



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E INFECTOLOGIA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PARASITOLOGIA E IMUNOLOGIA APLICADAS**

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO POLIMORFISMO rs1801274 NO GENE *FCGR1A***  
**EM MACRÓFAGOS DESAFIADOS COM *Leishmania infantum***

**Mestrando:** Jonatas da Silva Catarino

**Orientador:** Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

**Co-orientador:** Dr. Rafael Faria de Oliveira

**Uberaba-MG**

**2017**

**JONATAS DA SILVA CATARINO**

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO POLIMORFISMO rs1801274 NO GENE *FCGR1A*  
EM MACRÓFAGOS DESAFIADOS COM *Leishmania infantum***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em parasitologia e imunologia aplicadas do Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical e infectologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**Orientador:** Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

**Co-orientador:** Dr Rafael Faria de Oliveira

**Uberaba-MG**

**2017**

**Jonatas da Silva Catarino**

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO POLIMORFISMO rs1801274 NO GENE *FCGR1A*  
EM MACRÓFAGOS DESAFIADOS COM *Leishmania infantum***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Medicina Tropical e Infectologia, área de concentração Parasitologia e Imunologia Aplicadas, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Junior

\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Junior – Orientador  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciana Almeida  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva  
Universidade Federal de Uberlândia

**A minha mãe pelo apoio nas horas difíceis e por me acalmar apenas com seu doce olhar.**

**Ao meu pai, por me incentivar e nunca deixar de acreditar nos meus sonhos.**

**As minhas duas irmãs que são inspiração para continuar no caminho que escolhi para  
minha vida.**

## 1. AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, pelo dom da vida e por guiar minhas decisões

Ao meu orientador Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Junior, agradeço a oportunidade, a paciência, a confiança e os conhecimentos a mim transmitidos.

A minha família pelo apoio e torcida, agradeço a cada momento por ter todos ao meu lado.

Aos meus amigos, que estão de perto acompanhada a minha jornada e me dando apoio em todos os momentos e também aqueles que de longe torcem por meu sucesso nos passos que escolhi para minha vida. Tenho grande carinho por vocês e torço pelo sucesso de todos. A senhorita Lucila Langoni Naves que nos dois últimos anos se tornou uma pessoa mais que especial na minha vida, agradeço por todos os momentos compartilhados, pelo apoio nos momentos difíceis. Muito obrigado por estar ao meu lado sempre.

Ao. Dr. Marcos Vinicius pela amizade e todo o conhecimento durante esses dois anos, aos momentos de discussão e ideias que me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente, muito obrigado.

Ao Dr. Helioswilton Sales de Campos por todo conhecimento e paciência durante as horas na bancada, e os momentos em que discutimos sobre o futuro e perspectivas da ciência, me fazendo amadurecer como profissional e pela amizade em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Carlo Oliveira obrigado pelos conselhos, ensinamentos e pela cobrança todos os dias para ler mais um paper, fato que me fez crescer e aprender mais a cada dia. Agradeço muito a oportunidade de te ló como amigo e porque não dizer mentor.

Ao Dr. Cesar Hernandez obrigado pelas conversas, troca de conhecimentos e à grande ajuda com meu trabalho.

Aos professores da pós-graduação, obrigado pela amizade, e por compartilhar seus conhecimentos. Em especial ao Prof Dr. Luiz Eduardo Ramirez pela amizade e confiança, pelos momentos sentados na sua sala conversando sobre o futuro na pós-graduação e pelos conselhos, meu muito obrigado.

Aos secretários da pós-graduação: Clever e ao Marcelo, obrigado pela paciência e dedicação.

Aos funcionários dos Laboratórios de Parasitologia a Imunologia, obrigado pela disposição e amizade sempre!

A Lara, Monique, Emanuella, Beatriz, Raíssa, Fabiana, Poliana, Pablo, Rodolfo, Djalma, Jéssica Nevoa, Jéssica Campos, Juliana, Anderson, Janaína, Guilherme, Lorena, Isabela, Ana Carolina, Cristiane, Cecília enfim, a todos os colegas de pós-graduação.

CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFTM pelo apoio financeiro.

**‘O saber intelectual sempre deve vir acompanhado de uma dose de humildade e  
responsabilidade social para com aqueles que foram desprovidos de entrar em contato  
com a ignorância do conhecimento’**

**Autor desconhecido, adaptado por Catarino, J.S.**

## 2. Lista de figuras

Figura 1: Ciclo biológico do parasito do gênero <i>Leishmania</i>	
Figura 2: Plot de discriminação alélica gerado pelo aparelho de PCR em tempo real Stepone.....	37
Figura 3: Contagem de macrófagos que realizaram fagocitose de promastigotas marcados em FITC.....	39
Figura 4: Análise não pareada da taxa de fagocitose de <i>Leishmania infantum</i> por macrófagos de indivíduos com diferentes genótipos para os polimorfismos H/R 131 do gene FCGRRIIA.....	41
Figura 5: Níveis de IL-10 produzidos por macrófagos em condições diferentes de opsonização na presença ou ausência de LPS. *Twoway Anova significativo com $p < 0,05$ .....	43
Figura 6: Níveis de IL-10 produzidos por macrófagos do mesmo genótipo na ausência e presença de LPS em condições diferentes de opsonização. * Wilcoxon significativo com $p < 0,05$ .....	45
Figura 7: Níveis de IL-6 produzidos por macrófagos em condições diferentes de opsonização na presença ou ausência de LPS. *Twoway Anova significativo com $p < 0,05$ .....	47
Figura 8 Níveis de IL-6 produzidos por macrófagos do mesmo genótipo na ausência e presença de LPS em condições diferentes de opsonização. * Wilcoxon significativo com $p < 0,05$ .....	49
Figura 9: Níveis de TNF produzidos por macrófagos em condições diferentes de opsonização na presença ou ausência de LPS. *Twoway Anova significativo com $p < 0,05$ .....	51
Figura 10: Níveis de TNF produzidos por macrófagos do mesmo genótipo na ausência e presença de LPS em condições diferentes de opsonização. * Wilcoxon significativo com $p < 0,05$ .....	53
Figura 11: Níveis de IL-8 produzidos por macrófagos em condições diferentes de opsonização na presença ou ausência de LPS. *Twoway Anova significativo com $p < 0,05$ .....	55
Figura 12: Níveis de IL-8 produzidos por macrófagos do mesmo genótipo na ausência e presença de LPS em condições diferentes de opsonização. * Wilcoxon significativo com $p < 0,05$ .....	57

### 3. Lista de tabelas

Tabela 1: Análise da frequência genotípica e alélica em indivíduos positivos para leishmaniose visceral e grupo controles residentes em área endêmica.....36

Tabela 2: Análise da frequência genotípica de indivíduos residentes em área não endêmica para leishmaniose visceral e voluntários do estudo funcional.....38

### 4. Lista de Abreviaturas

°C - graus celsius

CRP - Proteína C reativa

SCRIP - Soro humano rico em proteína C reativa depletado de IgG

IgG - Imunoglobulinas G humana

LV - Leishmaniose visceral

LC- Leishmaniose cutânea

Fc - Fração Fc das imunoglobulinas

H - Histidina

R - Arginina

µL - Microlitros

mL- Mililitros

pg – Pico grama

SNP – Polimorfismo de base única

## 5. RESUMO

*Single nucleotide polymorphisms* (SNPs) são variações genéticas pontuais que ocorrem normalmente na população e na maioria das vezes não apresentam significados funcionais. Entretanto, dependendo de sua localização e do tipo de nucleotídeo trocado, pode alterar ou anular a função do gene em que está inserido. Nesse contexto os genes de alguns dos receptores de IgG apresentam vários polimorfismos descritos, dentre eles, o rs1801274 do gene *FCGR2A*, promove a troca de uma única base no DNA (A-G), resultando na alteração de um único aminoácido do transcrito (Histidina-H/Arginina-R) que altera a afinidade deste receptor aos subtipos de imunoglobulinas G (IgG) e à proteína C reativa (CRP). Recentemente, através de um estudo genético em área endêmica, nosso grupo identificou uma associação do polimorfismo rs1801274 com leishmaniose visceral (LV), indivíduos heterozigoto H/R foi associado com a doença em relação as homozigotos R/R. Estando mais frequente entre os indivíduos afetados.

Tendo em vista a importância deste polimorfismo no mecanismo de reconhecimento dos subtipos de IgG a nível celular e da associação observada deste polimorfismo com a LV e outras doenças infectocontagiosas, objetivamos avaliar o perfil de resposta imune produzida, após infecção *in vitro* por *Leishmania infantum*, por macrófagos de indivíduos com os diferentes genótipos do polimorfismo rs1801274. Foram genotipados indivíduos entre 20 e 40 anos, clinicamente saudáveis, para os polimorfismos rs1801274 do gene *FCGR2A* através de sondas Taqman. Foram isolados e cultivados macrófagos derivados de sangue periférico, de indivíduos na presença de promastigotas de *L. infantum*, com soro de pacientes em fase aguda de Leishmaniose visceral fonte de IgG e/ou CRP na presença ou ausência de lipopolissacárideo LPS.

Foi analisada a infectividade através de microscopia e dosado no sobrenadante de cultura óxido nítrico (NO) através da Reação de Griess. Além disso, a produção das citocinas/quimiocinas TNF $\alpha$ , IL-10, IL-12 p70, IL-6 e IL-8, foi determinada no sobrenadante utilizando a técnica de Cytometric Bead Array (CBA).

