças como malária, febre tifoide e tuberculose (SUNDAR et al., 2002; AMATO, 2009).

Recentemente, uma alternativa mais promissora tem sido as técnicas de biologia molecular, sendo a PCR uma técnica que pode ser utilizada como método de triagem inicial para casos suspeitos de leishmaniose, pois apresenta 94% de sensibilidade (ROBERTS et al., 2006; BRASIL, 2009; AMATO, 2009). Esta técnica deve ser considerada com cuidado, principalmente em pacientes provenientes de áreas endêmicas, com alta exposição antigênica (PASTORINO et al., 2002).

A intradermoreação de Montenegro, não é utilizada para o diagnóstico de LV, ao contrario do que ocorre na leishmaniose tegumentar, é geralmente negativa durante o período de estado da doença. Na maioria dos pacientes torna-se positivo após a cura, e se mantém por um período de 6 meses a 3 anos após o término do tratamento (SUNDAR et al., 2002; BRASIL, 2009).

Em situações onde o diagnóstico sorológico ou parasitológico não estiver disponível ou na demora para liberação dos mesmos, o início do tratamento não deve ser postergado frente a um quadro de muita suspeita clínica e epidemiológica (BRASIL, 2009).

## **2.5 Resposta imunológica na leishmaniose visceral**

A sequência dos acontecimentos a partir do momento da picada do vetor até o aparecimento dos sintomas de LV depende de fatores ambientais, da espécie de parasita envolvido e da suscetibilidade do hospedeiro (fatores genéticos e imunológicos); de forma geral, o desenvolvimento da doença é direcionado pela



resposta imune do hospedeiro (BADARO et al., 1986; ROBERTS et al., 2006; AMATO, 2009; MCCALL et al., 2013; BELO et al., 2014).

Primeiro ocorre a resposta inflamatória inespecífica. A fagocitose da promastigota ocorre quando há a ligação da molécula LPG ao macrófago. Porém, se a ligação com a membrana do macrófago não ocorrer, a forma promastigota pode ser lisada pela ativação do complemento humano e participação dos anticorpos inespecíficos (GANTT et al., 2001; AWASTHI et al., 2004). A fixação de c3 e a subsequente ligação da molécula de superfície das promastigotas (gp63 e LPG) com os receptores CR1/CR3 nos macrófagos, parecem ser essenciais para o início da infecção intracelular, pois os macrófagos atuam como células apresentadoras de antígenos (APC) para linfócitos T e B, ativando resposta imune adaptativa. (BOGDAN et al., 2008; AMATO, 2009).

Na modulação da resposta imune, o macrófago parasitado apresenta o antígeno para os linfócitos CD4<sup>+</sup> na tentativa de conter a infecção e, por meio de seus receptores e secreção de interleucina-1 (IL-1), esses linfócitos são ativados. Caso ocorra expansão preferencial de linfócitos CD4<sup>+</sup> do subtipo Th1 com produção de INF- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-2, ocorrerá a ativação dos macrófagos, destruição dos parasitas e resolução do processo. Vários processos celulares começam após a ativação de macrófagos, incluindo a produção de enzimas de degradação fagolisossomais (ex. proteases, nucleases, fosfatases, lípases e esterases), a geração do estresse oxidativo com produção de moléculas como os intermediários reativos do oxigênio (ROI) e nitrogênio (RNI), como superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e óxido nítrico (NO), respectivamente, que são essenciais para a eliminação do parasito (MAUEL et al., 1991; BOGDAN et al., 1998; GANTT et al., 2001; VAN ASSCHE et al., 2011; MCCALL et al., 2013).

Por outro lado, se a resposta for do tipo Th2, com produção de IL-4 e IL-13, o parasito escapa do ponto de inoculação e se dissemina através dos macrófagos para todos os órgãos do sistema fagocítico mononuclear (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2005; AMATO, 2009).

Na LV ocorre, portanto, produção inadequada de IL-2 e INF- $\gamma$  por linfócitos, que explica a incapacidade do macrófago infectado de destruir os parasitas, causada por uma imunossupressão específica para a *Leishmania*. O desequilíbrio na resposta específica de células Th1 ou Th2 é o fato que determina o controle imunológico da infecção ou a progressão para a doença, por meio das diferentes citocinas

produzidas por essas células, em modelos animais. (CARVALHO et al., 1994; GAMA et al., 2004; BACELLAR et al., 2005; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2005; SANTOS-OLIVEIRA et al., 2011).

É interessante notar que durante a resolução da doença há aumento progressivo das quantidades das citocinas de padrão Th1, principalmente INF- $\gamma$ , o que comprova a relação estreita entre a doença e o padrão imune. A produção de IL-12 por macrófagos tem um papel muito importante para estimular a citotoxicidade e a produção INF- $\gamma$  por células NK assim como no desenvolvimento de um tipo específico de imunidade mediada por células T, para destruição do parasito (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2005).

No entanto, em estudos realizados recentemente, observou-se que indivíduos com a forma ativa da doença têm níveis séricos elevados de INF- $\gamma$  e IL-12, mas não são capazes de controlar a infecção (HAILU et al., 2004; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006; KHOSHDEL et al., 2009; AKDIS et al., 2011; COSTA et al., 2013; GAMA et al., 2013; DUTHIE et al., 2014).

Esse paradoxo está associado à presença de IL-10, uma molécula de modulação da resposta imune que inibe a ação do INF- $\gamma$ , diminuindo, assim, as funções leishmanicidas do organismo (BACELLAR et al., 2005; NEYLEN et al., 2007; BOGDAN et al., 2008; GAUTAM et al., 2011; MCCALL et al., 2013). Outras citocinas têm sido apresentadas como reguladoras da resposta imune, como IL-6, IL-21 e IL-27, porém não está comprovado qual o mecanismo de ação dessas moléculas e em que fase da doença elas atuam (ANSARI et al., 2011; HUNTER et al., 2012; COSTA et al., 2013).

Em humanos, os níveis plasmáticos de IL-6 e IL-8 foram associados com a gravidade e letalidade da LV, sendo indicada como alvo terapêutico (COSTA, 2013), pois está comprovado que essa citocina promove proliferação de células T e diferenciação de células B com elevada produção de IgG, IgA e IgM (AKDIS et al., 2011). Após o tratamento, esses níveis de citocinas ficam semelhantes aos de indivíduos assintomáticos e controles saudáveis, pois ocorre a diminuição dessas citocinas de padrão inflamatório (IL-12 e INF- $\gamma$ ) e também promove a diminuição da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos, um dos mecanismos fundamentais na destruição intracelular da *Leishmania* (GAMA et al., 2004; HAILU et al., 2006; ROBERTS et al., 2006; BOGDAN et al., 2008; KHOSHDEL et al., 2009; DUTHIE et al., 2014).

## **2.6O papel do LPS e do sCD14 na Resposta Inflamatória da Leishmaniose Visceral**

A LV é caracterizada por alteração na resposta imune celular, especificamente de células T CD4<sup>+</sup> e as co-infecções bacterianas representam os fatores de severidade da doença, predispondo a um pior desfecho do curso da doença e do risco de morte.

O fato destes pacientes serem neutropênicos facilita a proliferação de bactérias Gram negativas, produtoras de lipopolissacarídeo (LPS). O LPS estimula o sistema imune inato e adaptativo, criando um ambiente que eleva as populações de células T inflamatórias, levando à deficiência imunológica sistêmica. Este fenômeno pode ser indiretamente detectado através da medição dos níveis de LPS no plasma, fato que também foi observado em condições como a doença inflamatória intestinal, linfocitopenia idiopática, e antes do transplante hematopoiético (CARADONNA et al., 2000; BRENCHLEY et al., 2004; LEE et al., 2009).

A presença do LPS no soro de pacientes com LV foi associada à severidade da doença por elevar a expressão de sCD14, MIF (macrophage Migration Inhibitory Factor), FABP2 (Fatty Acid-Binding Protein-2) e aumentar a ativação de células T (SANTOS OLIVEIRA et al., 2011). O LPS estimula as células mononucleares via complexo receptor Toll-like (TLR -4)/ CD14 e promove a secreção de uma variedade de fatores inflamatórios solúveis, tais como IFN- $\gamma$ , a IL-1, IL-6, TNF - $\alpha$ , e MIF (AKIRA et al., 2004; SANTOS-OLIVEIRA et al., 2011).

O sCD14 é a forma solúvel de uma glicoproteína de membrana de macrófagos e monócitos, que atua como co-receptor e está relacionada ao reconhecimento do LPS em conjunto com o receptor TLR-4 (LANDMANN et al., 1996; HENRIQUEZ-CAMACHO et al., 2014). Muitos estudos utilizam a mensuração de níveis plasmáticos de sCD14 para avaliar indiretamente, se o LPS no sangue dos pacientes era biologicamente ativo (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2011). O complexo LPS-CD14-TLR-4 está representado na figura 3.



## 2.7 Tratamento da Leishmaniose Visceral

O tratamento de suporte inclui medidas de hidratação, dieta, antitérmicos, suporte hemoterápico e antibióticos, quando indicados (BRASIL, 2014). Os tratamentos disponíveis no Brasil são: Antimoniais pentavalentes e Anfotericina B (MURRAY, 2004).

A apresentação do antimonial (Glucantime®) é a principal droga para o tratamento de LV e a dose recomendada é de 20 mg/kg/dia de SbV por 20 a 40 dias, sendo o tempo médio de tratamento de 28 dias internados (BRASIL, 2014; AMATO, 2009).

A droga com maior potencial leishmanicida é a Anfotericina B. Ela é a primeira escolha em pacientes com sinais de gravidade. É descrita como a droga com menor desenvolvimento de resistência, ao contrário dos antimoniais pentavalentes. Atualmente apresenta-se de duas formas, sendo basicamente separadas em formulação convencional (desoxicolato) e formulações lipídicas (lipossomal), todas elas para aplicação intravenosa lenta (RATH et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2011; BRASIL, 2014; AMATO, 2009).

