



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

RICARDO LUÍS LOUZADA DA SILVA

**SCD163 COMO BIOMARCADOR DE GRAVIDADE EM HANSENÍASE E
LEISHMANIOSE VISCERAL**

ARACAJU

2016

SILVA, 2016	Scd163 como biomarcador de gravidade em Hanseníase e Leishmaniose Visceral	2016

Ricardo Luís Louzada da Silva

**SCD163 COMO BIOMARCADOR DE GRAVIDADE EM HANSENÍASE E
LEISHMANIOSE VISCERAL**

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

Orientadora: Profa Dra Amélia Maria Ribeiro de Jesus

Co-Orientadora: Profa Dra Patrícia Rodrigues Marques de Souza

Aracaju

2016

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S586s Silva, Ricardo Luís Louzada da
SCD163 como biomarcador de gravidade em hanseníase e
leishmaniose visceral / Ricardo Luís Louzada da Silva ; orientadora
Amélia Maria Ribeiro de Jesus. – Aracaju, 2016.
119 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal
de Sergipe, 2016.

1. Leishmaniose visceral. 2. Hanseníase. 3. Neutrófilos. 4.
Macrófagos. 5. Marcadores biológicos. I. Jesus, Amélia Maria
Ribeiro de, orient. II. Título.

CDU 616.993.161:616-002.73

Ricardo Luís Louzada da Silva

**SCD163 COMO BIOMARCADOR DE GRAVIDADE EM HANSENÍASE E
LEISHMANIOSE VISCERAL**

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

Aprovada em: 13/07/2016

Orientadora: Profa. Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus

1º Examinador: Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres

2º Examinador: Prof. Dr Diego Moura Tanajura

3º Examinador: Prof. Dr Roque Pacheco Almeida

4º Examinador: Profa. Dra Fabrícia Alvisi de Oliveira

À minha família, de onde vim, para onde sempre vou.

Pai, mãe, esposa, filhas.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à minha mentora/orientadora Profa Amélia por toda a paciência e ajuda, com sua experiência e imensa competência. Agradeço pela disponibilidade, pela ajuda como médica da família, pela ajuda com minha saúde e conselhos familiares. Por causa da senhora sou um pesquisador melhor, professor melhor, pai melhor, esposo melhor e pessoa melhor. Mas acima de tudo, agradeço à senhora por me aceitar como sou e compreender meus defeitos apostando em minhas qualidades, quando muitos me viam perdido a senhora me via como estressado e precisando apenas de uma conversa.

Também agradeço ao meu segundo chefe, mestre e mentor Prof Roque Almeida por ter visto em mim uma pessoa que merecia oportunidade de aprender e participar do Laboratório de Biologia Molecular, me ensinando aspectos da pesquisa que não se aprende lendo em texto ou paper nenhum.

À minha amiga, colega e co-orientadora Profa Patrícia Souza, pela ajuda de sempre, acolhimento e brigas altamente produtivas. Você me deu tapas importantes para que eu caminhasse em um caminho que sem seu acolhimento não estaria disponível.

Agradeço aos professores da banca examinadora, tanto da qualificação como da defesa, Profa Tatiana Moura, Prof Diego Tanajura, Profa Patrícia Souza, Profa Nalu Peres e Profa Fabrícia Oliveira. Acredito que a atuação da banca examinadora é importantíssima para moldar o futuro profissional que se forma, chamaria essa atuação de polimento. Apenas uma banca séria, competente e consciente de seu papel pode dar esse polimento e ajuda final. Os senhores foram imprescindíveis para minha carreira.

Ao Prof Michael Lipscomb pelo suporte técnico na publicação, valiosas discussões científicas e pela disponibilidade para a realização de um pós-doutorado em seu laboratório.

Uma equipe numerosa de colaboradores pode tumultuar um trabalho mas, com as pessoas certas ao seu lado, esse trabalho pode ser grandioso. Muito obrigado amigos do LBM, quero estar sempre com vocês construindo conhecimento!!!

Aos amigos do Departamento de Educação em Saúde de Lagarto, muito obrigado pela compreensão e suporte por esses anos de vida corrida.

Aos amigos Prof Leandro e Prof Luís Felipe, mesmo em campos diferentes da ciência, nossas constantes discussões foram importantíssimas para a execução desse trabalho e ainda de outros que virão. Obrigado também pelo suporte logístico em nossa prática constante no Tutorial.

Ao amigo Dr Djalma Lima-Junior pela imensa ajuda e esclarecimento técnico. Você salvou minha vida.

Ao amigos que fiz em duros anos de trabalho e imensa aprendizagem na UNIAGES. Augusto, Rogério, Fabio, Carolina, Hiran, Jaldemir, Prof Wilson, Jaílson e muitos outros. Foi com vocês, senhores, que aprendi a ser professor.

À CAPES, CNPq, FAPITEC/SE e UFS pelo apoio material e financeiro.

Agradeço por último aos meus pais, deixei por último por ser a maior contribuição de todas, algo que não se consegue mensurar, minha criação, meus valores, minha vida.

O professor só pode ensinar quando está disposto a aprender

(Janoí Mamedes)

RESUMO

sCD163 como biomarcador de gravidade em Hanseníase e Leishmaniose Visceral. Ricardo Luís Louzada da Silva. Aracaju-SE, 2016.

O marcador CD163, receptor para o complexo Haptoglobina-Hemoglobina, é expresso em monócitos/macrófagos e neutrófilos. Sua forma solúvel (sCD163) tem sido associada com o fenótipo de macrófagos M2, que modulam negativamente a resposta inflamatória e descritos como relacionados à apresentação Virchowiana da Hanseníase bem como à Tuberculose. Este trabalho se baseou na hipótese de que sCD163 poderia se correlacionar com a gravidade de doenças provocadas por patógenos intracelulares. O objetivo geral foi verificar a presença e caracterizar a associação do marcador CD163 com apresentação clínica da Hanseníase e Leishmaniose Visceral (LV). Soros de pacientes com diferentes formas clínicas de hanseníase (n = 47), e de pacientes com LV foram testados para a presença do sCD163. Foram comparadas as concentrações do sCD163 entre as formas clínicas da hanseníase (Indeterminada - HI, Tuberculóide - HT, Dimorfa - HD e Virchowiana - HV). A presença do sCD163 foi também avaliada nos soros de pacientes com LV (n = 46) no D0 (antes do tratamento) (n = 33), D30 (pós-tratamento) (n = 19) e comparada entre os pacientes no D0 com LV grave (n = 13). Foram observados altos níveis do sCD163 nos soros dos pacientes com hanseníase em comparação com controles contactantes, e confirmou-se a associação desta molécula com a forma HV. Curvas ROC demonstraram alta sensibilidade e especificidade da dosagem desta molécula para a associação com a forma mais grave HV da doença. Na LV, foram observadas concentrações elevadas do sCD163 no D0, sendo estas ainda mais elevadas nos pacientes com LV grave. Além disso, observou-se redução do sCD163 após o tratamento (D30). Análises de correlação confirmaram inter-relação entre o biomarcador e parâmetros de gravidade da LV, sendo observadas correlações diretas entre as concentrações de sCD163 e as medidas do fígado e do baço. Curva ROC, também confirmou a associação entre o nível sérico alto desta molécula com a forma mais grave da LV. Adicionalmente, há uma redução significativa do sCD163 com cura clínica pós-tratamento. Experimentos in vitro indicaram indução da expressão de CD163 na superfície de macrófagos e neutrófilos por *Leishmania amazonensis*, sugerindo que estas células sejam possíveis fontes para a molécula sérica encontrada nos pacientes com LV. Não houve diferenças nos níveis de haptoglobina, heme-oxigenase-1 e arginase-1 entre os pacientes com LV clássico e LV grave. Em conjunto, esses dados um possível papel da molécula de sCD163 como biomarcador de doença e de gravidade na hanseníase e LV, e sugere um papel da leishmania na indução da expressão dessa molécula. Além disso, os achados sugerem que CD163 pode ser um marcador de macrófagos e neutrófilos M2 e N2, os quais podem modular a resposta imune e contribuir para a apresentação clínica de infecções por patógenos intracelulares.

Palavras-chave: CD163, Leishmania, Macrófagos, Neutrófilos, Hanseníase

ABSTRACT

sCD163 as a severity biomarker for Leprosy and Visceral Leishmaniasis. Ricardo Luís Louzada da Silva. Aracaju-SE, 2016

CD163, the receptor for haptoglobin–hemoglobin complex, is expressed on monocytes/macrophages and neutrophils. A soluble form (sCD163) has been associated with the M2 macrophage phenotype. M2 macrophages down-modulate the inflammatory response and has previously been described in the most severe, lepromatous (LL) clinical presentation of leprosy as well as tuberculosis. We hypothesized that sCD163 would correlate with severity of diseases caused by intracellular pathogens. Our general objective was to verify the presence of sCD163 in sera of Leprosy and Visceral leishmaniasis (VL) patients. Sera of patients with different clinical forms of leprosy (n = 47), and VL (n = 65) were tested for the presence of sCD163. The levels of sCD163 were compared in the different clinical forms of leprosy (Indeterminate - IL, Tuberculoid-TL, Borderline-BL and Lepromatous leprosy-LL). The levels of sCD163 were also compared in sera of VL patients before treatment (D0) (n = 46), and at D30 post treatment (n = 19), and also compared at D0, between patients with classical VL (n = 33) and severe VL (n = 13). High levels of sCD163 were detected in sera from leprosy patients as compared to contact controls, and confirmed the association of sCD163 with LL leprosy, finding it at elevated levels in this clinical form. ROC curves showed high sensitivity and specificity for the association between higher levels of this molecule with the most severe LL clinical form. VL patients also presented with high levels of sCD163 in sera at D0 as compared with healthy individuals, and even higher in sera from severe VL patients. Further stratification on infection and disease status revealed a clear association with clinical parameters of disease severity and clinical cure, with a direct correlation sCD163 concentration and liver and spleen sizes. ROC curves also demonstrated high sensitivity and specificity of this molecule to associate this molecule with disease severity of VL. Additionally, sCD163 concentrations reduces after treatment (D30). *In vitro* cultures indicated that *Leishmania* infection induced CD163 expression on the surface of monocyte/macrophages and neutrophils, suggesting these cells as possible sources of sCD163 in the sera. Interestingly, the association of sCD163 levels with disease status was not mirrored by levels of haptoglobin, heme-oxygenase, or arginase. Taken together, our data support the use of sCD163 as a biomarker of disease and severity in both leprosy and VL, and indicate a role of *Leishmania* infection in induce the expression of CD163 in macrophages and neutrophils. This data also suggest CD163 as a marker for M2 and N2, which down modulate inflammatory responses and interfere in the outcome of intracellular infections and the severity of their associated diseases.

Key words: CD163, Leishmania, Macrophages, Neutrophils, Leprosy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	26
Figura 2	35
Figura 3	36
Figura 4	38
Figura 5	39
Figura 6	40
Figura 7	41
Figura 8	41
Figura 9	42
Figura 10	43
Figura 11	44
Figura 12	45
Figura 13	47
Figura 14	48
Figura 15	50
Figura 16	51
Figura 17	52
Figura 18	53
Figura 19	60

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula Apresentadora de Antígenos
CD	<i>Cluster</i> de Diferenciação
DTH+	Delayed-type Hypersensitivity (Hipersensibilidade do tipo tardia)
GFP	Green Fluorescent Protein (Proteína Verde Fluorescente)
Hb	Hemoglobina
HD	Hanseníase Dimorfa
HI	Hanseníase Indeterminada
HO-1	Heme-oxigenase-1
Hp	Haptoglobina
HT	Hanseníase Tuberculóide
HV	Hanseníase Virchowiana
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Muco-cutânea
LV	Leishmaniose Visceral
MFI	Median Fluorescence Intensity (Mediana da Intensidade de Fluorescência)
NO	Nitric Oxide (Óxido Nítrico)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPS	Pathogen-Associated Molecular Pattern (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (Células Mononucleares de Sangue Periférico)
PE	Phycoerythrina
ROC	Receiver Operating Characteristic (Característica de Operação do Receptor)
TB	Tuberculose

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	14
2 - JUSTIFICATIVA	16
3 - REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 – Hanseníase	17
3.1.1- Hanseníase – Aspectos Gerais	17
3.1.2 - Formas clínicas, imunopatogênese da hanseníase	17
3.2 - Leishmaniose visceral	18
3.2.1 - Leishmanioses –Aspectos gerais	19
3.2.2 - Ciclo biológico do parasito	21
3.2.3 - Aspectos imunológicos na leishmaniose visceral humana	22
3.3 - Diferentes subpopulações de macrófagos na resposta imune à infecções	23
3.4 – Neutrófilos na leishmaniose visceral	27
3.5 – Biomarcador CD163	28
4-OBJETIVOS	31
4.1 - Geral:	31
4.2 - Específicos:	31
5 - MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1 - Seleção dos Pacientes com Hanseníase	32
5.2 – Seleção dos Pacientes com Leishmaniose Visceral	32
5.3 – Dosagens séricas	33
5.4 - Aspectos éticos	33
5.5 - Separação de células e cultura	34
5.6 - Infecção com <i>Leishmania</i> -GFP	34
5.7 - Citometria de Fluxo	36
5.8 - Análise estatística	36
6 - RESULTADOS	37
6.1 - Altas concentrações de sCD163 sérico como Biomarcador para Hanseníase Virchowiana	37
6.2 - Níveis de sCD163 se correlacionam com gravidade e melhora clínica em pacientes com Leishmaniose Visceral	40

6.3 - <i>Leishmania</i> induz a expressão de CD163 por macrófagos	44
6.4 - <i>Leishmania</i> induz expressão de CD163 em Neutrófilos	50
7 - DISCUSSÃO	54
8 - CONCLUSÕES	60
9 - PERSPECTIVAS	61
10 - ARTIGOS PRODUZIDOS DURANTE O DOUTORADO	61
11 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
APÊNDICE A	77
APÊNDICE B	80
APÊNDICE C	82

1 – INTRODUÇÃO

A resposta imune exerce um importante papel no reconhecimento e resposta a agentes agressores. Em diversas situações, a ausência de doença resulta de um equilíbrio entre a resposta inflamatória e anti-inflamatória, pois o excesso de resposta pode levar a lesão tecidual e fenômenos de autoimunidade ou hipersensibilidade. Nesse contexto, tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa têm mecanismos de regulação negativos importantes para evitar uma intensa agressão tecidual (Gurung e Kanneganti, 2015).

Na resposta imune inata, os fagócitos são células atraídas muito cedo em resposta a substâncias quimiotáticas dos patógenos ou a quimiocinas da própria resposta imune. As agressões ao tecido que levam a liberação de autoantígenos, a exemplo de hemoglobina, albumina, colágeno, DNA, habitualmente não devem induzir resposta inflamatória, ao contrário, induzem sinais que modulam negativamente a resposta imune. No entanto, os patógenos, os quais tem padrões moleculares específicos (Padrões Moleculares Associados a Patógenos - PAMPs) e diferentes dos de nossas células, induzem a ativação dos fagócitos, expressão de moléculas sinalizadoras e liberação de citocinas que estimulam a resposta inflamatória. Algumas moléculas dos patógenos podem ter efeitos supressores dessa resposta e não ativar a resposta imune, ou podem estimular produção de mediadores anti-inflamatórios, a exemplo da IL-10 (Gurung e Kanneganti, 2015).

A resposta imune adaptativa, cujas células principais são os linfócitos, tem ainda maior plasticidade de reconhecimento e possibilidades de diferenciação em subtipos que modulam positivamente ou negativamente a resposta imune a diferentes tipos de patógenos. Além disso, geram memória para que haja resposta mais rápida em uma nova exposição ao agente infeccioso (Gurung e Kanneganti, 2015).

Como os macrófagos são também células apresentadoras de antígenos, estes têm um papel importante em regular a ativação de linfócitos TCD4+, e diferenciação destes em subtipos que irão regular diferentes tipos de resposta imune. Assim, a depender do microambiente, os macrófagos podem ser fenotipicamente polarizados para montar programas específicos funcionais. Macrófagos polarizados podem ser amplamente classificados em dois grupos principais: os macrófagos classicamente ativados (M1), cujos estímulos ativadores *in vitro* são IFN- γ e LPS, e os macrófagos alternativamente ativados (M2), subdivididos em M2a (após exposição a IL-4 ou IL-13), M2b

(imunocomplexos em combinação com IL-1 β ou LPS) e M2c (IL-10, TGF- β ou glucocorticóides) (Murray *et al.*, 2014).

Macrófagos M1 exibem potentes propriedades microbidas e promovem fortes respostas Th1, mediada pela IL-12 e IL-23, enquanto que o fenótipo M2 é geralmente de suporte e conduz processos anti-inflamatórios. Macrófagos M2 desempenham um papel importante na resolução de inflamação através de altas capacidades endocíticas de depuração de moléculas dos tecidos e portanto autoantígenos, acompanhado pela secreção reduzida de citocinas pró-inflamatórias (Martinez *et al.*, 2008; Krausgruber *et al.*, 2011).

O CD163 expresso na superfície de macrófagos se liga ao complexo haptoglobina-hemoglobina (Hp-Hb), internalizando-o por endocitose mediada por receptor (Hwang e Greer, 1980; Kristiansen *et al.*, 2001). Primeiramente, a ligação da Hb à Hp tem um efeito inibitório às propriedades tóxicas deste complexo e previne a modificação peroxidativa da Hb (Buehler *et al.*, 2009). Adicionalmente, a formação do complexo com a Hp impede a filtração da Hb nos rins (Kino *et al.*, 1987; Fagoonee *et al.*, 2005) e a entrega aos fagócitos que expressam CD163 em sua superfície. E então, a subunidade globina é degradada no lisossomo e o grupamento Heme é liberado e convertido em um composto menos tóxico pela HemeOxigenase-1 (HO-1) no citosol (Belcher *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 2010).

Um outro papel da proteína CD163 é desempenhado na resposta imunológica. Nesse contexto, no qual os macrófagos são adaptados à limpeza tecidual, incluindo complexos Hp-Hb, é que pode ocorrer a expressão de CD163 por essas células, que tem sido associado ao fenótipo M2. Esses macrófagos M2 estão associados à modulação negativa da resposta imunológica e foram descritos como relacionados a uma apresentação mais grave da Hanseníase, a forma Virchowiana (Moura *et al.*, 2012).

Além disso, esse marcador de superfície pode sofrer proteólise e ser liberado para o meio, mediante estímulo anti-inflamatório (Kristiansen *et al.*, 2001), e ser detectado em sua forma solúvel (sCD163), sofrendo modulação mediada pela produção de IL-10 (Philippidis *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2012). Assim, é descrito como marcador para a polarização M2 e como sensor para bactérias gram negativas e positivas (Fabriek *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2015).

2 – JUSTIFICATIVA

As doenças parasitárias afetam de forma considerável a população mundial e dentre elas, as leishmanioses têm um grande impacto na saúde pública global. As leishmanioses são endêmicas em **88 países** distribuídos pelas **Américas**, África, Ásia e sul da Europa. A LV responde por cerca de **200.000 a 400.000 dos casos de leishmaniose**, sendo que mais de **90% destes estão concentrados em Bangladesh, Etiópia, Índia, Sudão, Sudão do Sul e Brasil**. No Brasil, é frequente a notificação de casos de LV nas **regiões nordeste, norte, centro-oeste e sudeste**, o que demonstra a disseminação da doença, **inicialmente concentrada na região nordeste do país**.

A forma solúvel sérica do CD163 tem sido descrita como um biomarcador preditor de gravidade de uma variedade de doenças inflamatórias, a exemplo de **glomerulonefrite, esclerose múltipla e doença de Gaucher** (Moller *et al.*, 2004; Lastrucci *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Stilund *et al.*, 2015), bem assim em doenças infecciosas por agentes intracelulares, como **na Hanseníase e Tuberculose (TB)** (Moura *et al.*, 2012; Lastrucci *et al.*, 2015). Contudo, **não** há estudos na literatura sobre o sCD163 na infecção por *Leishmania*. Nossa **hipótese** é que a infecção por *Leishmania sp.* induz a expressão de CD163 em macrófagos, sendo esta um marcador de permissividade à infecção e que a sua forma solúvel pode ser utilizada como biomarcador de doença e gravidade. Então nosso **objetivo geral** é verificar a presença e caracterizar a associação do marcador sCD163 com a apresentação clínica da Hanseníase e Leishmaniose Visceral e se a infecção por *Leishmania sp* é capaz de induzir a expressão do CD163 em fagócitos humanos.

3 - REVISÃO DA LITERATURA

3.1 - Hanseníase

3.1.1- Hanseníase – Aspectos Gerais

Hanseníase é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), transmitido por via respiratória, com que o homem tem convivido a milhares de anos. A doença atinge principalmente a pele e os nervos, provocando em muitos casos, deformidades graves, motivo de um forte estigma social (Richardus e Habbema, 2007; Alter *et al.*, 2008). São descritos cerca de 500 a 700 mil novos casos da doença no mundo e sua completa extinção não acontecerá com facilidade, apesar do uso de esquemas terapêuticos com múltiplas drogas eficazes (Britton e Lockwood, 2004; Scollard *et al.*, 2006). No Brasil a incidência é de 18,2 pacientes por 100.000 habitantes. Em Sergipe, dados publicados pelo nosso grupo mostram uma inciência de 18,4/100.000 em 2010. No entanto, taxas hiperendêmicas (> 40/100,000) foram observadas em 8 municípios em 2010 (De Oliveira *et al.*, 2012).

3.1.2 - Formas clínicas e imunopatogênese da hanseníase

A classificação clínica na Hanseníase considera 6 formas clínicas: indeterminada, tuberculóide, Virchowiana, e as formas dimorfas (dimorfa tuberculóide, dimorfa dimorfa e dimorfa Virchowiana).

A forma indeterminada (HI) caracteriza-se pela presença de manchas hipocrômicas com distúrbios de sensibilidade, queda de pêlos e ausência de horripilação. Não há comprometimento de troncos nervosos e os indivíduos não são contagiantes. A forma tuberculóide (HT) se caracteriza por lesões cutâneas tipo pápulas ou placas delimitadas com elevação nas bordas, eritêmato-acastanhadas. Pode haver neuropatia periférica que se inicia com a infecção, perpetuando-se por vários anos após a cura clínica da lesão, podendo trazer seqüelas que levam a debilidade física (Scollard *et al.*, 2006; Scollard, 2008a). Esta forma clínica esta associada à resposta imune mediada por células Th1, produtoras de IFN- γ , TNF- α e IL-2, que limitam com sucesso a replicação da bactéria, sendo uma forma não contagiante (Alter *et al.*, 2008).

Na Hanseníase Virchowiana (HV), as lesões cutâneas têm limites imprecisos e uma tonalidade ferruginosa típica. Quando há uma infiltração acentuada na face, com acentuação dos sulcos naturais, configura-se a “facies leonina”. Esta forma clínica é multibacilar e a mais contagiosa da doença. Neste caso existe uma ativação da resposta Th2, produtora das interleucinas IL-4 e IL-13 (Alter *et al.*, 2008) e T regulatória, produtora de IL-10 (Gulia *et al.*, 2010; Palermo *et al.*, 2012), que suprimem a resposta Th1, propiciando a replicação da bactéria com contínua infiltração na pele e nervos.

Na Hanseníase Dimorfa (HD), os casos típicos (Dimorfa dimorfa), apresentam-se com placas com uma área central circular de pele hipocrômica bem delimitada, e que se difunde na periferia, perdendo os seus limites na pele (lesões “esburacadas” ou “em queijo suíço”). A carga bacilar tende a ser alta, sendo uma forma contagiosa. Os nervos periféricos são comprometidos com frequência. A neuropatia periférica pode se perpetuar por vários anos após a cura clínica da lesão, podendo evoluir com seqüelas. A forma dimorfa pode apresentar-se com lesões que lembram as da forma tuberculóide (Dimorfa tuberculóide - HDT), ou as da forma Virchowiana (Dimorfa Virchowiana - HDW) (Scollard *et al.*, 2006).

O curso da infecção é dependente da resposta imunológica do hospedeiro, a qual é influenciada por fatores genéticos. Indivíduos com as formas multibacilares não produzem IFN- γ e ativação de macrófagos está comprometida, o *M. leprae* prolifera e se dissemina. Entretanto, na forma tuberculóide há produção de IFN- γ e TNF- α , mas observa-se também o desenvolvimento de lesões, embora sejam paucibacilares (Mempel *et al.*, 2000; Britton e Lockwood, 2004; Scollard *et al.*, 2006; Scollard, 2008b).

Alguns aspectos da imunopatogênese da doença permanecem ainda obscuros, a exemplo da participação de elementos da resposta imune inata e de células Th17 e T regulatórias no curso clínico da doença. Dentre os elementos da imunidade inata, as células apresentadoras de antígenos são importantes na definição do tipo de resposta imune adaptativa que irá se desenvolver. Citocinas da resposta imune inata, como a IL-6, IL-4, IL-8 e da família da IL-12 (IL-18, IL-23, IL-27), produzidas durante a apresentação de antígenos, quando há interação entre as células APC com linfócitos T CD4+, podem desencadear respostas distintas de células da resposta imune adaptativa por interferência na diferenciação de células T (Hunter *et al.*, 2004; Hunter, 2005; Kastelein *et al.*, 2007). Além disso, suas produções são orquestradas de formas distintas a depender do patógeno.

3.2 - Leishmaniose visceral

3.2.1 - Leishmanioses –Aspectos gerais

As leishmanioses são endêmicas em 88 países distribuídos pelas Américas, África, Ásia e sul da Europa (Pace, 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2014) as leishmanioses podem se manifestar sob três formas clínicas principais: a leishmaniose cutânea (LC), a mucocutânea (LMC) e a visceral (LV) também conhecida como Calazar. Nas suas diferentes formas clínicas, afetam aproximadamente 12 milhões de pessoas no mundo, estando 350 milhões expostas ao risco de contrair doença. Estima-se uma incidência anual de 1,2 milhões de casos, com 20.000 a 30.000 mortes em decorrência da doença. A LV responde por cerca de 200.000 a 400.000 dos casos de leishmaniose, sendo que mais de 90% destes estão concentrados em Bangladesh, Etiópia, Índia, Sudão, Sudão do Sul e Brasil ((Who), 2012). No Brasil, é frequente a notificação de casos de LV nas regiões nordeste, norte, centro-oeste e sudeste, inicialmente concentrada na região nordeste do país, os dados mais recentes mostram a disseminação da doença no país (Alves, 2009; Karagiannis-Voules *et al.*, 2013). Acredita-se que fatores como a alta capacidade adaptativa do inseto vetor *Lutzomia longipalpis*, principal responsável pela transmissão da doença no Brasil (Lainson e Rangel, 2005). As constantes migrações internas e crescente urbanização dessas regiões, provavelmente tenham contribuído para a rápida expansão da doença.

A apresentação clínica da doença está diretamente associada ao tropismo da espécie do parasito e à resposta imune do hospedeiro, eficiente ou não no combate ao protozoário (Alvar *et al.*, 2006; Banuls *et al.*, 2007). A LC é caracterizada pelo aparecimento de úlceras nas partes expostas do corpo, sobretudo face, pernas e braços, podendo estas lesões serem brandas e auto resolutivas ou graves. Em alguns casos, a LC pode acometer as mucosas e evoluir para a forma mucocutânea ou mucosa (Silveira *et al.*, 2004). A LV, a forma mais grave da doença, está associada aos parasitos do complexo *Leishmania donovani*, os quais possuem tropismo pelas células do sistema reticulo endotelial, principalmente do baço, do fígado e da medula óssea (Lukes *et al.*, 2007). De acordo com as manifestações clínicas e laboratoriais apresentada pelos pacientes, a LV pode ser classificada nas formas: assintomática; oligossintomática e clássica (LV) (Badaro *et al.*, 1986).

A forma assintomática é caracterizada pela ausência de sinais e sintomas associada à presença de teste de hipersensibilidade ao antígeno de *Leishmania* positivo

(DTH ou Teste de Montenegro), sendo a forma mais comum da infecção. Segundo Lima et al (2012), cerca de 40% dos moradores de áreas endêmicas são DTH positivos, os quais estão frequentemente associados com a presença de paciente com a forma clássica na família ou na vizinhança (Lima *et al.*, 2012). Carvalho et al (1992), demonstraram em um estudo de Coorte, que indivíduos com soroconversão recente e assintomáticos que desenvolviam uma resposta imune mediada por células com perfil Th1 não evoluíram para LV e apresentaram posteriormente o DTH positivo, enquanto que aqueles que não apresentaram esta resposta evoluíram para a forma clássica da doença (Carvalho *et al.*, 1992).