No presente trabalho observamos uma associação entre o genótipo e a taxa de fagocitose opsonina dependente, e que esse fenômeno se reflete na alteração de produção de citocinas por estas células. A opsonização com IgG levou a uma maior produção de IL-10 e IL-6. Houve uma inibição da produção de IL-8 nos indivíduos que expressam o receptor RR13 codificado por

GG, nessas mesmas células, a opsonização via CRP promove um aumento da produção de TNF- $\alpha$ . Mostrando que macrófagos com genótipos diferentes para o gene *FCGR1A*, apresentam diferentes padrões de ativação quando desafiados com *L.infantum* opsonizados com diferentes ligantes, desta forma sugerindo que indivíduos com diferentes genótipos para o polimorfismo em questão apresentam perfis diferentes de suscetibilidade/resistência quando expostos ao parasito.

## 6. ABSTRACT

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are specific genetic variations that occur normally in the population and most often do not have functional meanings. However, depending on its location and the type of nucleotide exchanged, it may alter or negate the function of the gene in which it is inserted. In this context the genes of some of the IgG receptors present several polymorphisms described, among them the rs1801274 of the FCGR2A gene, promotes the exchange of a single base in the DNA (AG), resulting in the alteration of a single amino acid of the transcript (Histidina-H / Arginine-R) which alters the affinity of this receptor to the immunoglobulin G (IgG) and C-reactive protein (CRP) subtypes. Recently, through a genetic study in endemic area, our group identified an association of rs1801274 polymorphism with visceral leishmaniasis (VL), heterozygous H/R individuals was associated with the disease in relation to the R/R homozygotes. Being more frequent among affected individuals.

Considering the importance of this polymorphism in the mechanism of recognition of IgG subtypes at the cellular level and the observed association of this polymorphism with LV and other infectious diseases, we aimed to evaluate the profile of the immune response produced after in vitro infection by *Leishmania infantum*. Macrophages of individuals with the different genotypes of the rs1801274 polymorphism. Twenty-four-year-olds, apparently healthy, were genotyped for the rs1801274 polymorphisms of the FCGR2A gene via Taqman probes. Peripheral blood derived macrophages of individuals in the presence of *L. infantum* promastigotes were isolated and cultured with serum from patients in acute phase of visceral leishmaniasis and IgG and / or CRP in the presence or absence of LPS lipopolysaccharide.

Infectivity was analyzed by microscopy and measured in the supernatant of nitric oxide (NO) culture. In addition, the production of cytokines / chemokines TNF $\alpha$ , IL-10, IL-12 p70, IL-6 and IL-8 was determined in the supernatant using the Cytometric Bead Array (CBA) technique.

In the present study we observed an association between the genotype and phagocytosis-dependent opsonin rate, and that this phenomenon is reflected in the alteration of cytokine production by these cells. IgG opsonization led to increased production of IL-10 and IL-6. There was inhibition of IL-8 production in individuals expressing the GG-encoded RR13 receptor in these same cells, opsonization via CRP promotes an increase in TNF- $\alpha$  production. By showing that macrophages with different genotypes for the FCGR2A gene have different activation patterns when challenged with *L. infantum* opsonized with different ligands, thus suggesting that

individuals with different genotypes for the polymorphisms in question have different susceptibility / resistance profiles when exposed to Parasite.

## 7. Sumário

1.	AGRADECIMENTOS.....	v
2.	Lista de figuras.....	viii
3.	Lista de tabelas.....	ix
4.	Lista de Abreviaturas.....	ix
5.	RESUMO.....	x
6.	ABSTRACT.....	xii
8.	INTRODUÇÃO.....	14
8.1	GENÉTICA DAS DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS.....	14
	Fatores determinantes para o desenvolvimento de doenças infecciosas parasitárias.....	14
	Genética do hospedeiro nas infecções parasitárias.....	15
8.2	LEISHMANIOSE VISCERAL.....	17
	Aspectos biológicos e dados epidemiológicos.....	17
	Fatores clínicos.....	19
	Imunologia durante a Leishmaniose visceral e mecanismos de escape do parasito.....	21
	Imunogenética da leishmaniose visceral.....	26
9.	JUSTIFICATIVA.....	30
10.	OBJETIVO GERAL.....	31
10.1	Objetivos específicos.....	31
11.	MATÉRIAS E METODOS.....	32
11.1	Casuística.....	32
11.2	Cultivo das formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> .....	32
11.3	Fixação de marcação das promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> .....	33
11.4	Purificação da Proteína C reativa.....	33
11.5	Purificação das Imunoglobulinas G do soro de indivíduos positivos para leishmaniose visceral.....	34
11.6	Opsonização das formas promastigotas.....	34

11.7	Extração de DNA e Discriminação alélica para rs1801274 do FcgRIIa.....	35
11.8	Isolamento de macrófagos derivados de monócitos de sangue periférico .....	35
11.9	Infecção <i>in vitro</i> .....	36
11.10	Coleta de sobrenadantes e dosagens de óxido nítrico e citocinas .....	36
11.11	Análise da taxa de fagocitose.....	37
11.12	Dosagem de citocinas e oxido nítrico .....	37
11.13	Análise estatística.....	38
12.	RESULTADOS.....	39
12.1	FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO RS1801274 NA CIDADE DE PARACATU, MINAS GERAIS BRASIL (resultados do projeto anterior ainda não publicados por nosso grupo).....	39
12.2	ESTUDO FUNCIONAL.....	40
	Frequência genotípica e alélica do polimorfismos do gene <i>FCGR1IA</i> em indivíduos do estudo funcional .....	41
12.3	Avaliação da taxa de fagocitose.....	42
12.4	Comparação da taxa de fagocitose em condições distintas de opsonização .....	43
12.5	Análise da produção de citocinas.....	45
	Análise da produção de IL-10 entre condições distintas de opsonização .....	45
	Análise da produção de IL-10 intra genotípica em condições distintas de opsonização ..	47
	Análise da produção de IL-6 entre condições distintas de opsonização .....	49
	Análise da produção de IL-6 intra genotípica em condições distintas de opsonização ....	51
	Análise da produção de TNF- $\alpha$ entre condições distintas de opsonização .....	53
	Análise da produção de TNF- $\alpha$ intra genotípica em condições distintas de opsonização	55
	Análise da produção de IL-8 entre condições distintas de opsonização .....	57
	Análise da produção de IL-8 intra genotípica em condições distintas de opsonização ....	59
13.	DISCUSSÃO.....	61
14.	CONCLUSOES.....	69
15.	REFERENCIAS.....	70

## 8. INTRODUÇÃO

### 8.1..... GENÉTICA DAS DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

#### Fatores determinantes para o desenvolvimento de doenças infecciosas parasitárias

Diante da exposição a um agente infeccioso ou parasitário existe uma complexa interação entre o microrganismo, o hospedeiro e fatores ambientais que vão ditar o resultado da doença infecciosa (DI) em questão. Muitos desses fatores desempenham um papel importante na gravidade e progressão da doença, bem como, na frequência da infecção em determinadas populações dentre esses, há evidências que a genética do hospedeiro está envolvida com doenças infecciosas. (CLEMENTI; DI GIANANTONIO, 2006; WEATHERALL; BELL; CLEGG; FLINT *et al.*, 1988)

Muitos parasitos humanos causam infecções crônicas em seus hospedeiros, sem causar sintomas clínicos. Entretanto, em uma parte considerável de indivíduos, estes mesmos parasitos provocam doença grave, seguida de morte ou sequelas. Este fenômeno tem despertado interesse de diversos pesquisadores, pois a identificação dos fatores responsáveis por suscetibilidade, que ocorre em apenas uma fração da população exposta, pode ser a chave para o desenvolvimento de novos procedimentos profiláticos, diagnósticos e terapêuticos (COURTIN; ARGIRO; JAMONNEAU; N'DRI *et al.*, 2006; CRAIG; FERNANDEZ-REYES; MESRI; MCDOWALL *et al.*, 2000; FLORI; DELAHAYE; IRAQI; HERNANDEZ-VALLADARES *et al.*, 2005).

A suscetibilidade para doenças infecciosas humanas não segue um padrão de herança Mendeliano clássico, uma vez que essas doenças são consideradas desordens complexas e com inúmeros fatores associados com a infecção e progressão da doença (SCHUMANN, 2004). Estudos de desordens complexas se iniciaram em meados do século 20 e tem sugerido modelos que expliquem o perfil de herança associado com tais doenças. Esses são definidos como poligenético (envolvendo mais de uma gene), multifatorial (dependendo da interação entre mais de um gene e outros fatores ambientais), oligogênico (envolvendo mutações em diferentes genes com pouco efeito) e gene major (um gene principal representando um fração importante de contribuição poligenética e fatores ambientais) (CAMPINO; KWIATKOWSKI; DESSEIN, 2006; CASTELLANO; ARGIRO; DESSEIN; DESSEIN *et al.*, 2015).

Desta forma o estudo de doenças infecciosas difere de outras doenças complexas pois muitos fatores devem ser considerados e incluídos na análise. Portanto, heterogeneidade fenotípica e resultado em desordens clínicas complexas podem ser determinadas em partes pela genética do hospedeiro. Este fenômeno pode ocorrer com doenças infecciosas onde a variação fenotípica e manifestações clínicas estão determinadas por uma variedade de fatores, entre eles a genética do hospedeiro (SOMECH; AMARIGLIO; SPIRER; REHAVI, 2003).