A formulação desoxicolato, a dose preconizada é 1 mg/kg/dia (com limite de 50mg/dia), até uma dose total entre 2 e 3 g, durante 14 a 20 dias. Esse esquema apresenta alta toxicidade, principalmente renal, e distúrbios hidroeletrólitos, além de cardiotoxicidade. As formulações lipídicas são medicamentos mais recentes que sofreram modificações da Anfotericina original com o intuito de diminuição de toxicidade e efeitos adversos, principalmente os renais. A mais utilizada no mercado para LV é a Anfotericina lipossomal (Ambisome®). No Brasil, a dose empregada pro tratamento da LV é de 3 mg/kg/dia, por 7 dias ou 4 mg/kg/dia durante 5 dias, nos pacientes graves, que sofreram falha terapêutica ou toxicidade ao desoxicolato de anfotericina B, transplantados renais ou pacientes com insuficiência renal ( $\text{TGF} < 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$ ), alterações renais laboratoriais, histopatológicas ou de imagem (ANTINORI et al., 2011). É usada para casos selecionados devido ao seu alto custo (BRASIL, 2014).

Uma droga que vem se tornando bastante atrativa no tratamento da LV tem sido a Miltefosina, principalmente na Índia, onde os resultados chegaram a 95% de cura. É um quimioterápico de apresentação oral, o que facilita o tratamento. A droga

parece ter poucos eventos adversos, mas ainda precisa de mais estudos para determinar seus efeitos na LV brasileira (MURRAY et al., 2001; AMATO, 2009).

Nos últimos anos foi observado um crescimento incessante dos estudos quanto a diversas combinações de drogas para o tratamento da LV, com o objetivo de diminuir o tempo de tratamento, reduzir a dose total acumulada, diminuição da resistência emergente e melhora da resposta aos pacientes resistentes ou com resposta débil à terapia, como os pacientes co-infectados com HIV. Porém ainda não se tem uma combinação terapêutica eficaz para tais objetivos (MURRAY et al., 2001; SUNDAR et al., 2008; ANTINORI et al., 2011; SINGH et al., 2012; DUTHIE et al., 2013; SUNDAR et al., 2013).

Para evitar complicações inerentes à própria doença, algumas medidas terapêuticas podem ser realizadas. A antibioticoterapia deve ser empregada especialmente em pacientes com menos de 2 meses de idade e em neutropênicos graves ( $<500$  cels/mm<sup>3</sup>), uma vez que é difícil caracterizar um quadro infeccioso em meio a uma síndrome febril como a LV (BRASIL, 2006, AMATO, 2009). Uma grande variedade de agentes infecciosos tem sido isolada em diferentes sítios de infecção, que mais frequentemente são a pele, os tratos respiratório, digestivo e urinário, e o ouvido médio (KADIVAR et al., 2000; BRASIL, 2014). A prescrição de antibióticos deverá seguir as recomendações da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) local ou as normas preconizadas na literatura (BRASIL, 2014).

A nutrição do paciente grave deverá ser iniciada o mais precocemente possível a fim de minimizar os efeitos do hipercatabolismo, utilizando preferencialmente a via enteral para evitar a atrofia intestinal e a translocação bacteriana (BRASIL, 2009).

Os critérios de cura são essencialmente clínicos. Observa-se o desaparecimento da febre por volta do primeiro ao quinto dia de medicação específica. Progressivamente, o paciente melhora o quadro geral, ocorre aumento do apetite e ganho ponderal. A recuperação das alterações hematológicas ocorre a partir da segunda semana e pode ser acompanhada observando-se inicialmente tendência à normalização do número de plaquetas e de leucócitos e após, ocorre melhora progressiva da anemia (BRASIL, 2014; AMATO, 2009).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKDIS, M. et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- gamma: receptors, functions, and roles in diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, n. 3, p. 701-21 e1-70, Mar 2011.

AKIRA S, TAKEDA K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**. Volume 4, 499-511, July 2004.

ALEXANDER J, RUSSEL, DG. The interaction of Leishmania species with macrophages. **Adv Parasitol**, v. 31, p. 175-254, 1992

ALVAR J, VELEZ ID, BERN C, NENERO M, DESJEUX P, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE** 7 (5): e35671. Doi: 10.1371/journal.pone.003567, May 2012.

AMATO VS, TUON FF, NICODEMO EL. Leishmaniose visceral. **Clínica Médica, volume 7: alergia e imunologia clínica, doenças e pele, doenças infecciosas** – Barueri, SP: Manole, 2009.

ANDRADE, T.M., et al. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v.162, n.6, Dec, p.1354-9. 1990.

ANSARI, NA et al. IL-27 and IL-21 are associated with T cell IL-10 responses in human visceral leishmaniasis. **J Immunol**, vol 186, n. 7, p. 3977-85, Apr 1 2011

ANTINORI S, SCHIFANELLA L, M GOBERLLINO. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** ,31: 109-118 DOI: 10.1007/s10096-011-1276-0, 2012.

AWASTHI, A; MATHUR, RK; SAHA, B. immune response to leishmania infection. **Indian J Med Res**, v. 119, n.6, p. 238-58, Jun 2004

BACELLAR OM, CARVALHO E. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. **Gazeta Médica da Bahia**, 2005.

BADARO R, JONES TC, CARVALHO EM, SAMPAIO D, REED SG, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, 154: 1003-1011, 1986.

BELO, VS et al. Risk Factors for Adverse Prognosis and Death in American Visceral Leishmaniasis: A Meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v.8, n.7, p. e2982, Jul 2014

BEZERRA H, TEIXEIRA MJ. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Balb/c mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n.3, p. 349-51, Apr 2001.

BOGDAN, C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. **Cellular Microbiology**, 10 (6) 1221-1234, 2008.

BOGDAN, C; ROLLINGHOFF, M. The immune response to leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. **Int J parasitol**, v. 28, n.1, p. 121-34, Jan 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica** – 7. ed. – Brasília-DF, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. -1ª edição, 5. Reimp - Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose Visceral grave: normas e condutas**/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.



BRECHLEY JM, PRICE DA, SCHACKER TW, ASCHER TE, SILVESTRI G, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. **Nat Med** 12: 1365- 1371, 2006

BRITTINGHAM A. et al. Interaction of Leishmania gp63 with cellular receptors for fibronectin. **Infect Immun**, v. 67, n. 9, p. 4477-84, Sep 1999

BUCALA, R. MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone and glucocorticoid-induced regulator of the immune response. **FASEB J**, v. 10, n.14, p. 1607-13, Dec 1996

CALDAS A, FAVALI C, AQUINO D, ET AL. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC Infect Dis** 2005;5:113.

CARADONNA L, AMATI L, MAGRONE T, PELLEGRINO NM, JIRILLO E, et al. Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. **J Endotoxin Res** 6: 205-214, 2000

CARVALHO EM et al. Restoration of IFN gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 152, p. 5949-5956, 1994.

CHAPPUIS F, SHYAN S, HAILU A, CHALIB H, RIJAL S, PEELING RW, ALVAR J, BOELAERTM. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis treatment and control? **Nat. Rev. Microbiol** 5(11): 873-82, Nov, 2007.

COSTA JML, COSTA ACR, NASCIMENTO MDSB, ALVIN AC, BURATTINI MN, SILVA AR. Leishmaniose Visceral no Estado do Maranhão, Brasil: a evolução de uma epidemia. **Cad Saúde Pública** 11 (2): 321-4,1995.

COSTA JML. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**. 75 (1): Jan-Jun 3-17, 2005

COSTA, AS et al. Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 735-9, Set 2012

COSTA, DL. Et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. **Pathog Glob Health**, v. 107, n. 2, p. 78-87, Mar 2013.

DANTAS- TORRES F, BRANDÃO FILHO SP. Visceral Leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** 28 (3): 151-156, May-June, 2006b

DANTAS-TORRES F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 537-541, 2006 a

DAS, R. et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a critical mediator of the innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 110, n. 32, p. E2997- 3006, Aug 6 2013

DATASUS. Indicadores de Morbidade. Taxa de incidência de LV por faixa etária segunda Unidade da Federação. Período: 2012. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/d0205.def> (Acessado em 21/09/2014)

DESJARDINS M, DESCOTEAUX A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan. **J Exp Med**, v. 185, n. 12, p. 2061-8, Jun 1997

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immun Microbiol Infect Dis**, 27 (5): 305-18, 2004

DUTHIE MS et al. Alteration of the serum biomarker profiles of visceral leishmaniasis during treatment. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, Oct 2013

GAMA ME et al. Severe visceral leishmaniasis in children: the relationship between cytokine patterns and clinical features. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 6, p. 741-5, Nov- Dec 2013.

GAMA ME, et al. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 1, p. 129-36, Jan 2004

GANTT KR, GOLDMAN TL, MCCORMICK ML, et al. Oxidative Responses of Human and Murine Macrophages During Phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **J Immunol** 2001; 167: 893-901 doi: 10.4049/jimmunol.167.2.893, 2001

GARCÉS, J.M., et al. Bacterial infection as a presenting manifestation of visceral leishmaniasis. **Rev Infect Dis**, v.12, n.3, May-Jun, p.518-9. 1990.

GAUTAM, S et al. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 204, n. 7, p. 1134-7, Oct 1 2011

GÓES MAO, MELO CM, JERALDO VLS. Time series of visceral leishmaniasis in Aracaju, state of Sergipe, Brazil (1999 to 2008): human and canine aspects. **Rev. Bras. Epidemiol**, 15(2): 298-307, 2012

GONTIJO CMF, MELO MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, 2004

HAILU, A et al. Elevated plasma levels of interferon (IFN)- gamma, IFN- gamma inducible cytokines and IFN- gamma inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 71, n. 5, p. 561-7, Nov 2004

HUNTER CA, KASTELEIN, R. Interleukin-27: balancing protective and pathological immunity. **Immunity**, v. 37, n.6, p. 960-9, Dec 14 2012

KADIVAR, M.R., et al. Childhood visceral leishmaniasis complicated by bacterial infections. **East Mediterr Health J**; v.6, n.5-6, Sep-Nov, p.879-83, 2000.