Na forma oligossintomática, também denominada subclínica, os indivíduos frequentemente apresentam sintomas leves como diarreia, mal-estar e febre baixa. Na maioria dos casos há discreto aumento do tamanho do fígado e o baço não é palpável. Em geral, apresentam DTH positivo, hemograma e provas de função hepática pouco alteradas. Essa forma clínica pode progredir para a cura clínica espontânea ou progredir para a LV clássica, forma mais grave da doença (Badaro *et al.*, 1986).

A forma clássica da doença é caracterizada pela presença de febre, anorexia, caquexia, hepatoesplenomegalia e hipergamaglobulinemia, além de alterações hematológicas tais como anemia, leucopenia e plaquetopenia, podendo associar-se a episódios hemorrágicos (Badaro *et al.*, 1986; Pastorino *et al.*, 2002). As dosagens de AST (aminotransferase de aspartato) e ALT (aminotransferase de alanina) estão frequentemente alteradas, evidenciando a ocorrência de disfunção hepática. Nessa forma clínica, há deficiência na resposta imune mediada por células (Th1) o que favorece a disseminação do parasito no hospedeiro, principalmente no baço, fígado, linfonodos e medula óssea. Os indivíduos com essa forma apresentam também teste de hipersensibilidade ao antígeno de *Leishmania* negativo. Além disso, esses pacientes apresentam um quadro de ativação policlonal de linfócitos B, com produção acentuada de anticorpos e hipergamaglobulinemia, além de liberação de diversos produtos da resposta imune, incluindo citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias. Caso não seja adequadamente tratada, a LV pode levar o indivíduo ao óbito, principalmente devido a infecções secundárias (Oliveira *et al.*, 2010).

Sampaio et al. (2010) descreveram score clínico, ou biomarcadores de gravidade, que se mostrou útil e eficiente para diferenciar casos de LV Grave, com o objetivo de facilitar a tomada de decisão durante o diagnóstico e inclui: contagem de plaquetas $<50,000/\text{mm}^3$, hemorragia, infecções bacterianas, contagem de neutrófilos $<500/\text{mm}^3$,

dispnéia e icterícia. Ademais, Dos Santos et al (2016) encontraram altas concentrações de IL-6, IL-27 and sCD14 em pacientes com LV Grave, também descrevendo esses fatores solúveis como biomarcadores de gravidade da doença. Além disso, esses autores determinaram um ponto de corte em que dosagens de IL-6 acima de 200 pg/ml estavam fortemente associadas com a morte dos pacientes.

Além disso, existem dados da literatura descrevendo uma variedade de biomarcadores ainda experimentais para diagnóstico da LV, entretanto ainda poucos possuem uma relação de sensibilidade e especificidade avaliável para comparação entre eles. O trabalho de Kip et al (2015) sumarizou o conhecimento acerca desses marcadores separando entre moléculas relacionadas ao parasito em si, moléculas relacionadas às células imunes, proteínas de fase aguda e especificamente citocinas. Em destaque, podemos evidenciar receptores solúveis derivados de macrófagos, passíveis de detecção sérica em pacientes: sCD14, sCD26, sCD30, sIL-2R e sIL-4R, entre outros (Kip *et al.*, 2015).

3.2.2 - Ciclo biológico do parasito

As *Leishmanias* são parasitos unicelulares, heteroxênicos que durante o seu ciclo de vida alternam entre duas formas evolutivas: promastigota flagelada, encontrada no inseto vetor, e uma forma amastigota intracelular arredondada, encontrada principalmente em macrófagos do hospedeiro vertebrado, mais frequentemente homem, o cão e alguns marsupiais (Handman, 1999). O ciclo biológico inicia-se com repasto sanguíneo da fêmea do inseto, em um animal infectado, ingere as formas amastigotas presentes nos macrófagos do sangue ingerido. No lúmen intestinal do inseto vetor, ocorre o rompimento dos macrófagos, liberando as formas amastigotas que se transformam, em promastigotas procíclicas. Estas formas se dividem rapidamente, causando o rompimento da membrana peritrófica, permitindo que o parasito colonize o trato digestivo do flebotomíneo onde se transformam em promastigotas metacíclicas, as quais são as formas infectantes do parasito (Lainson e Shaw, 1988). Ao realizar um novo repasto sanguíneo, as promastigotas metacíclicas, presentes no trato digestivo anterior do flebótomo, são inoculadas em um novo hospedeiro vertebrado.

No hospedeiro vertebrado, as promastigotas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos teciduais e neutrófilos. No fagossomo, estas se diferenciam em amastigotas. O vacúolo fagocitário se funde com o lisossomo, formando o fagolisossomo, onde as

formas amastigotas sofrem várias divisões binárias levando ao rompimento das células. Por sua vez, as amastigotas liberadas podem se converter em promastigotas novamente e parasitar novos macrófagos, e assim, serem ingeridas durante novo repasto sanguíneo do flebotomíneo, reiniciando o ciclo (Rittig e Bogdan, 2000).

3.2.3 - Aspectos imunológicos na leishmaniose visceral humana

Em hospedeiros vertebrados, a *Leishmania* é um parasito intracelular e dessa forma, a imunidade mediada por células efetoras do subgrupo Th1 é o principal mecanismo de defesa contra o parasito, sendo fundamental na proteção contra a doença (Solbach e Laskay, 1995).

A resposta Th1 é caracterizada pela secreção de citocinas inflamatórias especialmente IFN- γ , o TNF- α e a IL-12 (Scott *et al.*, 1989; Alexander e Bryson, 2005). Essas citocinas estão envolvidas na ativação de macrófagos e consequente produção de moléculas microbidas tais como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, essenciais para a eliminação do parasito (Liew *et al.*, 1990; Lima-Junior *et al.*, 2013). No entanto, a LV é uma doença caracterizada por uma deficiência na resposta imune mediada por células (Th1) frente ao antígeno de *Leishmania* (Carvalho *et al.*, 1989). Pacientes acometidos pela infecção apresentam o teste de hipersensibilidade tardia para o antígeno de *Leishmania* (teste de Montenegro) negativo e as células mononucleares do sangue periférico desses pacientes não produzem IFN- γ , IL-2 e IL-12 quando estimuladas *in vitro* com antígeno de *Leishmania* (Carvalho *et al.*, 1988; Carvalho *et al.*, 1989). Além disso, foi demonstrado em estudo prospectivo, que na soroconversão, a ausência de proliferação e da produção de IFN- γ são marcadores de evolução para a doença, enquanto que a presença desta resposta está associada à forma assintomática (Carvalho *et al.*, 1992).

A hipótese mais aceita é que haja uma supressão da resposta imune, mediada pela citocina anti-inflamatória IL-10, a qual suprime a ação das citocinas pró-inflamatórias, contribuindo com a proliferação do parasito e o desenvolvimento da doença (Gama *et al.*, 2004; Nylen e Sacks, 2007). Pacientes com a forma ativa da doença apresenta altas concentrações séricas da citocina IL-10, a qual acredita-se, estar associada à supressão da resposta Th1 e consequente desenvolvimento e progressão da doença (Nylen e Sacks, 2007). Elevados níveis séricos de IL-10, bem como elevados níveis de RNAm de IL-10 no baço e na medula óssea, são encontrados nesse pacientes (Karp *et al.*, 1993; Nylen *et al.*, 2007; Khoshdel *et al.*, 2009).

Além disso, já foi descrito uma correlação positiva entre os níveis sanguíneos de IL-10 com a carga parasitária (Verma *et al.*, 2010). A IL-10 é uma citocina regulatória produzida por vários tipos celulares, especialmente por células T regulatórias e macrófagos M2, atuando de forma antagônica ao IFN- γ , uma vez que suprime as respostas das células Th1, inibindo as funções leishmanicidas dos macrófagos (Nylen e Sacks, 2007; Moura *et al.*, 2012).

Após o tratamento e cura clínica, os pacientes com a forma clássica da LV frequentemente se tornam resistentes a reinfecção, bem como suas células *in vitro* restauram a capacidade de proliferar e produzir IFN- γ frente ao antígeno de *Leishmania* (Carvalho *et al.*, 1989). Além disso, tornam-se positivos para o teste cutâneo de hipersensibilidade tardia (DTH) em resposta ao antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) *in vivo* (teste de Montenegro) (De Andrade *et al.*, 1982).

Portanto, estudos investigando o papel da diferenciação de diferentes células, como macrófagos e neutrófilos em populações anti-inflamatórias, bem como a descoberta de novos biomarcadores para essa diferenciação, se tornam imprescindíveis para a construção do conhecimento acerca da evolução, piora ou cura da LV.

3.3 - Diferentes subpopulações de macrófagos na resposta imune à infecções

O macrófago é uma célula apresentadora de antígenos (APC) e indutora da resposta imune adaptativa. Foram descritos subtipos diferentes de macrófagos, os quais podem induzir respostas distintas de células Th, a depender dos sinais que estes produzam durante a apresentação do antígeno às células T. Além disso, a resposta efetora dos macrófagos pode ser ativada após a ativação dos linfócitos Th1, com a produção de IFN- γ e TNF- α , citocinas que potencializam a atividade macrofágica e são fundamentais para o desenvolvimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra os agentes intracelulares (Mege *et al.*, 2011).

Em relação à regulação da diferenciação dos subtipos diferentes de macrófagos, eles podem ser fenotipicamente polarizados pelo microambiente para montar programas específicos funcionais. Macrófagos polarizados podem ser amplamente classificados em dois grupos principais: os macrófagos classicamente ativados (M1), cujo protótipo estímulos ativadores são IFN- γ e LPS, e os macrófagos alternativamente ativados (M2), subdivididos em M2a (após exposição a IL-4 ou IL-13), M2b (imunocomplexos em combinação com IL-1 β ou LPS) e M2c (IL-10, TGF- β ou glicocorticóides). M1 exibem

potentes propriedades microbidas e promovem fortes respostas Th1, mediada pela IL-12 e IL-23, enquanto que o fenótipo alternativo M2 é geralmente de suporte e conduz processos anti-inflamatórios com uma resposta Th2. Macrófagos M2 desempenham um papel importante na resolução de inflamação através de altas capacidades endocíticas de depuração, acompanhado pela secreção reduzida de citocinas pró-inflamatórias (Martinez *et al.*, 2008; Krausgruber *et al.*, 2011).

Após ativados, os macrófagos desempenham um papel fundamental no processo inflamatório em diferentes tecidos. Eles são capazes de secretar citocinas pró-inflamatórias e substâncias com ação microbicida, a exemplo de IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1, radicais livres do oxigênio, proteases e outras enzimas (Lee *et al.*, 1985), atuando como “células efetoras”, que podem fagocitar e destruir o patógeno indesejado. Vários processos celulares começam após a ativação dos macrófagos, incluindo a produção de enzimas de degradação fagolisossomais (ex: proteases, nucleases, fosfatases, lípases e esterases), ativação do metabolismo oxidativo com produção de superóxido (O₂) e a produção de óxido nítrico (NO) (Van Assche *et al.*, 2011).

Macrófagos M1 e M2 possuem perfis distintos de produção de citocinas e quimiocinas, metabolismo e expressão de fatores de transcrição (Mantovani *et al.*, 2004; Tomioka *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2014). Macrófagos M2 tem papéis importantes na manutenção da homeostase e na resposta imune Th2, como contribuir para a morte de parasitos encapsulados, promoção do crescimento de tumores, reparação tecidual e remodelamento, além de papel imunorregulatório e anti-inflamatório (Gordon, 2003; Katakura *et al.*, 2004; Gordon e Taylor, 2005; Tomioka *et al.*, 2012). Além do mais, tem sido descrito que macrófagos M2 inibem a ativação de M1 através de CCL17 e IL-10 (Katakura *et al.*, 2004; Tomioka *et al.*, 2012).

A permanência de parasitos dentro de macrófagos é determinada pelo balanço entre a habilidade da resposta imune em ativar macrófagos infectados e a habilidade dos mecanismos evasivos dos parasitos (Mukbel *et al.*, 2007), bem como o microambiente pode influenciar em sua polarização e função efetora (Martinez *et al.*, 2009).

Quanto a interação de macrófagos com parasitos do gênero *Leishmania*, a interação inicial da forma promastigota com o macrófago ocorre através do flagelo do parasito. Essa interação pode desencadear a liberação de fatores intracelulares para sobrevivência do parasito e modulação da capacidade fagocítica do macrófago (Rotureau *et al.*, 2009; Podinovskaia e Descoteaux, 2015). Promastigotas de *Leishmania donovani*, mortos por glutaraldeído, ou parasitos com mobilidade inibida por fármacos, não são

internalizados por macrófagos murinos derivados de medula óssea (Forestier *et al.*, 2011; Podinovskaia e Descoteaux, 2015), destacando a importância do flagelo do parasito para os eventos iniciais da infecção de macrófagos.

Diferentes espécies de *Leishmania* interagem com uma variedade de receptores dos macrófagos, incluindo receptores de complemento (CR), receptores de manose, fibronectina e receptores Fc γ (Fc γ Rs) (Ueno e Wilson, 2012; Podinovskaia e Descoteaux, 2015). A escolha do receptor pode impactar no curso da infecção. Internalização mediada por CR via CR3 e CR1 inibe a inflamação e produção de superóxido, bem como o acúmulo de marcadores lisossomais, como LAMP1 e Catepsina D. Isso pode criar condições mais favoráveis para o parasito dentro do fagossomo dos macrófagos. Entretanto, em associação com receptores fibronectina, condições inflamatórias mais intensas podem resultar na eliminação do parasito. Sinalização via receptores de manose pode desencadear vias inflamatórias e transporte mais eficiente de enzimas hidrolíticas para o fagolisossomo. Interações do parasito com receptores Fc γ R levam a uma ativação aumentada de NADPH oxidase nos fagossomos recém-formados (Ueno e Wilson, 2012; Podinovskaia e Descoteaux, 2015).

A diferenciação de promastigotas para amastigota está associada com a redução da taxa de crescimento e a indução de um estado metabólico caracterizado pela diminuição do influxo e da utilização de glicose e aminoácidos, redução da secreção de ácidos orgânicos e aumento da β -oxidação de ácidos graxos. O catabolismo de hexoses e de ácidos graxos promove substratos para a síntese de glutamina, que é essencial para o crescimento e sobrevivência dos amastigotas. Amastigotas diferenciados *in vitro* apresentam um perfil metabólico similar ao de amastigotas provenientes de lesões, sugerindo que essa diferenciação está mais fortemente relacionada com os sinais de diferenciação do que com a disponibilidade de nutrientes (Saunders *et al.*, 2014; Podinovskaia e Descoteaux, 2015). Tais mudanças facilitam a sobrevivência dos amastigotas em um nicho intracelular pobre em nutrientes.

O macrófago é uma célula extremamente plástica e responsável pela função homeostática de limpar os tecidos de células mortas e debris celulares em seu estado de repouso, já suas propriedades microbicidas e de apresentação de antígenos surgem em sua forma ativada. A ativação clássica por IFN- γ (M1) leva a uma resposta inflamatória que inibe o crescimento da *Leishmania*, ao invés da ativação alternativa (M2), por IL-4, que inibe a inflamação através da produção de IL-10 e estimula o crescimento do parasito (Liu e Uzonna, 2012; Podinovskaia e Descoteaux, 2015).

Essa polarização é determinante na resposta imune no curso da hanseníase (Figura 1), determinando a gravidade da doença e seu fenótipo clínico, paucibacilar e multibacilar. Observações sugerem que um dos principais fatores que determinam a imunomodulação responsável pelo fenótipo multibacilar é a intensa produção de IL-10 por macrófagos M2 (Bleharski *et al.*, 2003). Ademais, estudos de expressão gênica mostraram que o perfil de expressão de biópsias de lesões lepromatosas foi enriquecido de genes marcadores de resposta imune por macrófagos M2, marcadores como CD36, CD163 e receptores de macrófagos com estrutura de colágeno (MARCO) (Montoya *et al.*, 2009).

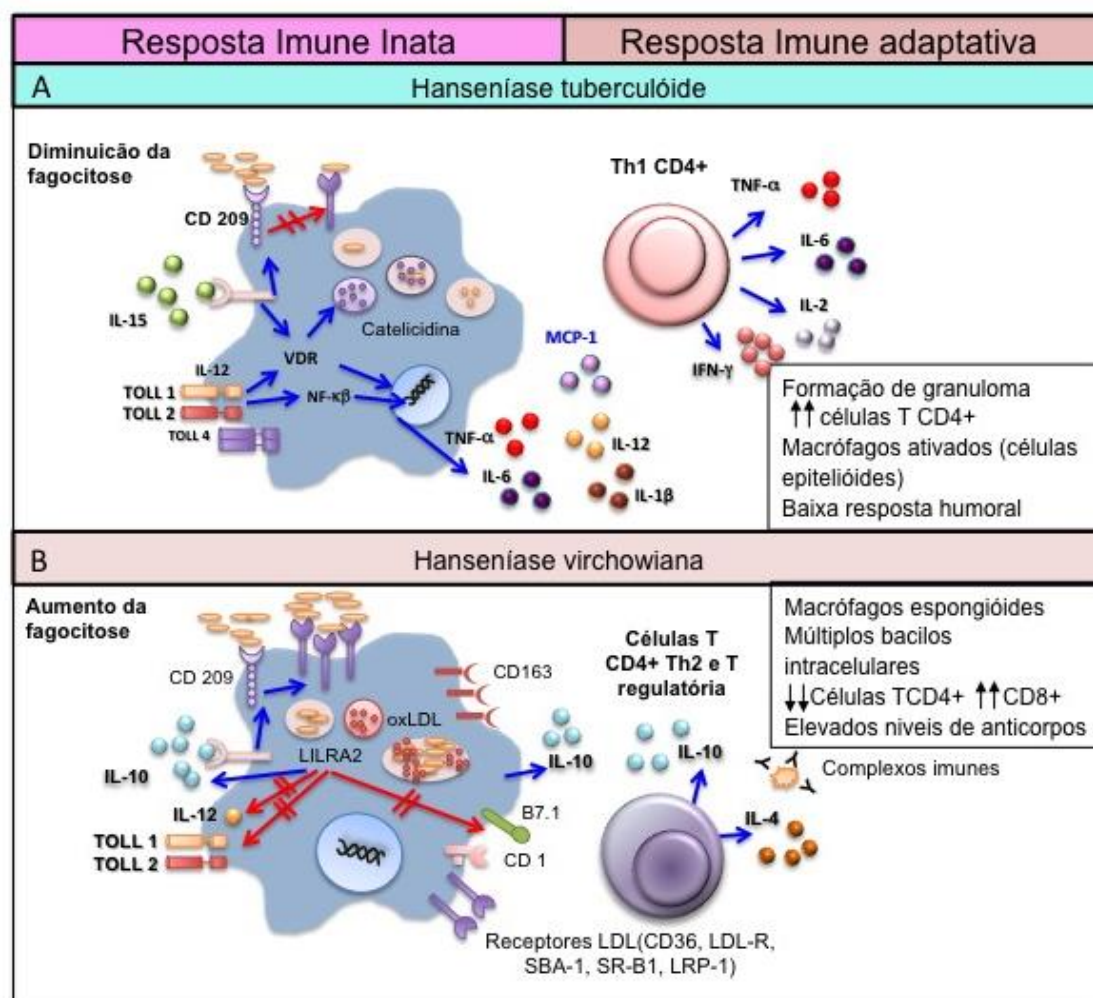


Figura 1. Representação esquemática da influência da polarização de macrófagos na imunopatologia da Hanseníase. Em pacientes com hanseníase tuberculóide (HT), a resposta imune inata é ativada através de receptores do tipo Toll (TLR2/1) para matar *M. leprae*. A IL-15 induz a atividade antimicrobiana dos macrófagos induzindo o programa antimicrobiano dependente de vitamina D e inibe a fagocitose de micobactérias. Estes macrófagos com perfil M1 ativam a diferenciação de células T em Th1, produtoras de IFN-γ, IL-2, TNF, e IL-15, que contém a infecção em granulomas bem formados. (B) Em pacientes com hanseníase virchowiana (HV), IL-4, IL-10 e ativação de receptores da

subfamília A membro 2 de imunoglobulina (LILRA2) e fosfolípidos oxidados inibem as respostas induzidas por receptores TLR2/1, incluindo a liberação de IL-12, mas preserva a liberação de IL-10. Além disso, os complexos imunes desencadeiam a produção de IL-10 e aumentam a fagocitose de *M. leprae*, ApoB, e fosfolípidos oxidados por macrófagos, através dos receptores CD209 e CD163, não havendo ativação da via antimicrobiana dependente de vitamina D, e resultando na formação de macrófagos espumosos. A aparência espumosa dos macrófagos é devido à acumulação de gotículas de gordura (LD) no interior dessas células. Há uma up-regulação de perilipina e da proteína relacionada à diferenciação adiposa no retículo endoplasmático e complexo de Golgi com a formação de vesículas que contêm lípidos, fosfolípidos, éster de colesterol, e colesterol. Além disso, há um aumento na síntese de receptores de LDL (tais como CD36, LDL-R, SBA-1, SR-B1, e LRP-1) e na absorção do colesterol endógeno, que se acumula intracelularmente. Estes macrófagos com perfil M2 induzem as células T a diferenciarem-se em Th2 e T reguladora, produtoras de IL-4 e IL-10, que estimulam a produção de anticorpos, ausência de granulomas, e falha para restringir o crescimento da *M. leprae*. (Adaptado de Fonseca e colaboradores 2016 – Manuscrito submetido ao periódico “Infectious Diseases of Poverty”).

Moura e colaboradores (2012) também mostraram uma expressão elevada de CD163 na superfície de macrófagos em lesões de pacientes com a forma multibacilar da doença, enquanto que na forma tuberculóide essa expressão foi menor, e em biópsias controles menor ainda. Ademais, o mesmo estudo mostrou elevada produção de IL-10, TNF e TGF- β por esses macrófagos, inclusive com redução da expressão de CD163 quando o estímulo de IL-10 foi bloqueado. Portanto, esse estudo confirmou a ideia de que o fenótipo dos macrófagos na resposta imune contra o *M. leprae* é impressionante para a determinação do fenótipo clínico da doença e, ainda, estabeleceu a molécula de superfície CD163 como marcador do fenótipo regulador de macrófagos nessas lesões (Moura *et al.*, 2012).

3.4 – Neutrófilos na leishmaniose visceral

Os neutrófilos são classicamente considerados como primeira linha de defesa contra agentes patogênicos. Migram rapidamente em números elevados para os locais da inflamação (Faurischou e Borregaard, 2003; Novais *et al.*, 2009; Marques *et al.*, 2015). Estas células são rapidamente mobilizadas e essenciais para a defesa do hospedeiro contra uma variedade de agentes patogênicos (Carvalho *et al.*, 2004; Novais *et al.*, 2009).

As infecções e inflamações são caracterizadas por um grande influxo de neutrófilos para o tecido afetado, estes granulócitos respondem a quimioatrativos e moléculas de adesão expressas nas células endoteliais dos indivíduos (Carvalho *et al.*, 2004; Mantovani *et al.*, 2011).

Atualmente os neutrófilos são reconhecidos como células versáteis e sofisticadas atuando tanto na resposta imune inata como na adaptativa e influenciam na resposta adaptativa através de interações com células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos (Mantovani *et al.*, 2011; Scapini e Cassatella, 2014).

Os neutrófilos tentam eliminar os microorganismos por fagocitose, degranulação e armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs) (Brinkmann *et al.*, 2004; Urban *et al.*, 2006; Guimarães-Costa *et al.*, 2009). Estas são as primeiras células que chegam ao local da injúria provocada pela picada do inseto na leishmaniose visceral e o principal objetivo dos neutrófilos é reparar os danos teciduais, sendo também capaz de fagocitar os parasitos inoculados pelo flebótomo (Peters e Sacks, 2009).

O envolvimento dos neutrófilos na infecção pelos parasitos do gênero *Leishmania* e a constatação da habilidade destes fagócitos em responder de forma rápida e eficiente a uma variedade de microrganismos patogênicos, sugerem que tais células podem ser um alvo inicial da infecção. Estudos *in vitro* ou em modelos experimentais têm demonstrado que os neutrófilos podem sofrer morte celular programada e servirem de veículo para os parasitos *Leishmania*, permitindo a entrada silenciosa dos mesmos no organismo hospedeiro, assumindo um papel importante para o estabelecimento da infecção. Sendo esta forma denominada de “Cavalo de tróia” do neutrófilo (Laskay *et al.*, 2008). Por outro lado, tem sido relatado que os neutrófilos contribuem para o desenvolvimento de uma imunidade protetora durante a infecção inicial por *Leishmania*, assumindo um papel de defesa ao estabelecimento da infecção no organismo hospedeiro (Mcfarlane *et al.*, 2008).

Alguns estudos foram realizados para compreender o papel de defesa do neutrófilo no hospedeiro contra Leishmaniose (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000; Ribeiro-Gomes, F. L. *et al.*, 2007; Mcfarlane *et al.*, 2008). Devido à diversidade dos estudos o impacto da resposta neutrofílica na promoção de resistência do hospedeiro ou susceptibilidade à infecção por *Leishmania* continua a ser um assunto controverso (Ribeiro-Gomes e Sacks, 2012).

3.5 – Biomarcador CD163

O marcador de superfície CD163 é descrito como expresso em monócitos, macrófagos e neutrófilos e atua como receptor com a finalidade de endocitar complexos haptoglobina-hemoglobina (Hp-Hb) (Kristiansen *et al.*, 2001; Knudsen *et al.*, 2005; Groselj-Grenc *et al.*, 2008). É membro do grupo B da família de receptores scavenger

ricos em cisteína (SRCR) e consiste de nove domínios extracelulares, um segmento transmembrana e uma curta cauda citoplasmática (Law *et al.*, 1993; Ritter *et al.*, 1999; Moller *et al.*, 2004).

O CD163 expresso na superfície de macrófagos se liga ao complexo haptoglobina-hemoglobina o internalizando através de uma endocitose mediada por receptor (Hwang e Greer, 1980; Kristiansen *et al.*, 2001). Esse é um importante mecanismo fisiológico que protege o corpo humano dos efeitos tóxicos da hemoglobina. Primeiramente, a ligação da Hb à Hp tem um efeito inibitório às propriedades tóxicas e previne a modificação peroxidativa da Hb (Buehler *et al.*, 2009). Adicionalmente, a formação do complexo com a Hp impede a filtração da Hb nos rins (Kino *et al.*, 1987; Fagoonee *et al.*, 2005) e a entrega aos fagócitos que expressam CD163 em sua superfície. E então, a subunidade globina é degradada no lisossomo e o grupamento Heme é liberado e convertido em um composto menos tóxico pela HemeOxigenase-1 (HO-1) no citosol (Belcher *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 2010).

A expressão de CD163 é induzida por glicocorticoides e regulada positivamente pela IL-6 e IL-10 (Buehler *et al.*, 2000; Sulahian *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2010), sendo que o CD163 é o gene mais fortemente regulado positivamente pela IL-10, segundo dados da literatura (Buehler *et al.*, 2000; Sulahian *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2010). Os moduladores negativos para o CD163 incluem TNF- α e IFN- γ (Zwadlo *et al.*, 1987; Buehler *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2010).

Um outro papel da proteína CD163 é desempenhado na resposta imunológica. Macrófagos são divididos em M1 e M2 segundo a expressão de diferentes moléculas de superfície e fatores de transcrição. Macrófagos classicamente ativados ou M1 apresentam um papel pró-inflamatório que contribui para o controle de patógenos, enquanto os macrófagos alternativamente ativados ou M2 têm propriedades de reparação tecidual e atividade antiinflamatória (Murray *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015).

Nesse contexto, no qual os macrófagos são adaptados à limpeza tecidual, incluindo complexos Hp-Hb, é que pode ocorrer a expressão de CD163 por essas células, que tem sido associado ao fenótipo M2. Esses macrófagos M2 estão associados à modulação negativa da resposta imunológica e foram descritos como relacionados a uma apresentação mais grave da Hanseníase, a forma Virchowiana (Moura *et al.*, 2012).