Muitos parasitos apresentam alternativas sofisticadas de escape do sistema imunológico, tornando-se extremamente adaptados a sobrevivência no hospedeiro. A plasticidade genômica de certos parasitos tem despertado interesse no desenvolvimento de estudos que tentam ligar as diferentes formas clínicas e subclínicas causadas pela infecção, à existência de clones e cepas de diferentes virulência e/ou patogenicidade na população de parasitos (MACEDO; PENA, 1998).

A importância da genética do hospedeiro no desenvolvimento da doença tem sido difícil de ser estudada devido à multiplicidade dos fatores que podem interferir com o curso da doença, incluindo a heterogeneidade de parasitos que pode determiná-la. Entretanto, estudos bem desenvolvidos, têm permitindo identificar passos críticos em mecanismos patogênicos em algumas infecções (DESSEIN; CHEVILLARD; MARQUET; HENRI *et al.*, 2001)

### **Genética do hospedeiro nas infecções parasitárias**

Um melhor entendimento de mecanismos de defesa naturais do hospedeiro são essenciais para o desenvolvimento de novas abordagens para o controle de doenças parasitárias, isto pode ser alcançado por revelar bases genéticas complexas de resistência e suscetibilidade para este tipo de doença (CAMPINO; KWIATKOWSKI; DESSEIN, 2006). Muitos estudos têm usado estratégias de abordagens populacionais, de estudo familiar e mapeamento de genes. Estudos de bases populacionais tem contribuído também com informações evolucionárias e tem se estabelecido que doenças infecto parasitárias atuam com forte influência seletiva na diversidade genética da população exposta favorecendo a sobrevivência de indivíduos mais aptos ao controle da infecção (FLINT; HARDING; BOYCE; CLEGG, 1998; TISHKOFF; WILLIAMS, 2002).

Os estudos iniciais de genética foram desenvolvidos em modelos experimentais, nos quais foi possível o controle de variáveis ambientais (estado nutricional, temperatura e umidade,

outras infecções) e parasitárias (heterogeneidade, tamanho do inóculo), comprovando que o componente genético está fortemente associado à suscetibilidade às doenças. Estudos em modelos animais e epidemiológicos vem humanos mostraram que doenças aparentemente não hereditárias, incluindo doenças infecciosas, desenvolve-se principalmente em indivíduos predisposto geneticamente, e esta predisposição envolve muitos genes (PHAROAH; ANTONIOU; BOBROW; ZIMMERN *et al.*, 2002)

Um exemplo clássico foi quando Bradley *et al.* (1979) identificaram o *locus* *lsh* do cromossomo 1 (posteriormente identificado como *Natural Resistance-Associated Macrophage Protein - NRAMP-1*) que controla a rápida multiplicação de *Leishmania donovani* em camundongos.

Durante anos, surgiu um grande interesse em associar genes relacionados à resposta imunológica, como genes do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) e de produtos da resposta imunológica, com doenças infecciosas e parasitárias. Muitos destes estudos comprovaram a ação de vários componentes genéticos na suscetibilidade de doenças como malária, esquistossomose e leishmanioses, e com menos progresso, na filariose, oncocercose, ascaridíase, tripanossomíase africana e doença de Chagas (CAMPINO; KWIATKOWSKI; DESSEIN, 2006).

Os genes do complexo HLA, que têm como função apresentar antígenos estranhos ao sistema imunológico, tiveram variantes genéticas associados com alterações hepáticas graves em indivíduos com esquistossomose (HIRAYAMA, 2002), leishmaniose cutânea (LARA; LAYRISSE; SCORZA; GARCIA *et al.*, 1991) e resistência em casos graves de malária (Hill *et al.*, 1991). Outros estudos associaram mutações no HLA a filariose linfática (YAZDANBAKHS; SARTONO; KRUIZE; KURNIAWAN *et al.*, 1995) e doença de Chagas (NIETO; BERAÚN; COLLADO; CABALLERO *et al.*, 2000)

Genes de produtos da resposta imune também apresentam grande importância devido ao papel destas moléculas na defesa do hospedeiro e na patogênese de doenças. Variantes do gene do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) foram associados à malária grave e risco de reinfecção (FLORI; DELAHAYE; IRAQI; HERNANDEZ-VALLADARES *et al.*, 2005), risco aumentado em desenvolver leishmaniose mucocutânea (CABRERA; SHAW; SHARPLES; WILLIAMS *et al.*, 1995) e doença de Chagas (PISSETTI; CORREIA; DE OLIVEIRA; LLAGUNO *et al.*, 2011).

Outras variações como polimorfismos do gene codificador da subunidade p40 da interleucina-12 (IL-12) foram associados à aumento de mortalidade em casos malária e

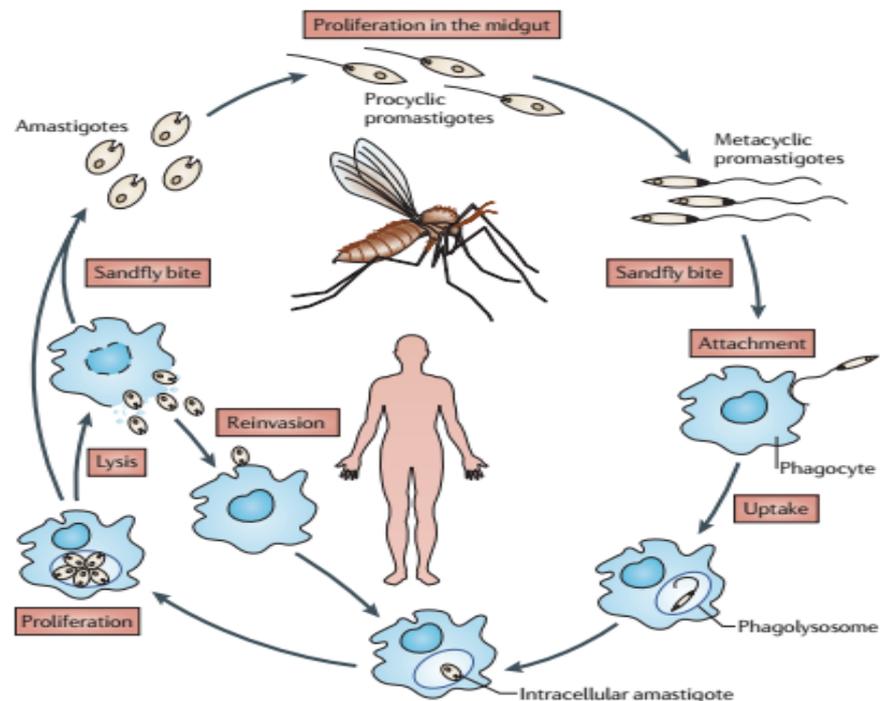
redução na síntese de óxido nítrico (MORAHAN; BOUTLIS; HUANG; PAIN *et al.*, 2002). Variações alélicas no gene da IL-4 demonstraram alterar a produção de anticorpos contra antígenos maláricos (LUONI; VERRA; ARCÀ; SIRIMA *et al.*, 2001) e no controle da leishmaniose visceral (LV) (MOHAMED; IBRAHIM; MILLER; PEACOCK *et al.*, 2003). Um polimorfismo do gene da interleucina-10 (IL-10) foi associado a menor risco de desenvolver tripanossomíase africana após longos períodos de exposição ao parasito, e maior risco de desenvolvimento de lesão na leishmaniose tegumentar (COURTIN; ARGIRO; JAMONNEAU; N'DRI *et al.*, 2006).

Pesquisas genéticas são de grande importância para o estudo de doenças infecto-parasitárias, entretanto, muitos efeitos genéticos ainda precisam ser elucidados na biologia destas doenças. Dentre elas a LV se destaca, devido ao status epidemiológico e associação da imunobiologia na sua patogênese, colocando se desta forma como um campo fértil para estudos associados a imunogénica em doenças infecciosas.

## **8.2..... LEISHMANIOSE VISCERAL**

### **Aspectos biológicos e dados epidemiológicos**

As leishmanioses, são um grupo de doenças causadas por diferentes espécies de protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*, cujo ciclo de vida é mantido através da transmissão entre dípteros do gênero *Flebotomus/Lutzmonia* e hospedeiros vertebrados (Figura (KAYE; SCOTT, 2011; KEDZIERSKI, 2010), caracterizando sua diversidade e complexidade. São doenças endêmicas em grandes extensões territoriais, sendo limitadas em áreas tropicais, subtropicais e no Sul da Europa.



Figural **Kaye e Scoot, 2011: O ciclo de vida dos parasitos Leishmania**. As formas promastigotas diferenciam se dentro do flebotomíneo infectado em promastigotas metacíclicas, qual já se encontram localizada na válvula estomodeo. Durante o repasto sanguíneo o flebotomíneo regurgita as promastigotas metacíclicas junto com componentes salivares bioativos e imunomoduladores. Os parasitos são então fagocitados por células residentes no local da picada principalmente células fagocitárias mononucleares. Após o estabelecimento da infecção, as promastigotas se transformam dentro dos macrófagos em formas não flageladas conhecidas como amastigotas sofrendo um ciclo de replicação dentro destas células hospedeiras, qual ocasionalmente se rompe liberando amastigotas que infectam células adjacentes. A transmissão do ciclo é completada quando macrófagos infectados são ingeridos durante o repasto sanguíneo por flebotomíneos não infectados.