KHOSHDEL, A et al. Increased levels of IL-10, IL-12 and IFN- $\gamma$  in patients with visceral leishmaniasis. **Braz J Infect Dis**, v. 13, n.1, p.44-6, Feb 2009

LANDMANN, R. et al. Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock. **J Infect Dis**, v. 173, n.3, p. 661-8, Mar 1996

LANDMANN, R. et al. Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide. **Infect Immun**, v. 64, n.5, p. 1762-9, May 1996

LEE PI, CICCONE EJ, READ SW, ASHER A, PITTS R, et al. Evidence for translocation of microbial products in patients with idiopathic CD4 lymphocytopenia. **J Infect Dis** 199; 1664-1670, 2009

LIU L, WANG L, ZHAO Y, WANG Y, WANG Z, et al. Testosterone attenuates p38 MAPK pathway during *Leishmania donovani* infection of macrophages. **Parasitol Res**, 2006.

LUKES, K. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc. Natl Acad Sci USA**, v. 104, n. 22, p. 9375-80, May 29 2007.

MAIA-ELKHOURY ANS, ALVES WA, SOUZA-GOMES ML, SENA JM, LUNA EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 24(12):2941-2947, dez, 2008;

MAUEL, J; CORRADIN, SB; BUCHMULLER ROUILLER, Y. Nitrogen and oxygen metabolites and the killing of *Leishmania* by activated murine macrophages. **Res Immunol**, v. 142, n. 7, p. 577-80; set 1991

MAURICIO, I.L.; STOTHARD, JR; MILES M.A. The strange case of *Leishmania* chagasi. **Parasitol Today**, v.16, n. 5, p. 188-9, May 2000.

MCCALL LI, ZHANG WW, MATLASHEWSKI. Determinantes for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. **PLoS Pathog** 9 (1): e1003053 doi: 10.1371/journal.ppat.1003053. Jan 2013

MINISTÉRIO DA SAÚDE/ PLANO NACIONAL DE SAÚDE – PNS 2012-2015/. Secretaria-executiva. **Subsecretaria de Planejamento e orçamento** – Brasília: Ministério da Saúde, 2011

MURRAY HW. Clinical and Experimental Advances in Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2001, 45 (8): 2185. DOI: 10.1128/AAC.45.8.2185-2197, 2001

NEYLEN S, SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends Immunol**, v. 28, n.9, p. 378-84. Sep 2007

NYLEN, S et al. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells Distinct from CD4+ CD25+(Foxp3) regulatory T cell in human visceral leishmaniasis. **J Exp Med**, v. 204, n. 4, p. 805-17, Apr 16 2007.

OLIVEIRA JM, et al. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 43 (2): 188-193, mar-abr, 2010

PASSOS S, CARVALHO LP, ORGE G, JERONIMO SM, BEZERRA G, SOTO M, ALONSO C, CARVALHO EM. Recombinant Leishmania Antigens for serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 12 (10): 1164. 2005

PASTORINO AC, JACOB CMA, OSELKA GW; CARNEIRO-SAMPAIO MMS. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **J Pediatr** (Rio J), 78 (2): 120-7 Jan 2002

PERUHYPE-MAGALHAES, V. et al. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. **Scand J Immunol**, v. 62, n. 5, p. 487-95, Nov 2005.

PERUHYPE MAGALHAES, V. et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alfa (+) monocytes are hallmarks of active human viscreal Leishmaniasis due to Leishmania chagasi infection. **Clin exp Immunol**, v. 146, n. 1, p. 124-32, Oct 2006.

QUEIROZ, M.J., et al. Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. **J Pediatr**, Rio de Janeiro, v.80, n.2, Mar-Apr, p.141-6. 2004.

ROBERTS MTM. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **British Medical Bulletin**, 2006.

SACKS, D; KAMHAWI, S. molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol**, v. 55, p. 453-83, 2001

SAMPAIO MJ, et al. Risk factors of death in children with visceral leishmaniasis. **Plos Negl Trop Dis**, V. 4, n.11, Nov 2010.

SANTOS-OLIVEIRA JR, REGIS EG, LEAL CRB, et al. Evidence That Lipopolysaccharide May Contribute to the Cytokine Storm and Cellular Activation in Patients with Visceral Leishmaniasis. **PLoS** Published online doi: [10.1371/journal.pntd.0001198](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001198). Jul 2011.

SILVA AR, TAUIL PL, CAVALCANTE MNS, MEDEIROS MN, PIRES BN, GONÇALVES EGR. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral, na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão. **Rev Soc Bras Med Trop** ,41(4): 352-7, 2008;.

SINAN, 2011  
<[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv\\_casos\\_05\\_09\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_casos_05_09_11.pdf)> Acessado em 29/10/14.

SINGH OP, GIDWANI K, KUMAR R, NYLÈN S, JONES SL, BOELAERT M, SACKS D, SUNDAR S. Reassessment of immune correlates in human visceral leishmaniasis as defined by cytokine release in whole blood. **Clin Vaccine Immunol**. 2012.

STUART K, et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J. Clin Invest**, v. 118, n. 4, p. 1301-10, Apr 2008.

SUNDAR S, CHAKRAVARTY J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opin Pharmacother**. 2013

SUNDAR S, RAI M, CHAKRAVARTY J, AGARWAL D, AGRAWAL N, VAILLANT M, OLLIARO P, MURRAY HW. New treatment approach in Indian visceral leishmaniasis: single-dose liposomal amphotericin B followed by short-course oral miltefosine. **Clin Infect Dis**, 47:1000-1006, 2008

SUNDAR S, RAI M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, p. 951-958, Set. 2002

TAVARES LMSA, TAVARES ED. Incidência, distribuição geográfica e aspectos ambientais das áreas endêmicas da Leishmaniose Visceral em Sergipe. **Inf Epidemiol SUS**. 1999;8(1):47-52.

TELES EBT, ARAUJO JG, SILVA A, CIPOLOTTI R. Manifestações Hemorrágicas e Leishmaniose Visceral. **Prática Hospitalar** nº 85, 10-14, Jan-Fev 2013

TRAVI BL, OSORIO Y, MELBY PC, CHANDRASEKAR B, ARTEAGA L, et al. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. **Infect Immun**, 70: 2288-2296, 2002..

TUON, F. F. ET AL. Expression of TLR2 and TLR4 in lesions of patients with tegumentary American Leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.54, n.3, p. 159-63, May-Jun 2012.

VAN ASSCHE, T. et. al. Leishmania – macrophage interactions insights into the redox biology. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 2, p. 337-51, Jul 15 2011.

WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. **WHO technical report series**, Geneva, 22-26 March 2010.

WHO. Leishmaniasis: burden of disease, surveillance & control, epidemics, access to medicines, information resources. 2010 Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>



#### 4 ARTIGO ORIGINAL

### **VISCERAL LEISHMANIASIS DISEASE SEVERITY IS ASSOCIATED WITH SERUM LEVELS OF IL-6, IL-27 AND SCD14**

Priscila L. dos Santos<sup>1</sup>, Fabrícia A. de Oliveira<sup>1</sup>, Micheli Luize B. Santos<sup>1</sup>, Luana Celina S. Cunha<sup>1</sup>, Michelle Teles Barbosa Lino<sup>1</sup>, Michelle F. S. de Oliveira<sup>1</sup>, Manuela O. M. Bomfim<sup>1</sup>, Angela Maria Silva<sup>1</sup>, Amélia R. de Jesus<sup>1, 2, 3</sup>, Malcolm Duthie<sup>4</sup>, Steven Reed<sup>4</sup>, Roque P. de Almeida<sup>1, 2, 3</sup>

1 – Laboratório de Biologia Molecular – Hospital Universitário – Universidade Federal de Sergipe – Aracaju - Brazil. 2 – Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde - Universidade Federal de Sergipe – Aracaju - Brazil. 3 – Instituto de Investigação em Imunologia, São Paulo, Brazil, 4-IDRI, Infectious Diseases Research Institute, WA-USA

Corresponding author:

Roque Pacheco de Almeida. Rua Cláudio Batista, s/n, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Hospital Universitário, Bairro Sanatório, Aracaju, Sergipe, Brazil. CEP 49060-100.

Tel: (5579) 2105-1806, (5579) 3243-5996;

Fax: (5579) 2105-1811;

e-mail [roquepacheco@uol.com.br](mailto:roquepacheco@uol.com.br).

Short title: Cytokine profile and VL severity

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a severe disease caused by a protozoa of the genus *Leishmania*. The classic VL is characterized by a systemic infection of phagocytic cells and an intense activation of inflammatory response, with major clinical manifestations: hepatosplenomegaly, fever and edema, neutropenia, thrombocytopenia, and hypergammaglobulinemia. The presence of inflammatory mediators in sera, including IFN- $\gamma$  and IL-12, theoretically could help to control the infection. However, it is well known that VL patients present an absence a Th1 response specific to *leishmania* antigen (IL-2 and IFN- $\gamma$ ). Instead, it is observed a production of Th2 and T regulatory cytokines, especially IL-10. It is also unclear why 90% of infected individuals do not develop the disease, while others develop the classical form and some evolve into a more severe form unresponsive to treatment. In this study, we took advantage of this spectrum of disease outcomes, and our objective was to associate the immune profile of individuals infected with *Leishmania infantum chagasi* with the development of disease and disease severity. Sera from patients with confirmed diagnosis for VL were evaluated for the presence of molecules, sCD14, FABP2, MIF and LPS, and compared with healthy controls and asymptomatic individuals. Our results show elevated sCD14 in VL patients as compared to asymptomatic individuals, without differences in LPS levels. This data suggest that some molecule from leishmania could be starting the activation of the inflammatory response via CD14, stimulating a generalized inflammatory response, with production of several cytokines and soluble molecules, including IFN- $\gamma$ , IL-27, IL-10, IL-6 and sCD14. These cytokines are strongly associated with hepatosplenomegaly, neutropenia and thrombocytopenia. We also observed that IL-6 levels greater than 200 pg/ml is strongly associated with death. Together our data reinforce the close relationship of IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-27 in immune dynamics of VL and suggest the direct participation of sCD14 in the activation of the immune response against *L. infantum chagasi*.

## INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL), also known as kala-azar, is a disease caused by intracellular protozoa, *Leishmania donovani* in old world and *Leishmania infantum chagasi* in the new world. VL is ranked as second in mortality and fourth in morbidity, among tropical diseases, with 20,000 to 40,000 deaths per year [1,2]. In the Americas, Brazil is the most prevalent endemic country, registering 3,526 new cases of VL and 219 deaths in 2010 [3-5].