Além disso, esse marcador de superfície pode sofrer proteólise e ser liberado para o meio, mediante estímulo anti-inflamatório (Kristiansen *et al.*, 2001), e ser

detectado em sua forma solúvel (sCD163), sofrendo modulação mediada pela produção de IL-10 (Philippidis *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2012),

Descrito como marcador para a polarização M2 e como sensor para bactérias gram negativas e positivas (Fabriek *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2015), Kneidl et al descreveram esse fator solúvel, clivado pelas metaloproteases ADAM10 e ADAM17, como promovendo reconhecimento, mediando fagocitose e morte de *Staphilococos aureus* ao ligar em peptídeos específicos de fibronectina (Kneidl *et al.*, 2012). Outro papel biológico para o sCD163 foi descrito por Hogger et al (2001), os autores encontraram um efeito inibitório desse biomarcador à proliferação de linfócitos, induzida por Phorbol-Ester, atuando como mediador anti-inflamatório (Hogger e Sorg, 2001).

Estudos in vitro envolvendo monócitos/macrófagos tem mostrado que a liberação de sCD163 pode ser induzida por ativação de receptores do tipo TOLL, ativação por LPS ou PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (Droste et al., 1999; Hintz et al., 2002; Weaver et al., 2006), ligação cruzada com receptores Fc (Sulahian et al., 2004), estresse oxidativo e trombina (Timmermann e Hogger, 2005; Chung et al., 2011).

Mesmo sem estímulo inflamatório, pequenas quantidades de sCD163 são liberadas constitutivamente na circulação sanguínea, portanto sua presença pode ser detectada em indivíduos saudáveis (Moller *et al.*, 2002).

Entretanto, altos níveis da forma solúvel sérica do CD163 também são descritos como preditores de gravidade de uma variedade de doenças inflamatórias, como dengue, Hanseníase, Tuberculose (TB), Pneumococos, Meningite e Artrite reumatóide (Moller et al., 2004; Lastrucci et al., 2015; Li et al., 2015; Stilund et al., 2015), mas ainda não existe na literatura evidência científica que o associe esse a dosagem desse biomarcador com a infecção por *Leishmania sp.*

4 - OBJETIVOS

4.1 - Geral:

- ✓ Verificar a presença e caracterizar a associação do marcador sCD163 com apresentação clínica da Hanseníase e Leishmaniose Visceral e se a infecção por *Leishmania sp* é capaz de induzir a expressão do CD163 em fagócitos humanos.

4.2 - Específicos:

1. Detectar a molécula de sCD163 nos soros de pacientes com hanseníase e leishmaniose visceral (LV).
2. Analisar a associação do biomarcador sérico sCD163 com a apresentação clínica da Hanseníase.
3. Analisar a associação do biomarcador sérico sCD163 com a apresentação clínica da Leishmaniose Visceral.
4. Avaliar se a infecção por *Leishmania* induz a expressão do sCD163 em macrófagos e neutrófilos humanos, buscando uma possível origem celular desta molécula solúvel na leishmaniose.

5 - MATERIAL E MÉTODOS

5.1 - Seleção dos Pacientes com Hanseníase

Os pacientes portadores de Hanseníase foram recrutados do ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário da UFS (HU-UFS), do Projeto (DES)MANCHA Sergipe. O critério de inclusão foi o diagnóstico de Hanseníase confirmado pelo aspecto clínico das lesões, baciloscopia positiva e confirmação histopatológica em biopsias de pele. Os pacientes foram classificados quanto a sua forma clínica pelo critério de Madri (1953): Hanseníase Indeterminada (HI) (n=9), Tuberculóide (HT) (n=14), Dimorfa (HD) (n=14) e Hanseníase Virchowiana (HV) (n=10) (Oliveira *et al.*, 2013). Os critérios de exclusão foram gravidez ou doenças (HIV, HTLV-I, Diabetes mellitus) que possam interferir na resposta imunológica ou apresentação clínica da Hanseníase.

O soro dos pacientes foi coletado antes do início do tratamento. Os pacientes foram tratados com poliquimioterapia, segundo preconiza o Ministério da Saúde (MS) e Organização Mundial de Saúde (OMS), para as formas operacionais Multibacilares e Paucibacilares. Além disso, foram coletadas amostras de sangue de indivíduos saudáveis, contactantes dos pacientes, sem histórico de Hanseníase, de ambos os sexos, para utilização como controles (Contactantes) (n=23).

5.2 – Seleção dos Pacientes com Leishmaniose Visceral

As amostras de soro dos pacientes com Leishmaniose Visceral (LV) foram coletadas de um estudo longitudinal, realizado entre Junho de 2011 e Junho de 2013 no centro de referência em LV do HU-UFS. O critério de inclusão foi diagnóstico confirmado de LV pela observação direta do parasito (*Leishmania infantum*) em amostras de biópsia de medula óssea ou amostra de cultura do parasito em meio NNN (Neal, Novy, Nicolle) (Sigma-Aldrich), ou teste rK39 sorológico positivo (KalazarDetect Rapid Test: InBios International Inc, Seattle, WA). Os critérios de exclusão foram os mesmos aplicados aos pacientes de Hanseníase. Os pacientes foram submetidos ao tratamento padrão com Antimonial Pentavalente (Sbv) (Saúde., 2006). As amostras de soro foram coletadas antes (D0) (n = 33) e 30 dias após o início do tratamento (D30) (n = 19) e parâmetros clínicos de gravidade como mensuração de tamanho de baço e fígado foram coletados. Os indivíduos contactantes que apresentaram teste de hipersensibilidade

cutânea (DTH) positivo (Montenegro Skin test - Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, Piraquara PR, Brazil), que não apresentaram os sintomas clássicos da LV, foram considerados controles assintomáticos (n = 11).

A amostra também consistiu de pacientes diagnosticados como LV grave, segundo score clínico baseado em fatores como contagem de plaquetas $<50,000/\text{mm}^3$, hemorragia, infecções bacterianas, contagem de neutrófilos $<500/\text{mm}^3$, dispnéia e icterícia, descritos por Sampaio et al. (Sampaio *et al.*, 2010) (LV GRAVE) (n = 13). Além do mais, também foram utilizados como controles saudáveis indivíduos residentes em áreas não endêmicas para Leishmaniose, que não possuíam diagnóstico de outras doenças (HC) (n = 8).

5.3 – Dosagens séricas

Todas as amostras de soro foram separadas do sangue periférico total por centrifugação e armazenadas em freezer -80°C . Ao mesmo tempo, as amostras de soros de pacientes com Hanseníase, LV e controles foram submetidas a dosagem de sCD163 por kit de ELISA, segundo recomendações do fabricante (R&D Systems).

As dosagens de Haptoglobina foram realizadas em 45 pacientes com Hanseníase e 21 controles contactantes, e 29 pacientes com LV antes do tratamento (18 com LV clássica e 11 com LV GRAVE) utilizando kit de ELISA segundo instruções do fabricante (GenWay). Heme-oxigenase-1 foi quantificada em 31 pacientes com hanseníase e 11 controles contactantes, e em 24 pacientes com LV antes do tratamento (15 LV clássica e 9 LV GRAVE) utilizando kit de ELISA, seguindo as recomendações do fabricante (Assay Designs) (Luz *et al.*, 2012). Ademais, a quantificação de Arginase-1 foi realizada em 47 amostras de pacientes com Hanseníase e 23 controles contactantes, e em 25 pacientes com LV, sendo 15 com LV clássica e 10 com LV GRAVE, utilizando kit de ELISA segundo instruções do fabricante (Hycult Biotech).

5.4 - Aspectos éticos

Este projeto de trabalho seguiu as recomendações da Normativa 466/2012 e foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário, Universidade Federal de Sergipe, antes do início de sua execução, CAAE 0152.0.107.000-07 e CAAE 0151.0.107.000-07. Na avaliação inicial, os pacientes recrutados ou responsáveis

receberam uma explicação verbal e foram convidados a participar do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (**APÊNDICES A E B**).

Ademais, o presente estudo não trouxe nenhum grande risco para os sujeitos da pesquisa, além de pequena morbidade decorrente de procedimentos simples largamente utilizados na atenção médica aos pacientes, como punção venosa. A punção venosa foi realizada seguindo as recomendações do CDC (Center for Disease Control), utilizando-se equipamento descartável e luvas de proteção. Este procedimento pode causar dor local e pequena área de equimose, a qual foi evitada por compressão adequada da área de punctura e uso de curativo oclusivo.

5.5 - Separação de células e cultura

A separação dos monócitos foi realizada a partir de amostras de sangue venoso heparinizado de doadores saudáveis, utilizando protocolo de separação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) por meio de reagente Ficoll-Paque PLUS 1077, seguindo instruções do fabricante (GE HealthCare Life Sciences). Após a separação as células foram lavadas em PBS e cultivadas por 3h a 37°C/5% CO₂ em placa de 24 poços com meio RPMI 1640 (GibcoBRL) suplementado com 20% soro bovino fetal (SBF) (GibcoBRL), para aderência. Após a incubação, as células não aderentes foram retiradas cuidadosamente o meio de cultura removido. As células aderentes foram lavadas com RPMI cuidadosamente e cultivadas por 5 dias à concentração de 5×10^5 células/poço em RPMI suplementado com 20% SBF e 1% Penicilina/Streptomicina para diferenciação em macrófagos (De Oliveira *et al.*, 2015).

Os neutrófilos foram isolados de amostras de sangue periférico, retirado de doadores saudáveis utilizando EDTA como anticoagulante, utilizando o reagente PolimorphPrep, segundo instruções do fabricante (Axis-Shield). Após a separação as células foram lavadas e cultivadas em placa de 96 poços na concentração de 1×10^6 neutrófilos por poço, em meio RPMI 10% SBF para infecção com *Leishmania*.

5.6 - Infecção com *Leishmania*-GFP

Foi utilizada para os experimentos uma linhagem de *Leishmania amazonensis* que expressa constitutivamente Proteína Verde Fluorescente (GFP) (cepa MHOM/BR/73M2269) juntamente com gene que confere resistência a Higromicina

(Lima-Junior *et al.*, 2013) (*Leishmania-GFP*), gentilmente cedida pela Profa Dra Silvia Reni Bortolin Uliana, Universidade de São Paulo. Os parasitos foram cultivados a 24°C, em meio Schneider's Drosophila (Invitrogen), suplementado com 10% SBF e 0,1% Higromicina (50mg/mL) (Sigma-Aldrich).

A infecção dos macrófagos (Figura 2) foi realizada utilizando 10 promastigostas em fase estacionária para cada macrófago em placa de 24 poços em meio RPMI suplementado com 10% SBF e 1% Penicilina/Streptomicina por 24 horas, para marcação com anticorpos específicos e análise por citometria de fluxo. Os parasitos extracelulares foram removidos dos poços por lavagem após 2 horas de infecção e as células infectadas permaneceram outras 22 horas em cultura antes da análise (De Oliveira *et al.*, 2015). No momento da análise, os macrófagos foram removidos da placa de 24 poços com 3 lavagens (600ul) de PBS-EDTA (10mM) mantido em geladeira.

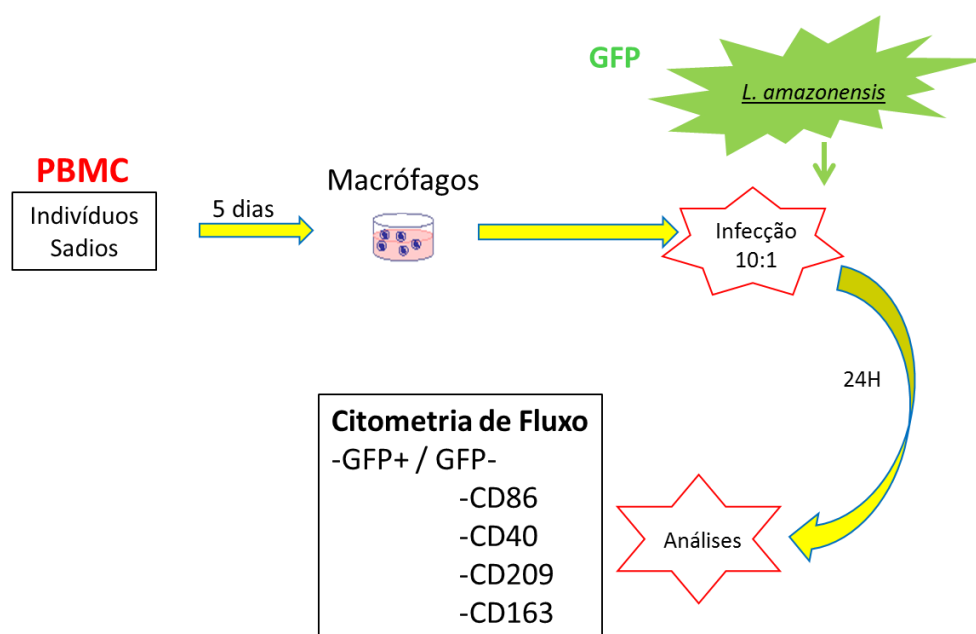


Figura 2. Delineamento experimental para análise de macrófagos infectados com *Leishmania-GFP*.

Os neutrófilos foram infectados a 5 parasitos por célula (Figura 3), em placa de 96 poços com RPMI suplementado com 10% SBF e 1% Penicilina/Streptomicina, por 3 horas, para posterior marcação e análise em citômetro de fluxo (Tavares *et al.*, 2014).

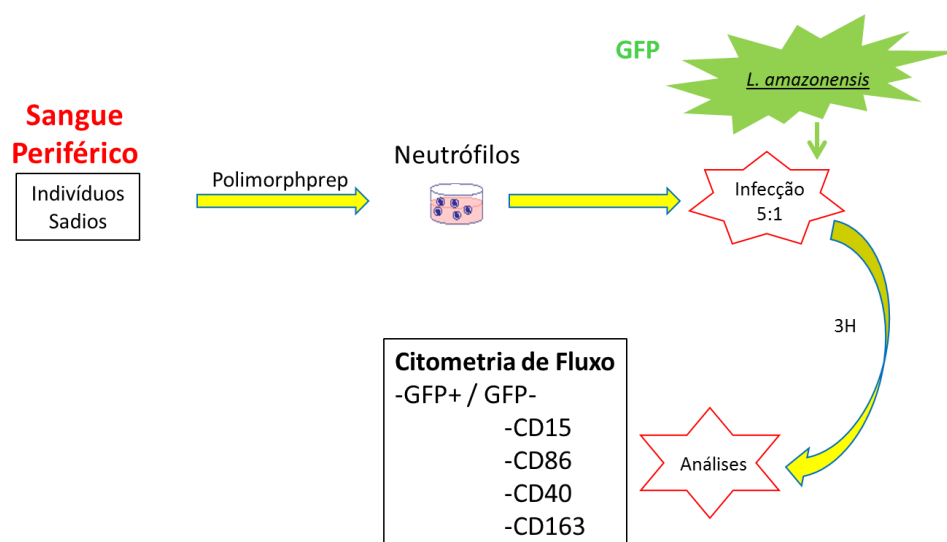


Figura 3. Delineamento experimental para análise de neutrófilos infectados com *Leishmania-GFP*.

5.7 - Citometria de Fluxo

As células foram lavadas com PBS-SBF (2%) e incubadas com anticorpos monoclonais específicos, conjugados com fluorocromos, adquiridos junto à BD Biosciences, a 4°C, por 30 minutos protegidas da luz, segundo instruções do fabricante (concentração de anticorpos para marcação recomendada na bula do produto). Após a marcação, as células foram lavadas com PBS-SBF (2%) e fixadas com PBS-Formaldeído (4%) para aquisição dos dados em citômetro de fluxo FACS CANTO II (BD Biosciences) e análise em software especializado FlowJo (Tree Star). Para analisar o fenótipo de superfície dos macrófagos infectados, foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD209-BV421 (cat. 564127), anti-CD163-PE (cat. 556018), anti-CD86-BV510 (cat. 563461) e anti-CD40-APC (cat. 555591). Ademais, para analisar os marcadores de superfície dos neutrófilos infectados foram utilizados os anticorpos anti-CD15-BV450 (cat. 561584), anti-CD163-PE, anti-CD86-V500 e anti-CD40-APC.

5.8 - Análise estatística

Os resultados estão expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão. Para avaliar a normalidade dos dados foi utilizado teste D'Agostinho and Pearson. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando teste de Mann-Whitney (análises quanto ao

sCD163, Haptoglobina, HO-1 e Arginase-1) para análises não pareadas de dados não paramétricos. Teste t pareado foi utilizado para as comparações entre dosagens antes e depois do tratamento para LV. Teste pareado de Friedman com pós-teste de Dunn (Fenótipo de Superfície e Análise das Medianas da Intensidade de Fluorescência) foram utilizados para comparações pareadas de dados não paramétricos. As análises de correlação foram realizadas utilizando o teste de correlação de Spearman para dados não paramétricos. As curvas ROC (*receiver operator characteristic curve*) foram construídas utilizando os dados das dosagens de sCD163 dos indivíduos de acordo com as orientações oferecidas pelo software estatístico. Foi considerado um p valor ≤ 0.05 para a significância dos resultados. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software).

6 - RESULTADOS

6.1 - Altas concentrações de sCD163 sérico como Biomarcador para Hanseníase Virchowiana

Os valores individuais e as médias $\pm$ Desvio Padrão (DP) da dosagem de sCD163 dos indivíduos com Hanseníase Indeterminada (HI) (n=9) ($114 \pm 49,57$ ng/mL), Hanseníase Tuberculóide (HT) (n=14) ($90,29 \pm 44,06$ ng/mL), Hanseníase Dimorfa (HD) (n=14) ($97,71 \pm 47,97$ ng/mL), Hanseníase Virchowiana (HV) (n=10) ($177,6 \pm 62,18$ ng/mL) e Controles Contactantes (Contactantes) (n = 23) ($90,78 \pm 31,55$ ng/mL) são mostradas na figura 4. Os pacientes com Hanseníase Virchowiana (HV), forma mais grave da doença, apresentaram concentrações mais elevadas de sCD163 em relação aos pacientes com a forma Tuberculóide (HT) (p=0,001; Mann-Whitney test), a apresentação clínica mais branda da doença, e também em relação aos indivíduos controles contactantes (p<0.001; Mann-Whitney test). Nos pacientes diagnosticados com as formas intermediárias da Hanseníase, Indeterminada (HI) e Dimorfa (HD), também foi detectada diferença significativa com os pacientes HV.

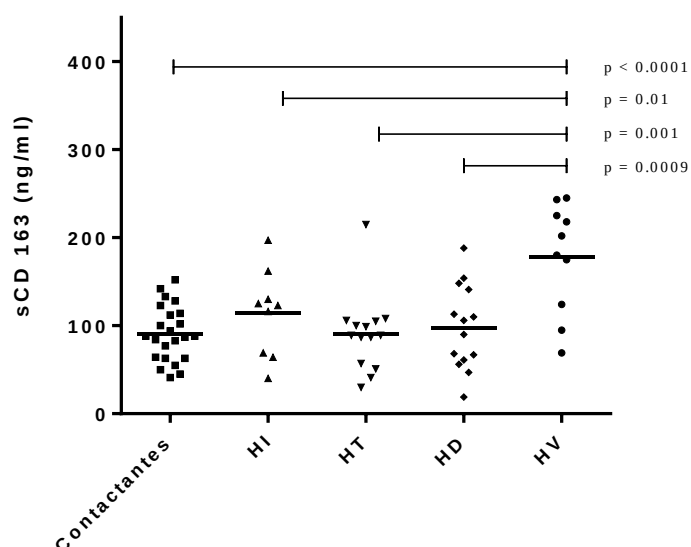


Figura 4. Quantificação de sCD163 em amostras de soro de pacientes com Hanseníase. O soro foi coletado a partir de amostras de sangue periférico e utilizado para quantificação de sCD163 por ELISA. Amostras de soro de indivíduos contactantes sem sinais nem sintomas de Hanseníase foram utilizadas como controles (n=23). As dosagens de indivíduos com Hanseníase Indeterminada (HI) (n=9), Hanseníase Tuberculóide (HT) (n=14), Hanseníase Dimorfa (HD) (n=14), Hanseníase Virchowiana (HV) (n=10) e Controles Contactantes (Contactantes) (n=23) foram comparadas pelo teste não pareado e não paramétrico de Mann-Whitney. Foi considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

Como análise complementar, foram construídas curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) para comparar os resultados das dosagens entre os grupos. Como mostrado na Figura 5, a área abaixo da curva (AUC – Area Under the Curve) construída comparando pacientes HV com pacientes HT foi 0.8571 com intervalo de confiança (CI) de [0.69 – 1.02] ($p=0.0034$) (Figura 5A); Contactantes em relação aos pacientes HV foi 0.8439, 95% CI [0.72 – 1.02] ($p=0.0008$) (Figura 5B); HI em relação aos pacientes HV foi 0.7944, 95% CI [0.58 – 1.00] ($p=0.03$) (Figura 5C); e HD em relação aos pacientes HV foi 0.8500, 95% CI [0.69 – 1.00] ($p=0.004$) (Figura 5D). Além disso, o ponto de corte ideal para a comparação entre pacientes HT e HV apresentou uma sensibilidade de 80% e especificidade de 92,86%.

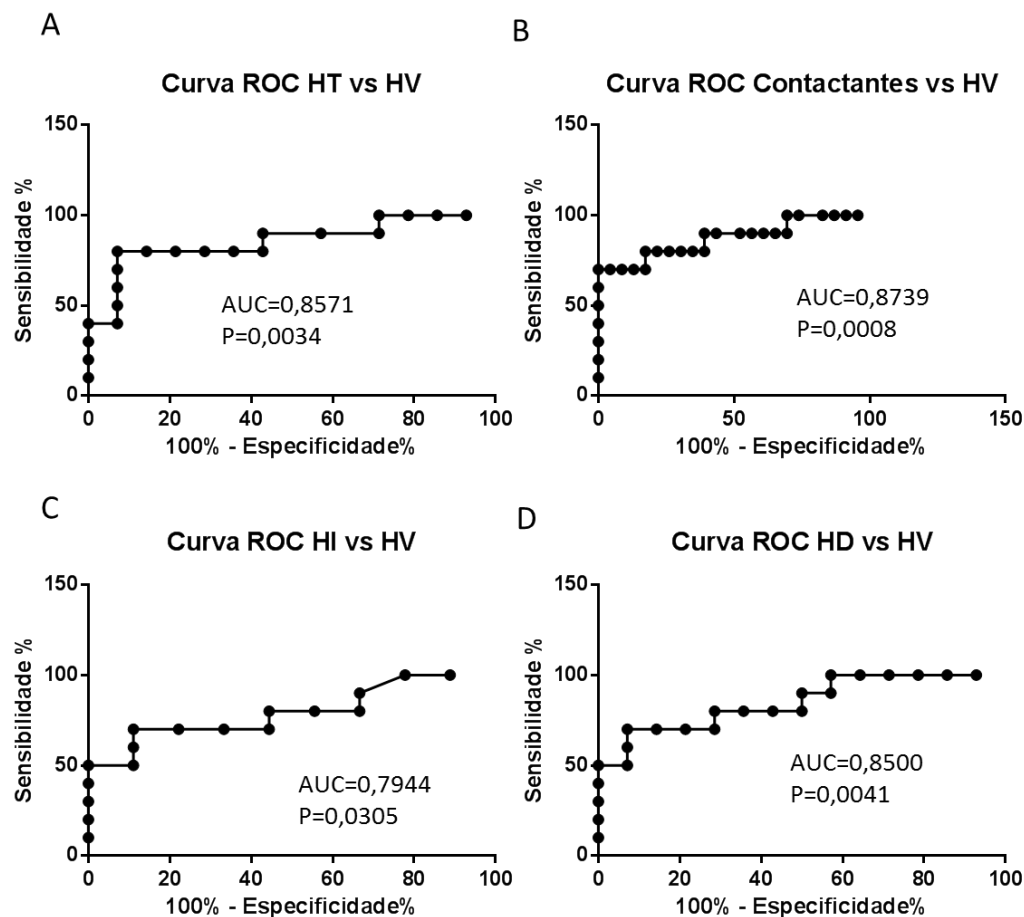


Figura 5. Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) da concentração sérica sCD163 nos grupos HT em relação aos pacientes HV (A); Contactantes em relação aos pacientes HV (B), HI em relação aos pacientes HV (C) e HD em relação aos pacientes HV (D). Foi considerado significativo p valor < 0,05.

Por fim, com o objetivo de compreender o contexto em que esses resultados se inserem, foi realizada dosagem de HO-1, Haptoglobina e Arginase-1, visando relacionar a dosagem de sCD163 com outras duas moléculas participantes do metabolismo de Hemoglobina (HO-1 e Hp) e com a enzima característica do metabolismo de macrófagos M2 (Arginase-1). Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos analisados (Figura 6A-C).

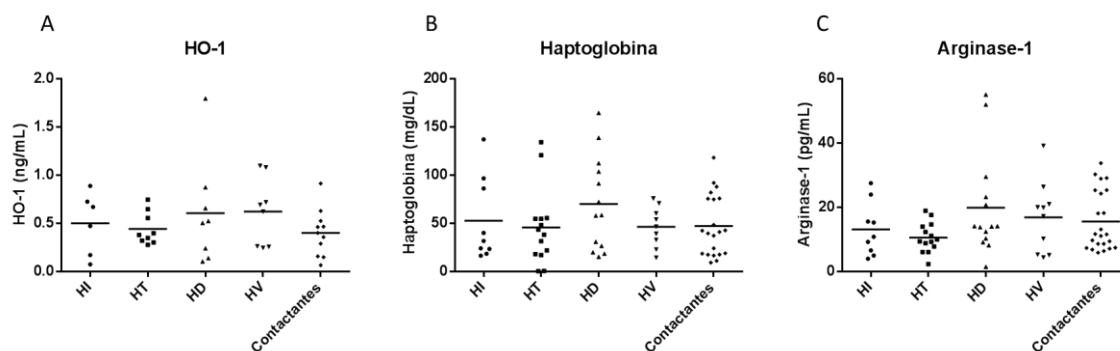


Figura 6. Quantificação de HO-1 (A), Haptoglobina (B) e Arginase-1 (C) em amostras de soro de pacientes com Hanseníase. O soro foi coletado a partir de amostras de sangue periférico e utilizado para quantificação por ELISA. Amostras de soro de indivíduos contactantes sem sinais ou sintomas de Hanseníase foram utilizadas como controles. As dosagens de indivíduos com Hanseníase Indeterminada (n = 6) (HI), Hanseníase Tuberculóide (n = 9) (HT), Hanseníase Dimorfa (n = 8) (HD), Hanseníase Virchowiana (n = 8) (HV) e Controles Contactantes (n = 12) (Contactantes) foram comparadas pelo teste não pareado e não paramétrico de Mann-Whitney. Foi considerado significativo um $p < 0,05$.

6.2 - Níveis de sCD163 se correlacionam com gravidade e melhora clínica em pacientes com Leishmaniose Visceral

O presente estudo também detectou altas concentrações de sCD163 em amostras de soro de pacientes com Leishmaniose Visceral, quando comparados a indivíduos controles, que não apresentavam sinais clínicos da doença. Como os pacientes mais graves apresentaram concentrações muito mais elevadas do sCD163, estes são apresentados em um grupo separado (Figura 7). As médias $\pm$ Desvio Padrão da dosagem de indivíduos D0 (n = 33) ($152,1 \pm 67,86$ ng/mL), foram mais elevadas do que as de indivíduos contactantes (DTH positivos) sem sinais ou sintomas da LV (DTH, n = 11, $72,55 \pm 25,68$ ng/mL) e de indivíduos provenientes de áreas não endêmicas para LV (HC, n = 8, $49,0 \pm 23,71$ ng/mL). Essas concentrações caem após o tratamento, no D30 (n=19) ($98,79 \pm 58,58$ ng/mL) ($p < 0.005$). Mais importante, concentrações ainda mais elevadas foram detectadas nos indivíduos diagnosticados com Leishmaniose Visceral Grave (LV Grave) (n=13) ($241,5 \pm 76,88$ ng/mL), considerando os critérios de gravidade descritos previamente por Sampaio et al. (Sampaio *et al.*, 2010), que inclui: contagem de plaquetas $< 50,000/\text{mm}^3$, hemorragia, infecções bacterianas, contagem de neutrófilos $< 500/\text{mm}^3$, dispnéia e icterícia. Adicionalmente, foi detectado também uma diminuição dos níveis deste marcador nos pacientes 30 dias após o tratamento.