De acordo com as características clínicas, este complexo pode ser dividido em duas principais formas clínicas: Leishmaniose tegumentar e Leishmaniose visceral. A LV é uma desordem infecciosa generalizada, crônica e a LT resulta de replicação do parasito dentro do sistema fagócito mononuclear, nas camadas da derme e tecido orofaríngeo (HERWALDT, 1999). São estimados ao ano 1,6 milhões de casos novos de leishmanioses, dos quais cerca 500 mil se manifestam na forma visceral e 1,1 milhões na forma tegumentar (WHO, 2010).

As leishmanioses são causadas por cerca de 21 espécies de parasitos do gênero *Leishmania*, as quais possuem como vetores cerca de 30 espécies de flebotomíneos (PEARSON; SOUSA, 1996). O homem é hospedeiro acidental do parasito e outras espécies de mamíferos (canídeos e roedores) são reservatórios. Os quais podem ou não mostrar manifestações clínicas devido a infecção (LAINSON; READY; SHAW, 1979).

A LV aparece como manifestação clínica mais grave da doença, podendo levar a óbito se não tratada. Esta é causada por espécies de *Leishmania* do complexo donovani (*L. donovani* e *L. infantum* no velho mundo e *L. infantum (chagasi)* no novo mundo). Sendo endêmica em

89 países, estima-se cerca de 500.000 casos novos, 50.000 mortes por ano e cerca de 350 milhões de pessoas em risco de contrair a doença. Em 2014 cerca de 90% dos casos de LV foram notificados em Bangladesh, Brasil, Índia, Sudão e Nepal (WHO, 2015).

LV é endêmica em 12 países nas américas, é classificado em três cenários epidemiológicos: países com transmissão esporádicas (Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Bolívia Guiana e México), países com transmissão controlada (Colômbia e Venezuela) e países com transmissão em expansão (Argentina, Brasil Paraguai)., de 2001 a 2014 um total de 48.720 casos da doença foi reportado, com um média anual de 3.480, com 96,42% desses casos sendo concentrados no Brasil. No país, houve um aumento progressivo no número de notificações de leishmaniose visceral. Em 1984, havia notificação de casos autóctones em 520 municípios e no ano de 2000, esse número aumentou para 930 (SIMPLÍCIO et al., 2002).

Em 1998, foi demonstrado que a maior incidência de LV encontrava-se no Nordeste, com 92% do total das notificações, seguida pelas regiões Sudeste (4%), Norte (3%) e Centro-Oeste (1%) (Vieira e Coelho, 1998). Em 2004, as maiores taxas de incidência (casos/100.000 habitantes) foram registradas em Tocantins (12,04), Piauí (11,05), Mato Grosso do Sul (10,09) e Maranhão (9,76) (DATASUS, 2006). Em 2015 os municípios com maior número de aso notificados são Teresina (291), São Luis (280) e Fortaleza (268) (DATASUS, 2015).

Nos últimos 20 anos, a incidência das leishmanioses no Brasil tem aumentado em praticamente todos os estados, sendo considerada uma das infecções mais importantes causadas por protozoários. Em 2014, um total de 3,624 casos de LV foram registrados nas regiões das Américas, com uma taxa de incidência de 2.42 casas para cada 100,000 habitantes, sendo que cerca de 95% desses casos foram notificados no Brasil (WHO, 2018)

### **Fatores clínicos**

A LV humana apresenta um período de incubação variável, com média de dois a oito meses, em alguns casos com até quatro anos de evolução (ZIJLSTRA; ALI; EL-HASSAN; EL-TOUM *et al.*, 1991). Acomete principalmente crianças, mas pode ocorrer em qualquer faixa etária e com discreta predominância do sexo masculino (ZIJLSTRA; EL-HASSAN, 2001) (BADARO; JONES; CARVALHO; SAMPAIO *et al.*, 1986; EVANS; TEIXEIRA; MCAULIFFE; VASCONCELOS *et al.*, 1992)

A doença é caracterizada por uma ampla variedade de manifestações clínicas variando

de assintomática, subclínica a LV clássica. Formas assintomáticas são caracterizadas pela infecção com ausência de sintomas aparentes. A Organização Mundial da Saúde (WHO) estima que infecções causadas por *Leishmania* são na sua grande maioria assintomáticas. A maioria dos indivíduos que apresentam evidência de exposição através do teste positivo de Montenegro ou da sorologia, relata não se lembrar de ter uma doença clínica. Na verdade, a maioria das pessoas infectadas não progredem para LV clássica e acredita-se que os doentes graves representam 10-20% do total de infectados (BADARO; JONES; CARVALHO; SAMPAIO *et al.*, 1986);(PEARSON; SOUSA, 1996). O surgimento da síndrome da imunodeficiência humana adquirida (AIDS) demonstrou a presença do parasito em indivíduos assintomáticos para LV, que, na condição de imunossupressão (contagem de células CD4 <200 células/mm<sup>3</sup>) desenvolveram a forma sintomática da doença.

Apresentações subclínicas são caracterizadas por pelo menos uma manifestação, como linfadenopatia ou sintomas leves (febre, tosse, diarreia, mal estar, leve hepatomegalia e, eventualmente, esplenomegalia) associados a um teste diagnóstico positivo (BADARO; JONES; CARVALHO; SAMPAIO *et al.*, 1986). A LV clássica é caracterizada principalmente pela tríade: febre irregular, palidez e esplenomegalia. Nesta fase os pacientes estão com o sistema fagocítico mononuclear amplamente infectado e o paciente se encontra em risco de vida com a progressão da doença após o período de incubação de semanas a meses. (ALVAR; CAÑAVATE; GUTIÉRREZ-SOLAR; JIMÉNEZ *et al.*, 1997)

Após instalada, a doença clássica geralmente se manifesta em três períodos, um inicial, outro de estado e um estágio final. O período inicial pode ser insidioso, marcado por febre baixa (até 38,5 °C), sem padrão estabelecido, hiporexia, astenia e palidez progressiva, podendo apresentar esplenomegalia discreta. Outros casos têm início abrupto, com febre alta, contínua e aumento considerável do baço (PRATA, 1957). O período de estado da doença apresenta amplo quadro clínico. Tem como sinal mais comum a febre, que tende a continuar baixa e sem periodicidade ou horários regulares. Em geral, o paciente mantém seu ânimo preservado, sem toxemia, apresentando astenia progressiva com a evolução do quadro. Pode ocorrer edema, especialmente de membros inferiores associado à hipoalbuminemia. Alguns indivíduos apresentam sinais de hemorragia, sendo a epistaxe o mais comum, seguido de gengivorragia e petéquias (HERWALDT, 1999; PEARSON; SOUSA, 1996; PRATA, 1957).

A esplenomegalia e a hepatomegalia, associadas à anemia e à febre, constituem um dos principais elementos clínicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral. O baço apresenta crescimento lento, acompanhando a evolução da doença. A maioria dos pacientes apresenta distensão abdominal, com tensão da parede, decorrente principalmente da

visceromegalia, mas podendo ser causada por distúrbios gastrointestinais. A diarreia é o sintoma mais frequente do aparelho digestivo, havendo relatos de dor abdominal, náuseas, vômitos ou mesmo obstipação. Pode também ser observada nesse período a tosse, seca ou produtiva, decorrente de uma pneumonite intersticial sendo, por vezes, o motivo que leva o paciente a procurar o serviço de saúde (PRATA, 1957; ZIJLSTRA; EL-HASSAN, 2001).

Sem intervenção correta, a doença progride para o período final onde o paciente apresenta caquexia, edema e agravamento dos sinais e sintomas descritos. É comum o surgimento de complicações bacterianas graves como pneumonia e sepse, podendo levar o paciente ao óbito (PRATA, 1957). Observando a evolução e o comportamento da doença em vários indivíduos e em diferentes regiões, pôde-se constatar que a LV não apresenta clínica uniforme. A importância de se estudar os mecanismos de patogenicidade em diferentes grupos populacionais, se torna essencial para o entendimento aprofundado dos processos fisiopatológicos da leishmaniose visceral.

---

### **Imunologia durante a Leishmaniose visceral e mecanismos de escape do parasito**

O mecanismo de infecção clássico é mediado pela picada de flebotomíneos infectado por *Leishmania* conduzindo para exposição assintomática ou leishmaniose grave em humanos. O primeiro passo no estabelecimento da infecção, se baseia no escape deste parasito da lise por fatores extracelulares, em especial o sistema complemento, um conjunto de proteínas solúveis que tem como função a lise de microrganismos estranhos. A forma promastigota metacíclica é capaz de impedir a inserção do componente final do complemento C5b-políC9, também conhecido como complexo de ataque a membrana (MAC) (PUENTES; DA SILVA; SACKS; HAMMER; JOINER, 1990).