*Leishmania donovani* or *Leishmania infantum chagasi*, multiplies inside the mononuclear phagocyte system cells in the spleen, liver and bone marrow, with enlargement of spleen and liver and can cause hematological disorders, especially thrombocytopenia, which may cause bleeding; and neutropenia, with increased host susceptibility to bacterial infection. Polyclonal activation of B cells and increased gamma globulins is also a disease marker. In addition to these alterations, patients with VL present weight loss and fever [6]. Recent study proposed a prognostic score system for VL patients, that is considered as predictor risks for death, as follows: mucosal bleeding, dyspnea, jaundice, suspected or confirmed bacterial infection, neutropenia and thrombocytopenia [7]. These complications may lead the patient to death if there is no proper treatment. About 90% of those subjects that are infected with *Leishmania* do not develop the classic form of the disease, considered subclinical or asymptomatic, here called asymptomatic [6]. The immune response differs between classical VL and asymptomatic patients. Asymptomatic subjects have a positive cellular immune response against *Leishmania* antigens assessed by DTH (delayed-type hypersensitivity) skin test [6,8] while symptomatic patients do not.

Several studies in animals and humans prove the effectiveness of Th1 type immune response, mediated by IFN- $\gamma$  and IL-12, in eliminating the *Leishmania* to the detriment of Th2 type immune response mediated by IL-4 and IL-13 [8-12]. However, individuals with active VL have high serum concentration of Th1, Th2 cytokines and other molecules, called cytokine storm, including IFN- $\gamma$  and IL-12, but are not able to control the infection. This paradox activity of Th1 cytokines is associated with the potent down modulating effect of IL-10, also present at high levels in these patients' sera [13,14]. This storm of immune mediators in sera is followed by an absence of a leishmania-specific cellular immune response [10]. After successful treatment, this cytokine storm decrease, and the specific response also restores [11,13,15-22]. More

recent studies have also described other sera cytokines as modulators of immune response in VL patients, such as IL-6 [16], IL-21 and IL-27 [23,24]. It is not known how these molecules are induced and interact and whether they are correlated with the patient's clinical outcome. Some questions arise from these observations: What is orchestrating this serum storm? It would be a predisposition of the individual to an exacerbate immune response in an attempt to eliminate the parasite? Or the parasite induces this response to evade host immune attack? The interaction with other pathogens, such as HIV and bacterial co-infections has been describe and associated with severity of VL [25,26]. Santos-Oliveira et al., [27] suggested the interference of bacterial co-infections in the severity of VL, based on the finding of Lipopolysaccharide (LPS), Soluble cluster differentiation 14, (sCD14), Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF), Fatty Acid-Binding Protein 2 (FABP2). This is an interesting finding, but cannot be generalized as an explanation for all VL patients, because is a conclusion based on the evaluation of a few patients.

The identification of biomarkers for assessment disease severity, may contribute to improved clinical monitoring of VL patients, in addition to give some clue to understanding the mechanisms involved in disease pathogenesis. In this study, we confirmed the presence of the cytokine storm in patients with VL and followed their levels during and after treatment. We observed strong correlations between these cytokines with clinical parameters of disease severity.

## **METHODS**

### **Study design and subjects**

This is a cross-sectional study executed from June 2011 to June 2013 in VL Reference Center at the University Hospital in Sergipe State, Brazil. The inclusion criteria were as follows: a suspect case of VL based on clinical symptoms and signs, such as fever, weight loss, anemia, enlargement of spleen an liver, pancytopenia and hypergammaglobulinemia, confirmed by positive bone marrow aspiration by direct microscope observation and/or positive culture in NNN media (Sigma-Aldrich, StLouis, MO) and/or serological rK39 positive test (KalazarDetect® Rapid Test: InBiosInternational Inc., Seattle, WA). Exclusion criteria were: pregnancy, and comorbidities, such as diabetes, HIV, HTLV-1 co-infections. VL relatives presenting

positive DTH skin test, who did not developed classical VL, were considered asymptomatic.

A total of 65 patients and relatives were included in this study and they had their data collected following a standard protocol containing demographic, clinical and laboratory features and submitted to recommended treatment [4]. The subjects were divided in 4 groups: a) DTH+ (n=11) are relatives of VL patients with positive DTH skin test and who did not developed VL; b) VL D0 (n=25) are patients with classical manifestation of VL before treatment; c) VL D30 (n=17) are patients with classical manifestation of VL, 30 days after treatment; d) SVL (severe VL) (n=12) are patients classified as severe VL, based on clinical features described by Sampaio et al., [7] that includes platelet counts  $< 50.000/mm^3$ , bleeding, bacteria infections, neutrophil counts  $< 500/mm^3$ , dyspnea and jaundice; and e) healthy controls (HC) subjects who lives outside the risk areas and are not infected with other infectious disease (n=7).

### **Detection of cytokine in sera**

We collected blood of all subjects, taking care of do not wait more than 30 minutes before separation of sera and freezing at  $-80^{\circ}C$  until use. A total of 11 cytokines were measured by multiplex, using Human Th17 Kit (HTH17MAG-11K, Merck Millipore, Massachusetts, USA), according to manufacturer's instruction. The measured cytokines were IFN- $\gamma$ , IL-12p70, IL-4, IL-13, IL-6, IL-10, IL-17 $\alpha$ , IL-23, IL-27, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . The concentrations was read by Luminex (L200, Austin, USA) and analyzed by MILLIPLEX Analyst 5.1 software (Merck Millipore, Billerica, USA).

### **sCD14, MIF, FABP2 and LPS assay**

The serum levels of these molecules were determined by ELISA assays, according to manufacturer's instruction. Kits for detection of sCD14 (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) present a sensitivity of 125 pg/mL; MIF (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) detect a range 0.156 - 10 ng/mL; FABP2 (Duo set; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) present a sensitivity of 31.2 pg/mL; LPS (Limulus amebocyte lysate QCL-1000; Cambrex, Milan, Italy) present a sensitivity of 10 pg/mL, and the assay was performed twice.

## Statistical analyze

Descriptive and statistic data analysis was performed. Kolmogorov-Smirnov normality test was applied and the data did not follow a Gaussian distribution. Then, we analyze differences between 2 groups by Mann-Whitney Test. Spearman correlation test was used to correlate clinical and laboratorial data with the serum levels of immune molecules. All test were carried out in Graph Pad Prism, version 4.0, 2005. Test were considered statistically significant if the probability of a type I error was less than 5% (p value <0.05).

## Ethical considerations

Ethics Committee of the Hospital Universitário of the Universidade Federal de Sergipe approved this study (CAAE 0151.0.107.000-07). Written informed consent was obtained from all subjects or the guardians of minor of 18 years old. All patients were treated according to the conventional protocol of the Brazilian Ministry of Health.

## RESULTS

### Demographical, clinical and laboratorial data of patients

All the patients had diagnosis of VL confirmed by rK39 serology and/or bone marrow culture. Table 1 describes the demographical, clinical and laboratorial data of the studied subjects. About 45% of the subjects were men in all groups, except for the SVL group that have a great majority of men. The mean  $\pm$  SD age of the SVL group was higher than the VL D0 group, but not significant ( $31 \pm 25$  vs  $15 \pm 13$ , respectively),  $p = 0,13$ . We did not detect differences in spleen or liver sizes between the VL D0 and SVL groups. All groups with active disease presented hematologic disorders that was restored after treatment, especially a decrease in platelet and neutrophil counts, but a more severe decrease was observed in the SVL group (Platelets  $41,359/\text{mm}^3 \pm 66,401$  and neutrophils  $423.4/\text{mm}^3 \pm 324.0$ ), as compared to the VL D0 group (Platelets  $121,130/\text{mm}^3 \pm 80,496$  and neutrophils  $1,106/\text{mm}^3 \pm 820.5$ ) ( $p \leq 0,005$  and  $p \leq 0,05$ , respectively). Hepatic enzymes were elevated in all groups with active disease were reestablished to normal range after treatment. The DTH positive individuals did not present any clinical or laboratorial abnormalities.

### Cytokine profile in VL patients

As expected, our results confirm the presence of serum cytokine storm in active VL patients, when compared with healthy and asymptomatic individuals

(Figure 1). Additionally, we also show a high increase of the IL-27 and IL-1 $\beta$ , cytokine not previously described in VL. The levels of these cytokines decrease significantly after treatment, especially IFN- $\gamma$  ( $1053 \pm 4267$  pg/mL to  $24 \pm 83$  pg/mL), IL-10 ( $46 \pm 41$  pg/mL to  $5 \pm 19$  pg/mL), IL-6 ( $32 \pm 64$  pg/mL to  $3 \pm 8$  pg/mL), IL-27 ( $2675 \pm 1630$  pg/mL to  $895 \pm 1361$  pg/mL) and TNF- $\alpha$  ( $94 \pm 82$  pg/mL to  $20 \pm 31$  pg/mL) (Figure 1, 4a and 4b).

### **Correlation between cytokines**

The serum cytokine storm described as inflammatory condition in VL active disease, could be a determinant or a consequence of disease severity. However, it is a clue which molecules are orchestrating this storm. Looking the levels of cytokines before and after treatment, we observed a decrease of all molecules, but IL-27 presented a lower decline (3x) while the other cytokines showed zero concentration after 30 days of treatment (Figure 2a and 2b). We found stronger correlation between IL-27 and IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  and these correlations maintain after treatment, except with IL-6 (Figure 2c and 2d). In the active VL, IL-6 is correlated positively with inflammatory and regulatory cytokines (IFN- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ ; IL-17 $\alpha$  and IL-27) and after treatment, IL-6 is correlated just with IFN- $\gamma$  and IL-23 (Figure 2c and 2d). The same occurs with IL-17, before treatment, IL-17 $\alpha$  levels correlate with inflammatory and regulatory cytokines (IFN- $\gamma$ ; IL-12p70, TNF $\alpha$ , IL-23, IL-6 and IL-27), and after treatment, they correlate with Th1 cytokines (Figure 2c and 2d).