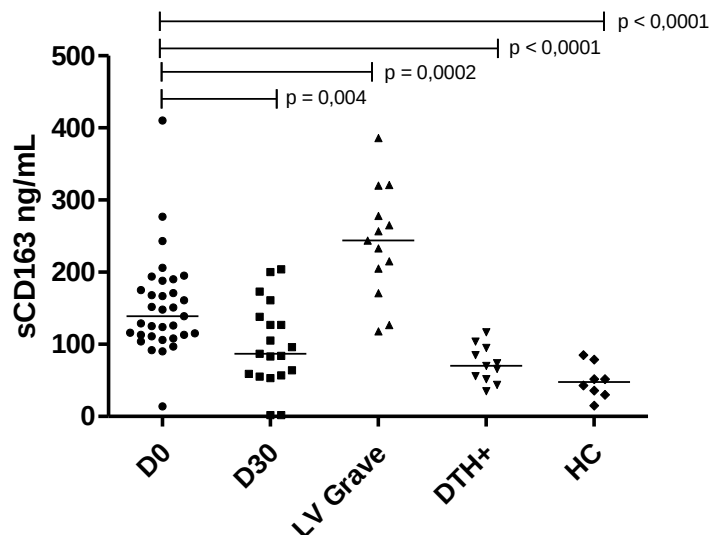


Figura 7. Quantificação de sCD163 em amostras de soro de pacientes com Leishmaniose Visceral. O soro foi coletado a partir de amostras de sangue periférico e utilizado para quantificação de sCD163 por ELISA. Os valores da dosagem de indivíduos com LV antes do tratamento, D0 (n = 33), após o tratamento, D30 (n=19) e LV Grave (n=13), de indivíduos contactantes sem sinais ou sintomas da LV (DTH, n = 11) e de indivíduos provenientes de áreas não endêmicas para LV (HC, n = 8) foram comparadas pelo teste não pareado e não paramétrico de Mann-Whitney. Foi considerado significativo um $p < 0,05$.

Correlação com gravidade da LV é suportada pela presença de correlação direta entre as concentrações de sCD163 e tamanho de baço ($r=0.3915$; $p=0.0049$) (Figura 8A) e fígado dos pacientes ($r=0.4353$; $p=0.0018$), (Figura 8B), aspectos clínicos utilizados como parâmetros clínicos de melhora e piora da LV.

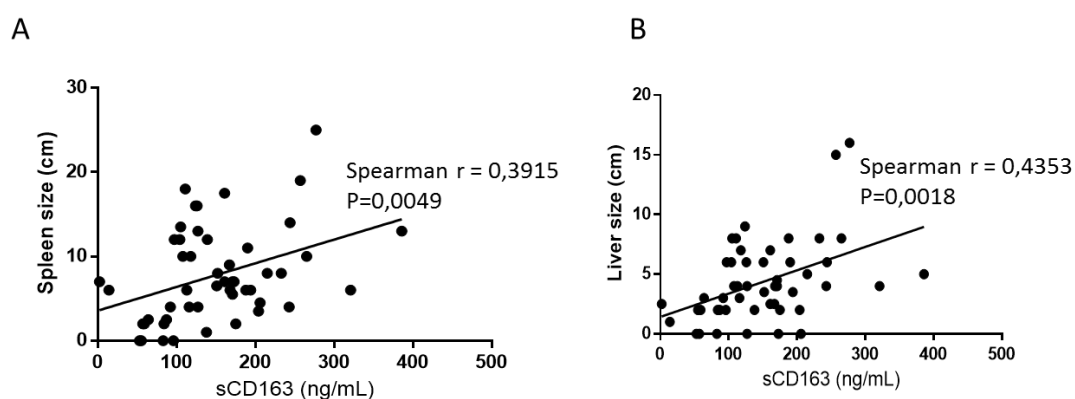


Figura 8 Análise de correlação de Spearman entre as concentrações séricas de sCD163 e tamanhos dos baços (A) e dos fígados (B) de pacientes com Leishmaniose Visceral. Foi considerado significativo p valor $< 0,05$.

Além disso, foi realizada análise pareada entre a dosagem de sCD163 antes e 30 dias depois do início do tratamento dos mesmos pacientes, mostrando diminuição dos níveis do biomarcador após o tratamento ($p=0,0455$) (Figura 9), corroborando a hipótese de que sCD163 pode ser usado como um dos parâmetros de cura ou melhora clínica.

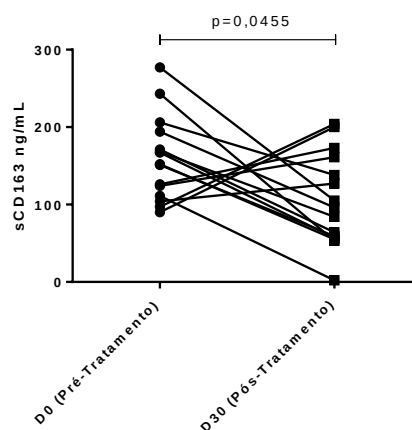
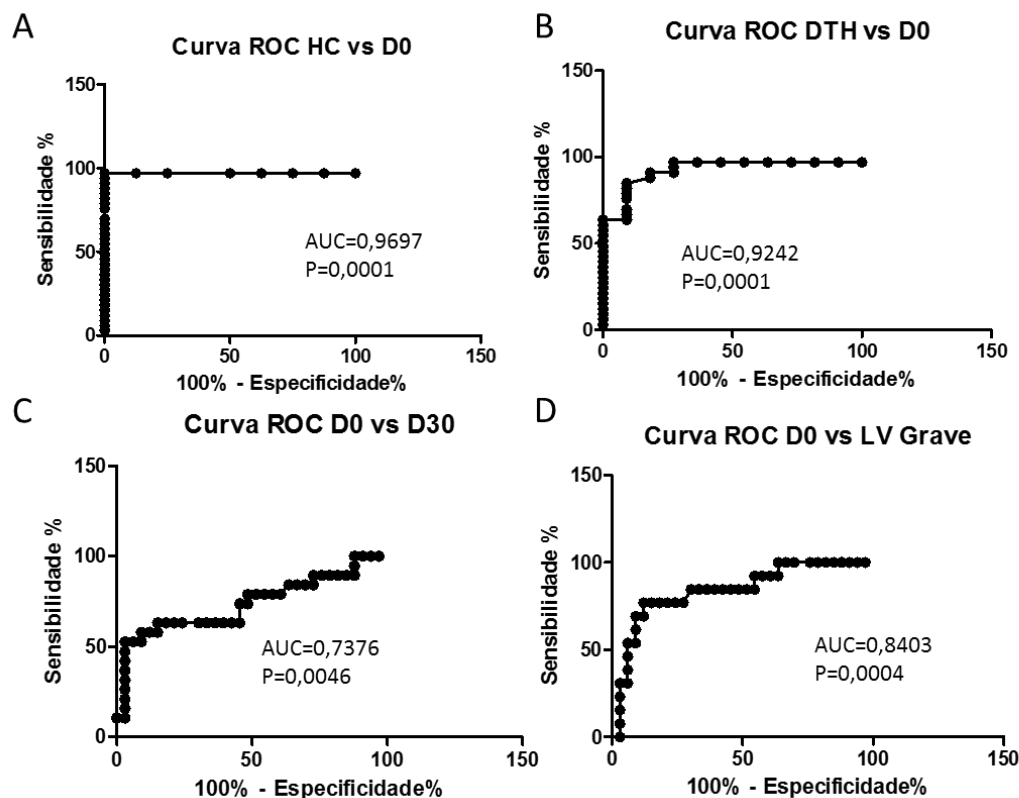


Figura 9. Análise por teste t pareado da concentração sérica de sCD163 comparando os mesmos pacientes de LV antes e após 30 dias do tratamento padrão para leishmaniose. Foi considerado significativo um $p < 0,05$.

Curvas ROC foram construídas para confirmar a importância clínica dos dados obtidos das dosagens de sCD163. Como podemos ver na Figura 10A-D, foi obtida AUC acima de 0,7 e $p < 0,0005$ para as análises que visaram diferenciar todos os grupos. A distinção entre ambos os grupos controles (HC e DTH+) comparados aos pacientes no D0 (Figura 10A-B) evidencia a importância do sCD163 como marcador de doença/não-doença (HC em comparação a D0, $AUC=0,9697$, CI 0,9112-1,02; DTH+ em comparação a D0, $AUC=0,9242$, CI 0,8385-1,01). A análise comparando os pacientes com LV no D0 e no D30 ($AUC=0,7376$, CI 0,5832-0,89) (Figura 10C) evidencia a importância CD163 como parâmetro de cura clínica dos pacientes, enquanto a análise D0 em comparação a pacientes com LV Grave ($AUC=0,8403$, CI 0,7101-0,97) (Figura 10D) revela que o este biomarcador pode ser utilizado como parâmetro de gravidade da LV.



0

Figura 10. Curvas ROC da concentração sérica de sCD163 em pacientes com LV comparando HC versus pacientes D0 (A), DTH+ versus pacientes D0 (B), D0 versus pacientes D30 (C) e D0 versus pacientes LV GRAVE (D). Foi considerado significativo p valor < 0,05.

Quanto as dosagens de HO-1, Haptoglobina e Arginase-1, apesar de não haver significância estatística, os resultados demonstraram níveis menores de Haptoglobina no grupo LV Grave, em comparação com os D0 com forma clássica, enquanto as concentrações séricas da enzima Arginase-1 encontra-se mais elevada neste grupo (Figura 11A-C). A hemeoxigenase encontra-se elevada nos pacientes com LV na fase aguda, em relação aos grupos controles, reduzindo no D30 pós tratamento.

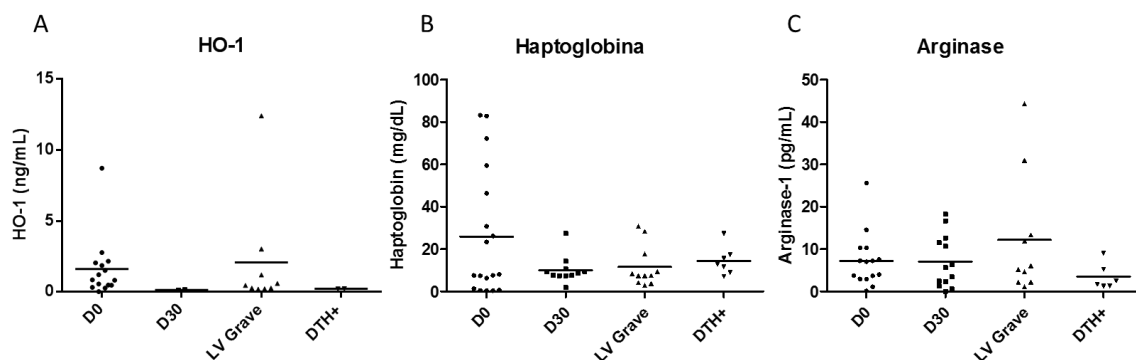


Figura 11. Quantificação de HO-1 (A), Haptoglobina (B) e Arginase-1 (C) em amostras de soro de pacientes com Leishmaniose Visceral. O soro foi coletado a partir de amostras de sangue periférico e utilizado para quantificação por ELISA. As dosagens de indivíduos D0 (n = 18 a 15), D30 (n = 2 a 3), LV Grave (n = 10 a 12) e de indivíduos contactantes sem sinais ou sintomas da LV (DTH) (n = 2 a 7) foram comparadas pelo teste não pareado e não paramétrico de Mann-Whitney. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

6.3 - *Leishmania* induz a expressão de CD163 por macrófagos

Com o objetivo de identificar a origem do sCD163 encontrado nas amostras de soro dos pacientes, foi avaliada a expressão desse marcador na superfície de macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis*, sendo que essa linhagem expressa constitutivamente a Proteína Verde Fluorescente (GFP) (*Leishmania-GFP*) (Lima-Junior *et al.*, 2013). Ferramenta essa que nos permite analisar separadamente células que contenham o parasito intracelular.

Inicialmente o experimento foi padronizado testando dois modelos de infecção, 5 ou 10 parasitos para cada macrófago, em 3 tempos diferentes, 2, 48 e 72 horas de infecção. Como mostra a figura 12, no tempo de duas horas temos uma taxa de infecção de 4,97 no experimento 5:1, e 23,9 quando foi usado 10:1. Já com 48 e 72 horas obteve-se queda na porcentagem de células infectadas. Portanto, nenhum dos tempos analisados representou uma análise nos parâmetros desejados. Com 2 horas de experimento a porcentagem de infecção estava próxima à desejada, mas considerando o contexto de expressão do CD163 em células intensamente parasitadas em infecções crônicas, 2 horas pode ser considerado precoce para a análise do fenômeno que visamos. Com 48 e 72 horas as células infectadas se mostraram eficazes em responder ao parasito e diminuindo as taxas de infecção. Assim foi escolhido o tempo de 24 horas para os experimentos que seguem, sendo um modelo em que podemos observar muitas células infectadas e, em um tempo de experimento favorável a análise de fenômenos inerentes a infecções crônicas. Outra variável a ser

padronizada foi a quantidade de parasitos por macrófago, foi escolhida a proporção de 10 parasitos para cada macrófago por ser a estratégia que forneceu a maior porcentagem de células infectadas.

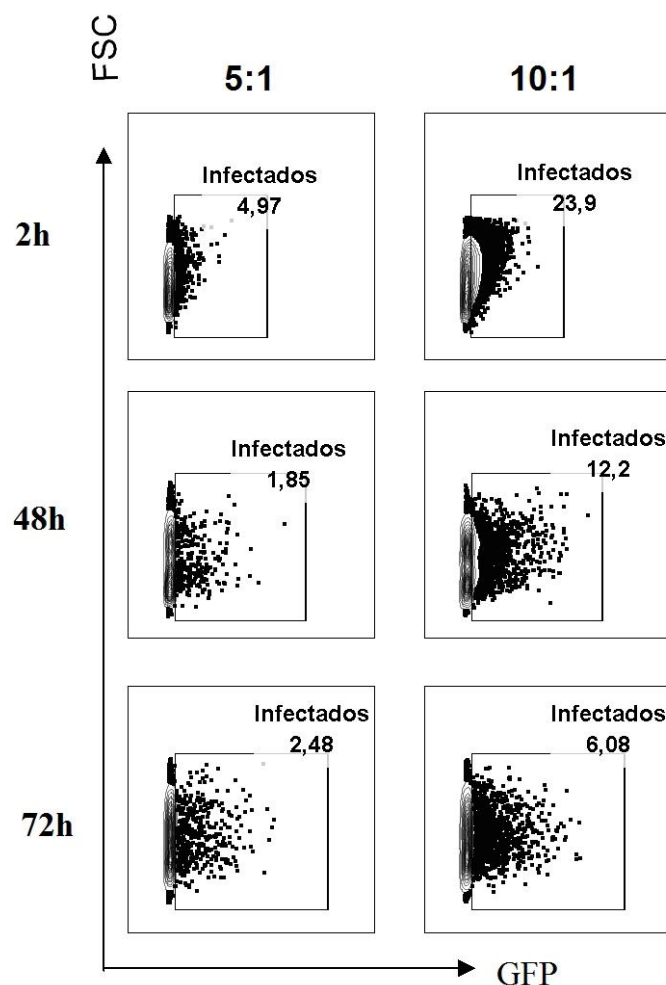


Figura 12. Células mononucleares de sangue periférico foram obtidas de amostras de um indivíduo saudável e plaqueadas em triplicata por 3 horas. As células aderentes foram cultivadas por 5 dias em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de SBF para diferenciação em macrófagos. As células foram então infectadas com cepa de *Leishmania amazonensis* que expressa constitutivamente a proteína verde fluorescente GFP (1 MΦ: 5 parasitos e 1 MΦ: 10 parasitos), por 2, 48 e 72 horas e analisadas por Citometria de Fluxo.

Após a padronização do protocolo seguiu-se para a avaliação de moléculas de superfície. A análise contou com macrófagos não expostos a *Leishmania*-GFP, cultivados apenas em meio, e macrófagos expostos ao parasito. Depois de 24 horas de infecção, os macrófagos foram removidos da placa com PBS gelado, marcados com anticorpos específicos e submetidos a análise de imunofenotipagem por citometria de fluxo (FACS).

Foi realizada uma curva de tempo, com células de indivíduos saudáveis, acompanhando a infecção dos macrófagos e foi escolhido o tempo de 24 horas como ideal para as análises, já que com 48 horas foi obtida uma menor taxa de infecção. Entretanto, foi obtido o mesmo padrão de resultados para a imunofenotipagem em ambos os tempos (dados não mostrados).

Como mostra a Figura 13, a estratégia de análise de “Gate” permite a separação de duas populações distintas de células expostas à *Leishmania-GFP*, GFP positivas e GFP negativas. Ambas as populações foram analisadas quanto a expressão dos marcadores de superfície CD40, CD86, CD209 e CD163, permitindo a análise do biomarcador CD163 em diferentes populações de células, no contexto de outros marcadores normalmente utilizados para avaliar a atividade de macrófagos.

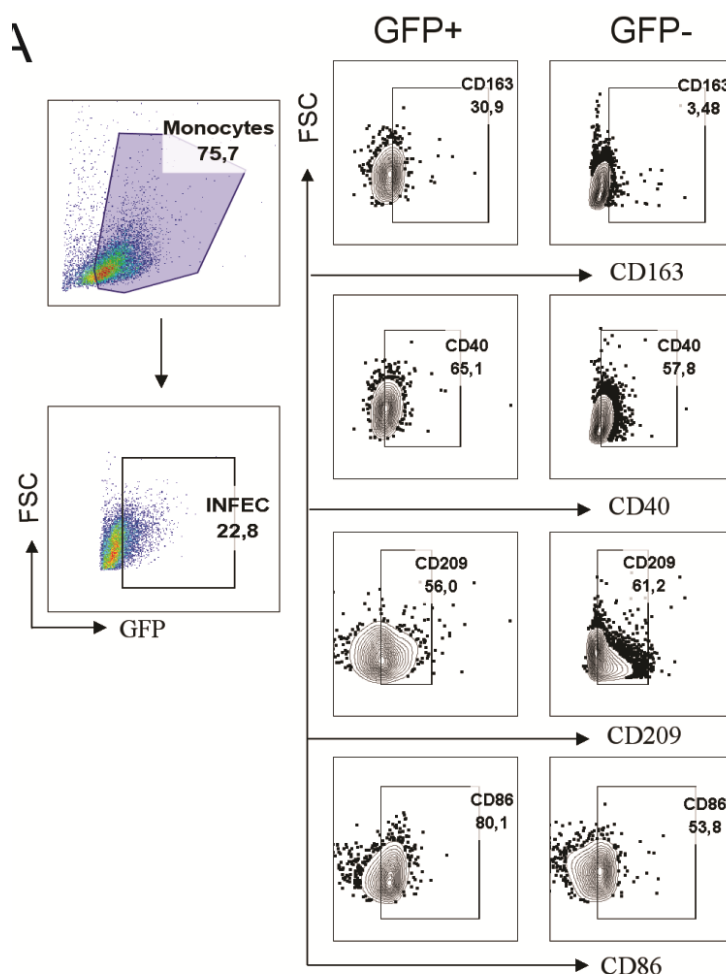


Figura 13. Estratégia de Gate. Expressão de CD163 na superfície de Monócitos/Macrófagos (MΦ) induzida por *Leishmania GFP*. Células mononucleares de sangue periférico foram obtidas de amostras de indivíduos saudáveis (n = 7) e plaqueadas em duplicata por 3 horas. As células aderentes foram cultivadas por 5 dias em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de SBF para diferenciação em macrófagos. As células foram então infectadas com cepa de *Leishmania amazonensis* que expressa constitutivamente a proteína verde fluorescente GFP (1 MΦ: 10 parasitos), por 24 horas e então analisadas por citometria de fluxo para os marcadores CD163, CD40, CD209 e CD86.

Com o objetivo de refinar a análise, as populações de estudo foram divididas segundo estratégia previamente descrita (Tavares *et al.*, 2014), células não expostas à infecção por *L. amazonensis*-GFP ou Não-Estimuladas (NE) e as células expostas à *Leishmania*-GFP. Estas células expostas à infecção podem ser GFP+ ou GFP-. Os macrófagos GFP- são considerados não infectados, e foram e interpretados como aqueles que foram resistentes à infecção ou foram capazes de eliminar o parasito no tempo

avaliado de 24 horas. Enquanto as células GFP+ foram consideradas infectadas, permissivas ao parasito no tempo de 24 horas.

Como mostrado na Figura 14A, a população de células infectadas (GFP+) possui uma maior porcentagem de células positivas também para os marcadores CD86 (B7.2) ($p < 0.05$) e CD163 ($p < 0.05$), comparado aos grupos NE e GFP-. Enquanto que para os outros marcadores, CD40 e CD209, não é possível detectar diferenças entre as frequências nas populações estudadas.

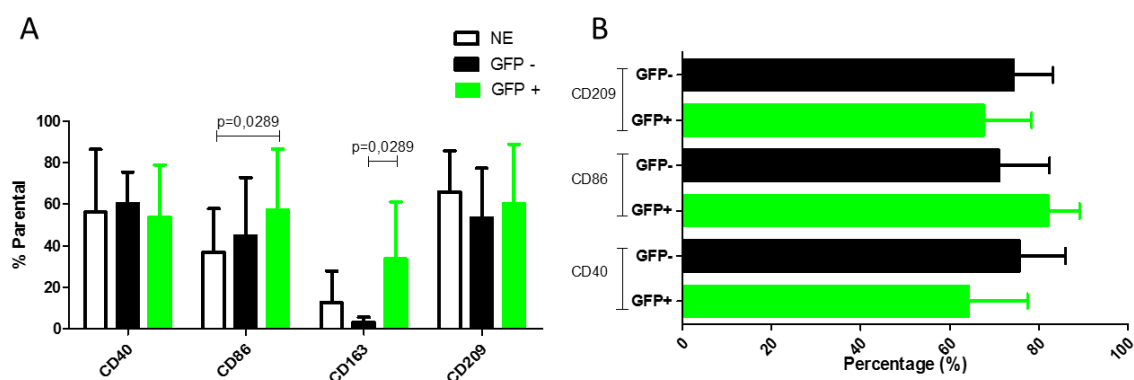


Figura 14. Expressão de CD163 na superfície de Monócitos/Macrófagos (MΦ) induzida por *Leishmania GFP*. Células mononucleares de sangue periférico foram obtidas de amostras de indivíduos saudáveis e plaqueadas por 3 horas. As células aderentes foram cultivadas por 5 dias em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de SBF para diferenciação em macrófagos. As células foram então infectadas com cepa de *Leishmania amazonensis* que expressa constitutivamente a proteína verde fluorescente GFP (*Leishmania GFP*) (1 MΦ: 10 parasitos), por 24 horas e então analisadas por citometria de fluxo. (A) Fenótipo de superfície quanto aos marcadores CD163, CD40, CD209 e CD86 ($n = 6$, experimentos em duplicata). Barras verdes e pretas representam respectivamente as populações GFP+ e GFP-. As barras brancas representam a população de células que não foram expostas a *Leishmania GFP* (NE). As médias $\pm$ Desvio Padrão da porcentagem parental das populações de células foram comparadas utilizando o teste pareado não paramétrico de Friedman com pós-teste de Dunn. (B) Porcentagem de células positivas para os marcadores CD40, CD86 e CD209 na população de células que expressam CD163, para os grupos GFP+ e GFP- ($n=7$ experimentos em duplicata). Foi considerado significativo um $p < 0,05$.

Ademais, as células CD163 positivas, tanto infectadas (GFP+) como não infectadas (GFP-), também possuem os outros marcadores estudados. Entretanto, não houve diferença entre os perfis de expressão desses marcadores nessas duas populações comparadas, GFP+ e GFP-. Apesar de o CD209 ser considerado marcador de macrófagos M2 (Montoya *et al.*, 2009), assim como o CD163, não foi possível detectar, no modelo

construído, diferenças em sua expressão entre células infectadas e não infectadas (Figura 14B).

O próximo passo foi analisar a relação entre os marcadores estudados e a quantidade relativa de parasitos dentro das células. Para tanto, a Mediana da Intensidade de Fluorescência (MFI) do fluorocromo GFP foi aferida nas diferentes subpopulações marcadas para CD40, CD86, CD209 e CD163. Com o objetivo de refinar a análise e demarcar a relação entre a carga parasitária e a expressão de CD163, essa análise foi realizada nas diferentes subpopulações excluindo-se as células CD163+. Como mostrado na Figura 15A, as células CD163+ apresentaram MFI mais alta que a população CD40+CD163- ($p < 0.0005$, Friedman paired test). Entretanto, não foi detectada diferença entre as células CD163+ e as populações CD86+CD163- e CD209+CD163-, mostrando que existem, em nosso modelo, células que expressam CD86 e CD209 com a mesma intensidade de infecção que células CD163+.

Além disso, para confirmar essa relação analisada entre o marcador CD163 e a quantidade de parasitos intracelulares, foi realizada uma análise de correlação de Spearman entre as intensidades de fluorescência dos fluorocromos PE (CD163) e GFP (*Leishmania-GFP*). Como mostrado na Figura 15B, foi obtida uma correlação positiva entre as intensidades de fluorescência com fator r de Spearman 0,6696 e $p < 0,0001$.

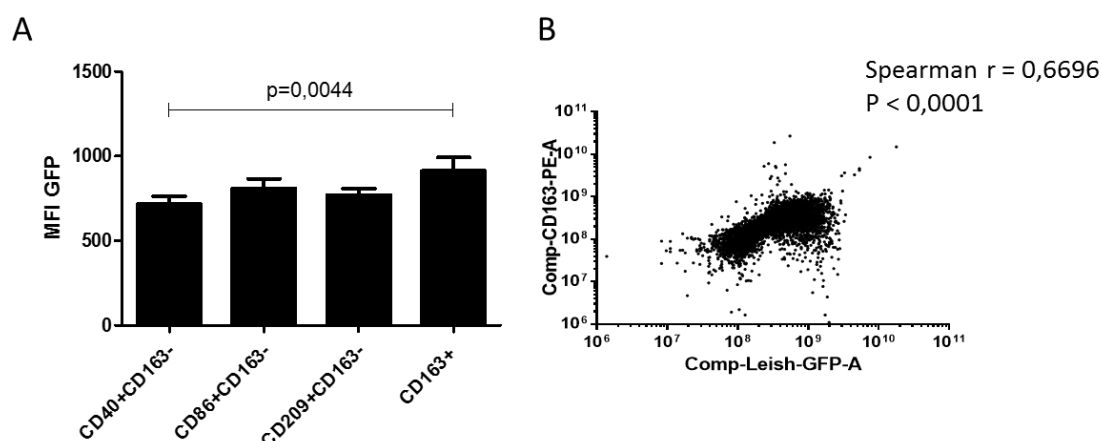


Figura 15. Expressão de CD163 na superfície de Monócitos/Macrófagos (MΦ) induzida por *Leishmania GFP*. Células mononucleares de sangue periférico foram obtidas de amostras de indivíduos saudáveis e plaqueadas por 3 horas. As células aderentes foram cultivadas por 5 dias em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de SBF para diferenciação em macrófagos. As células foram então infectadas com cepa de *Leishmania amazonensis* que expressa constitutivamente a proteína verde fluorescente GFP (*Leishmania GFP*) (1 MΦ: 10 parasitos), por 24 horas e então analisadas por citometria de fluxo quanto aos marcadores CD163, CD40, CD209 e CD86 (n=7 experimentos em duplicata). (A) Análise da Mediana da Intensidade de Fluorescência do fluorocromo GFP nas populações de células delimitadas quanto aos marcadores de superfície, comparada utilizando o teste pareado não paramétrico de Friedman com pós-teste de Dunn. (B) Análise de correlação de Spearman entre as fluorescências dos fluorocromos PE (CD163) e GFP (*Leishmania*) para cada célula do experimento (01 experimento representativo de 7 em duplicata). Foi considerado significativo p valor < 0,05.

6.4 - *Leishmania* induz expressão de CD163 em Neutrófilos

Após caracterizar a expressão do biomarcador CD163 em macrófagos infectados com *Leishmania-GFP*, o próximo passo foi analisar se o mesmo ocorreria em outro tipo celular da resposta inata, os Neutrófilos. Para tanto, Neutrófilos foram isolados de amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis e expostos a infecção por *Leishmania-GFP*, por 3 horas e analisados por citometria de fluxo.

Células expostas ou não à *Leishmania-GFP* foram analisadas pela positividade quanto aos marcadores CD15, CD40, CD86 e CD163, seguindo estratégia de gate similar à construída para analisar macrófagos, distinguindo e analisando células positivas e negativas para GFP (Figura 16).