Os anticorpos parecem exercer papel importante na interação inicial do hospedeiro com as formas promastigotas infectantes (NEVES, 2003). As moléculas de IgG, as fibronectinas, e o componente C3b do complemento, atuam na adesão das promastigotas infectantes aos macrófagos através de receptores para estas estruturas dentre eles o receptor para porção Fc das IgG (REY, 1991; NEVES, 2003). O parasito apresenta uma glicoproteína de superfície denominada gp63 que converte C3b em iC3b favorecendo a fagocitose, mediada por receptores do complemento como CR3 e CR1, em relação à lise pelo complemento. Este mecanismo favorece o parasito, pois após interiorizados por macrófagos são resistentes à proteólise e degradação no fagossomo (HERMOSO; FISHELSON; BECKER;

HIRSCHBERG; JAFFE, 1991) pois estas vias de internalização não ativam os mecanismos oxidativos leishmanicidas dos macrófagos (WRIGHT E SIVESTEIN, 1983).

O sistema complemento, neutrófilos, eosinófilos bem como altos níveis de anticorpos IgG, são encontrados atuando contra as formas amastigotas. Os polimorfonucleares são as primeiras células a migrarem ao sítio de infecção, atuando como células efetoras, internalizando as leishmanias (PEARSON et al., 1981; CHANG 1981). Os neutrófilos parasitados secretam quimiocinas, como por exemplo IL-8, relacionada com atração de mais neutrófilos no sítio de infecção (LAUFS et al., 2002).

*Leishmania* sp. são capazes de aumentar o tempo de meia vida de neutrófilos, para aproximadamente 2-3 dias, como o parasito é incapaz de multiplicar se nestas células, fazem com o objetivo de parasitar macrófagos com maior facilidade. Um que neutrófilos tem a capacidade de expressar sinais quimiotáticos como MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  que tem a capacidade de atrair monócitos/macrófagos para o sítio da infecção (MÜLLER; BISCHOF; SOMMER; LOHOFF *et al.*, 2003). Ao recrutar os macrófagos, estes reconhecem os corpos apoptóticos infectados e iniciariam o processo de fagocitose destes, por meio de reconhecimento de moléculas relacionadas a danos celulares, como fostatidil-serinas. Ao realizar a fagocitose de corpos celulares infectado e em apoptose, os macrófagos têm suas funções microbicidas/leishmanicidas silenciadas, desta forma representando um mecanismo de escape imune e conseqüentemente de estabelecimento e manutenção da infecção (McCONVILLE et al., 1992).

No curso da leishmaniose visceral ocorre hipergamaglobulinemia devido à grande produção de imunoglobulinas, especialmente as da classe IgG, entretanto, clinicamente, esta elevação da resposta humoral não se traduz em regressão da doença (NEVES, 2003). Pelo contrário, a intensa produção de imunoglobulinas é deletéria; os imunocomplexos na circulação podem ligar o complemento às células sanguíneas diminuindo sua meia vida. Além disso, podem estar associadas a fenômenos patológicos como trombocitopenia, glomerulonefrite e anemia imuno mediada (FEITOSA et al., 2000). MILES et al., (2005), demonstraram em camundongos BALB/c infectados com *L. major* que a administração passiva de IgG anti-leishmania resultou em aumento de lesões e de produção de IL-10, sugerindo o a suscetibilidade a infecção é associada o aumento dos níveis de IgG levando ao alto produção de IL-10, favorecendo a manutenção e replicação do parasito.

A imunidade celular é a principal responsável pelo controle da infecção, entretanto, o tipo de resposta imunológica direcionada pela produção de citocinas deve ser apropriado. Estudos de infecção com espécies visceralizantes de *Leishmania* (*L. donovani* e *L. infantum*)

têm ressaltado o fato que a resposta celular do hospedeiro frente a estes parasitos difere significativamente da infecção com *L. major*. Em modelos murinos, o paradigma Th1/Th2 é importante na determinação da gravidade da infecção por *L. major* (MIRALLES et al., 1994). Por outro lado, este quadro não é tão determinante da doença durante a infecção com *L. donovani* e *L. infantum*, onde a resposta protetora do tipo Th1 é suprimida por IL-10 e TGF- $\beta$ . *L. infantum* afeta diretamente o meio ativando TGF- $\beta$  latente, e ambas *L. donovani* e *L. Infantum*, suprimem as respostas de macrófagos ao IFN- $\gamma$  (revisto por MCMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004).

A imunidade protetora contra *L. donovani*, assim como contra as espécies que causam a leishmaniose cutânea, é dependente de uma resposta tipo Th1 direcionada por IL-12 e consequente produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , os quais resultam na indução da morte de parasitos por macrófagos via produção de reativos de nitrogênio e oxigênio. O papel da IL-4 e da resposta Th2, entretanto, é mais complexo que na leishmaniose cutânea. A produção diferencial de citocinas do tipo Th1 e Th2, por exemplo, não determinam a taxa de cura da leishmaniose visceral murina (revisto por BOGDAN et al., 1993).

Na leishmaniose visceral humana ativa, células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), exibem uma fraca resposta proliferativa a antígenos do parasito e falham na produção de IFN- $\gamma$  *in vitro* (SACKS et al., 1987; WHITE et al., 1992). Esta deficiência na produção de IFN- $\gamma$  parece promover a progressão da infecção para a doença fulminante (Carvalho et al., 1989). Embora pacientes não apresentem resposta cutânea à leishmania durante esta fase, uma forte resposta é observada de 6 a 12 meses após o tratamento (Costa et al., 1999). Em contraste, linfócitos de pacientes curados por terapia ou casos subclínicos, determinados por teste cutâneo, demonstraram uma forte resposta proliferativa e alta produção de IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-12 na estimulação com antígenos do parasito *in vitro* (CARVALHO et al., 1994).

A IL-12 induz a produção de IFN- $\gamma$  em camundongos infectados por Leishmania e em PBMCs de pacientes. Em indivíduos infectados, esta citocina aumenta a resposta Th1, restaura a resposta linfoproliferativa, produção de IFN- $\gamma$  e resposta citotóxica (GHALIB et al., 1995; Bacellar et al., 1996). Também diminui a apoptose espontânea ou induzida em PBMCs de pacientes. Esta citocina em combinação com antígeno de leishmania restaura a proliferação de PBMC de indivíduos com calazar com eficiência maior do que com uso de anticorpos monoclonais anti-IL-4 ou anti-IL-10, ou mesmo a combinação dos monoclonais (revisto por BARRAL-NETTO et al., 1998).

Uma forte evidência de que a citocina IFN- $\gamma$  está envolvida no controle da infecção

por *Leishmania* veio de um estudo longitudinal que avaliou a resposta linfoproliferativa e a produção dessa citocina por PBMCs de crianças vivendo em área endêmica para a doença. Foi observado que crianças infectadas por *L. infantum*, que apresentavam produção de IFN- $\gamma$  por PBMCs estimuladas com *Leishmania*, podiam controlar a infecção, no entanto, crianças cuja produção de IFN- $\gamma$  era fraca progrediram para a doença (CARVALHO et al., 1992). Apesar de que linfócitos de pacientes com leishmaniose visceral apresentem aumentada expressão de mRNA de IL-4 e que o soro destes pacientes apresente altos níveis de IL-4, não há evidência que a IL-4 esteja envolvida na modulação da resposta Th1 na leishmaniose humana (revisto por WILSON et al., 2005). Foi observado que adição de anticorpos monoclonais mAb contra IL-4 não restaura a resposta linfoproliferativa ou a produção de IFN- $\gamma$  em PBMCs estimuladas por *L. infantum* em pacientes com leishmaniose visceral. IL-4 também não suprime a resposta linfoproliferativa ou produção de IFN- $\gamma$  em indivíduos curados (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998). Desta forma, o proeminente papel da IL-4 observado em modelos murinos não é consistente com o que é observado na leishmaniose visceral humana.

A IL-10 parece ser a principal citocina inibidora de macrófagos em contraste com o IFN- $\gamma$ . Indivíduos com leishmaniose visceral apresentam aumento na expressão de mRNA de IL-10 na medula óssea e em células de linfonodos e altos níveis de IL-10 em sobrenadantes de PBMCs estimuladas por antígeno de *L. infantum* (D'OLIVEIRA et al., 1997). A adição de anticorpos monoclonais anti IL-10 restaura a resposta linfoproliferativa e a produção de IFN- $\gamma$  em PBMCs de pacientes com a doença (Hailu et al., 2005). O fato de que a IL-10 inibe o efeito da IL-12 na indução da produção de IFN- $\gamma$  em PBMCs estimuladas por *L. infantum* sugere que a IL-10 seja a principal citocina responsável pela progressão da doença visceralizante (BACELLAR et al., 1996).

Foi mostrado que a IL-10 bloqueia a ativação Th1 e consequentemente a resposta citotóxica pela supressão da produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ . A capacidade desta citocina de inibir a ativação de macrófago também diminui a capacidade destas células de matar o parasito (revisto por RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998). A medula óssea e células de linfonodos de indivíduos Sudaneses com leishmaniose visceral aguda, expressam simultaneamente transcritos de IL-10 e IFN- $\gamma$  e mRNA de IL-10, os quais diminuem após a resolução da doença (GHALIB et al., 1993). Várias populações de células expressam IL-10 durante a infecção por leishmania, incluindo células T regulatórias (Tregs) (BELKAID et al., 2002), células Th1 (STAGER et al., 2006; ANDERSON et al., 2007), células NK (MAROOF et al., 2008), macrófagos, células B (MAROOF et al., 2008) e células dendríticas (SVENSSON et al.,

2004). Entretanto, ainda não se sabe qual tipo de célula é responsável pela progressão da doença e persistência do parasito.