### **Pathogen recognition molecules and VL**

In order to clarify if bacteria infection could be one of the stimuli to this cytokine storm, LPS, FABP2, MIF and sCD14 molecules were tested. As observed in figure 3, LPS and FABP2 levels are similar between the patients with VL D0 and DTH+ and no disease controls and did not change after treatment (VL D30) (Figure 3a and 3b). However, sCD14 and MIF, molecules associated with TRL recognition, are more elevated in the active disease ( $2882$  ng/L and  $39$  ng/ml, respectively) than in DTH+ individuals ( $1348$  ng/L and  $19$  ng/ml, respectively). These levels decrease with treatment ( $1820$  ng/mL and  $17$  ng/mL, respectively) (Figure 3c and 3d).

sCD14 concentrations correlated with spleen and liver size, hematocrit, hemoglobin concentration, number of the neutrophils, platelets and eosinophil (Table 2). sCD14 also presented more 40% association with IL10, IL6, TNF- $\alpha$  and IL-27 (Table 2). MIF showed low correlation with clinical and laboratorial parameters (data did not presented).

### **IL-6 is associated with disease severity and death**

When we compare the cytokine profiles between classical VL and severe VL, IL-6 levels were significantly more elevated in the severe patients, as compared to the classical VL ( $6430 \pm 11682$  pg/mL versus  $32,3 \pm 64,7$  pg/mL respectively;  $p=0.03$ ) (Figure 4a). Even more interestingly, while severe VL patients that died had

IL-6 serum levels of  $11443 \pm 15388$  pg/mL the survivors severe VL patients had  $2848 \pm 7512$  pg/mL ( $p=0,01$ ), and the classical VL patients had  $32,29 \pm 64,75$  pg/mL ( $p=0,0005$ ) (Figure 4b). All the severe patients that had IL-6 levels  $> 200$  pg/mL in sera died. Although not statistically significant, we also observed that severe VL patients have a tendency to present higher levels of TNF- $\alpha$ , IL-23, IL-27 and IL-10 (Figure 4c – 4f). Once more, analyzing if LPS, FABP2, MIF and sCD14 molecules are related to disease severity, we did not observe any differences in the their levels between patients with classical or severe VL (Figure 4g – 4j).

### **Cytokines levels are correlated with the clinical, hematological and biochemical parameters**

We evaluated how cytokines levels are involved in the disease outcome. These data are in the table 3. Spleen and liver sizes, classical manifestation of VL, are strongly and positively correlated with the levels of IL-10, IL-6, IL-27, IL-23 and TNF $\alpha$ ,  $p \leq 0.0005$ . Hematological disorders were negatively correlated with cytokines levels. For instance, hemoglobin concentration, anemia marker, is negatively correlated with TNF $\alpha$ , IL-6, IL-27, IL-10 and IL-1 $\beta$ ,  $p \leq 0.0005$ . Platelet and eosinophil counts were negatively correlated with TNF $\alpha$ , IL-6, IL-27 and IL-10,  $p \leq 0.0005$ . Neutrophil counts were also negatively correlated with TNF $\alpha$ , IL-27 and IL-6,  $p \leq 0.0005$ . Serum levels of the hepatic enzymes, also considered as a marker of disease severity, especially aspartate aminotransferase (AST), was positively correlated with TNF $\alpha$ , IL-27 and IL-10,  $p \leq 0.0005$ .

## **DISCUSSION**

In our study, we obtained homogeneous groups in bond with gender, except in the severe VL that was more men. This profile could be for the reason that testosterone is linked with increase of the parasite replication and lesion size [28,29], and because that the men was more exposit to sandflies [30]. Regarding age was observed that the most classical VL patients are younger than 15 years. Whereas more susceptibility to severity of VL in patients with more 40 years old. In a meta-analysis study, Belo et al. [31] appoint that children are more prone to developed VL. In fact, severity followed of the death occurs in individual younger than 1 years old and more than 50 [32,33]. In the SVL group, five patients died, two younger than five and three older than 49. Neutrophil and platelet was determinant to distinguish classical and severe VL. Alterations in these elements they are important in the clinical VL because foment infections and bleeding [7,25,33], as observed in SVL group.

In here, we confirmed the higher serum levels of the Th1, Th2, regulatory and inflammatory cytokines in active VL, cytokines storm. We had already observed that



this elevated concentration is more intense than others inflammatory diseases as tuberculosis and Chagas disease [17]. This profile is well described in literature [11,15-22] and could be the direct cause of the manifestation of VL, or by damages of the intense and continue inflammatory response, or by contributing to the proliferation of the parasite. Evidence that increase of the cytokine favors evolution/gravity the disease is that asymptomatic individual did not showed this profile [11,15,17-20,22].

In fact, we revealed stronger correlation between cytokines (specially IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6, IL-27 and TNF- $\alpha$ ) and spleen and liver size, lower counts of the neutrophil and platelets and higher concentrations of the hepatic enzyme, classical manifestations of the VL. Although IFN- $\gamma$  ensure infection control, its ability to eliminate parasite appears to be suppressed [8,34]. The explanation for this paradoxical is that IFN- $\gamma$ , in the early of infection can to eliminate the parasite, but a modulatory response is generate stopping the macrophage activation, specially by IL-10 [10]. Moreover, elevation of the IFN- $\gamma$  is associated with complications of the inflammatory diseases, infectious or not [35,36]. Belkhef et al. [35] describe that nitric oxide-induced proinflammatory cytokines are involved with neurologic deleterious defects in Alzheimer disease. IL-10 is a important immunosuppressive cytokine, acts protecting tissues from collateral damages caused by excessive inflammation [37]. In infectious diseases, where inflammatory response prevent parasite proliferation, IL-10 seem as villain of the ideal response [34]. Several study related the presence of the IL-10 in serum, PBMCs, spleen, liver and lymph node of the VL patients and her association with severity of the VL (reviewed in [14]). We reported the stronger relationship of the levels of the IL-10 and *Leishmania* DNA [17]. Neutralization of the IL-10 in splenic aspirate cells of the VL patients result in more production of the IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  with reduction of the viable *L. donovani* amastigotes [13]. This high production of the IL-10 could be explain by presence of the Blimp+ T cell stimulating the differentiation and proliferation of the plasmocyt cell [38]. IL-6 is a pleiotropic cytokine that, by gp130, can be suppress Th1 response by SOCs [39] and induces developed of the Th2 by NFAT [40]. Polymorphism in the IL-6 gene induce less production of the IL-6 implicating in more severity in the mucosal leishmaniasis [41]. In contrast, in here, we related that patients with high levels of IL-6 evaluated to died. In conformidad with our study, Costa et al., [16] related IL-6 as central cytokine associated with lethal disease and suggest a potential adjuvant therapy. IL-6-/- mice demonstrated accelerated control of the *L. donovani* infection with elevated production of the IFN- $\gamma$  [42]. IL-27 is known as “promiscuous” cytokine, since her subunits can be linked with a diversity of the molecules (reviewed in [24,43]). In fact, IL-27 has been related with Th1, Th2 and Treg responses, but in VL is been as disease promote by stimulated differentiation and expansion of the IL-10 producer T cell [23,43]. This ability in increase IL-10 concentration can be triggered by different pathways that can be promoted too B cell production of antibodies, aggravating more the clinical conditions in VL [24]. TNF- $\alpha$  is a proinflammatory cytokine that acts in synergism with IFN- $\gamma$  activating macrophage to eliminate the parasite. Peruhype-Magalhães et al.

[22] related that although high levels of the TNF- $\alpha$  are detectable in the serum, active VL patients showed low circulant TNF- $\alpha$ + monocytes. De Leonardis et al. [44] described VL case of the VL under TNF- $\alpha$  treatment. All data support the complexity of the immune response in VL and appears to block the understanding of the disease.

Considering the cytokine storm and duplicity of some of them either in direct response, we evaluated which among them would be more interconnected. Initially we observed a strong correlation between IL-10, TNF- $\alpha$  and IL-27. Of these, IL-27 stands out for being more involved with the recognition of microorganisms, inducing expression of TLR2 and 4 and activation Th1 response by STAT1 and STAT3 (reviewed in [43]). Chakravorty and Hensel. [45] demonstrated that activation increases the of IFN- $\gamma$ -induced nitric oxide (NO) production, a proinflammatory molecule capable of eliminating intracellular parasites. In patients with pulmonary complications, IL-27 acts in synergy with TNF- $\alpha$  regulating the expression of CXCL10, a major chemokine, intensifying inflammation [46]. In contrast, IL-27 was associated with inhibition of TNF- $\alpha$  and a decrease in NO production in microglia cells [47]. Moreover, Ansari et al. [23] showed that in VL patients, IL-27 induces production of IL-10 by CD4 + cells as infection control mechanism. IL-27 also was associated with IL-6, these data is conformed literature. Costa et al. [16] suggested that IL-6 would be inhibiting the action of TNF- $\alpha$  still in the early phase of the disease, favoring the development of the disease. Really, we observed a correlation between these cytokines. Analyzing the interaction between members of the IL-12 family, we observed that IL-27 was associated with IL-12p70 and IL-23. IL-12p70 is the bridge to the acquired immune response by stimulating the production of IFN- $\gamma$  in Th1 cells in an attempt to eliminate the parasite [8]. Since IL-23, is involved in the induction of Th1 memory response and different cells of the IL-27 induces differentiation of IL-17. The production of both IL-27 and IL-23 is a factor of complementarity and control in patients with cutaneous leishmaniasis [48]. The fact that IL-27 also be associated with concentrations of IL-1 $\beta$ , reinforces this dual role of this cytokine in VL. IL-1 $\beta$  is involved in activation of inflammasome and intensification of Th1 immune response [49]. This paradox can be explained by the fact that IL-27 is a heterodimer, like its receiver. Different combinations of subunits thereof, as well as interaction with the receptors may result in either immune response according to the nature and stage of infection, as proposed by Hunter and Kastelein [24].