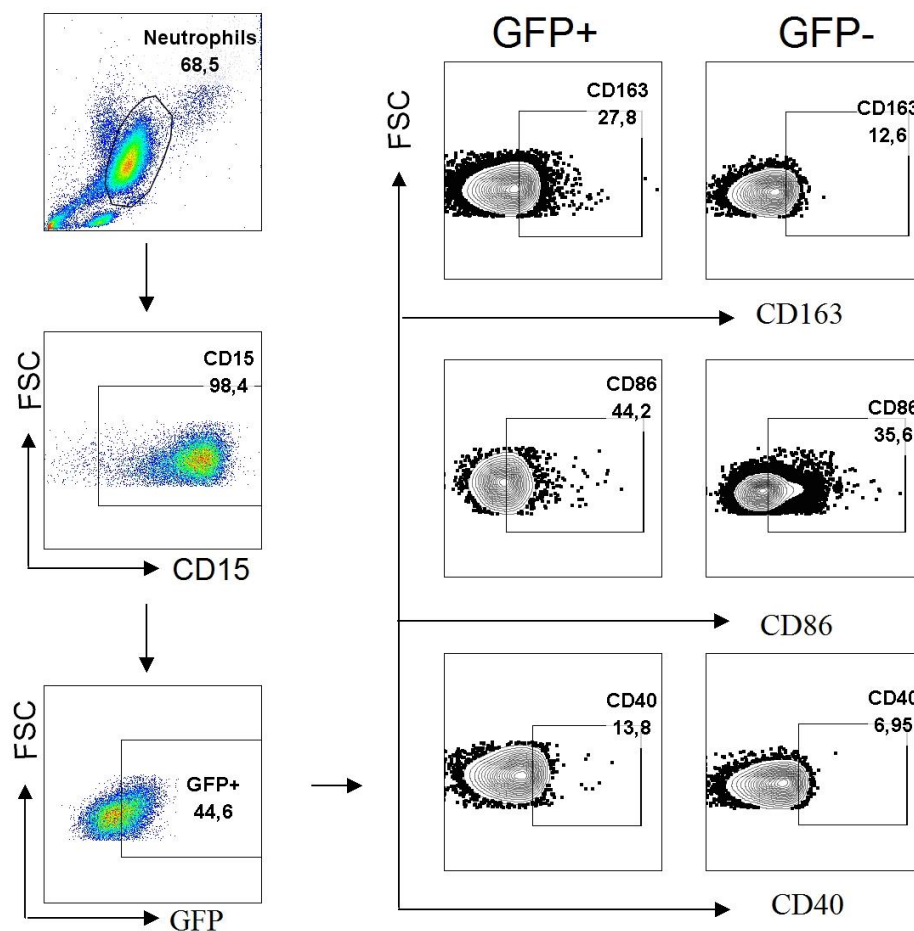


Figura 16. Estratégia de Gate. Expressão de CD163 na superfície de Neutrófilos induzida por *Leishmania GFP*. Neutrófilos foram purificados de amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis. As células foram infectadas com cepa de *Leishmania amazonensis* que expressa constitutivamente a proteína verde fluorescente GFP (*Leishmania GFP*) (1 NΦ: 5 parasitos), em RPMI 1640 10% SBF por 3 horas. Foi realizada análise por citometria de fluxo quanto aos marcadores CD15, CD163, CD40 e CD86 (n=5 experimentos em duplicata).

Os resultados mostram um aumento da porcentagem parental de células positivas para os marcadores CD86 e CD163 ($p < 0.0008$, Friedman paired test) (Figura 17), mesmo perfil apresentado pelos macrófagos infectados com *Leishmania-GFP*.

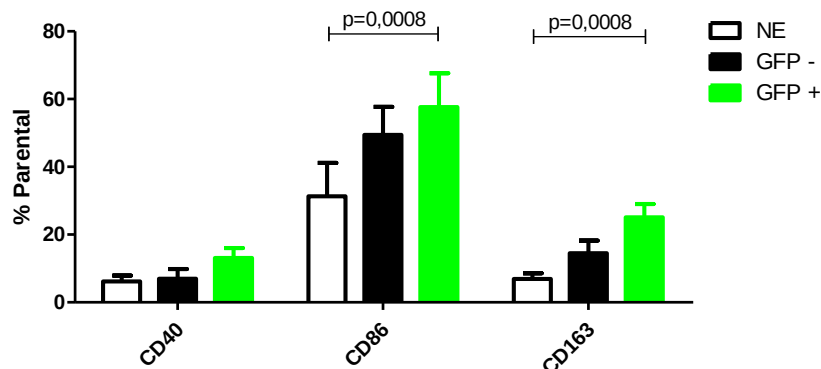


Figura 17. Expressão de CD163 na superfície de Neutrófilos induzida por *Leishmania GFP*. Neutrófilos foram purificados de amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis. As células foram infectadas com cepa de *Leishmania amazonensis* que expressa constitutivamente a proteína verde fluorescente GFP (*Leishmania GFP*) (1 NΦ: 5 parasitos), em RPMI 1640 10% SBF por 3 horas. Foi realizada análise por citometria de fluxo quanto aos marcadores CD15, CD163, CD40, e CD86 (n=5 experimentos em duplicata). As barras brancas representam a população de células que não foram expostas a *Leishmania GFP* (NE). As medias $\pm$ Desvio Padrão da porcentagem parental das populações de células foram comparadas utilizando o teste pareado não paramétrico de Friedman com pós-teste de Dunn. Foi considerado significativo p valor < 0,05.

Ademais, foi realizada análise de MFI do GFP nas diferentes subpopulações, com simples marcação e também análise booleana de dupla marcação, segundo os marcadores de superfície utilizados. Como apresentado pela Figura 18, não houve diferença entre a intensidade de infecção entre as populações com marcação simples. Entretanto, quando utilizada análise booleana com a utilização de dois marcadores, é possível diferenciar que a população triplo positiva CD40+CD86+CD163+ possui MFI de GFP mais intensa que as outras populações com análise de marcação simples.

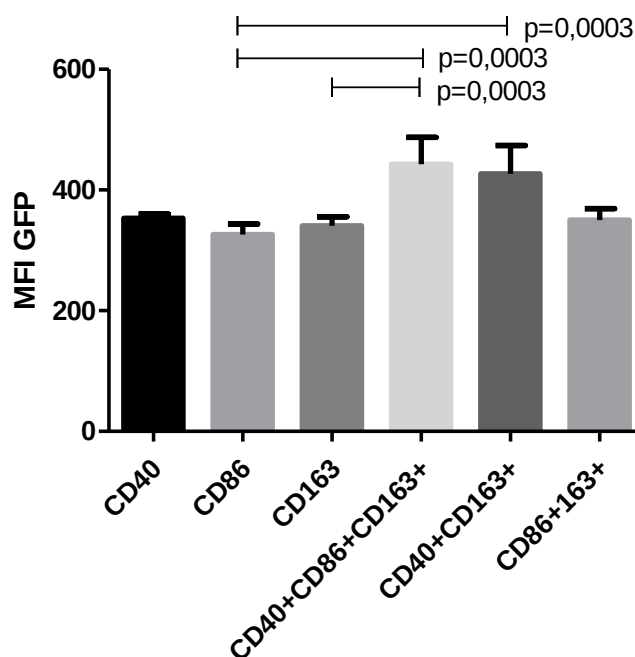


Figura 18. Expressão de CD163 na superfície de Neutrófilos induzida por *Leishmania GFP*. Neutrófilos foram purificados de amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis. As células foram infectadas com cepa de *Leishmania amazonensis* que expressa constitutivamente a proteína verde fluorescente GFP (*Leishmania GFP*) (1 NΦ: 5 parasitos), em RPMI 1640 10% SBF por 3 horas. Foi realizada análise por citometria de fluxo quanto aos marcadores CD15, CD163, CD40, e CD86 (n=5 experimentos em duplicata). As barras brancas representam a população de células que não foram expostas a *Leishmania GFP*. Análise da Mediana da Intensidade de Fluorescência do fluorocromo GFP nas populações de células delimitadas quanto aos marcadores de superfície, comparada utilizando o teste pareado não paramétrico de Friedman com pós-teste de Dunn. Foi considerado significativo p valor < 0,05.

7 - DISCUSSÃO

Considerando que o biomarcador CD163 foi demonstrado ser característico de macrófagos permissivos à infecção por *M. leprae*, sua expressão é indicativa de um macrófago com subtipo M2. Além disso, sua secreção (sCD163) evidencia um combate ineficiente contra os patógenos *M. leprae* e *L. infantum*, e marcador de progressão dessas doenças causadas por patógenos intracelulares (Montoya *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2012).

Nossos dados, utilizando pacientes com hanseníase, confirmam as observações de Moura e colaboradores (2012), o primeiro grupo a descrever a forma sérica sCD163 associada a Hanseníase Virchowiana (HV), comparando com pacientes da forma Tuberculóide (HT) (Moura *et al.*, 2012). Ademais, nosso trabalho inclui também a dosagem deste biomarcador em pacientes com as formas intermediárias da hanseníase (HI e HD).

Nossos resultados, através das curvas ROC, mostram que a dosagem de sCD163 no soro desses pacientes possui uma relação entre sensibilidade e especificidade muito significativa para a distinção clínica entre o a forma mais grave multibacilar, HV, e a forma HT. Além disso, essa dosagem se mostrou eficiente em distinguir a forma HV dentre todas as outras, inclusive quando comparada aos indivíduos controles contactantes.

Essa relação entre os níveis séricos de sCD163 e a gravidade da Hanseníase, explicada pela diferenciação de macrófagos para o fenótipo M2, pode ser evidenciada também pela presença de macrófagos CD163+ em lesões de pacientes com a forma HV (Moura *et al.*, 2012). Essa diferenciação de macrófagos, que os faz permissivos à multiplicação da Micobactéria é finamente regulado e retroalimentado pela citocina anti-inflamatória IL-10 (Moura *et al.*, 2012). A IL-10 tem diversos efeitos supressores nos macrófagos, reduzindo suas funções microbidas e de apresentação de antígenos, sendo possivelmente um dos mecanismos da supressão acentuada da resposta Th1 observada nos pacientes com a HV. Sousa e colaboradores (2016) encontraram correlação positiva entre a expressão de CD163 e uma variedade de citocinas antiinflamatórias em lesões de pacientes com HV, pela técnica de imuno-histoquímica, além da expressão da enzima Arginase-1 (característica do metabolismo de macrófagos M2) (De Sousa *et al.*, 2016). O CD163 é o receptor do complexo haptoglobina-hemoglobina, sendo esse metabolismo importante para neutralizar os efeitos tóxicos dos derivados de degradação da hemoglobina (4-6). É importante que esses macrófagos tenham efeito anti-inflamatório, pois são responsáveis pelo clearance de autoantígenos nos tecidos (Martinez *et al.*, 2009).

Nosso estudo não observou diferenças entre os grupos analisados quanto a dosagem de seu ligante Haptoglobina, nem da enzima que degrada o complexo Hemoglobina-haptoglobina (Hb-Hp), a hemeoxigenase-1 (HO-1), e a Arginase-1. Fato esse esperado considerando que a Hanseníase com poucas manifestações sistêmicas e normalmente de evolução muito lenta, restrita aos sítios de inflamação na pele e nervos.

Com base na forte evidência que foi encontrada nos pacientes com Hanseníase, o próximo passo foi avaliar se esse mecanismo pode ser extrapolado e associado a outra doença provocada por patógeno intracelular, que também possui uma forte conexão com a resposta efetora de macrófagos, a Leishmaniose Visceral (LV). Assim, altos níveis de sCD163 foram encontrados no soro de pacientes com LV, e ainda mais elevados em pacientes com LV Grave. Esses dados sugerem que, a exemplo da Hanseníase, o biomarcador CD163 é importante sinal de células reservatórias de *Leishmania infantum*.

Além disso, outra forte evidência que associa a dosagem desse biomarcador com a gravidade da LV foi fornecida pelas análises de correlação dessa dosagem com os parâmetros clínicos mais utilizados para acompanhamento da gravidade da LV, os tamanhos de fígado e baço (De Oliveira *et al.*, 2013; Dos Santos *et al.*, 2016). Esses órgãos são alvo do tropismo do parasito e sofrem intensa inflamação e edema durante o progresso da doença (Dos Santos *et al.*, 2016). A correlação positiva entre a dosagem de sCD163 com tamanho de fígado e baço corrobora a utilização do sCD163 como biomarcador de doença e de gravidade da LV, já que esses sítios intensamente inflamados são o sítio dos fagócitos reservatórios do parasito.

Adicionalmente, observa-se por análise pareada, uma queda nos níveis desse biomarcador em pacientes tratados (D30), sugerindo a utilização do sCD163 como um eficiente parâmetro de cura clínica. Evidência essa suportada pelas análises de curva ROC realizadas, as quais mostram, pelas altas AUC, que a dosagem desse biomarcador possui uma eficiente relação sensibilidade/especificidade para quaisquer comparações realizadas, seja entre pacientes com diferentes apresentações clínicas ou indivíduos controles. Esses resultados destacam a potencial utilização desse biomarcador como parâmetro de gravidade e de melhora clínica da LV.

Lastrucci e colaboradores (2015), realizaram análises similares em pacientes com TB e obtiveram resultados análogos. Através de curvas ROC, os autores destacaram a importância do sCD163 em distinguir indivíduos saudáveis de pacientes com TB ativa (AUC=0.78), e também pacientes com TB ativa de pacientes curados, após 12 meses de tratamento padrão (AUC=0.76) (Lastrucci *et al.*, 2015). Além disso, o sCD163 foi

descrito como biomarcador em doenças como a Glomerulonefrite (Li *et al.*, 2015), Esclerose Múltipla (Stilund *et al.*, 2015), entre outras doenças inflamatórias (Moller *et al.*, 2004; Mueller *et al.*, 2015; Ab-Rahman *et al.*, 2016).

Em conjunto, esses dados sugerem que o biomarcador sCD163 possui forte associação com diagnóstico, gravidade e melhora clínica das doenças causadas por agentes intracelulares TB, Hanseníase e LV, entretanto essa relação é muito mais evidente e pronunciada com Hanseníase e LV.

Apesar de não ter significância estatística, níveis mais baixos de Haptoglobina nos soros de pacientes com LV grave sugerem que os níveis elevados de sCD163 estão contribuindo para retirada de complexos Hb-Hp do plasma desses indivíduos e posterior processamento pela HO-1. Além do mais, Arginase-1 foi encontrada em níveis mais elevados no soro de pacientes LV grave, sugerindo um desvio do metabolismo característico de macrófagos M2 (Iniesta *et al.*, 2005). Essa análise em específico foi prejudicada pela perda das amostras ao longo da utilização pelo grupo de pesquisa. As dosagens desses fatores solúveis contaram com uma quantidade menor de amostras, impedindo a possibilidade de significância estatística.

A partir desses resultados, surgiu a necessidade de se descrever o mecanismo da indução da expressão dessa molécula e a fonte celular da molécula sCD163. Alguns estudos suportam a ideia de que o macrófago pode receber um estímulo a se diferenciar no fenótipo M2, que pode ser identificado pela expressão de CD163. Essas moléculas podem também sofrer proteólise e ser liberada para o microambiente (Philippidis *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2012). Observamos que a infecção por *Leishmania* é capaz de induzir a expressão de CD163 na superfície de macrófagos e neutrófilos.

Em hanseníase essa relação foi sugerida previamente, pela atividade de macrófagos intensamente parasitados expressando CD163 em biopsias de lesões. Além disso, Moura e colaboradores mostraram a expressão de CD163 em monócitos induzida por micobactérias (Moura *et al.*, 2012). Entretanto, não existem dados disponíveis, até o momento, mostrando se parasitos do gênero *Leishmania* induzem o mesmo efeito em macrófagos.

O modelo de infecção com cepa de *Leishmania amazonensis* que expressa constitutivamente GFP, mostra que, assim como para *Mycobacterium leprae*, macrófagos infectados com *Leishmania-GFP* expressam diferencialmente o marcador CD163, além da molécula co-estimulatória CD86. Esses dados corroboram a hipótese que a *Leishmania*

pode fornecer o estímulo para diferenciação M2 e esses macrófagos são uma das possíveis fontes para o sCD163 que foi encontrado no soro de pacientes com LV.

Ademais, estas células expressam o CD209, considerado marcador de macrófagos ativados, também reportado como característico de macrófagos M2, permissivos a patógenos como *Mycobacterium leprae* [10], contribuindo para o entendimento do contexto de ativação dessas células CD163+.

As análises realizadas sugerem que a infecção por *Leishmania* induz a expressão de CD163 concomitantemente com outros marcadores, mostrando que essas células CD163+ são capazes de estimular a apresentação de antígenos com CD86, receber a sinalização de Lectina tipo C via CD209 e receber estimulação de CD40L, diretamente de linfócitos T CD4 ou através de sua forma solúvel (sCD40L), já descrito como importante na resposta imune contra *Leishmania* (De Oliveira *et al.*, 2015).

Na infecção por *M. leprae* a co-expressão de CD209 e CD163 é indicativo de uma programação celular fagocítica e permissiva dos macrófagos, característica de lesões multibacilares, descrito por Montoya e colaboradores (2009) [10]. Entretanto, no nosso modelo de infecção por *Leishmania*, não foi constatado aumento de células positivas para CD209 em células infectadas. Como as populações NE, GFP- e GFP+ possuem praticamente a mesma porcentagem de macrófagos CD209+ e apenas a população GFP+ teve aumento na porcentagem de células CD163+, é possível que o CD209 seja um marcador expresso em células em estágios mais iniciais de ativação, até mesmo no repouso. Após o estímulo que direciona a diferenciação para M2, nesse caso a *Leishmania-GFP*, a célula permanece expressando CD209 e passa a expressar o marcador CD163+, sendo que essa célula já diferenciada, positiva para ambos os marcadores, pode ser o fenótipo observado por Montoya (2009), também encontrada em nossas análises. Futuras análises utilizando marcação intracelular de citocinas, por citometria de fluxo, fornecerão as evidências necessárias para a compreensão da diferenciação dessas células em M1 ou M2. Principalmente no que tange as citocinas IL-10, IL-4, TNF- α e IL-12, essas análises proverão respostas interessantes quanto ao real papel das células CD163+ no microambiente de resposta imunológica.

Os macrófagos que expressam CD163 são mais parasitados com *Leishmania-GFP*, sugerido que a expressão desse marcador está associada com uma maior susceptibilidade dos macrófagos à infecção por agentes intracelulares. Esse resultado é suportado pela correlação positiva entre a intensidade de fluorescência do fluorocromo que marca o CD163 e o marcador da *Leishmania-GFP*.

Além dos macrófagos, neutrófilos infectados com *Leishmania-GFP* também expressam o biomarcador CD163 e podem ser uma outra fonte para o sCD163 encontrado nos pacientes com LV. Além disso, a combinação dos 3 marcadores, CD163, CD40 e CD86, por análise booleana, revelou um neutrófilo mais permissivo à infecção, apesar da expressão dos marcadores CD86 (molécula coestimulatória para apresentação de antígeno) e CD40 (receptor de estimulação provinda dos linfócitos T auxiliares) que possibilitam a essa célula tanto fornecer sinais de amplificação da resposta imune, quanto receber sinais de ativação, respectivamente.

Neutrófilos são classicamente a primeira linha de defesa contra patógenos, juntamente com os macrófagos residentes no tecido, migram rapidamente em grandes quantidades de células para os sítios inflamatórios (Faurschou e Borregaard, 2003; Marques *et al.*, 2015). Essas células são rapidamente mobilizadas e são uma proteção essencial do hospedeiro contra uma variedade de patógenos (Carvalho *et al.*, 2004; Hakkim *et al.*, 2011).

Neutrófilos são reconhecidos como primeiro tipo celular a chegar ao sítio de injúria da picada do *Flebotomineo*, como demonstrado em modelos experimentais, e são capazes de fagocitar a *Leishmania* (Laurenti *et al.*, 1996; Peters e Sacks, 2009). Esses dados sugerem que os neutrófilos podem ser um alvo inicial para a *Leishmania* (Ribeiro-Gomes e Sacks, 2012). Modelos experimentais *in vitro* tem mostrado que neutrófilos podem evitar a morte celular programada (apoptose) e servir como veículo para o parasito ganhar a corrente linfática e circulatória, por isso comumente chamado de “Cavalo de tróia”. Esse fenômeno promove uma infecção silenciosa, assumindo papel importante no estabelecimento da doença (Laskay *et al.*, 2008). Por outro lado, tem sido demonstrado que os neutrófilos podem contribuir para o desenvolvimento de imunidade protetora durante os eventos iniciais da infecção por *Leishmania* (Mcfarlane *et al.*, 2008). Entretanto, ainda não está claro as condições de infecção e resposta imune que levam essas células a ter comportamentos tão distintos e opostos, (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000; Ribeiro-Gomes, Flavia L *et al.*, 2007).

Adicionalmente, a expressão de CD163 por neutrófilos pode ser uma evidência científica útil para o entendimento dos papéis opostos desempenhados por essa célula frente a infecção por *Leishmania*. Tacchini-Cottier e colaboradores descreveram um possível papel imunomodulatório de leucócitos polimorfonucleares (PMN) na diferenciação da resposta imune para o polo Th2, durante as fases iniciais da infecção por *Leishmania major*, mas esse trabalho não avaliou o mecanismo ou as Citocinas

produzidas por esses PMNs (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000). Groselj-Grenc e colaboradores encontraram a expressão de CD64 e CD163 em neutrófilos em pacientes com Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica com ou sem sepse, mas este grupo de pesquisa não realizou mais análises com objetivo de descrever o papel dessas células na resposta imunológica, se limitaram a avaliar a acurácia da expressão dessas moléculas para o diagnóstico da doença (Groselj-Grenc *et al.*, 2008).

Extrapolando o conhecimento disponível acerca da atividade de macrófagos e sua diferenciação, pode-se sugerir que a molécula CD163 pode estar relacionada à diferenciação de neutrófilos para um fenótipo recentemente descrito na literatura como N2 ou Neutrófilos associados a tumor (TAN), em modelos animais de câncer (Fridlender *et al.*, 2009; Sionov *et al.*, 2015). Célula essa descrita como sendo permissiva aos tumores, contribuindo com seu desenvolvimento. Entretanto, somente com análises visando o perfil de citocinas inerente à essas células será possível analisar seu real papel na resposta imunológica contra *Leishmania*. Outras análises, com células CD163+ isoladas, visando relacionar esse fenótipo com perfis de expressão gênica, podem esclarecer o papel de macrófagos e neutrófilos CD163+ no contexto de resposta imunológica a patógenos intracelulares.

8 - CONCLUSÕES

1. O papel do sCD163 como preditor de gravidade da Hanseníase foi reafirmado e a evidência científica ampliada, com a avaliação das formas intermediárias de doença (HI e HD) e com base nas curvas ROC;
2. Foi revelada a importância do sCD163 como biomarcador de gravidade e resposta ao tratamento da Leishmaniose Visceral através das curvas ROC e correlação com parâmetros de gravidade da doença;
3. Uma possível origem do sCD163 sérico são macrófagos intensamente parasitados, com polarização para M2;
4. Outra possível fonte para o sCD163 sérico são neutrófilos intensamente parasitados, possivelmente diferenciados para o perfil N2 ou TAN.

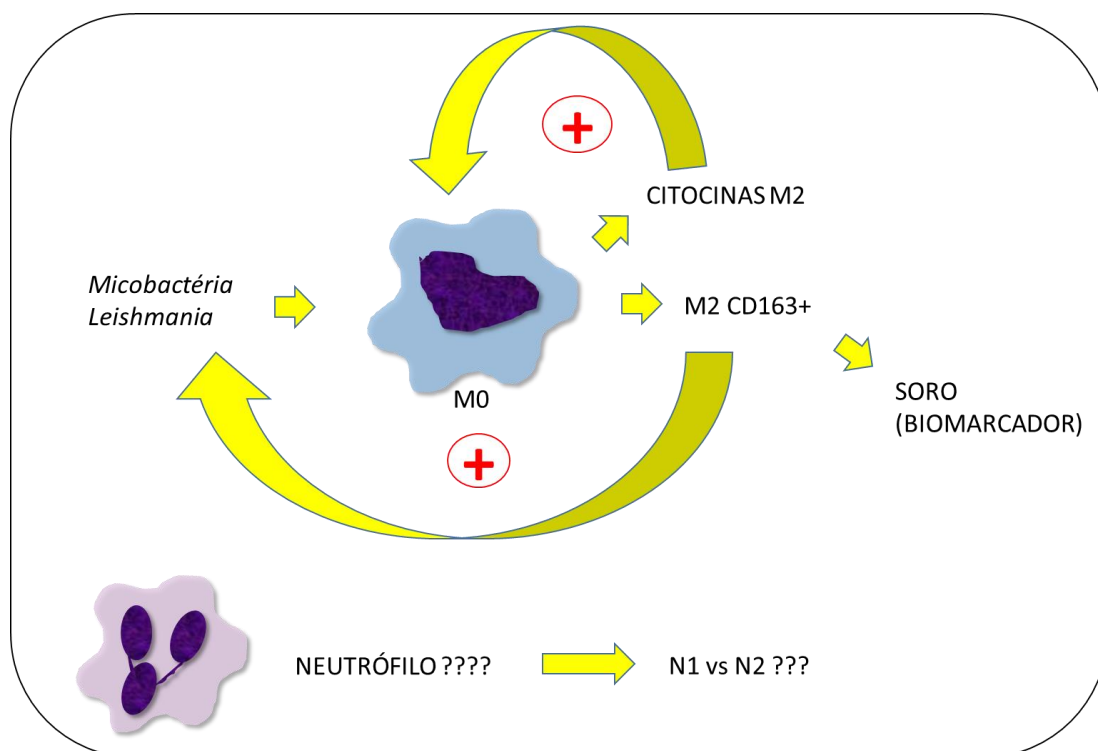


Figura 19. Resumo esquemático das conclusões.

9 - PERSPECTIVAS

1. Dosagem do CD163 nos sobrenadantes dos macrófagos e neutrófilos infectados com leishmania
2. Análise das Citocinas produzidas por macrófagos CD163+;
3. Análise das Citocinas produzidas por neutrófilos CD163+;
4. Análise das quinases fosforiladas em células CD163+;
5. Análise da expressão de genes relacionados a função efetora das células CD163+;
6. Avaliação da influência de Hormônios sexuais na diferenciação de macrófagos CD163+.
7. Comparação da diferenciação de células CD163+ em macrófagos e neutrófilos de pacientes com passado de hanseníase e controles contactantes.
8. Comparação da diferenciação de células CD163+ em macrófagos e neutrófilos de pacientes com passado de LV e controles DTH+.

10 – ARTIGOS PRODUZIDOS DURANTE O DOUTORADO

- ✓ **sCD163 levels as a biomarker of disease severity in leprosy and Leishmaniasis.** Submetido à PLOS Neglected Tropical Diseases, com parecer favorável do *Pressubmission Inquiry*. Primeiro autor.
- ✓ FONTOURA, I.C. ; TROMBONE, A.P.F. ; ALMEIDA, L.P. ; LORENZI, J.C.C. ; ROSSETTI, R.A.M. ; MALARDO, T. ; PADILHA, E. ; SCHLUCHTING, W. ; **SILVA, R.L.L.** ; GEMBRE, A.F. ; FIUZA, J.E.C. ; SILVA, C.L. ; PANUNTO-CASTELO, A. ; COELHO-CASTELO, A.A.M. . **B cells expressing IL-10 mRNA modulate memory T cells after DNA-Hsp65 immunization.** Brazilian journal of medical and biological research, v. 00, p. 00, 2015.
- ✓ MÁRCIO BEZERRA SANTOS; DANIELA TELES DE OLIVEIRA; RODRIGO ANSELMO CAZZANIGA; CRISUELLE S. VARJÃO; PRISCILA LIMA DOS SANTOS; **RICARDO L. LOUZADA DA SILVA**; CRISTIANE BANE CORREIA; DANIELA R. FARIA; MARISE DO VALE SIMON; MALCOLM S. DUTHIE; STEVEN G. REED; JOÃO SANTANA DA SILVA; WALDEREZ O. DUTRA; ROQUE PACHECO DE ALMEIDA AND AMÉLIA RIBEIRO DE JESUS. **ELEVATED SERUM CYTOKINES LEVELS OF IL-1 β AND IL-17A ARE ASSOCIATED WITH THE TUBERCULOID FORM OF LEPROSY.** Submetido à Clinical and Infectious Diseases. Co-autor.

11 - REFERÊNCIAS

(WHO), W. H. O. Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. **Technical Report Series**, v. 975, Geneva 2012 2012.