Em humanos, a dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura de PBMCs ativadas por antígenos de leishmania e clones de células-T, tem auxiliado na determinação do papel dos padrões de resposta imune Th1 e Th2 na infecção. Estudos na expressão tecidual de RNAm de IL-10 têm revelado seu papel na regulação de respostas de célula T e no envolvimento desta citocina na patologia da infecção por *L. donovani*. Entretanto, a leishmaniose visceral ativa também apresenta correlação com níveis elevados de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10 e IL-4. Após a cura, altos níveis de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 persistem, sugerindo uma coexistência de Th1 e Th2 em indivíduos com LV assim como nos curados (Caldas et al., 2005). Devido ao papel inibidor da IL-10 na ativação de macrófagos, altos níveis desta citocina podem representar um contrabalanço necessário a uma resposta imune extremamente polarizada, limitando o dano tecidual (TRINCHIERI, 2001). Outras citocinas como IL-13 (BABALOO et al., 2001) e TGF- $\beta$  (GANTT et al., 2003), têm sido observadas na leishmaniose visceral, entretanto seu papel biológico na modulação da resposta anti-leishmania ainda não está bem definido. Estudos em células T reguladoras, as quais produzem IL-10 e TGF- $\beta$ , podem ajudar no entendimento do papel do TGF- $\beta$ . Entretanto, é evidente que a sobrevivência do parasito é favorecida na conversão de TGF- $\beta$  latente em TGF- $\beta$  ativa por alguns fatores derivados do parasito (GANTT et al., 2003).

Mais recentemente foram descritas células do tipo Th17. Estas células produzem as citocinas IL-17 (Também chamada IL-17A), IL-17F, e IL-22. Dentre elas, a IL-17 tem sido mais estudada e é considerada a principal citocina efetora deste grupo de células. Células Th17 participam de respostas inflamatórias e possuem funções críticas na defesa do hospedeiro contra bactérias e fungos, principalmente aqueles encontrados em mucosas (AUJLA et al., 2007; AUJLA et al., 2008). A diferenciação *in vitro* de células Th17 requer a ação coordenada de múltiplas citocinas, incluindo TGF- $\beta$ , IL-6, IL-21, e IL-23 (BETTELLI et al., 2006; MANGAN et al., 2006; VELDHOEN et al., 2006; KORN et al., 2007; NURIEVA et al., 2007; ZHOU et al., 2007). Foi descrito que estas citocinas também são necessárias para a diferenciação de células Th17 *in vivo* em respostas protetoras a patógenos de mucosa ou reações inflamatórias (MANGAN et al., 2006; KORN et al., 2007; NURIEVA et al., 2007).

Stager e colaboradores (2006) observaram que células dendríticas de medula óssea de camundongos selvagens, estimuladas com LPS, têm efeito benéfico quando transplantadas em camundongos infectados por *L. donovani*. Este efeito benéfico, devido ao aumento da resistência e diminuição de carga parasitária, foi associado à diminuição de células T CD25<sup>-</sup>

FoxP3<sup>-</sup> IL-10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, e é dependente de produção de IL-6, necessária na diferenciação de células Th17. PITTA et al. (2009) mostraram que antígenos de *L. donovani* estimulam a diferenciação de células Th17 as quais passam a produzir IL-17, IL-22 e IFN- $\gamma$ . A análise de produção de citocinas por PBMCs de indivíduos que desenvolveram ou não o LV, durante um surto no Sudão, mostrou que IL-17 e IL-22 estão altamente e independentemente associadas com proteção à doença.

### **Imunogenética da leishmaniose visceral**

A capacidade do indivíduo de montar sua defesa imunológica contra a *L. infantum* é influenciada por diversos fatores como ambientais, nutricionais e genéticos (D'OLIVEIRA et al., 1997; MARZOCHI et al., 1999). Vários autores vêm tentando identificar fatores responsáveis pela causa da suscetibilidade à doença que ocorre em apenas uma fração da população exposta ao parasito (BUCHETON et al., 2003; JAMIESON et al., 2007; JERONIMO et al., 2007; MILLER et al., 2007).

Os primeiros estudos de suscetibilidade genética à leishmaniose visceral foram desenvolvidos em modelos experimentais, e desta forma foi identificado o *locus* lsh do cromossomo 1 murino, responsável pelo controle da rápida multiplicação de *L. donovani* em camundongos (BRADLEY et al., 1979). Este gene, também associado com a resistência inata a *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium bovis*, *M. lepraemurium* e *M. intracellulare*, foi identificado por clonagem posicional e renomeado como proteína macrofágica 1 associada à resistência natural (Nramp1). Nramp1, também denominado SLC11a1, é um transportador de cátions divalentes (Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>), que se localiza em endossoma e lisossomas maduros de macrófagos e atua em várias funções da célula (BLACKWELL et al., 2001).

Estudos investigando a susceptibilidade à LV no Sudão, mostraram que polimorfismos do gene Nramp1 estão associados à leishmaniose visceral (BUCHETON et al., 2003; MOHAMED et al., 2004). MOHAMED et al. (2003) demonstraram associação alélica com os marcadores 5'(GTn, 274C/T, 469+14G/C) e não com os 3' (D543N, 3'UTR TGTG, 3'UTR CAAA) do SLC11A1. Dados preliminares de um estudo no Brasil mostraram associação de leishmaniose visceral com os polimorfismos 274C/T e 469+14G/C (Revisto por BLACKWELL et al., 2009). Entretanto, estudos utilizando *genome-wide linkage studies* (GWLS), que se baseiam no mapeamento de regiões de suscetibilidade do genoma através do

uso de vários marcadores aleatórios, não foram encontradas associações sugestivas ou significantes no locus que inclui o *Nramp1* (BUCHETON et al., 2003B; JAIMESON et al., 2007; JERONIMO et al., 2007; MILLER et al., 2007).

Em relação ao locus HLA, estudos no Sudão e no Brasil falharam em associar genes HLA classe II (DR/DQ) e/ou classe III (LTA e TNFA) com LV (PEACOCK et al., 2002; BUCHETON et al., 2003). Estudos do tipo caso-controle no Irã (FAGHIRI et al., 1995) e Tunísia (MEDDEB-GARNAQUI et al., 2001), mostraram associação com genes classe I (A25) e classe II (DRB1\*15\*16 e DQB1\*0201), entretanto estes trabalhos foram realizados com baixo poder de análise. No Brasil, foram observadas associações de polimorfismos do gene do TNF- $\alpha$  (posição -308) quando casos de leishmaniose visceral foram comparados com indivíduos positivos para o teste cutâneo de hipersensibilidade tardia (DTH+). Neste estudo foi observado um viés na transmissão de alelos do TNF- $\alpha$  de pais heterozigotos para filhos positivos para LV (KARPLUS et al., 2002). Para a região HLA também não foi possível observar associações genéticas positivas em GWLS (BUCHETON et al., 2003; JAMIESON et al., 2007; JERONIMO et al., 2007; MILLER et al., 2007).

Alguns estudos têm investigado a região cromossômica 5q23-q33, onde se localizam o grupo de genes associados com resposta Th2. Mohamed et al. (2003) mostraram associação entre marcadores IL-4RP1 e IL-4RP2 com infecção no Sudão. No Brasil, não foram observadas associações para IL-4, entretanto, associações independentes nos loci LECT2 e TGFBI com positividade para teste de hipersensibilidade tardia (DTH), foram observadas. Também foram detectadas associações independentes entre DTH- e o SNP rs2070874 do gene da IL-4 e o SNP rs30740 localizado entre LECT2 e TGFBI (JERONIMO et al., 2007).

Na leishmaniose murina, a polarização da resposta adaptativa entre Th1 e Th2 está associada com a resistência e suscetibilidade em diferentes tipos de camundongos. A região do cromossomo 11 murino, que está em sintonia conservada com a região 5q23-q33 humana e carrega os genes da IL-4 e outros do padrão Th2, está ligada à visceralização de *L. major* em camundongos suscetíveis BALB/c (Roberts et al., 1996). Em relação aos outros genes da região, TGFBI codifica uma queratopielina que é similar a outras proteínas de adesão e é expressa em vários tecidos, também contribui com o perfil de DTH (WEIRATHER; DUGGAL; NASCIMENTO; MONTEIRO et al., 2017).

Utilizando GWLS em famílias afetadas no Sudão, Bucheton et al. (2003) encontraram marcadores na região cromossômica 22q12. Continuando o estudo nessa mesma população, observou-se que um polimorfismo no receptor- $\beta$  da IL-2 (G245R) é o principal responsável pela associação (BUCHETON et al., 2007). Outros genes candidatos da região incluem C4,

que codifica a subunidade p40 da NADPH oxidase, CSF2RB codificando o receptor do Fator de estimulação de colônias de macrófago-granulócito (GM-CSF) e LIF codificando o Fator Inibitório de Leucemia.

MILLER et al. (2007), trabalhando também no Sudão, encontraram como principais loci de suscetibilidade D1S1568 em 1p22 e D6S281 em 6q27. Dados de associações alélicas na Índia e no Brasil identificaram o gene DLL1 que codifica o Ligante de Notch Delta-1 como o principal gene em 6q27 (Revisto por Blackwell et al., 2009). Células apresentadoras de antígenos utilizam a sinalização por Notch para promover a diferenciação de células T. DLL1 em células dendríticas interagem com Notch3 de células T CD4+ para induzir o fenótipo Th1 (MAEKAWA; TSUKUMO; CHIBA; HIRAI *et al.*, 2003) e DLL1 pode alterar a suscetibilidade a *L. major* em camundongos BALB/c por promover resposta Th1 (MAEKAWA; TSUKUMO; CHIBA; HIRAI *et al.*, 2003).