CD14 is a glycoprotein of the membrane find in monocyte and macrophage that acts as co-receptor [50]. Also presented in soluble form, sCD14, which assists in the recognition of circulating pathogens being able to activate endothelial cells [51,52]. In add, the presence of the sCD14 could be inhibit the macrophage activation decrease inflammatory response [53]. Although, related to the recognition of LPS in conjunction of TLR4 [27,54], in this study we observed that high levels of sCD14 in VL patients are not associated with bacterial co-infections or LPS serum levels. In contrast, Santos-Oliveira et al. LPS was associated with serum levels of

sCD14 in patients with VL. Furthermore, the levels of sCD14 in this study were closely related to clinical and laboratory manifestations of VL, and are associated too with production of IL10, IL6, IL-27 and TNF- $\alpha$ . Those data indicate that either parasite antigens are triggering TLR4 or sCD14 participates in activation of other receptors of the innate immune response, such as TLR2, which is most associated with *Leishmania* infections [55]. Activation of the production of the TNF- $\alpha$ - and IFN- $\gamma$  by sCD14 cannot represent risk to parasite since it can developed resistance to macrophage microbicide mechanisms. Giudice et al., [56] and Santos et al., [57] recorded the presence of *Leishmania* resistant to nitric oxide, microbicide molecule released by macrophages activated by IFN- $\gamma$  and that this resistance is related to the multiplication of the parasite. Thus, the parasite would be recruiting more macrophages, modulating its activation and in addition, acquired resistance.

Together, our data suggest that *Leishmania* may trigger sCD14 and start an inflammatory response, stimulating IL-27, IL-10 and IL-6 production. These cytokines down regulate macrophage microbicidal activity contributing to leishmania proliferation and induce antibody production, that is a marker of VL. It is not clear why IL-6 is associated with the most severe cases and death, but it is possible that the known effect of this cytokine in inhibit IFN- $\gamma$  and induce IL-4 production might interfere with specific Th1 cell response in the acute phase of disease, that is also a marker of VL. Further studies should clarify which molecules from the parasite are involved in this phenomenon and explain why the majority of infected individuals did not develop disease, while others develop more severe form.

## CONCLUSIONS

- Active VL patients present high concentrations of inflammatory cytokines, but also of down regulatory cytokines that is probable interfering with parasite killing.
- These cytokines decrease after treatment, specially the down regulatory cytokines.
- The concentrations of IL12p70, IFN- $\gamma$ , IL10, IL17 $\alpha$ , IL6, IL27, IL23, TNF $\alpha$  and IL1 $\beta$  correlates with markers of disease severity, such as liver and spleen size, platelet and neutrophil counts and anemia, along VL patients clinical evolution.
- IL-6 and IL-27 are the cytokines more associated with disease severity, and IL-6 with patient death.
- sCD14 and MIF molecules are elevated in VL patients, as compared to endemic DTH positive controls, and sCD14 is correlated with pro and anti-inflammatory cytokines, suggesting that this molecule is involved in this cytokine storm, and may be involved in the pathogenesis of VL
- These patients have negative blood culture for bacteria, and LPS and IFABP serum levels were not different between VL patients and controls, suggesting that bacteria infection are not associated with these inflammatory phenomena.

We hypothesize that molecules from *Leishmania* are involved in sCD14 production and these immune response deregulations observed in active VL patients.

## REFERENCES

1. Organization WH (2010) Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. WHO technical report series 949.
2. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, et al. (2012) Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. Plos one 7: e35671.
3. Karagiannis-Voules DA, Scholte RG, Guimaraes LH, Utzinger J, Vounatsou P (2013) Bayesian geostatistical modeling of leishmaniasis incidence in Brazil. PLoS Negl Trop Dis 7: e2213.
4. Saúde. BMd (2006) Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde.
5. SINAN (2011) [http://portalsaude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv\\_casos\\_05\\_09\\_11.pdf](http://portalsaude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_casos_05_09_11.pdf)> Acessado em 06/10/11.
6. Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, et al. (1986) New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. J Infect Dis 154: 1003-1011.
7. Sampaio MJ, Cavalcanti NV, Alves JG, Filho MJ, Correia JB (2010) Risk factors for death in children with visceral leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis 4: e877.
8. Bacellar; O, M.Carvalho E (2005) Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. Gazeta Médica da Bahia 75.
9. Sacks D, Noben-Trauth N (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nat Rev Immunol 2: 845-858.
10. Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, et al. (1994) Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. Journal of Immunology 152: 5949-5956.
11. Gama ME, Costa JM, Pereira JC, Gomes CM, Corbett CE (2004) Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. Braz J Med Biol Res 37: 129-136.
12. Bacellar O, Brodskyn C, Guerreiro J, Barral-Netto M, Costa CH, et al. (1996) Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. J Infect Dis 173: 1515-1518.

13. Gautam S, Kumar R, Maurya R, Nylen S, Ansari N, et al. (2011) IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 204: 1134-1137.
14. Nylen S, Sacks D (2007) Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol* 28: 378-384.
15. Costa AS, Costa GC, Aquino DM, Mendonca VR, Barral A, et al. (2012) Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 735-739.
16. Costa DL, Rocha RL, Carvalho RM, Lima-Neto AS, Harhay MO, et al. (2013) Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathog Glob Health* 107: 78-87.
17. Duthie MS, Guderian J, Vallur A, Bhatia A, Lima dos Santos P, et al. (2014) Alteration of the serum biomarker profiles of visceral leishmaniasis during treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33: 639-649.
18. Gama ME, Gomes CM, Silveira FT, Laurenti MD, Goncalves Eda G, et al. (2013) Severe visceral leishmaniasis in children: the relationship between cytokine patterns and clinical features. *Rev Soc Bras Med Trop* 46: 741-745.
19. Hailu A, van der Poll T, Berhe N, Kager PA (2004) Elevated plasma levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-gamma inducing cytokines, and IFN-gamma inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 71: 561-567.
20. Khoshdel A, Alborzi A, Rosouli M, Taheri E, Kiany S, et al. (2009) Increased levels of IL-10, IL-12, and IFN- in patients with visceral leishmaniasis. *Braz J Infect Dis* 13: 44-46.
21. Peruhype-Magalhaes V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva Lde A, Rabello A, et al. (2005) Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. *Scand J Immunol* 62: 487-495.
22. Peruhype-Magalhaes V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva Lde A, Rabello A, et al. (2006) Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol* 146: 124-132.
23. Ansari NA, Kumar R, Gautam S, Nylen S, Singh OP, et al. (2011) IL-27 and IL-21 are associated with T cell IL-10 responses in human visceral leishmaniasis. *J Immunol* 186: 3977-3985.
24. Hunter CA, Kastelein R (2012) Interleukin-27: balancing protective and pathological immunity. *Immunity* 37: 960-969.

25. Belo VS, Struchiner CJ, Barbosa DS, Nascimento BW, Horta MA, et al. (2014) Risk Factors for Adverse Prognosis and Death in American Visceral Leishmaniasis: A Meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2982.
26. Diro E, Lynen L, Ritmeijer K, Boelaert M, Hailu A, et al. (2014) Visceral Leishmaniasis and HIV coinfection in East Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2869.
27. Santos-Oliveira JR, Regis EG, Leal CR, Cunha RV, Bozza PT, et al. (2011) Evidence that lipopolisaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1198.
28. Liu L, Wang L, Zhao Y, Wang Y, Wang Z, et al. (2006) Testosterone attenuates p38 MAPK pathway during *Leishmania donovani* infection of macrophages. *Parasitol Res* 99: 189-193.
29. Travi BL, Osorio Y, Melby PC, Chandrasekar B, Arteaga L, et al. (2002) Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infect Immun* 70: 2288-2296.
30. Costa CH, Pereira HF, Araujo MV (1990) [Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980-1986]. *Rev Saude Publica* 24: 361-372.
31. Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simoes TC, Nascimento BW, et al. (2013) Factors associated with visceral leishmaniasis in the americas: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2182.
32. Leite AI, Araújo LB (2013) Leishmaniose visceral: aspectos epidemiológicos relacionados aos óbitos em Mossoró-RN. *Rev Patol Trop* 42: 301-308.
33. de Araujo VE, Morais MH, Reis IA, Rabello A, Carneiro M (2012) Early clinical manifestations associated with death from visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1511.
34. Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, van Weyenbergh J, et al. (2005) Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis* 5: 113.
35. Belkhef M, Rafa H, Medjeber O, Arroul-Lammali A, Behairi N, et al. (2014) IFN-gamma and TNF-alpha Are Involved During Alzheimer Disease Progression and Correlate with Nitric Oxide Production: A Study in Algerian Patients. *J Interferon Cytokine Res*.
36. Wang SM, Liao YT, Hu YS, Ho TS, Shen CF, et al. (2014) Immunophenotype expressions and cytokine profiles of influenza A H1N1 virus infection in pediatric patients in 2009. *Dis Markers* 2014: 195453.
37. Sabat R, Grutz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, et al. (2010) Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 21: 331-344.

38. Neumann C, Heinrich F, Neumann K, Junghans V, Mashreghi MF, et al. (2014) Role of Blimp-1 in programming Th effector cells into IL-10 producers. *J Exp Med*.
39. Diehl S, Anguita J, Hoffmeyer A, Zapton T, Ihle JN, et al. (2000) Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity* 13: 805-815.
40. Diehl S, Rincon M (2002) The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* 39: 531-536.
41. Castellucci L, Menezes E, Oliveira J, Magalhaes A, Guimaraes LH, et al. (2006) IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J Infect Dis* 194: 519-527.
42. Murray HW (2008) Accelerated control of visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin-6-deficient mice. *Infect Immun* 76: 4088-4091.
43. Wynn C, Petes C, Gee K (2014) Interleukin-27 Mediates Inflammation During Chronic Disease. *J Interferon Cytokine Res*.
44. De Leonardis F, Govoni M, Lo Monaco A, Trotta F (2009) Visceral leishmaniasis and anti-TNF-alpha therapy: case report and review of the literature. *Clin Exp Rheumatol* 27: 503-506.
45. Chakravorty D, Hensel M (2003) Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes Infect* 5: 621-627.
46. Dong S, Zhang X, He Y, Xu F, Li D, et al. (2013) Synergy of IL-27 and TNF-alpha in regulating CXCL10 expression in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 48: 518-530.
47. Baker BJ, Park KW, Qin H, Ma X, Benveniste EN (2010) IL-27 inhibits OSM-mediated TNF-alpha and iNOS gene expression in microglia. *Glia* 58: 1082-1093.
48. Tolouei S, Ghaedi K, Khamesipour A, Akbari M, Baghaei M, et al. (2012) IL-23 and IL-27 Levels in Macrophages Collected from Peripheral Blood of Patients with Healing Vs Non-Healing Form of Cutaneous Leishmaniasis. *Iran J Parasitol* 7: 18-25.
49. Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva AL, et al. (2013) Inflammasome-derived IL-1beta production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nat Med* 19: 909-915.
50. Henriquez-Camacho C, Losa J (2014) Biomarkers for Sepsis. *Biomed Res Int* 2014: 547818.
51. Landmann R, Reber AM, Sansano S, Zimmerli W (1996) Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock. *J Infect Dis* 173: 661-668.
52. Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K (1999) The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today* 5: 123-132.