AB-RAHMAN, H. A. et al. Macrophage Activation Syndrome-Associated Markers in Severe Dengue. **International Journal of Medical Sciences**, v. 13, n. 3, p. 179-186, 2016. ISSN 1449-1907.

ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. **Immunol Lett**, v. 99, n. 1, p. 17-23, Jun 15 2005. ISSN 0165-2478 (Print)

0165-2478 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15894106> >.

ALTER, A. et al. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. **Hum Genet**, v. 123, n. 3, p. 227-35, Apr 2008. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18247059 >.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol**, v. 22, n. 12, p. 552-7, Dec 2006. ISSN 1471-4922 (Print)

1471-4922 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17023215> >.

ALVES, W. A. Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 71, p. 25-29, 2009.

BADARO, R. et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 154, n. 6, p. 1003-11, Dec 1986. ISSN 0022-1899 (Print)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3782864> >.

BANULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Adv Parasitol**, v. 64, p. 1-109, 2007. ISSN 0065-308X (Print)

0065-308X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17499100> >.

BELCHER, J. D. et al. Heme degradation and vascular injury. **Antioxid Redox Signal**, v. 12, n. 2, p. 233-48, Feb 2010. ISSN 1557-7716 (Electronic)

1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19697995> >.

BLEHARSKI, J. R. et al. Use of genetic profiling in leprosy to discriminate clinical forms of the disease. **Science**, v. 301, n. 5639, p. 1527-30, Sep 12 2003. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12970564> >.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, p. 1532-5, 2004.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. Leprosy. **Lancet**, v. 363, n. 9416, p. 1209-19, Apr 10 2004.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15081655 >.

BUECHLER, C. et al. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. **J Leukoc Biol**, v. 67, n. 1, p. 97-103, Jan 2000. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648003> >.

BUEHLER, P. W. et al. Haptoglobin preserves the CD163 hemoglobin scavenger pathway by shielding hemoglobin from peroxidative modification. **Blood**, v. 113, n. 11, p. 2578-86, Mar 12 2009. ISSN 1528-0020 (Electronic)

0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19131549> >.

CARVALHO, E. M. et al. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. **J Clin Invest**, v. 83, n. 3, p. 860-4, Mar 1989. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2522103> >.

CARVALHO, E. M. et al. Visceral leishmaniasis: a disease associated with inability of lymphocytes to activate macrophages to kill leishmania. **Braz J Med Biol Res**, v. 21, n. 1, p. 85-92, 1988. ISSN 0100-879X (Print)

0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3179584> >.

CARVALHO, E. M. et al. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. **J Infect Dis**, v. 165, n. 3, p. 535-40, Mar 1992. ISSN 0022-1899 (Print)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1347057> >.

CARVALHO, L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Continuing Medical Education**, v. 79, p. 647-664, 2004. ISSN 0365-0596.

CHUNG, S. et al. Neutrophil and monocyte activation markers have prognostic impact in disseminated intravascular coagulation: in vitro effect of thrombin on monocyte CD163 shedding. **Thromb Res**, v. 127, n. 5, p. 450-6, May 2011. ISSN 1879-2472 (Electronic)

0049-3848 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21255822> >.

DE ANDRADE, T. M. et al. [Hypersensitivity of delayed type in visceral leishmaniasis]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 24, n. 5, p. 298-302, Sep-Oct 1982. ISSN 0036-4665 (Print)

0036-4665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7167708> >.

DE OLIVEIRA, D. T. et al. Neurological disability in leprosy: incidence and gender association in Sergipe, Brazil. **Geospat Health**, v. 6, n. 3, p. S125-9, Sep 2012. ISSN 1970-7096 (Electronic)

1827-1987 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23032278> >.

DE OLIVEIRA, F. A. et al. Soluble CD40 Ligand in Sera of Subjects Exposed to Leishmania infantum Infection Reduces the Parasite Load in Macrophages. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0141265, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26488744> >.

DE OLIVEIRA, F. A. et al. High levels of soluble CD40 ligand and matrix metalloproteinase-9 in serum are associated with favorable clinical evolution in human visceral leishmaniasis. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 331, 2013. ISSN 1471-2334 (Electronic)

1471-2334 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23870715> >.

DE SOUSA, J. R. et al. In situ expression of M2 macrophage subpopulation in leprosy skin lesions. **Acta Trop**, Jan 28 2016. ISSN 1873-6254 (Electronic)

0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26827741> >.

DOS SANTOS, P. L. et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 1, p. e0004375, Jan 2016. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26814478>

<http://www.plosntds.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pntd.0004375&representation=PDF> >.

DROSTE, A.; SORG, C.; HOGGER, P. Shedding of CD163, a novel regulatory mechanism for a member of the scavenger receptor cysteine-rich family. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 256, n. 1, p. 110-3, Mar 5 1999. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066432> >.

FABRIEK, B. O. et al. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. **Blood**, v. 113, n. 4, p. 887-92, Jan 22 2009. ISSN 1528-0020 (Electronic)

0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18849484> >.

FAGOONEE, S. et al. Plasma protein haptoglobin modulates renal iron loading. **Am J Pathol**, v. 166, n. 4, p. 973-83, Apr 2005. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15793279> >.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1317-1327, 2003. ISSN 1286-4579 (Print)\n1286-4579.

FORESTIER, C. L. et al. Imaging host cell-Leishmania interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. **Cell Host Microbe**, v. 9, n. 4, p. 319-30, Apr 21 2011. ISSN 1934-6069 (Electronic)

1931-3128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21501831> >.

FRIDLENDER, Z. G. et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. **Cancer Cell**, v. 16, n. 3, p. 183-94, Sep 8 2009. ISSN 1878-3686 (Electronic)

1535-6108 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19732719> >.

GAMA, M. E. 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. ISSN 0100-879X (Print)

0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14689054> >.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 1, p. 23-35, Jan 2003. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12511873> >.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 12, p. 953-64, Dec 2005. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16322748> >.

GROSELJ-GRENC, M.; IHAN, A.; DERGAN, M. Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes. **Mediators Inflamm**, v. 2008, p. 202646, 2008. ISSN 1466-1861 (Electronic)

0962-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18604302> >.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 6748-53, 2009.

GULIA, A.; FRIED, I.; MASSONE, C. New insights in the pathogenesis and genetics of leprosy. **F1000 Med Rep**, v. 2, 2010. ISSN 1757-5931 (Electronic)

1757-5931 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20948855> >.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T. D. Innate immunity against Leishmania infections. **Cell Microbiol**, v. 17, n. 9, p. 1286-94, Sep 2015. ISSN 1462-5822 (Electronic)

1462-5814 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26249747> >.

HAKKIM, A. et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. **Nature chemical biology**, v. 7, p. 75-77, 2011. ISSN 1552-4469.

HANDMAN, E. Cell biology of Leishmania. **Adv Parasitol**, v. 44, p. 1-39, 1999. ISSN 0065-308X (Print)

0065-308X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10563394> >.

HINTZ, K. A. et al. Endotoxin induces rapid metalloproteinase-mediated shedding followed by up-regulation of the monocyte hemoglobin scavenger receptor CD163. **J Leukoc Biol**, v. 72, n. 4, p. 711-7, Oct 2002. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12377940> >.

HOGGER, P.; SORG, C. Soluble CD163 inhibits phorbol ester-induced lymphocyte proliferation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 288, n. 4, p. 841-3, Nov 9 2001. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11688984> >.

HUNTER, C. A. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 7, p. 521-31, Jul 2005. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15999093 >.

HUNTER, C. A. et al. The role of IL-27 in the development of T-cell responses during parasitic infections. **Immunol Rev**, v. 202, p. 106-14, Dec 2004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15546389 >.

HWANG, P. K.; GREER, J. Interaction between hemoglobin subunits in the hemoglobin . haptoglobin complex. **J Biol Chem**, v. 255, n. 7, p. 3038-41, Apr 10 1980. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7358726> >.

INIESTA, V. et al. Arginase I induction during Leishmania major infection mediates the development of disease. **Infect Immun**, v. 73, n. 9, p. 6085-90, Sep 2005. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16113329> >.

KARAGIANNIS-VOULES, D. A. et al. Bayesian geostatistical modeling of leishmaniasis incidence in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 5, p. e2213, 2013. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23675545> >.

KARP, C. L. et al. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. **J Clin Invest**, v. 91, n. 4, p. 1644-8, Apr 1993. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8097208> >.

KASTELEIN, R. A.; HUNTER, C. A.; CUA, D. J. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 221-42, 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17291186 >.

KATAKURA, T. et al. CCL17 and IL-10 as effectors that enable alternatively activated macrophages to inhibit the generation of classically activated macrophages. **J Immunol**, v. 172, n. 3, p. 1407-13, Feb 1 2004. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734716> >.

KHOSHDEL, A. et al. Increased levels of IL-10, IL-12, and IFN- in patients with visceral leishmaniasis. **Braz J Infect Dis**, v. 13, n. 1, p. 44-6, Feb 2009. ISSN 1678-4391 (Electronic)

1413-8670 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19578629> >.

KINO, K. et al. Immunohistochemical studies on hemoglobin-haptoglobin and hemoglobin catabolism sites. **J Histochem Cytochem**, v. 35, n. 3, p. 381-6, Mar 1987. ISSN 0022-1554 (Print)

0022-1554 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3546486> >.

KIP, A. E. et al. Systematic review of biomarkers to monitor therapeutic response in leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 1, p. 1-14, Jan 2015. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25367913> >.

KNEIDL, J. et al. Soluble CD163 promotes recognition, phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* via binding of specific fibronectin peptides. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 6, p. 914-36, Jun 2012. ISSN 1462-5822 (Electronic)

1462-5814 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22309204> >.

KNUDSEN, T. B. et al. Predictive value of soluble haemoglobin scavenger receptor CD163 serum levels for survival in verified tuberculosis patients. **Clin Microbiol Infect**, v. 11, n. 9, p. 730-5, Sep 2005. ISSN 1198-743X (Print)

1198-743X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16104988> >.

KRAUSGRUBER, T. et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. **Nat Immunol**, v. 12, n. 3, p. 231-8, Mar 2011. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21240265> >.

KRISTIANSEN, M. et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 198-201, Jan 11 2001. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11196644> >.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-27, Dec 2005. ISSN 0074-0276 (Print)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16444411> >.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Observations on the development of *Leishmania* (L.) *chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Ann Parasitol Hum Comp**, v. 63, n. 2, p. 134-45, 1988. ISSN 0003-4150 (Print)

0003-4150 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3421641> >.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, v. 213, p. 183-91, 2008.

LASTRUCCI, C. et al. Tuberculosis is associated with expansion of a motile, permissive and immunomodulatory CD16(+) monocyte population via the IL-10/STAT3 axis. **Cell Res**, v. 25, n. 12, p. 1333-51, Dec 2015. ISSN 1748-7838 (Electronic)

1001-0602 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26482950> >.

LAURENTI, M. D. et al. The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host-parasite interaction in hamsters inoculated with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. **Int J Exp Pathol**, v. 77, n. 1, p. 15-24, Feb 1996. ISSN 0959-9673 (Print)

0959-9673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8664142> >.

LAW, S. K. et al. A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. **Eur J Immunol**, v. 23, n. 9, p. 2320-5, Sep 1993. ISSN 0014-2980 (Print)

0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8370408> >.

LEE, S. H.; STARKEY, P. M.; GORDON, S. Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. **J Exp Med**, v. 161, n. 3, p. 475-89, Mar 1 1985. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3973536> >.

LI, J. et al. Significance of CD163-Positive Macrophages in Proliferative Glomerulonephritis. **Am J Med Sci**, v. 350, n. 5, p. 387-92, Nov 2015. ISSN 1538-2990 (Electronic)

0002-9629 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26379042> >.

LIEW, F. Y. et al. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **J Immunol**, v. 144, n. 12, p. 4794-7, Jun 15 1990. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2351828> >.

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. **Nat Med**, v. 19, n. 7, p. 909-15, Jul 2013. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23749230> >.

LIMA, I. D. et al. Leishmania infantum chagasi in northeastern Brazil: asymptomatic infection at the urban perimeter. **Am J Trop Med Hyg**, v. 86, n. 1, p. 99-107, Jan 2012. ISSN 1476-1645 (Electronic)

0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22232458> >.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p. 83, 2012. ISSN 2235-2988 (Electronic)

2235-2988 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919674> >.

LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 22, p. 9375-80, May 29 2007. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17517634> >.

LUZ, N. F. et al. Heme oxygenase-1 promotes the persistence of *Leishmania chagasi* infection. **J Immunol**, v. 188, n. 9, p. 4460-7, May 1 2012. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22461696> >.

MANTOVANI, A. et al. **Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity**. *Nature reviews. Immunology*. 11: 519-531 p. 2011.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, v. 25, n. 12, p. 677-86, Dec 2004. ISSN 1471-4906 (Print)

1471-4906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530839> >.

MARQUES, C. S. et al. New insights into neutrophil and *Leishmania infantum* in vitro immune interactions. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 40, p. 19-29, 2015.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 451-83, 2009. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19105661> >.

MARTINEZ, F. O. et al. Macrophage activation and polarization. **Front Biosci**, v. 13, p. 453-61, 2008. ISSN 1093-4715 (Electronic)

1093-4715 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981560> >.

MCFARLANE, E. et al. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. **Infection and immunity**, v. 76, p. 532-41, 2008.

MEGE, J. L.; MEHRAJ, V.; CAPO, C. Macrophage polarization and bacterial infections. **Curr Opin Infect Dis**, v. 24, n. 3, p. 230-4, Jun 2011. ISSN 1473-6527 (Electronic)

0951-7375 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21311324> >.

MEMPEL, M. et al. Comparison of the T cell patterns in leprous and cutaneous sarcoid granulomas. Presence of Valpha24-invariant natural killer T cells in T-cell-reactive leprosy together with a highly biased T cell receptor Valpha repertoire. **Am J Pathol**, v. 157, n. 2, p. 509-23, Aug 2000. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10934154 >.

MOLLER, H. J. et al. Plasma level of the macrophage-derived soluble CD163 is increased and positively correlates with severity in Gaucher's disease. **Eur J Haematol**, v. 72, n. 2, p. 135-9, Feb 2004. ISSN 0902-4441 (Print)

0902-4441 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14962251> >.

MOLLER, H. J. et al. Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma. **Blood**, v. 99, n. 1, p. 378-80, Jan 1 2002. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756196> >.

MONTOYA, D. et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. **Cell Host Microbe**, v. 6, n. 4, p. 343-53, Oct 22 2009. ISSN 1934-6069 (Electronic)

1931-3128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19837374> >.

MOURA, D. F. et al. CD163 favors Mycobacterium leprae survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 11, p. 2925-36, Nov 2012. ISSN 1521-4141 (Electronic)

0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22851198> >.

MUELLER, J. L. et al. Circulating Soluble CD163 is Associated with Steatohepatitis and Advanced Fibrosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Clin Trans Gastroenterol**, v. 6, p. e114, 10/08/online 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ctg.2015.36> >.

MUKBEL, R. M. et al. Macrophage killing of Leishmania amazonensis amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **Am J Trop Med Hyg**, v. 76, n. 4, p. 669-75, Apr 2007. ISSN 0002-9637 (Print)

0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426168> >.

MURRAY, P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14-20, Jul 17 2014. ISSN 1097-4180 (Electronic)

1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25035950> >.

NIELSEN, M. J.; MOLLER, H. J.; MOESTRUP, S. K. Hemoglobin and heme scavenger receptors. **Antioxid Redox Signal**, v. 12, n. 2, p. 261-73, Feb 2010. ISSN 1557-7716 (Electronic)

1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19659436> >.

NOVAIS, F. O. et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against Leishmania braziliensis infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, p. 8088-98, 2009.

NYLEN, S. et al. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **J Exp Med**, v. 204, n. 4, p. 805-17, Apr 16 2007. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389235> >.

NYLEN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends Immunol**, v. 28, n. 9, p. 378-84, Sep 2007. ISSN 1471-4906 (Print)

1471-4906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17689290> >.

OLIVEIRA, D. T. et al. Clinical variables associated with leprosy reactions and persistence of physical impairment. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 5, p. 600-4, Sep-Oct 2013. ISSN 1678-9849 (Electronic)

0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24270251> >.

OLIVEIRA, J. M. et al. [Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 2, p. 188-93, Mar-Apr 2010. ISSN 1678-9849 (Electronic)

0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20464151> >.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, p. S10-S18, 2014.

PALERMO, M. L. et al. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. **Am J Trop Med Hyg**, v. 86, n. 5, p. 878-83, May 2012. ISSN 1476-1645 (Electronic)

0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22556091> >.

PASTORINO, A. C. et al. [Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects]. **J Pediatr (Rio J)**, v. 78, n. 2, p. 120-7, Mar-Apr 2002. ISSN 0021-7557 (Print)

0021-7557 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14647793> >.

PETERS, N. C.; SACKS, D. L. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. **Cellular microbiology**, v. 11, p. 1290-6, 2009.

PHILIPPIDIS, P. et al. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. **Circ Res**, v. 94, n. 1, p. 119-26, Jan 9 2004. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14656926> >.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 111-29, 2015. ISSN 1746-0921 (Electronic) 1746-0913 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25598341> >.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Neutrophils Activate Macrophages for Intracellular Killing of Leishmania major through Recruitment of TLR4 by Neutrophil Elastase. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 3988-3994, 2007.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of Leishmania major through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 179, p. 3988-94, 2007.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 59, 2012.

RICHARDUS, J. H.; HABBEMA, J. D. The impact of leprosy control on the transmission of M. leprae: is elimination being attained? **Lepr Rev**, v. 78, n. 4, p. 330-7, Dec 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18309706 >.

RITTER, M. et al. Genomic organization and chromosomal localization of the human CD163 (M130) gene: a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 260, n. 2, p. 466-74, Jul 5 1999. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10403791> >.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitol Today**, v. 16, n. 7, p. 292-7, Jul 2000. ISSN 0169-4758 (Print)

0169-4758 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858648> >.

ROTUREAU, B. et al. The flagellum-mitogen-activated protein kinase connection in Trypanosomatids: a key sensory role in parasite signalling and development? **Cell Microbiol**, v. 11, n. 5, p. 710-8, May 2009. ISSN 1462-5822 (Electronic)

1462-5814 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19207727> >.

SAMPAIO, M. J. et al. Risk factors for death in children with visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 11, p. e877, 2010. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21072238> >.

SAÚDE., B. M. D. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. **Brasília: Editora do Ministério da Saúde.**, 2006.

SAUNDERS, E. C. et al. Induction of a stringent metabolic response in intracellular stages of *Leishmania mexicana* leads to increased dependence on mitochondrial metabolism. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 1, p. e1003888, Jan 2014. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24465208> >.

SCAPINI, P.; CASSATELLA, M. A. Social networking of human neutrophils within the immune system. **Blood**, v. 124, p. 710-9, 2014.

SCOLLARD, D. M. The biology of nerve injury in leprosy. **Lepr Rev**, v. 79, n. 3, p. 242-53, Sep 2008a. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19009974 >.

_____. Leprosy is (still) here, but recognition is often delayed. **South Med J**, v. 101, n. 6, p. 583, Jun 2008b. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18475232 >.

SCOLLARD, D. M. et al. The continuing challenges of leprosy. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 2, p. 338-81, Apr 2006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16614253 >.

SCOTT, P. et al. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. **Immunol Rev**, v. 112, p. 161-82, Dec 1989. ISSN 0105-2896 (Print)

0105-2896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2575073> >.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239-51, May 2004. ISSN 0074-0276 (Print)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15273794> >.

SIONOV, R. V.; FRIDLENDER, Z. G.; GRANOT, Z. The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. **Cancer Microenviron**, v. 8, n. 3, p. 125-58, Dec 2015. ISSN 1875-2292 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24895166> >.

SOLBACH, W.; LASKAY, T. *Leishmania major* infection: the overture. **Parasitol Today**, v. 11, n. 10, p. 394-7, Oct 1995. ISSN 0169-4758 (Print)

0169-4758 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15275406> >.

STILUND, M. et al. Biomarkers of inflammation and axonal degeneration/damage in patients with newly diagnosed multiple sclerosis: contributions of the soluble CD163 CSF/serum ratio to a biomarker panel. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0119681, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25860354> >.

SULAHIAN, T. H. et al. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. **Cytokine**, v. 12, n. 9, p. 1312-21, Sep 2000. ISSN 1043-4666 (Print)

1043-4666 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10975989> >.

SULAHIAN, T. H. et al. Cross-linking of FcγR triggers shedding of the hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163. **J Leukoc Biol**, v. 76, n. 1, p. 271-7, Jul 2004. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075364> >.

TACCHINI-COTTIER, F. et al. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4⁺ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. **J Immunol**, v. 165, n. 5, p. 2628-36, Sep 1 2000. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10946291> >.

TAVARES, N. M. et al. Understanding the mechanisms controlling *Leishmania amazonensis* infection in vitro: the role of LTB4 derived from human neutrophils. **J Infect Dis**, v. 210, n. 4, p. 656-66, Aug 15 2014. ISSN 1537-6613 (Electronic)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24634497> >.

TIMMERMAN, M.; HOGGER, P. Oxidative stress and 8-iso-prostaglandin F(2α) induce ectodomain shedding of CD163 and release of tumor necrosis factor-α from human monocytes. **Free Radic Biol Med**, v. 39, n. 1, p. 98-107, Jul 1 2005. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15925282> >.

TOMIOKA, H. et al. Characteristics of suppressor macrophages induced by mycobacterial and protozoal infections in relation to alternatively activated M2 macrophages. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 635451, 2012. ISSN 1740-2530 (Electronic)

1740-2530 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666284> >.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends Parasitol**, v. 28, n. 8, p. 335-44, Aug 2012. ISSN 1471-5007 (Electronic)

1471-5007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22726697> >.

URBAN, C. F.; LOURIDO, S.; ZYCHLINSKY, A. How do microbes evade neutrophil killing? **Cellular microbiology**, v. 8, p. 1687-96, 2006.

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. ISSN 1873-4596 (Electronic)

0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21620959> >.

VERMA, S. et al. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10107, 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404924> >.

WEAVER, L. K. et al. Pivotal advance: activation of cell surface Toll-like receptors causes shedding of the hemoglobin scavenger receptor CD163. **J Leukoc Biol**, v. 80, n. 1, p. 26-35, Jul 2006. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16799153> >.

WILLIAMS, L. et al. IL-10 expression profiling in human monocytes. **J Leukoc Biol**, v. 72, n. 4, p. 800-9, Oct 2002. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12377950> >.

ZWADLO, G. et al. A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process. **Exp Cell Biol**, v. 55, n. 6, p. 295-304, 1987. ISSN 0304-3568 (Print)

0304-3568 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3450546> >.

APÊNDICE A**CONSENTIMENTO INFORMADO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA
IMUNE****Nome do Projeto: Influência da Resposta Imune e Sistema Endócrino na
Apresentação Clínica da Hanseníase**

Registro.HU: _____ Nº: ____ - ____

Nome do Paciente:

Investigador Principal: Amelia Ribeiro de Jesus, médica, Hospital Universitário
Rua Cláudio Batista S.N, Bairro Sanatório, Aracajú,-Brazil., Tel: (79)3218-1805.

Nº do Projeto:**Convite e Objetivo:**

Você é convidado(a) a participar de um estudo que tem como objetivo entender porque as pessoas têm Hanseníase. Este estudo incluirá pessoas com esta doença que apresentam formas diferentes de feridas na pele. Além das informações deste documento você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo você será solicitado(a) assinar este formulário de consentimento.

Participação voluntária: A sua participação é voluntária. Você pode decidir não participar do estudo em qualquer momento, sem perder os benefícios dos cuidados médicos prestados e de seu tratamento. Caso, após aceite participar, resolva descontinuar sua participação, isto será feito sem qualquer prejuízo para você. Participando ou não do estudo você receberá o medicamento utilizado para o tratamento da Hanseníase.

Finalidade do estudo: Este estudo vai estudar como o seu corpo se defende quando atacado pela bactéria que causa esta doença. Para isto estudaremos o seu sangue e, possivelmente uma parte do exame de biópsia de sua ferida na pele.

Procedimentos: Caso você concorde em participar do estudo, além de ser examinado por um médico clínico, realizar biópsia da lesão, teste intradérmico e exame de secreção de sua orelha, métodos que são necessários para o diagnóstico da doença,

você doará sangue para a pesquisa dos mecanismos de defesa do organismo. A retirada do pedaço da pele ou da ferida para diagnóstico da sua doença será feita com anestesia para você não sentir dor e parte deste material poderá ser utilizado para os estudos da defesa do seu corpo contra a bactéria que causa a doença. Caso o diagnóstico de Hanseníase não seja confirmado, todo o material obtido para pesquisa será destruído.

Duração do estudo: Após a assinatura do termo de consentimento sua participação no estudo é de 5 anos, a contar do primeiro dia de tratamento, caso você tenha Hanseníase. Periodicamente, você será examinado para determinar a cura da doença ou necessidade de utilização de novo tratamento, que também lhe será fornecido gratuitamente.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo só será do conhecimento da equipe médica e do órgão que protege o indivíduo em pesquisas (Comitê de ética do Hospital Universitário). Você e qualquer participante desse estudo não será identificado por nome nas publicações dos resultados do estudo. Apenas os representantes do Comitê de Ética em Pesquisa poderão ver sua ficha clínica.

Análises de riscos e benefícios: A retirada de seu sangue e de um pedaço da ferida são feitos se você tiver ferida, ainda antes do tratamento, para confirmar o diagnóstico da doença. Dor leve na retirada de sangue devido à punção com agulha pode ocorrer. Em casos raros a retirada de sangue provoca sangramento ou mancha roxa na pele. Como anestesia local é utilizada, a retirada de um pedaço da ferida não é acompanhada de dor. O tratamento que você receberá é igual ao que todos os pacientes receberão participando ou não do estudo. A participação lhe trará como benefício um acompanhamento clínico mais freqüente. Um médico lhe visitará em sua casa para examinar também sua família. Você deve retornar às consultas médicas regularmente de acordo com marcação de seu cartão do Ambulatório do HU

Retorno de benefícios para o sujeito e para a sociedade: A Hanseníase é relacionada a reação do seu organismo contra a bactéria que causa a doença e o conhecimento destas reações do seu corpo pode contribuir não só para o entendimento da doença como para o aparecimento de novas formas de tratamento ou controle os sintomas e também formas de prevenir a doença.

Custos: Você não terá custos com o tratamento. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

Esclarecimentos: Caso você precise de atendimento médico durante o estudo, você pode contactar um dos seguintes Médicos pelo telefone (79)3237-7353: Dra. Amélia

Ribeiro de Jesus Dr. Emerson Ferreira da Costa ou Dr. Roque Almeida. Caso você queira saber alguma coisa sobre seus direitos e de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário, cujo endereço encontra-se no início deste consentimento ou pelo telefone (79) 3218-1805.

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

Assinatura do participante

Data

Assinatura do pesquisador

Data

Assinatura da testemunha

Data

APÊNDICE B**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nome do Projeto: Avaliação Epidemiológica, Clínica e Imunológica de familiares e pacientes com Leishmaniose Visceral.

NOME DO PACIENTE: _____

Nº do Projeto: _____

Investigador Principal: Roque Pacheco de Almeida, Hospital Universitário da UFS, Aracaju-Sergipe-Brasil. Este documento explica um estudo de pesquisa e pede a sua permissão para o(a) senhor(a) ou seu (sua) filho(a) participar desta pesquisa. Se o(a) senhor(a) for pai/mãe ou guardião de uma criança abaixo de 18 anos, que foi convidado a participar desta pesquisa, a palavra “você” neste documento se refere ao seu filho. Ao final da explicação, pediremos ao senhor(a) para assinar este documento, caso concordem participar desta pesquisa.

Convite e Objetivo: Você está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é identificar familiares de pacientes com diagnóstico de Leishmaniose visceral que foram ou são atendidos no Hospital Universitário. Após lhe ser explicado o que contém neste documento, você pode perguntar tudo sobre a pesquisa a seu médico. Todos os familiares desses pacientes serão convidados a participar do estudo. Caso decida participar do estudo, você será solicitado a assinar este consentimento.

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

Finalidade do estudo: Identificar indivíduos assintomáticos que residem no mesmo ambiente de pacientes com leishmaniose visceral através da resposta ao teste de Montenegro e Sorologia positiva para *L. infantum*, avaliando também a resposta imune inata através da liberação de redes extracelulares de neutrófilos nos indivíduos

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial, sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe médica do Comitê de Ética do Hospital Universitário. Embora os resultados obtidos neste estudo sejam publicados,

não haverá na apresentação destes resultados meios que possam identificar os participantes. Suas fichas clínicas e os resultados de seus exames poderão ser também vistos pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário. Fotos suas poderão ser mostradas em público sem identificar você e protegendo partes íntimas.