GWLS realizado no Brasil (Jamieson et al., 2007) revelou evidência de associações nas regiões cromossômicas 6q27 e 17q21.3. O pico de 6q27 coincide com o pico observado no Sudão. O pico de 17q21.3 pertence a um grupo de genes de resposta imune, dos quais, CCL1 e CCL16 estão mais próximos dos marcadores associados à leishmaniose visceral (Revisto por BLACKWELL et al., 2009).

Os resultados de trabalhos com genes candidatos de GWLS sugerem diferenças geográficas e populacionais dos genes que controlam a suscetibilidade a leishmaniose visceral. Isto pode refletir na adaptação local do parasito ao background genético do hospedeiro, diferença na pressão seletiva levando a diferentes variantes funcionais. O estudo da análise de vários polimorfismos genéticos em outras regiões endêmicas para a doença é de fundamental importância para o melhor entendimento dos mecanismos patogênicos.

Diante do apresentado e com bases em estudos prévios realizados por nosso grupo (ainda não publicados, apresentados em resultados), onde foi determinado a frequência elevada do polimorfismo rs1801274 no gene *FCGR2A*. Estes responsáveis pela interação parasito hospedeiro com as diferentes formas do parasito do gênero *Leishmania*. Analisamos a influência desse polimorfismo em macrófagos infectados *in vitro* em grupos com diferentes variantes alélicas deste receptor.

A família de receptores Fc de imunoglobulinas é expressa na superfície de muitas células do sistema imunológico, dentre elas monócitos e macrófagos, o que permite a ligação entre mediadores da resposta imune adaptativa com a resposta inata. O FCGR2A (CD32), é um receptor considerado de baixa afinidade que apresenta capacidade para se associar a diferentes subclasses de IgG. Porém a afinidade por essas proteínas é alterada por um

polimorfismo que gera variantes desse receptor. Uma substituição de base simples na posição 131 da proteína, altera uma histidina por uma arginina, fazendo com que a proteína tenha menor afinidade para molécula de IgG2 e IgG3. A variante H131 se liga de forma eficiente as imunoglobulinas enquanto a variante R131 perde afinidade por IgG e ganha para a CRP. (SCHULDT; ESSER; EVANS; MAY *et al.*, 2010; WARMERDAM; VAN DE WINKEL; VLUG; WESTERDAAL; CAPEL, 1991)

A CRP é um dos elementos da família das pentraxinas, caracterizada por uma estrutura complexa formada por um disco pentâmerico homólogo, dependente de cálcio para sua associação com seus ligantes. Esta proteína compartilha de funções biológicas com moléculas de IgG, como opsonização, ativação de sistema complemento, e tem demonstrado potencial de ligação para promastigotas do parasito de *Leishmania* (BEE; CULLEY; ALKHALIFE; BODMAN-SMITH *et al.*, 2001). Foi demonstrado que a opsonização de *L. donovani*, por CRP promove aumento de internalização do parasito por macrófagos (CULLEY; HARRIS; KAYE; MCADAM; RAYNES, 1996), e sua conformação nativa promove o mecanismo de explosão respiratória em macrófagos (MIYAGAWA; OKAMOTO; NAKANO, 1988).

Enquanto associado a outros receptores a CRP contribui para produção de citocinas, sugerindo um possível potencial pro inflamatório (MIYAGAWA; OKAMOTO; NAKANO, 1988). Baseado no acima explicado o presente trabalho tem como objetivo avaliar *in vitro* como a interação de diferente isoformas do receptor FcγRIIa com o parasito *Leishmania infantum*, na presença de diferentes opsoninas, modula a função de macrófagos derivados de células aderentes do sangue periférico.

## 9. JUSTIFICATIVA

Os estudos de genética em indivíduos de área endêmica para uma doença infecciosa e parasitária permitem a descoberta de fatores de susceptibilidade/resistência de grande importância para determinar novos alvos que possam ser manipulados para vacinas e quimioterapias. A resposta imunológica é um dos fatores de extrema importância no combate a Leishmaniose. Portanto a identificação de alterações genicas que possam modular componentes da resposta imune em resposta ao parasito é crucial, e pode auxiliar no entendimento e no processo de resolução da infecção. Vários estudos para determinar essas associações com a leishmaniose visceral têm sido realizados, trazendo dados interessantes, mas muitas vezes contraditórios. Até o momento, estudos em imunogenética conduzidos em populações expostas à *L. donovani* no Sudão, e *L. infantum* nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, têm apontado diferenças de padrões de suscetibilidade/resistência genética entre as populações. Isto provavelmente se deve à diversidade genética tanto parasitária quanto do hospedeiro humano entre as regiões. Fatores que alteram de forma significativa a resposta imune montada diante do parasito. Desta forma, estudos funcionais focados em alterações genotípicas em componentes da resposta imunológica, se colocam como importante ferramenta para o melhor entendimento de mecanismo que estão associados à suscetibilidade/resistência nas populações de área endêmica.

## 10. OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* se os polimorfismos afeta a capacidade fagocitocítica, produção de citocinas e óxido nítrico em macrófagos cultivados em diversas condições (sem estímulo, na presença de promastigotas de *L. infantum*, na presença de promastigotas opsonizados por soro de indivíduos em fase aguda da doença, na presença de promastigotas opsonizados por CRP e na presença de LPS) de voluntários saudáveis com diferentes genótipos para o polimorfismo do genes do receptor FcγRIIA. Afim de caracterizar o perfil imunológico associado as alterações genotípicas.

### 10.1 ... Objetivos específicos

- 1- Avaliar a distribuição genética do polimorfismo rs1801274 H131R (A/G) em indivíduos aparentemente saudáveis não procedentes de área endêmica para a leishmaniose visceral humana
- 2- Comparar os níveis de IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  IL-8 e NO produzidos por macrófagos derivados de sangue periférico de indivíduos saudáveis com os diferentes genótipos do polimorfismo supracitado.
- 3- Avaliar o perfil de fagocitose de macrófagos derivados de sangue periférico de indivíduos saudáveis, com os diferentes genótipos do polimorfismo descrito anteriormente.

## 11. MATÉRIAS E METODOS

### 11.1 ... Casuística

O trabalho foi realizado após a aprovação do projeto no comitê de ética e pesquisas em seres humanos, com número de protocolo CAAE: 58301516.8.0000.5154. Todos os indivíduos participantes autorizaram a coleta do material utilizado diante a apresentação do termo de consentimento livre e esclarecido, e assinatura do mesmo pelos voluntários.

A amostra estudada foi composta de 69 indivíduos saudáveis, que no momento do estudo residiam em Uberaba e possuíam entre 20 e 40 anos de idade. Foram incluídos apenas indivíduos que não eram oriundos de área endêmica. Os indivíduos foram classificados como clinicamente saudáveis e não apresentavam histórico de sorologia positiva pra Leishmanioses ou outras comorbidades semelhantes.

Como não ocorrem alterações genótípicas ao decorrer da idade, é possível realizar estudos genéticos utilizando grupos com diferentes faixas etárias. No entanto foi adota uma faixa etária devido a alterações que possam ocorrer em proteínas relacionadas a resposta imunológica, tais proteínas sofrem diferentes graus de glicosilação e de incorporação de outras radicais na cadeia lateral das proteínas. Desta forma minimizando as alterações no repertório imune devido a exposição a infecções previas devido ao tempo de exposição proporcionado a indivíduos com maior faixa etária.

### 11.2... Cultivo das formas promastigotas de *Leishmania infantum*

A cepa MCER/BR/79/M6445 de *L. infantum*, isolada de mamífero do gênero *Cercopithecus* (Carnívora) no Brasil em 1979, recebendo o código de identificação do laboratório do Instituto Evandro Chagas (IEC), foi cultivada em meio Schneider's complementado com soro fetal bovino inativado a 20%, piruvato de sódio a 1%, Lglutamina a 1%, cloreto de cálcio 750mg/l e gentamicina 40µg/ml. O meio complementado foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm. Os parasitos foram cultivados em frascos plásticos de 25 cm<sup>2</sup> a 26°C, e os repiques realizados a cada 48/72 horas.

### **11.3... Fixação de marcação das promastigotas de *Leishmania infantum***

No fim da fase exponencial, parasitos foram coletados das garrafas de cultura, transferidos para um tubo plástico cônico de 50 ml e então centrifugados para ocorrer a precipitação e formação de um pellet de parasitos. Após essa etapa foram ressuspensos em salina estéril e lavados por duas vezes através de centrifugação. Em seguida, os parasitos foram ressuspensos, fixados em formol a 4% e, armazenados a 4°C até a data de uso.

Marcação dos parasitos: A suspensão de *L. infantum* fixadas na solução de 4% de formaldeído, foi centrifugada a 800G durante 30 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensado em tampão Bicarbonato salino 0,05M/015 de NaCl. Para a correta lavagem das amostras, esse passo foi repetido 3 vezes. Após a última centrifugação, o pellet foi ressuspensado em tampão bicarbonato salino contendo 100µg/ml de FITC e incubado a 4°C *overnight*.