53. Gluck T, Silver J, Epstein M, Cao P, Farber B, et al. (2001) Parameters influencing membrane CD14 expression and soluble CD14 levels in sepsis. *Eur J Med Res* 6: 351-358.
54. Landmann R, Knopf HP, Link S, Sansano S, Schumann R, et al. (1996) Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide. *Infect Immun* 64: 1762-1769.
55. Tuon FF, Fernandes ER, Duarte MI, Amato VS (2012) Expression of TLR2 and TLR4 in lesions of patients with tegumentary American leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 54: 159-163.
56. Giudice A, Camada I, Leopoldo PT, Pereira JM, Riley LW, et al. (2007) Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis* 7: 7.
57. Santos PL, Costa RV, Braz JM, Santos LF, Batista AC, et al. (2012) *Leishmania chagasi* naturally resistant to nitric oxide isolated from humans and dogs with visceral leishmaniasis in Brazil. *Nitric Oxide* 27: 67-71.



**TABLE 1. DEMOGRAPHICAL AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF SUBJECTS PARTICIPANT IN THE STUDY.**

|                                    | Healthy Control - HC (n=7) | DTH+ (n=11)         | Visceral Leishmaniasis pre-treatment - VL D0 (n=25) | Visceral Leishmaniasis pos-treatment - VL D30 (n=17) | Severe Visceral Leishmaniasis – SVL (n=12) |
|------------------------------------|----------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Gender (M/F)                       | 1/6                        | 5/6                 | 12/13                                               | 9/8                                                  | 11/1                                       |
| Mean age (min/max)                 | 33 (24/50)                 | 25 (3/50)           | 15 (0,7/44)                                         | 16 (0,7/44)                                          | 31 (1/65)                                  |
| Clinical data (mean $\pm$ SD)      |                            |                     |                                                     |                                                      |                                            |
| Spleen size (cm)                   | 0 $\pm$ 0                  | 0 $\pm$ 0           | 9,5 $\pm$ 5,6                                       | 3,3 $\pm$ 3,6c                                       | 10,6 $\pm$ 4,1                             |
| Liver size (cm)                    | 0 $\pm$ 0                  | 0,5 $\pm$ 1,5       | 5,0 $\pm$ 3,2                                       | 2,1 $\pm$ 1,9c                                       | 6,2 $\pm$ 3,8                              |
| Hematological data (mean $\pm$ SD) |                            |                     |                                                     |                                                      |                                            |
| Hematocrit (%)                     | -                          | 40,2 $\pm$ 4,0      | 25,1 $\pm$ 4,1                                      | 32,7 $\pm$ 3,7c                                      | 23,8 $\pm$ 4,8                             |
| Hemoglobin (g/dL)                  | -                          | 13,2 $\pm$ 1,4      | 7,9 $\pm$ 1,3                                       | 10,6 $\pm$ 1,3c                                      | 7,6 $\pm$ 1,5                              |
| Platelet (/mm <sup>3</sup> )       | -                          | 240.273 $\pm$ 5.145 | 121.130 $\pm$ 80.496                                | 245.125 $\pm$ 72.475c                                | 41.359 $\pm$ 66.40b                        |
| Neutrophil (/mm <sup>3</sup> )     | -                          | 2.873 $\pm$ 1.006   | 1.106 $\pm$ 820,5                                   | 2.358 $\pm$ 875,2c                                   | 423,4 $\pm$ 324,0a                         |
| Eosinophils (/mm <sup>3</sup> )    | -                          | 645,9 $\pm$ 538,8   | 71,4 $\pm$ 173, 6                                   | 344,9 $\pm$ 367, 2c                                  | 17,0 $\pm$ 33,5                            |
| Hepatic enzymes (mean $\pm$ SD)    |                            |                     |                                                     |                                                      |                                            |
| AST (U/L)                          | -                          | 24,6 $\pm$ 12,0     | 101,4 $\pm$ 69,49                                   | 44,1 $\pm$ 23,0b                                     | 44,1 $\pm$ 36,8b                           |
| ALT (U/L)                          | -                          | 15,6 $\pm$ 6,8      | 56,9 $\pm$ 38,2                                     | 38,1 $\pm$ 34,9a                                     | 53,0 $\pm$ 146,8c                          |
| $\gamma$ GT (U/L)                  | -                          | 19,7 $\pm$ 7,9      | 85,7 $\pm$ 71,5*                                    | 48,1 $\pm$ 35,2**                                    | 123,3 $\pm$ 61,1                           |
| Alkaline phosphatase(U/L)          | -                          | 137,6 $\pm$ 91,4    | 206,4 $\pm$ 216,5*                                  | 111,3 $\pm$ 99,1**                                   | 228,9 $\pm$ 125,8                          |

a -  $p \leq 0,05$  b -  $p \leq 0,005$  c -  $p \leq 0,0005$  (VL D0 comparison) \*n= 10 \*\*n=8

**TABLE 2. CORRELATION OF THE SCD14 AND CLINICAL, HEMATOLOGIC DATA AND CYTOKINE CONCENTRATIONS.**

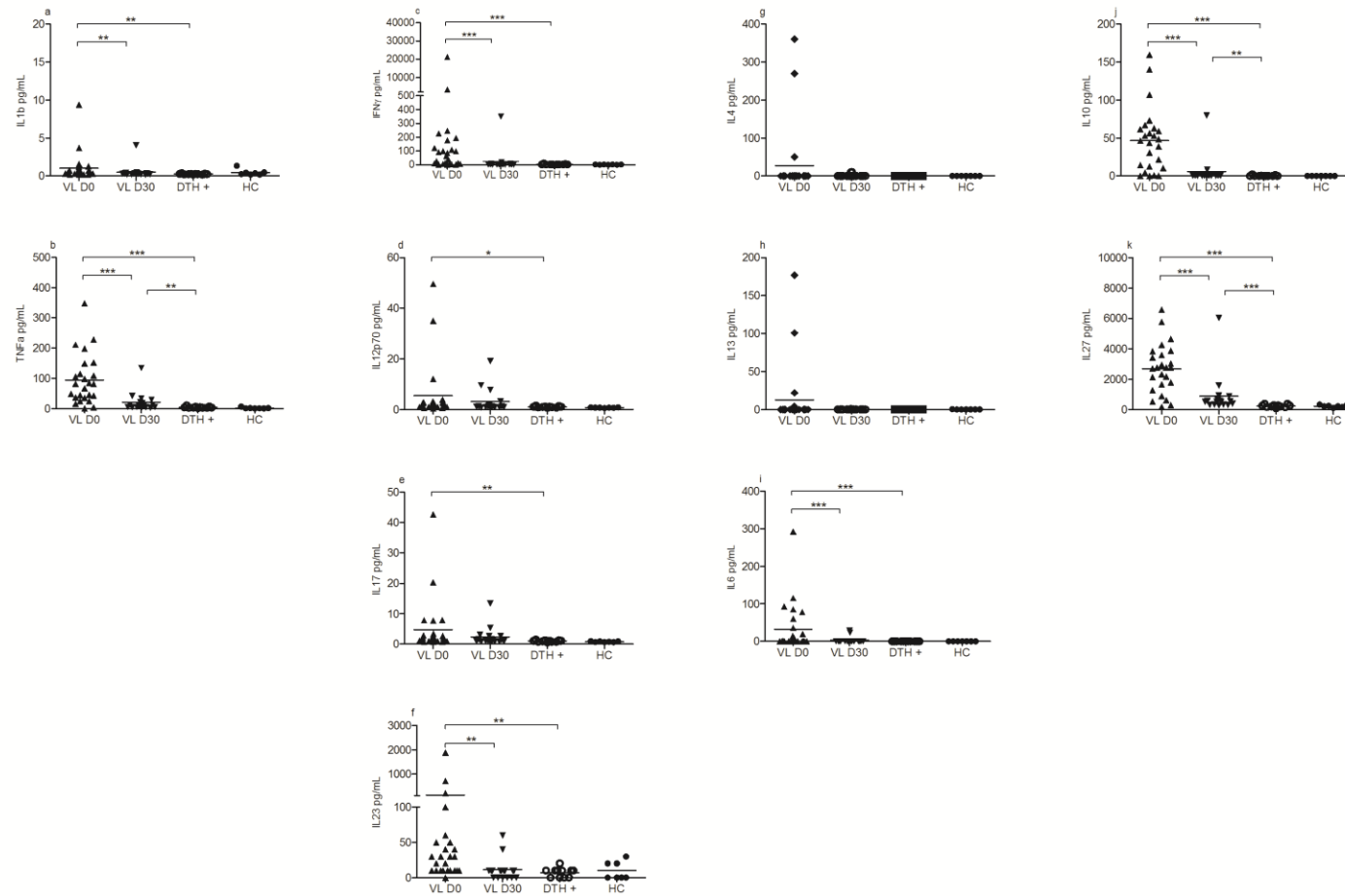
| Clinical and laboratorial evolution | sCD14 |          |
|-------------------------------------|-------|----------|
|                                     | R     | p        |
| Spleen size (cm)                    | 0,67  | < 0.0001 |
| Liver size (cm)                     | 0,52  | < 0.0001 |
| Hemoglobin (g/dL)                   | -0,64 | < 0.0001 |
| Platelet (/mm <sup>3</sup> )        | -0,51 | < 0.0001 |
| Neutrophil (/mm <sup>3</sup> )      | -0,53 | < 0.0001 |
| Eosinophils (/mm <sup>3</sup> )     | -0,53 | < 0.0001 |
| AST (U/L)                           | 0,55  | < 0.0001 |
| ALT (U/L)                           | 0,22  | 0,0687   |
| IL-1 $\beta$                        | 0,37  | 0,0024   |
| TNF $\alpha$                        | 0,49  | < 0.0001 |
| INF $\gamma$                        | 0,35  | 0,0042   |
| IL-12p70                            | 0,35  | 0,0043   |
| IL-17                               | 0,38  | 0,0017   |
| IL-23                               | 0,45  | 0,0002   |
| IL-4                                | 0,07  | 0,3026   |
| IL-13                               | 0,08  | 0,2800   |
| IL-6                                | 0,55  | < 0.0001 |
| IL-10                               | 0,55  | < 0.0001 |
| IL-27                               | 0,47  | 0,0001   |