Procedimento: Será retirado por punção venosa, 20 ml de sangue, que ao deve levar a riscos para sua saúde, podendo apresentar dor discreta no local da punção. O teste de Montenegro será aplicado no seu braço e é o mesmo procedimento quando você toma uma vacina e também não é prejudicial para sua saúde. Retorno de benefício para o sujeito e para a sociedade: O melhor conhecimento sobre o leishmaniose visceral poderá contribuir no futuro para medidas de controle da doença.

Custos: Você não terá custos com a participação no estudo e, caso necessite de tratamento para leishmaniose, a medicação lhe será fornecida gratuitamente. Você não receberá nenhum pagamento para participar desta pesquisa. Poderemos apenas contribuir com o seu transporte para comparecer as visitas no ambulatório após a alta do hospital.

Esclarecimentos: Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode ligar para Dr. Roque Pacheco de Almeida (Tel.: (79)8823-7244) ou Dra. Amélia Ribeiro de Jesus (Tel: (79) 8823-7245). Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário, cujo endereço consta no início deste consentimento.

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

Assinatura ou impressão do participante

Data Hora

Nome/Assinatura do pesquisador

Data Hora

Nome/Assinatura da testemunha

Data Hora

APENDICE C

- ✓ Trabalho submetido para PLOS Neglected Tropical Diseases, com parecer favorável do *Pressubmission Inquiry*.

Decision on your PLOS Neglected Tropical Diseases submission (PNTD-D-16-01075) - [EMID:a0d7770ed732d1e3]

PLOS Neglected Tropical Diseases <em@editorialmanager.com>

8 de junho de 2016 20:21

Responder a: PLOS Neglected Tropical Diseases <plosntds@plos.org>

Para: Ricardo Luis Louzada Silva <qjobio@gmail.com>

Dear Dr Silva

Thank you very much for your presubmission inquiry to PLOS Neglected Tropical Diseases.

We are interested in your work, "Circulating CD163 levels are indicative of infection and disease status in leprosy and leishmaniasis," and its relevance to neglected tropical diseases. The Editorial Board would like to invite you to submit your manuscript for full consideration at:

<http://www.editorialmanager.com/pntd>

This decision reflects the Board's interest in the study you have described. However, please understand that the editorial decision to send a paper out for peer-review can only be made after we have the opportunity to evaluate the full-length manuscript.

When you do submit, please include mention of this presubmission inquiry and the manuscript number (PNTD-D-16-01075) in the "Previous Interactions" section of the submission form.

We look forward to receiving your paper.

Sincerely,

Peter J. Hotez, M.D., Ph.D.
Editor-in-Chief

PLOS Neglected Tropical Diseases

sCD163 levels as a biomarker of disease severity in leprosy and leishmaniasis

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PNTD-D-16-01123
Full Title:	sCD163 levels as a biomarker of disease severity in leprosy and leishmaniasis
Short Title:	CD163 as a biomarker for Leishmaniasis disease
Article Type:	Research Article
Keywords:	Leishmaniasis; Leprosy; CD163; Macrophages; Neutrophils.
Corresponding Author:	Ricardo Luis Louzada Silva, Msc Universidade Federal de Sergipe Aracaju, Sergipe BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Sergipe
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Ricardo Luis Louzada Silva, Msc
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Ricardo Luis Louzada Silva, Msc Marcio B. Santos Priscila L. S. Almeida Thayse S. Barros Lucas Magalhães Rodrigo A. Cazzaniga Patricia R. M. Souza Nivea F. Luz Jaqueline França-Costa Valeria M. Borges Djalma S. Lima-Junior Michael W. Lipscomb Malcolm S. Duthie Steven G. Reed Roque Pacheco Almeida Amélia Ribeiro Jesus
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Background. CD163, receptor for the haptoglobin-hemoglobin complex, is expressed on monocytes/macrophages and neutrophils. A soluble form of CD163 (sCD163) has been associated with the M2 macrophage phenotype; the M2 fate has been shown to down-modulate inflammatory responses. In particular, previous studies have shown that M2 is closely associated with the most severe clinical presentation of leprosy (i.e. Lepromatous (LL)), as well as tuberculosis. We hypothesized that sCD163 correlates with severity of diseases caused by intracellular pathogens. Methodology/Principal Findings.

	To assess, the studies first confirmed that elevated levels of sCD163 were associated with the clinical form. sCD163 in the serum of Visceral Leishmaniasis (VL) patients was found at significantly higher levels than that of healthy individuals. Further analyses on infection and disease status of VL patients revealed a clear association with clinical disease parameters. In vitro culture assays revealed that Leishmania infection induced CD163 expression on the surface of monocyte/macrophages and neutrophils, suggesting these cells as possible sources of sCD163 release. Conclusions/Significance. Taken together, our results reveal an important role for sCD163 in immune modulation by M2 macrophages, particularly in serving as a biomarker for determining severity and disease progression of intracellular infections.
Suggested Reviewers:	MARY E WILSON University of Iowa mary-wilson@uiowa.edu MAURO M TEIXEIRA Universidade Federal de Minas Gerais mmtex.ufmg@gmail.com Marshall Glesby Joan and Sanford I Weill Medical College of Cornell University mag2005@med.cornell.edu Alda Cruz Instituto Oswaldo Cruz alda@ioc.fiocruz.br
Opposed Reviewers:	Carlos Costa Universidade Federal do Piaui There is a competing research in visceral leishmaniasis.
Additional Information:	
Question	Response
Data Availability PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available, without restriction and from the time of publication, with only rare exceptions to address legal and ethical concerns (see the PLOS Data Policy and FAQ for further details). When submitting a manuscript, authors must provide a Data Availability Statement that describes where the data underlying their manuscript can be found. Your answers to the following constitute your statement about data availability and will be included with the article in the event of publication. Please note that simply stating 'data available on request from the author' is not acceptable. If, however, your data are only available upon request from the author(s), you must answer "No" to the first question below, and explain your exceptional situation in the text box provided. Do the authors confirm that all data underlying the findings described in their manuscript are fully available without restriction?	Yes - all data are fully available without restriction

Please describe where your data may be found, writing in full sentences. **Your answers should be entered into the box below and will be published in the form you provide them, if your manuscript is accepted.** If you are copying our sample text below, please ensure you replace any instances of **XXX** with the appropriate details.

All relevant data are within the paper and its Supporting Information files

If your data are all contained within the paper and/or Supporting Information files, please state this in your answer below. For example, “All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.”

If your data are held or will be held in a public repository, include URLs, accession numbers or DOIs. For example, "All XXX files are available from the XXX database (accession number(s) XXX, XXX)." If this information will only be available after acceptance, please indicate this by ticking the box below. If neither of these applies but you are able to provide details of access elsewhere, with or without limitations, please do so in the box below. For example:

"Data are available from the XXX Institutional Data Access / Ethics Committee for researchers who meet the criteria for access to confidential data."

“Data are from the XXX study whose authors may be contacted at XXX.”

* typeset

Additional data availability information:



Universidade Federal de Sergipe
Hospital Universitário
Departamento de Medicina
Laboratório de Biologia Molecular

Cláudio Batista Street, Sanatório district, Aracaju, Sergipe, Brazil
 Telephone 55 (79) 2105-1806, Fax 55 (79) 2105-1811 e-mail: jesus-amelia@uol.com.br



Tuesday, June 14, 2016

PLOS Neglected Tropical Diseases Journal
 1160 Battery Street
 Koshland Building East, Suite 100
 San Francisco, CA 94111
 United States

Dear Peter J. Hotez, Editor-In-Chief,
 Serap Aksoy, Editor-In Chief,

We would like to submit the manuscript entitled “**sCD163 levels as a biomarker of disease severity in leprosy and leishmaniasis**” as a Full-Length Text in PLOS Neglected Tropical Diseases. Briefly, our work demonstrates, for the first time, that soluble CD163 presence is directly correlated to disease severity in visceral leishmaniasis. Our studies present several clinical (i.e. correlating spleen and liver sizes with sera levels of sCD163 before and after treatment(s)) and *in vitro* experimental indices (i.e. evaluating monocyte/macrophage and neutrophil expression of CD163 upon infection with *Leishmania* by flow cytometric analyses) to show this correlation of sCD163 with clinical parameters of disease. As a leading journal in the field of Neglected Tropical Diseases, we believe PLOS is an excellent forum for disseminating our work, which will be of immediate interest to scientists and clinicians investigating parasitic diseases endemic to tropical countries. In particular, we believe these studies may further prompt the field to investigate the mechanistic interplay of parasite infections with soluble mediators of Leprosy and Visceral Leishmaniasis (VL).

We ensure that:

- 1) All authors concur with the submission.
- 2) All funding for the studies in the manuscript, together with the names of the principal funding recipients, are listed in the Funding Support Section.
- 3) All persons cited in the manuscript by way of the Acknowledgements concur with the citation.
- 4) The work has not been published elsewhere, either completely, in part, or in another form.
- 5) The manuscript has not been submitted to another journal and will not be published elsewhere within one year after its publication in this journal.
- 6) The manuscript does not contain experiments using animals.
- 7) The manuscript includes human studies. The local Ethical Committee of the Federal University of Sergipe approval was received for the studies (CAAE 0151.0.107.000–07 and CAAE 0152.0.107.000-07), and the informed consent of all participating subjects or their legal guardians was obtained.
- 8) The authors have no financial/commercial conflict of interest
- 9) Any papers by the authors that are under consideration or in press with other journals and not yet available online and are related to the manuscript submitted to

the PLOS Neglected Tropical Diseases have been submitted as supporting information.

Best regards,

Amélia Ribeiro de Jesus
MD, PhD, Associate Professor,
Universidade Federal de Sergipe
Instituto de Investigação em Imunologia, INCT, CNPq.

sCD163 levels as a biomarker of disease severity in leprosy and leishmaniasis

Ricardo L. L. Silva^{1,2}; Marcio B. Santos^{1,2}; Priscila L. S. Almeida^{1,2}; Thayse S. Barros¹;
Lucas Magalhães¹; Rodrigo A. Cazzaniga¹; Patrícia R. M. Souza^{1,2}; Valeria M. Borges³;
Nívea F. Luz³; Jaqueline França-Costa³; Djalma S. Lima-Junior⁴; Michael W.
Lipscomb⁵; Malcolm S. Duthie⁶; Steven G. Reed⁶; Roque P. Almeida¹; Amélia R. de
Jesus*^{#1}

1. Laboratório de Biologia Molecular – Hospital Universitário – Universidade Federal
de Sergipe – Aracaju - Brazil.

2. Departamento de Educação em Saúde de Lagarto – Universidade Federal de Sergipe
– Lagarto - Brazil

3. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM), Fundação Oswaldo Cruz
(FIOCRUZ), Salvador, Brazil

4. Departamento de Bioquímica e Imunologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto – Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto – Brazil

5. Department of Biology, Howard University, Washington – DC – USA.

6. Infectious Diseases Research Institute (IDRI) – Seattle – WA – USA.

Short Title: CD163 as a biomarker for Leishmaniasis disease

*Corresponding author

E-mail: ameliaribeirodejesus@gmail.com (ARJ)

Keywords – Leishmaniasis, Leprosy, CD163, Macrophages, Neutrophils

Abstract

Background.

CD163, receptor for the haptoglobin–hemoglobin complex, is expressed on monocytes/macrophages and neutrophils. A soluble form of CD163 (sCD163) has been associated with the M2 macrophage phenotype; the M2 fate has been shown to down-modulate inflammatory responses. In particular, previous studies have shown that M2 is closely associated with the most severe clinical presentation of leprosy (i.e. Lepromatous (LL)), as well as tuberculosis. We hypothesized that sCD163 correlates with severity of diseases caused by intracellular pathogens.

Methodology/Principal Findings.

To assess, the studies first confirmed that elevated levels of sCD163 were associated with the clinical form. sCD163 in the serum of Visceral Leishmaniasis (VL) patients was found at significantly higher levels than that of healthy individuals. Further analyses on infection and disease status of VL patients revealed a clear association with clinical disease parameters. *In vitro* culture assays revealed that *Leishmania* infection induced CD163 expression on the surface of monocyte/macrophages and neutrophils, suggesting these cells as possible sources of sCD163 release.

Conclusions/Significance.

Taken together, our results reveal an important role for sCD163 in immune modulation by M2 macrophages, particularly in serving as a biomarker for determining severity and disease progression of intracellular infections.

Author Summary

Visceral leishmaniasis (VL) is a systemic, and most severe, form of leishmaniasis. Soluble CD163 (sCD163) levels can serve as biomarker for disease severity in several inflammatory disorders. However, no linkage has been reported for its relationship with *Leishmania* infections. We now demonstrate, for the first time, that sCD163 presence is directly correlated to disease severity in VL. Our studies present both clinical and *in vitro* experimental evidence showing that sCD163 levels are increased in VL patients and during *in vitro* infection of monocyte-derived macrophages and neutrophils with leishmania cultures. Furthermore, presence of sCD163 is reduced during clinical improvements. Taken together, results reveal an important role for sCD163 in immune modulation during disease progression, and suggest a potential role as biomarker for determining disease severity and clearance.

Introduction

CD163 is a member of the scavenger receptor cysteine-rich family [1]. CD163 binds to hemoglobin (Hb) and haptoglobin (Hp) complex [2] and helps to coordinate the receptor-mediated endocytosis by phagocytes [3]. The binding of Hp inhibits Hb toxic properties [4] and delivers Hb to phagocytes expressing CD163 to be processed by hemoxygenase-1 (HO-1) [5, 6]. CD163, largely expressed on monocytes/macrophages and neutrophils [7, 8], has several roles as an extracellular sensor for bacteria and modulator of immunological responses [9]. CD163 is induced by glucocorticoids and upregulated by interleukin-6 (IL-6) and IL-10 [6, 10, 11]. Inversely, the molecule is downregulated in response to TNF- α and IFN- γ [6, 10]. Alternatively activated, or M2, macrophages express CD163 and have anti-inflammatory and tissue repair properties [12, 13]. These M2 macrophages have been described in the most severe lepromatous presentation of leprosy (LL) [8]. CD163 can be shed from macrophage surfaces in response to

inflammatory stimuli [3]; the molecule can then be found as a soluble form (i.e. sCD163) [8, 14]. The molecule has also been shown to be predictive of disease severity in several inflammatory diseases [8, 12, 15-18], but no such linkage has been reported for *Leishmania* infection. Sampaio et al described prognostic and severity markers useful to inform clinical decisions in Visceral Leishmaniasis (VL) patients, as mucosal bleeding, jaundice, dyspnea, suspected or confirmed bacterial infections, neutrophil count $<500/\text{mm}^3$ and platelet count $<50,000/\text{mm}^3$ [19]. In addition, dos Santos et al reported IL-6, IL-27 and sCD14 as useful biomarkers for severity of VL [20]. Moreover, the authors additionally found that IL-6 levels greater than 200 pg/ml were strongly associated with death. Therefore we hypothesized that sCD163 would correlate with severity of diseases caused by intracellular pathogens, particularly those with variant manifestations determined by the immune response, such as VL and Leprosy. This study measured sCD163 in the sera of leprosy and VL patients to determine whether correlative association could be made with severity of disease. Results reveal strong correlations of sCD163 levels with the severest clinical presentations of both leprosy and VL. Moreover, we detected induction of CD163 expression on monocyte/macrophages and neutrophils by *in vitro Leishmania* infection. Collectively, our data suggest that intracellular pathogens induce CD163 expression to modulate the immune response and facilitate their survival, leading to the most severe clinical presentations.

Methods

Patients and serum measurement of sCD163 for Leprosy.

Patients were enrolled at the Leprosy Clinic from the University Hospital, Federal University of Sergipe, in Sergipe State, Brazil (HU-UFS). They were classified according to the Madrid (1953) criteria of clinical forms: Indeterminate Leprosy (IL, n=9),

Tuberculoid Leprosy (TT, n=14), Borderline Leprosy (BL, n=14) and Leprometous Leprosy (LL, n=10) [21]. The inclusion criteria were have a diagnosis of leprosy confirmed by clinical aspect of the lesions and either positive bacilloscopy or histopathological confirmation in skin biopsies. Exclusion criteria were to have other conditions (pregnancy) or diseases that interfere in the immune response or in the clinical outcome of leprosy (HIV, HTLV-1). The patients were treated following the standard multidrug therapy (MDT), according to the Brazilian Ministry of Health and World Health Organization, for paucibacillary or multibacillary operational forms. Sera samples of households contacts of patients (Contacts) (n=23) were used as controls; these are healthy individuals who lived with the Leprosy-positive patients in direct contact with microbe but did not develop diseases (i.e. resistant).

Patients and serum measurement of sCD163 for Visceral Leishmaniasis.

VL patients' serum samples were collected in the VL Reference Center at HU-UFS. The patients were divided in five groups; (1) before treatment (D0-Classic, n=33), (2) 30 days after diagnosis with VL (receiving treatment during the time period) (D30, n=19), (3) severe VL at day 0 (D0-SVL, n=13), (4) asymptomatic (delayed type-hypersensitivity (DTH)-positive, n=11) and (5) non-endemic controls (HC, n=8). DTH positive individuals are people who live with the patients but do not have clinical symptoms of the disease; the individuals are responsive as measured by positive for DTH upon treatment with *Leishmania* soluble antigen on the skin. Patients were classified as severe VL based on clinical features that included platelet counts $<50,000/\text{mm}^3$, bleeding, bacterial infections, neutrophil counts $<500/\text{mm}^3$, dyspnea and jaundice as described by Sampaio et al. [19]. The inclusion criteria were to have VL diagnosis confirmed by direct observation of *Leishmania* in bone marrow aspirates or positive culture in NNN media

(Sigma-Aldrich), or positive rK39 serological test (KalazarDetect Rapid Test: InBios International Inc). Exclusion criteria were the same applied to Leprosy patients. Patients were submitted to standard VL treatment with Antimonial (Sb^V) [22]. All sera samples were stored at $-80^{\circ}C$. sCD163 quantification were performed at the same time for all sera samples by ELISA kit according to the manufacturer's instructions (R&D Systems).

Ethical considerations

The Ethics and Research Committee of the Federal University of Sergipe approved this study (CAAE 0151.0.107.000-07 and CAAE 0152.0.107.000-07) and all patients, or their legal guardians, willfully consented. The patients in this manuscript have given written informed consent (as outlined in the PLOS consent form) to publication of their case details.

Cell isolation and culture.

Monocytes were isolated from peripheral blood and plated in 24 well plate at 5×10^5 cells/well. Differentiation of macrophages were performed as previously described by de Oliveira et al [23]. Neutrophils were isolated from peripheral blood samples (with EDTA as anticoagulant) from healthy donors using PolimorphPrep reagent, according to the manufacturer's instructions (Axis-Shield). The cells were washed with PBS prior to plating in 96 wells plates at a concentration of 10^6 neutrophils/well in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS.

***Leishmania*-GFP infection.**

L. (L.) amazonensis strain (MHOM/BR/73M2269) [24] constitutively expresses GFP (*Leishmania*-GFP). The parasites were cultured in Schneider's *Drosophila* medium

(Invitrogen) plus 10% FBS. The infection of human macrophages was performed at a 10:1 stationary-phase of promastigotes to macrophage, respectively. Extracellular parasites were removed 2 hours later by washing. After 24h, the cells were stained and analyzed by FACS. Neutrophils were infected with 5:1 parasites to neutrophil ratio, respectively for 3h, prior to staining and analysis by FACS.

FACS Analysis.

The cells were washed with PBS and incubated with fluorescently-labeled antibodies (BD Biosciences, USA), according to the manufacturer's instructions. Acquisition of the data was performed on FACS CANTO II (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo v10.0 software (Tree Star). To access the Macrophages phenotype, cells were stained with anti-CD209-BV421 (cat. 564127), anti-CD163-PE (cat. 556018), anti-CD86-BV510 (cat. 563461) and/or anti-CD40-APC (cat. 555591). To access the neutrophils phenotype, staining was with anti-CD15-BV450 (cat. 561584) and anti-CD163-PE. Stained cells were fixed with 4% paraformaldehyde prior to acquisition.

Statistical analysis.

Results were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). D'Agostinho and Pearson test was performed to test if the data had a normal distribution. Differences between two groups were determined by Mann-Whitney test (sCD163 analysis). Parametric t paired test was used in before/after treatment analysis. Friedman paired test with Dunn's post test (Surface Phenotype and Median of Fluorescence Intensity analysis) was used for non-parametric paired analyses. Correlation analysis was performed using Spearman correlation test. A p-value ≤ 0.05 was considered significant. Analyses were performed using Windows GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software).

Results

High serum levels of sCD163 is a good biomarker for Lepromatous Leprosy

Patients with LL, the most severe form of Leprosy, had higher serum sCD163 relative to households contacts of patients (contacts) ($p < 0.001$, Mann-Whitney test), tuberculoid leprosy (TT) ($p = 0.001$, Mann-Whitney test), indeterminate leprosy (IL) ($p = 0.01$, Mann-Whitney test) and borderline leprosy (BL) ($p = 0.0009$, Mann-Whitney test) (Fig 1A). Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were constructed. Area under the curve (AUC) analysis highlights sCD163 dosage for clinical distinction between the more severe (LL) compared to TT (AUC=0.8571, 95% confidence interval (CI) [0.69 – 1.02], $p = 0.0034$) or contacts (AUC=0.8439, 95% CI [0.72 – 1.02], $p = 0.0008$) (Fig 1B-C). The serum levels of haptoglobin, heme-oxygenase-1 and arginase-1 were not different between the groups with different clinical forms or the control group (data not shown).

Fig 1. sCD163 in sera samples of LL Patients is higher than in other clinical forms and controls, and has a good sensitivity for diagnosis of this clinical form. (A) Serum of Leprosy patients of different clinical presentations were collected and sCD163 concentrations were measured by ELISA. Home contacts without symptoms or signs of Leprosy (Contacts) were used as a control group ($n = 23$). The means $\pm$ SD of sCD163 in Indeterminate Leprosy (IL) ($n = 9$) (114 ± 49.57 ng/mL), Tuberculoid Leprosy (TT) ($n = 14$) (90.29 ± 44.06 ng/mL), Borderline Leprosy (BL) ($n = 14$) (97.71 ± 47.97 ng/mL), Lepromatous Leprosy (LL) ($n = 10$) (177.6 ± 62.18 ng/mL) and Contacts (90.78 ± 31.55 ng/mL) were compared, by Mann-Whitney test. (B) ROC curve of sCD163 concentration comparing TT versus LL (B) and Contacts versus LL patients (C).

sCD163 levels correlate with severity and clinical improvement of Leishmaniasis

We detected high serum levels of sCD163 in VL patients, as compared to healthy individuals (HC; from non-endemic regions) and controls (that are delayed-type hypersensitivity-positive (DTH+) ($p < 0.0001$, Mann-Whitney test) [20]. Higher levels were detected in patients classified as severe VL (D0-SVL) ($p < 0.004$, Mann-Whitney test), suggesting that CD163-positive macrophages are an important reservoir for *Leishmania infantum* (Fig 2A). We also observed a positive correlation between sera sCD163 levels and spleen size ($r = 0.3915$) (Fig 2B) and liver size ($r = 0.4353$) (Fig 2C) in these patients; the method is a standard clinical parameter for determining VL severity [20]. These results highlight the potential of sCD163 as a biomarker for predicting severity of VL. A reduction of sCD163 serum levels, confirmed by paired analysis before (D0-Classic) and after treatment (D30) ($p = 0.0455$, paired t test) (Fig 2D) corroborates that the decrease of sCD163 can be used as a parameter for clinical stages and treatment success.

Fig 2. sCD163 levels correlate with severity of VL. (A) sCD163 levels were measured in sera of VL patients of different clinical status by ELISA. The means $\pm$ SD of patients with classical VL at D0 (D0-Classic, $n = 33$) ($152,1 \pm 67,86$ ng/mL), D30 ($n = 19$) ($98,79 \pm 58,58$ ng/mL) and of patients of severe VL at D0 (D0-SVL) ($n = 13$) ($241,5 \pm 76,88$ ng/mL) were compared by Mann-Whitney test. Sera samples of household contacts without symptoms or signs of VL (DTH+, $n = 11$, $72,55 \pm 25,68$ ng/mL) and non-endemic individuals (HC, $n = 8$, $49,0 \pm 23,71$ ng/mL) were included as control groups. Spearman correlation analysis between sCD163 sera quantification and the (B) spleen size and the (C) liver size. (D) Paired analysis of sCD163 quantification in sera samples of LV patients before and after treatment ($n = 16$, $p = 0.0455$, paired t test).

Fig 3A shows the distinction between control group (HC) versus D0-classic patients (AUC=0,9697, CI [0,9112-1,02], $p=0,0001$), by ROC curve, reiterating the value of sCD163 as a biomarker of disease. The analysis of D0-classic versus D0-SVL patients (AUC=0,8403, CI [0,7101-0,97], $p=0,0004$) (Fig 3B) and D30 group (AUC=0,7376, CI [0,5832-0,89], $p=0,0046$) (Fig 3C) further reveals evidence of disease severity and clinical improvement, respectively. No significant differences were observed in serum levels of haptoglobin, HO-1 and arginase-1 between these groups (data not shown).

Fig 3. ROC curves of sCD163 concentration. Comparing HC versus D0-Classic (A), D0-Classic versus D30 (B) and D0 versus D0-SVL group (C).

***Leishmania* induces macrophage CD163 expression**

CD163 expression was evaluated in macrophages infected by *Leishmania amazonensis* expressing GFP under the non-repressible CMV promoter (*Leishmania-GFP*). Macrophages exposed to *Leishmania-GFP* for 24 hours yielded two cells subpopulations, GFP+ and GFP-. Both were analyzed for surface marker expression of CD40, CD86, CD209 and CD163 by flow cytometric analyses (Fig 4A) [25]. GFP- cells were assumed to be non-infected bystanders (i.e. resistance to infection). GFP+ cells were considered infected (i.e. permissive cell to *Leishmania*). As observed in Fig. 4B, the GFP+ population has a higher percentage of CD86+ (57,11%) and CD163+ (33,6%) cells as compared to GFP- (CD86 44,78%, CD163 3,22%) and Unstimulated group (i.e. unexposed to *Leishmania-GFP*) (CD86 36,93%, CD163 12,62%).

The median fluorescence intensity (MFI) of GFP was evaluated in CD40, CD86, CD209 and/or CD163 positive populations to assess the relationship of the studied markers with parasite load. CD163⁺ cells showed higher infection (MFI = 913.167) than CD40⁺CD163⁻ (MFI = 715.143) cells ($p < 0.0005$, Friedman paired test) (Fig 4C). A positive correlation between the CD163 and GFP (*Leishmania-GFP*) was observed ($r = 0.6696$, $p < 0.0001$), confirming the relationship between parasite infection/load with macrophage/monocyte responses in CD163 expression (Fig 4D). These results corroborate the proposed model that high-infected macrophages permissive to *Leishmania* are a source of sCD163.

Fig 4. CD163 expression induced by *Leishmania-GFP* in Monocyte/Macrophage. (A)

Gating strategy of the monocyte/macrophage surface phenotype analysis. PBMC were collected from healthy donors and the adherent cells cultured for 5 days in RPMI 1640 plus 20% FBS. The cells were infected with *Leishmania-GFP* (10 parasites: 1 macrophage), and stained with specific antibodies for macrophage surface molecules prior to analysis by flow cytometry. (B) The macrophage phenotype were analyzed by FlowJo software ($n = 6$ experiments, in duplicate). Green and black bars represent, respectively, the GFP positive and negative cells after 24h of exposure to *Leishmania-GFP*. White bars are the non-exposed group (Unstimulated). The means $\pm$ SD of parental percentage of the cell populations was compared by Friedman paired test with Dunn's post test. (C) MFI analysis of GFP in the different populations according to the surface phenotype, 24h after infection ($n = 7$ experiments in duplicate). The means $\pm$ SD of MFI of each population were compared by Friedman paired test with Dunn's post test. (D) Spearman correlation analysis between CD163-PE and *Leishmania-GFP* fluorescence for each cell of the analysis (one representative of 7 experiments in duplicate).