**TABLE 3. SERUM CYTOKINE CORRELATIONS BETWEEN CLINICAL AND HEMATOLOGIC DATA**

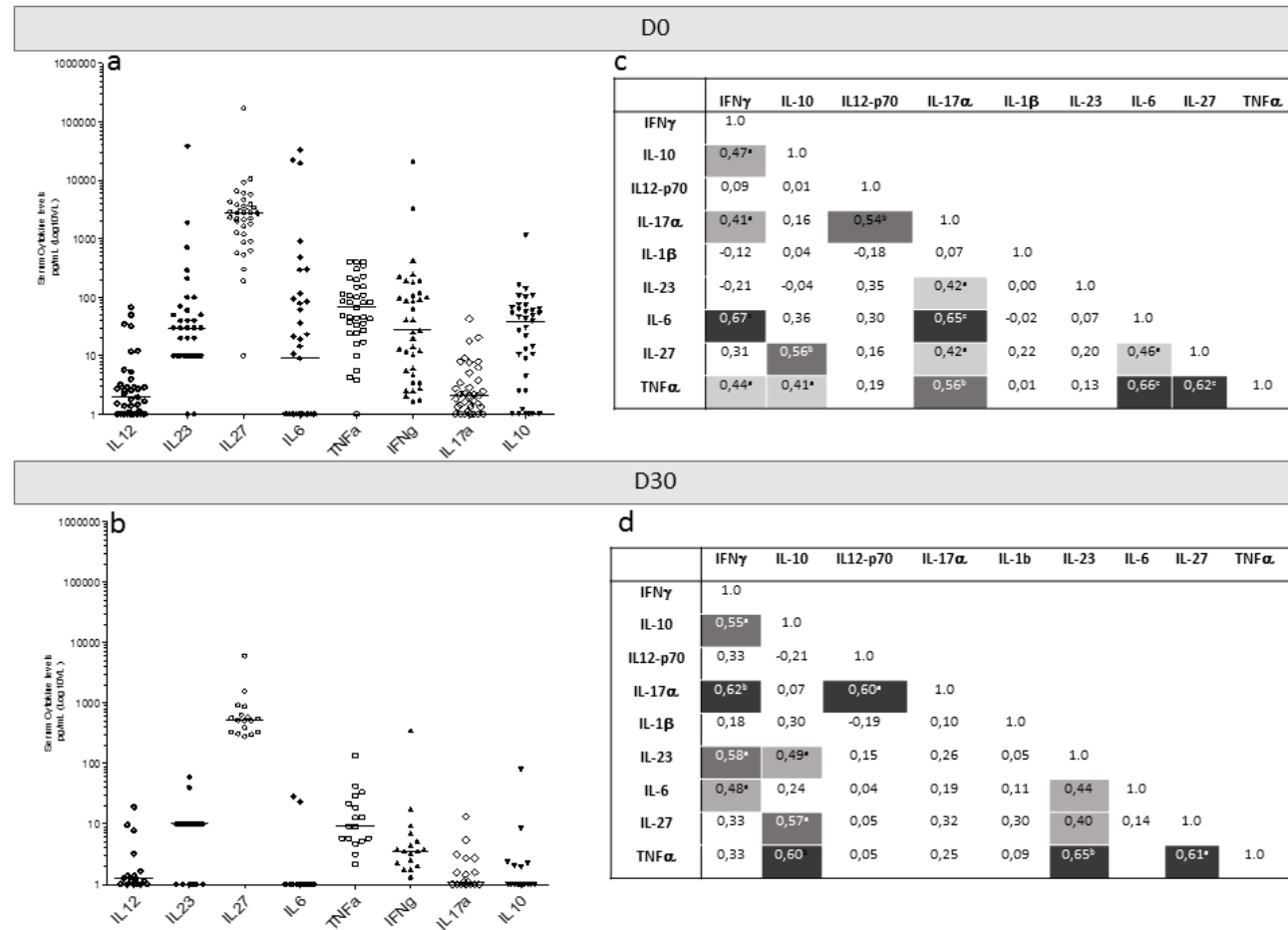
| Clinical and laboratorial data  | Biomolecules |               |               |            |            |       |       |            |            |            |
|---------------------------------|--------------|---------------|---------------|------------|------------|-------|-------|------------|------------|------------|
|                                 | IL-1 $\beta$ | TNF- $\alpha$ | IFN- $\gamma$ | IL-17      | IL-23      | IL-4  | IL-13 | IL-6       | IL-10      | IL-27      |
| Clinical data                   |              |               |               |            |            |       |       |            |            |            |
| Spleen size (cm)                | 0,32b        | 0,64c         | 0,37b         | 0,36b      | 0,46c      | 0,15  | 0,04  | 0,52c      | 0,56c      | 0,65c      |
| Liver size (cm)                 | 0,33b        | 0,63c         | 0,45c         | 0,53c      | 0,53c      | 0,22  | 0,14  | 0,50c      | 0,57c      | 0,72c      |
| Hematological data              |              |               |               |            |            |       |       |            |            |            |
| Hemoglobin (g/dL)               | -<br>0,52c   | -<br>0,69c    | -<br>0,46c    | -<br>0,34b | -<br>0,42c | -0,15 | -0,10 | -<br>0,66c | -<br>0,60c | -<br>0,65c |
| Platelet (/mm <sup>3</sup> )    | -<br>0,49c   | -<br>0,61c    | -<br>0,44c    | -<br>0,30a | -<br>0,36b | -0,13 | -0,20 | -<br>0,53c | -<br>0,53c | -<br>0,62c |
| Neutrophil (/mm <sup>3</sup> )  | -<br>0,39b   | -<br>0,60c    | -<br>0,33b    | -<br>0,44c | -<br>0,40b | -0,11 | -0,27 | -<br>0,54c | -<br>0,46c | -<br>0,64c |
| Eosinophils (/mm <sup>3</sup> ) | -<br>0,35b   | -<br>0,56c    | -<br>0,49c    | -<br>0,41c | -<br>0,30b | -0,07 | -0,11 | -<br>0,53c | -<br>0,54c | -<br>0,59c |
| Hepatic enzymes                 |              |               |               |            |            |       |       |            |            |            |
| AST (U/L)                       | 0,16         | 0,49c         | 0,34b         | 0,12       | 0,28       | 0,10  | -0,11 | 0,26a      | 0,45c      | 0,45c      |
| ALT (U/L)                       | 0,18         | 0,30a         | 0,34b         | 0,08       | 0,17       | 0,08  | -0,02 | 0,00       | 0,36b      | 0,32a      |

a -  $p \leq 0,05$    b -  $p \leq 0,005$    c -  $p \leq 0,0005$

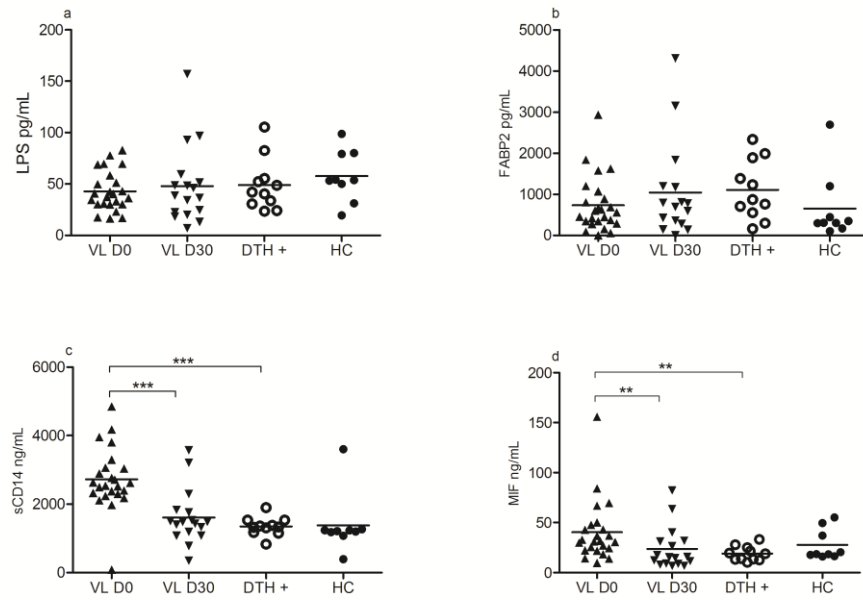
**FIGURE 1. SERUM LEVELS OF CYTOKINES IN VL PATIENTS BEFORE (N = 25) AND AFTER TREATMENT (N = 17) (D0 AND D30, RESPECTIVELY), DTH+ (N = 11) AND HEALTHY CONTROL (N = 07). THE MOLECULES WERE MEASURED BY LUMINEX ASSAY**



**FIGURE 2. SERUM LEVELS OF CYTOKINES IN VL PATIENTS BEFORE (A; N = 25) AND AFTER (B; N = 17) TREATMENT. DIAGRAM OF THE RELATIONSHIP OF THE CYTOKINES BEFORE (C) AND AFTER (D) TREATMENT. A -  $P \leq 0,05$  B -  $P \leq 0,005$  C -  $P \leq 0,0005$**



**FIGURE 3. SERUM LEVELS OF THE IFABP, LPS, SCD14 AND MIF IN VL PATIENTS BEFORE (N = 25) AND AFTER TREATMENT (N = 17) (D0 AND D30, RESPECTIVELY), DTH+ (N = 11) AND HEALTHY CONTROL (N = 07). THE MOLECULES WERE MEASURED BY ELISA ASSAY.**



**FIGURE 4: SERUM LEVELS OF CYTOKINES IN VL PATIENTS WITH CLASSICAL VL (N = 25) AND SEVERE VL (N = 12). THE MOLECULES WERE MEASURED BY LUMINEX ASSAY. SERUM LEVELS OF THE IFABP, LPS, SCD14 AND MIF IN VL PATIENTS WITH CLASSICAL VL AND SEVERE VL. THE MOLECULES WERE MEASURED BY ELISA ASSAY**