***Leishmania* induces CD163 expression in neutrophils**

To identify if infected neutrophils could also express CD163, the cells of healthy individuals were exposed to *Leishmania-GFP* and analyzed by FACS (Fig 5A). Results reveal a higher percentage of CD15+CD163+ cells in GFP+ (25,08%), as compared to GFP- (14,84%) and unstimulated controls (6,90%) ($p=0,0008$, Friedman paired test) (Fig 5B). Collectively, these studies parallel those of macrophages, and further suggest that both macrophages and neutrophils are dominant contributors of soluble CD163.

Fig 5. CD163 expression induced by *Leishmania-GFP* in Neutrophils. (A) Gating strategy of neutrophils for membrane-bound phenotypic analysis. Neutrophils were purified from healthy donors and infected with *Leishmania-GFP* (5 parasites: 1 neutrophil) in RPMI 1640 plus 10% FBS. (B) 3h after infection, neutrophils were immunophenotyped by acquiring samples using flow cytometric analyzers and datasets analyzed by FlowJo software ($n=5$ experiments, in duplicate). Green and black bars represent, respectively, the GFP positive and negative cells. The white bars represent non-exposed group (Unstimulated). The means $\pm$ SD of parental percentage of GFP+, GFP- and non-exposed cells were compared by Friedman paired test with Dunn's post test.

Discussion

Whereas biomarker CD163 has been shown to be characteristic of macrophages permissive to infection with *M. leprae*, its expression is indicative of M2 subtype macrophage. In addition, sCD163 shedding (from surface of macrophages or neutrophils) represent a population of cells inefficient in fighting against *M. leprae* and *L. infantum*

infections (i.e. representing the M2 subtype). It can therefore be a valuable marker of diseases caused by intracellular pathogens [8, 26].

Our data, using leprosy patients, corroborate studies by Moura et al describing serum sCD163 association with leprosy Lepromatous (LL), as compared to patients Tuberculoid form (TT) [8]. Moreover, our work measured the levels of sCD163 in patients with intermediate forms of leprosy (IL and BL). ROC curves show that these levels of sCD163 have a very significant relationship between sensitivity and specificity among the most severe multibacillary, LL, and TT medium forms. Furthermore, this level was efficient in distinguishing the LL form from all others, even when compared to control subjects.

This relationship between serum levels of sCD163 and severity of leprosy, can (in part) be explained by the differentiation of macrophages to M2 phenotype, demonstrated by the presence of CD163+ macrophages in lesions of LL patients [8]. Sousa et al (2016) found a positive correlation between CD163 expression and a variety of inflammatory cytokines in lesions of LL patients, besides of arginase-1 enzyme expression (characteristic M2 macrophages metabolism) [27]. Interestingly, our study found no differences among the groups in the levels of Haptoglobin and the enzyme that degrades the hemoglobin-haptoglobin complex (Hb-Hp), heme-oxygenase-1 (HO- 1) and arginase-1.

Because of similarities between the disease causing-pathogens, we next studies the role of sCD163 in VL. Thus, high levels of sCD163 were found in the serum of patients with VL; levels were proportional to disease severity. These data suggest that, like leprosy, the CD163 is an important marker of pathogen load. The positive correlation between the sCD163 dosage with liver and spleen size supports the use of sCD163 as a biomarker of disease severity in VL. Additionally, a paired comparison shows a decrease in levels of this biomarker in treated patients (D30), suggesting use of sCD163 as a parameter for

stages of clinical progression. This evidence was supported by the ROC curve analyses, the levels of this biomarker has an efficient sensitivity/specificity between patients with different clinical presentations or control subjects.

Lastrucci et al (2015) conducted similar analyses in patients with Tuberculosis (TB) and obtained similar results. Together, these data suggest that sCD163 biomarker is strongly associated with diagnosis, severity and clinical improvement of diseases caused by intracellular agents, such as TB, Leprosy and VL, although this relationship is much more pronounced with leprosy and VL. Based on these results, there was a need to describe the mechanism of CD163 expression and the cellular source of this molecule. We observed that infection by *Leishmania* is capable of inducing CD163 expression on macrophages and neutrophils surface. In leprosy this relationship has been previously suggested by activity of heavily parasitized macrophages expressing CD163 in lesions biopsies. Moreover, Moura et al (2012) showed CD163 expression on monocytes was induced by mycobacteria [8]. However, no studies have shown whether *Leishmania* parasites can induce the same fate in macrophages. In the infection with *M. leprae*, co-expression of CD209 and CD163 is indicative of a permissive cell programming and phagocytic macrophages, characteristic of multibacillar lesions [26]. However, in our model of *Leishmania* infection did not lead to increases in CD209 positive cells. As non-infected, GFP- and GFP+ populations have the same percentage of CD209+ macrophages and only the GFP+ population was increased in the percentage of CD163+ cells, it is possible that CD209 is a marker expressed on cells in early stages of activation. One caveat of the studies was the use the *L. amazonensis* species/strain expressing GFP instead *L. infantum* strain. Unfortunately, our group, at this moment, have just an *L. amazonensis* strain expressing GFP, and no *L. infantum* strain. Interestingly, several review papers about the interaction between *Leishmania* and phagocytes did not analyze species separately [28-

32]. Additionally, the infection with *L. amazonensis* - GFP indeed induced CD163 expression in both macrophages and neutrophils. Our experiment using a non-fluorescent strain of *Leishmania* could not separate the populations to be analyzed by flow cytometry. Although the readout indices corroborate each other, future studies will want to evaluate all the species of *Leishmania*.

Analysis targeting the cytokines produced by these cells can provide the evidence necessary for understanding the differentiation of these cells in M1 or M2. CD163 expressing macrophages are more parasitized with *Leishmania-GFP*, suggesting that biomarker expression is associated with increased susceptibility of these cells to infection by intracellular agents. This result is supported by positive correlation between the fluorescence intensity GFP and CD163.

In addition to macrophages, neutrophils infected with *Leishmania-GFP* also express CD163 and may be another source for this soluble biomarker in patients with VL. An immunomodulatory role of polymorphonuclear leukocytes was described during the early phase after *Leishmania* major delivery [33]. Groselj-Grenc found expression of CD163 on neutrophils in systemic inflammatory response syndrome, but no mechanisms were proposed in these studies to explain the role of these CD163⁺ neutrophils [7]. We suggest that CD163 may be related to differentiation of these cells to an anti-inflammatory subtype of neutrophil, recently described in the literature as N2[34, 35]. This altered fate may be a clue to understand the apparently opposite roles of neutrophils during VL. Further studies are needed to confirm the presence of CD163 positive neutrophils in VL patients during active disease, and verify the role of N2 neutrophils as reservoir for *Leishmania* in VL.

Conclusion

In conclusion, we reaffirm and enhance the scientific evidence for the use sCD163 in serum of patients to predict disease status in Leprosy. For the first time, we show the importance of high sCD163 in VL, with reduction observed after treatment. We also show a direct correlation between sCD163 and spleen and liver sizes, and associate CD163 levels to VL severity. We thus propose this soluble receptor as a potential biomarker to evaluate disease progression and predict treatment response in VL. This study also suggests that infected macrophages and neutrophils are two possible sources of sCD163. Our data suggest that the genus *Leishmania* has the potential to provide polarizing stimulus to an anti-inflammatory fate within macrophages and neutrophils, called M2 and N2. This would favor parasite multiplication and suppression of *Leishmania*-specific cellular immune response observed in clinical cases. This can be explained by differentiation of M2 macrophages, as demonstrated by detection of CD163+ cells [8], and correlation between CD163 expression and a variety of anti-inflammatory cytokines and Arginase-1 expression, characteristic of M2 macrophages, in LL biopsies [27].

Acknowledgements

To Dr Silvia Reni Bortolin Uliana, University of São Paulo, Brazil for providing the *Leishmania-GFP*. To the doctors from the Leprosy Clinic, Lenise Franco and Jonnia Sherlock. To Daniela Oliveira for the leprosy patients follow-up. To Dr. Enaldo Melo for the VL patients follow-up. To Fabricia Alvisi and Meirielly Lima for sera collection and storage.

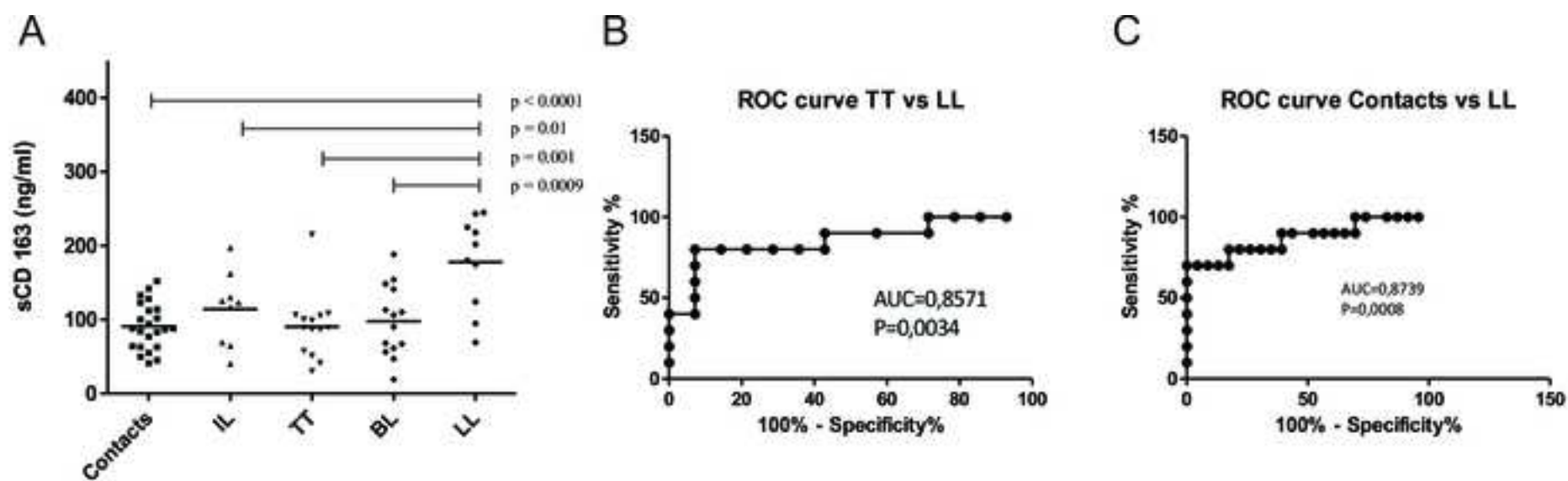
References

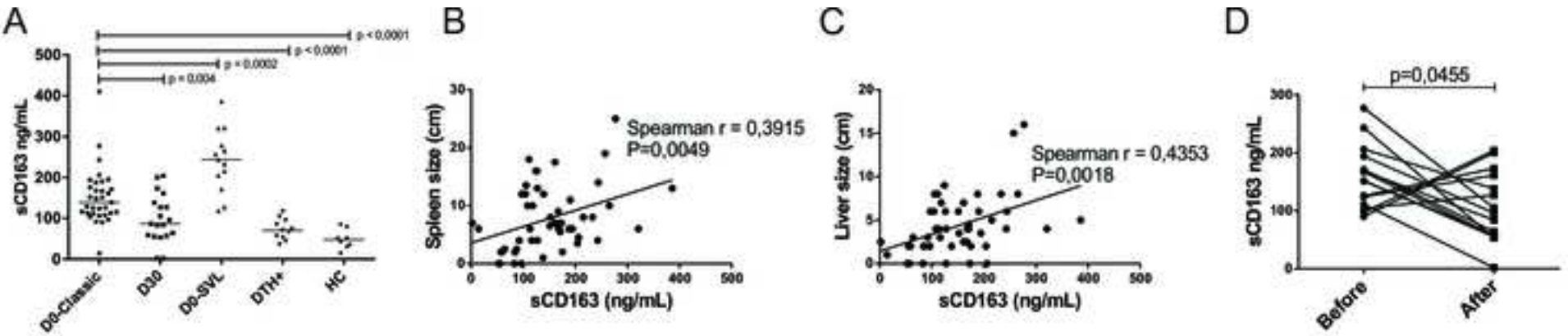
1. Law SK, Micklem KJ, Shaw JM, Zhang XP, Dong Y, Willis AC, et al. A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. European

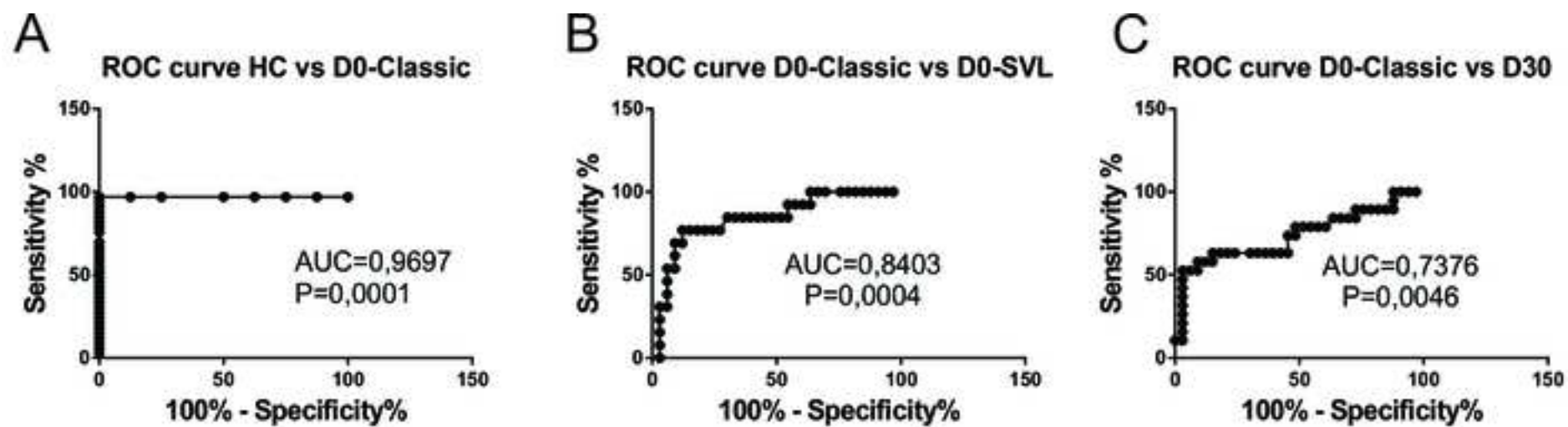
- journal of immunology. 1993;23(9):2320-5. doi: 10.1002/eji.1830230940. PubMed PMID: 8370408.
2. Hwang PK, Greer J. Interaction between hemoglobin subunits in the hemoglobin . haptoglobin complex. The Journal of biological chemistry. 1980;255(7):3038-41. PubMed PMID: 7358726.
 3. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. Nature. 2001;409(6817):198-201. doi: 10.1038/35051594. PubMed PMID: 11196644.
 4. Buehler PW, Abraham B, Vallelian F, Linnemayr C, Pereira CP, Cipollo JF, et al. Haptoglobin preserves the CD163 hemoglobin scavenger pathway by shielding hemoglobin from peroxidative modification. Blood. 2009;113(11):2578-86. doi: 10.1182/blood-2008-08-174466. PubMed PMID: 19131549.
 5. Belcher JD, Beckman JD, Balla G, Balla J, Vercellotti G. Heme degradation and vascular injury. Antioxidants & redox signaling. 2010;12(2):233-48. doi: 10.1089/ars.2009.2822. PubMed PMID: 19697995; PubMed Central PMCID: PMC2821146.
 6. Nielsen MJ, Moller HJ, Moestrup SK. Hemoglobin and heme scavenger receptors. Antioxidants & redox signaling. 2010;12(2):261-73. doi: 10.1089/ars.2009.2792. PubMed PMID: 19659436.
 7. Groselj-Grenc M, Ihan A, Derganc M. Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes. Mediators of inflammation. 2008;2008:202646. doi: 10.1155/2008/202646. PubMed PMID: 18604302; PubMed Central PMCID: PMC2442385.
 8. Moura DF, de Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, Schmitz V, et al. CD163 favors Mycobacterium leprae survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. European journal of immunology. 2012;42(11):2925-36. doi: 10.1002/eji.201142198. PubMed PMID: 22851198.
 9. Fabrick BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Schornagel K, et al. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. Blood. 2009;113(4):887-92. doi: 10.1182/blood-2008-07-167064. PubMed PMID: 18849484.
 10. Buechler C, Ritter M, Orso E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. Journal of leukocyte biology. 2000;67(1):97-103. PubMed PMID: 10648003.
 11. Sulahian TH, Hogger P, Wahner AE, Wardwell K, Goulding NJ, Sorg C, et al. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. Cytokine. 2000;12(9):1312-21. doi: 10.1006/cyto.2000.0720. PubMed PMID: 10975989.
 12. Li J, Liu CH, Xu DL, Gao B. Significance of CD163-Positive Macrophages in Proliferative Glomerulonephritis. The American journal of the medical sciences. 2015;350(5):387-92. doi: 10.1097/MAJ.0000000000000569. PubMed PMID: 26379042.
 13. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity. 2014;41(1):14-20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008. PubMed PMID: 25035950; PubMed Central PMCID: PMC4123412.
 14. Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, Nadra I, Taylor KM, Haskard DO, et al. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. Circulation research. 2004;94(1):119-26. doi: 10.1161/01.RES.0000109414.78907.F9. PubMed PMID: 14656926.
 15. Stilund M, Gjelstrup MC, Petersen T, Moller HJ, Rasmussen PV, Christensen T. Biomarkers of inflammation and axonal degeneration/damage in patients with newly diagnosed multiple sclerosis: contributions of the soluble CD163 CSF/serum ratio to a biomarker panel.

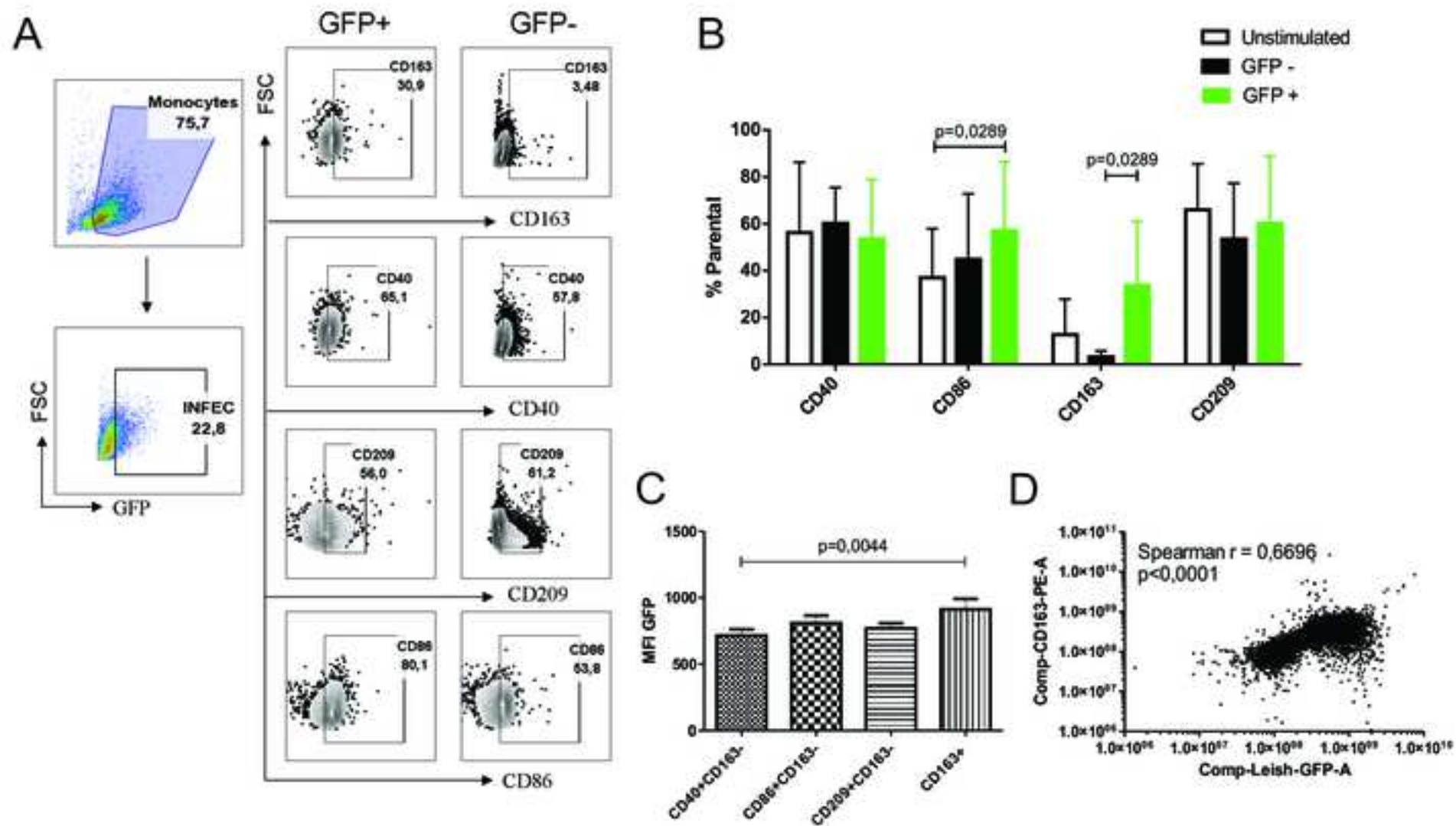
- 446 PLoS one. 2015;10(4):e0119681. doi: 10.1371/journal.pone.0119681. PubMed PMID: 25860354;
 447 PubMed Central PMCID: PMC4393241.
- 448 16. Ab-Rahman HA, Rahim H, AbuBakar S, Wong P-F. Macrophage Activation Syndrome-
 449 Associated Markers in Severe Dengue. *International Journal of Medical Sciences*.
 450 2016;13(3):179-86. doi: 10.7150/ijms.13680.
- 451 17. Mendonca VR, Luz NF, Santos NJ, Borges VM, Goncalves MS, Andrade BB, et al.
 452 Association between the haptoglobin and heme oxygenase 1 genetic profiles and soluble CD163
 453 in susceptibility to and severity of human malaria. *Infect Immun*. 2012;80(4):1445-54. doi:
 454 10.1128/IAI.05933-11. PubMed PMID: 22290142; PubMed Central PMCID: PMC3318432.
- 455 18. Lastrucci C, Benard A, Balboa L, Pingris K, Souriant S, Poincloux R, et al. Tuberculosis is
 456 associated with expansion of a motile, permissive and immunomodulatory CD16(+) monocyte
 457 population via the IL-10/STAT3 axis. *Cell research*. 2015;25(12):1333-51. doi:
 458 10.1038/cr.2015.123. PubMed PMID: 26482950; PubMed Central PMCID: PMC4670988.
- 459 19. Sampaio MJ, Cavalcanti NV, Alves JG, Filho MJ, Correia JB. Risk factors for death in
 460 children with visceral leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(11):e877. doi:
 461 10.1371/journal.pntd.0000877. PubMed PMID: 21072238; PubMed Central PMCID:
 462 PMC2970542.
- 463 20. Dos Santos PL, de Oliveira FA, Santos ML, Cunha LC, Lino MT, de Oliveira MF, et al. The
 464 Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14.
 465 *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(1):e0004375. doi: 10.1371/journal.pntd.0004375.
 466 PubMed PMID: 26814478; PubMed Central PMCID: PMC4729473.
- 467 21. Oliveira DT, Sherlock J, Melo EV, Rollemberg KC, Paixao TR, Abuawad YG, et al. Clinical
 468 variables associated with leprosy reactions and persistence of physical impairment. *Revista da*
 469 *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2013;46(5):600-4. doi: 10.1590/0037-8682-0100-
 470 2013. PubMed PMID: 24270251.
- 471 22. Saúde. BMD. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora
 472 do Ministério da Saúde. 2006.
- 473 23. de Oliveira FA, Barreto AS, Bomfim LG, Leite TR, Dos Santos PL, de Almeida RP, et al.
 474 Soluble CD40 Ligand in Sera of Subjects Exposed to *Leishmania infantum* Infection Reduces the
 475 Parasite Load in Macrophages. *PloS one*. 2015;10(10):e0141265. doi:
 476 10.1371/journal.pone.0141265. PubMed PMID: 26488744; PubMed Central PMCID:
 477 PMC4619201.
- 478 24. Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva AL, Mineo TW, et al.
 479 Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to
 480 *Leishmania*. *Nature medicine*. 2013;19(7):909-15. doi: 10.1038/nm.3221. PubMed PMID:
 481 23749230.
- 482 25. Tavares NM, Araujo-Santos T, Afonso L, Nogueira PM, Lopes UG, Soares RP, et al.
 483 Understanding the mechanisms controlling *Leishmania amazonensis* infection in vitro: the role
 484 of LTB4 derived from human neutrophils. *J Infect Dis*. 2014;210(4):656-66. doi:
 485 10.1093/infdis/jiu158. PubMed PMID: 24634497; PubMed Central PMCID: PMC4111911.
- 486 26. Montoya D, Cruz D, Teles RM, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, et al. Divergence of
 487 macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell host & microbe*.
 488 2009;6(4):343-53. doi: 10.1016/j.chom.2009.09.002. PubMed PMID: 19837374; PubMed
 489 Central PMCID: PMC2764558.
- 490 27. de Sousa JR, de Sousa RP, de Souza Aarao TL, Dias LB, Jr., Carneiro FR, Fuzii HT, et al. In
 491 situ expression of M2 macrophage subpopulation in leprosy skin lesions. *Acta tropica*. 2016. doi:
 492 10.1016/j.actatropica.2016.01.008. PubMed PMID: 26827741.
- 493 28. Handman E, Bullen DV. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in*
 494 *parasitology*. 2002;18(8):332-4. PubMed PMID: 12377273.
- 495 29. Gollob KJ, Viana AG, Dutra WO. Immunoregulation in human American leishmaniasis:
 496 balancing pathology and protection. *Parasite immunology*. 2014;36(8):367-76. doi:
 497 10.1111/pim.12100. PubMed PMID: 24471648; PubMed Central PMCID: PMC4113557.

30. Podinovskaia M, Descoteaux A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future microbiology*. 2015;10(1):111-29. doi: 10.2217/fmb.14.103. PubMed PMID: 25598341.
31. Lievin-Le Moal V, Loiseau PM. Leishmania hijacking of the macrophage intracellular compartments. *The FEBS journal*. 2016;283(4):598-607. doi: 10.1111/febs.13601. PubMed PMID: 26588037.
32. Liu D, Uzonna JE. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012;2:83. doi: 10.3389/fcimb.2012.00083. PubMed PMID: 22919674; PubMed Central PMCID: PMC3417671.
33. Tacchini-Cottier F, Zweifel C, Belkaid Y, Mukankundiye C, Vasei M, Launois P, et al. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with Leishmania major. *Journal of immunology*. 2000;165(5):2628-36. PubMed PMID: 10946291.
34. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell*. 2009;16(3):183-94. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.017. PubMed PMID: 19732719; PubMed Central PMCID: PMC2754404.
35. Sionov RV, Fridlender ZG, Granot Z. The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society*. 2015;8(3):125-58. doi: 10.1007/s12307-014-0147-5. PubMed PMID: 24895166; PubMed Central PMCID: PMC4714999.

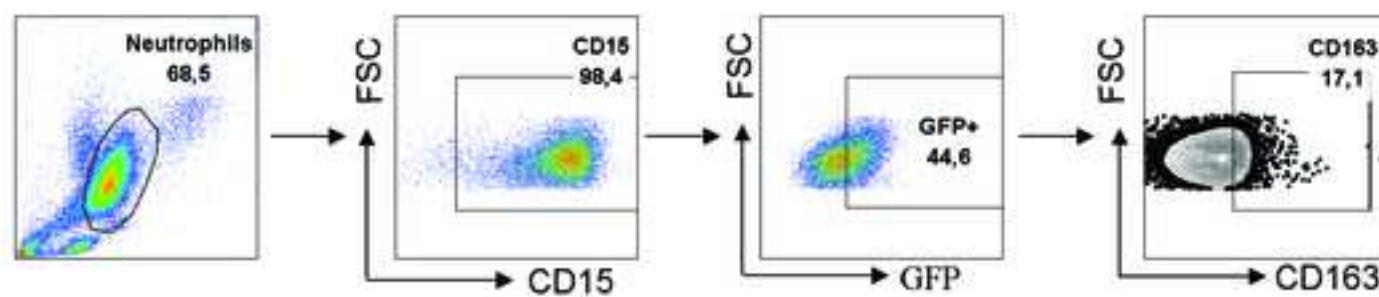








A



B