Após a incubação a amostra foi lavada por centrifugação nas condições supracitadas e ressuspensada em PBS 1X e analisado sobre lâmina e lamínula para observar a marcação.

### **11.4... Purificação da Proteína C reativa**

Amostra de soro de indivíduos com altas concentrações de CRP foram coletados e usados para o preparo de um pool, com uma concentração média de 254,2 mg/dL dosada com uso da técnica de turbidimetria. O pool de soro rico em CRP foi incubado com uma solução contendo anticorpos anti -CRP em partículas de látex durante uma 1 hora com agitação constante para que ocorresse a interação e associação dos anticorpos com CRP presente no soro. Ao final da incubação a solução foi centrifugada e ocorreu a formação de um pellet contendo o complexo formado entre partículas de látex-CRP humana. O pellet foi ressuspensado em solução de TrisHCl com pH 5 e incubado durante 15 minutos para promover a quebra da associação entre o complexo Latex anti CRP-CRP humana, ao fim da incubação a solução filtrada em filtros de seringa 0,22µm, com a finalidade de purificar a CRP das demais partículas presentes na solução inclusive o Latex-anti CRP. O filtrado teve então o pH acertado para 7 e

foi feito a dosagem de CRP por Kit diagnóstico utilizando a metodologia de turbidimetria, onde é reconhecido e quantificado apenas CRP na sua conformação estrutural pentâmerica, portanto mantida a sua atividade biológica.

### **11.5... Purificação das Imunoglobulinas G do soro de indivíduos positivos para leishmaniose visceral**

Soro de pacientes positivos para leishmaniose visceral, fase aguda e crônica, foram coletados e usados para o preparo de um pool de soros ricos em imunoglobulinas G (IgG) específicas para *L. infantum*. Esse material foi incubado com proteína A (ProtA) associada a polímero durante 1 hora para que ocorresse a interação e associação dessa proteína com a região Fc das IgGs. Após a incubação, o complexo ProtA-IgG, foi centrifugado e ocorreu a formação de um pellet no fundo do tubo contendo o complexo de interesse. O pellet foi ressuspensionado em TrisHCl com pH 3,5 para desfazer associação do complexo ProtA-IgG. Em seguida, a solução foi incubada por 15 min, centrifugada, e o sobrenadante contendo apenas as IgGs foi coletado e transferido para um novo tubo e o pH acertado para 7.

A solução foi armazenada a 4°C até a data de uso.

### **11.6... Oponização das formas promastigotas**

**Protocolo 1 de oponização:** culturas de *L. infantum* no final da fase exponencial de crescimento, após fixação em formaldeído e marcadas com isotiocinato de fluoresceína (FITC), foram incubadas com 5µg/mL de CRP previamente purificada, em meio de cultura durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Após o período de incubação foram lavadas para retirada do excesso de proteínas que não se ligaram a superfície do parasito.

**Protocolo 2 de oponização:** cultura de *L. infantum* no final da fase exponencial de crescimento, após fixação e marcação (conforme descrito acima), foram incubadas com IgG antígeno específica na concentração de 1:800 (concentração sub-aglutinante) em meio de cultura durante 1 hora a TA. Após o período de incubação, foram lavadas para retirada das imunoglobulinas que não se ligaram a superfície do parasito.

**Protocolo 3 de opsonização:** cultura de *L.infantum* (conforme descrito acima), incubada com CRP e IgG antígeno específica na concentração 5µg/mL e 1:800, respectivamente, em meio de cultura durante 1 hora à TA. Após o período de incubação foram lavadas para retiradas de CRP e imunoglobulinas que não se ligaram a superfície do parasito.

### **11.7... Extração de DNA e Discriminação alélica para rs1801274 do FcgRIIa**

Para extração de DNA, foram coletados aproximadamente 5 ml de sangue periférico dos voluntários desse estudo, após a assinatura do termo de consentimento livre esclarecido, em tubos de coleta a vácuo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anti-coagulante. A extração foi realizada com Kit comercial Wizard genomic purification (PROMEGA), de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a extração, o DNA foi quantificado utilizando o NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids, e ajustada a concentração pré-estabelecida de 4ng a fim de prosseguir para o protocolo de genotipagem alélica com uso de sondas Taqman para o rs1801274 (Thermofisher) de acordo com as condições estabelecidas pelo fabricante.

### **11.8... Isolamento de macrófagos derivados de monócitos de sangue periférico**

As células mononucleares do sangue periférico foram separadas por gradiente de densidade utilizando-se Ficoll-Hystopaque (PHAMACIA-SUÉCIA), um polímero hidrofílico de sacarose indicado para separar células de densidades semelhantes e tamanhos diferentes, sem que ocorra dano à integridade funcional e morfológica das membranas. Cerca de 20 mL de sangue periférico coletados em tubos contendo Heparina Sódica foram cuidadosamente colocados sobre 10mL de a solução de Ficoll-Hystopaque em tubos plásticos cônicos de 50mL (SARTEDT-EUA). Os tubos foram centrifugados a 400xG por 30 minutos, a 22°C, em centrífuga refrigerada. Ao final da centrifugação cerca de 100µl do plasma foram retirados e transferido para tubos Eppendorf para a realização de outros estudos paralelos. O anel de células formado na interface Ficoll-plasma foi coletado com pipeta de 5mL e transferido para outro tubo de fundo cônico de 15mL (SARTEDT-EUA). O excesso de Ficoll foi removido, as células

foram lavadas por três vezes, com 10mL de meio RPMI incompleto (GIBCO-EUA) por centrifugação a 200xg a 4°C por 15 minutos. A quantidade de células obtidas foi determinada por contagem em câmara de Neubauer e o volume do meio adicionado foi ajustado para se obter  $2 \times 10^6$  células/mL. As células foram finalmente ressuspensas em RPMI completo, contendo 50mM de HEPES (GIBCO-EUA), 10% de soro fetal bovino inativado, 2mM de L-glutamina (GIBCO-EUA), 40µg/mL de gentamicina (ARISTON-BRASIL). Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis utilizando-se capela de fluxo laminar.

As células mononucleares foram plaqueadas em placas de cultura de 48 poços (SARTEDT-EUA), e após cerca de 3 a 4 horas foram lavadas através de retirada e reposição do meio de cultura nos poços para retirada de células não aderentes. As células que permaneceram aderidas foram cultivadas durante 7 dias para diferenciação de monócitos em macrófagos derivados de sangue periférico.

### **11.9... Infecção *in vitro***

No sexto dia após plaqueamento e adesão das células nas placas de cultura de 48 poços (SARTEDT-EUA), foi analisado a morfologia das células que permaneceram aderidas e evidenciamos células dotadas de prolongamentos característicos de macrófagos humanos em cultura. Dessa forma, promastigotas de *L. infantum* nas condições de opsonização pré-estabelecidas, na ausência de LPS e na presença de 1µg de LPS, foram adicionadas aos poços. Todo o experimento foi realizado em duplicata.

### **11.10 . Coleta de sobrenadantes e dosagens de óxido nítrico e citocinas**

Ao término da cultura, foram coletados os sobrenadantes e transferidos para placas devidamente identificadas para posterior dosagem de citocinas e óxido nítrico, as células de uma das duplicatas foram armazenadas em RNA later (Sigma-Aldrich) para análises futuras e os demais poços prosseguiram para análise da taxa de fagocitose.

### 11.11 . Análise da taxa de fagocitose

A análise de taxa de fagocitose foi realizada através da contagem do número de macrófagos que apresentavam fluorescência verde difusa no citoplasma, após a infecção *in vitro* descrita no item acima. Característica que tais células assumiam após internalizar as promastigotas de *L. infantum* marcadas com isotiocinato de fluoresceína (FTIC).

Foram contados 5 campos diferentes do poço de cultura ou até atingir 100 células para realizar do percentual de células que realizaram fagocitose. O poço foi previamente analisado, percorrendo toda a sua extensão em menor aumento, para asseguramos que a fagocitose ocorreu de forma homogênea no poço de cultura.

### 11.12 . Dosagem de citocinas e oxido nítrico

A produção de IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12, IL1 $\beta$  e IL-8, no sobrenadante de cultura foi realizada pela técnica de *Cytometric Bead Array* (CBA), seguindo as especificações do fabricante (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) as amostras foram incubadas com beads contendo anticorpos de capturas e com anticorpos de detecção durante aproximadamente 4 horas, posteriormente foram lavadas e ressuspendidas para leitura no citometro de fluxo BD FACS Calibur. As análises estatísticas da produção de citocinas foram realizadas sobre o valor do delta (valor de produção dos macrófagos sem estimulação retirado do valor de produção dos macrófagos nas condições específicas) em cada indivíduo. A fim de observar a modulação positiva ou negativa de produção de acordo com condição de cultura.

Para a determinação de oxido nítrico (NO) foi realizado a Reação de Griess como descrito por Sá-Nunes e colaboradores, 2007, na qual é feita a quantificação de nitrito no sobrenadante de cultura de macrófagos como parâmetro indireto da produção de NO. Para tanto 50 $\mu$ l do sobrenadante de cultura dos macrófagos, foi então distribuído em placas de 96 poços e

seguida da adição de 50µl da solução de revelação na diluição de 1:1 das soluções A e B (A: 1 % sulfamilamida em 5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e B: 0,1% NEED). Para a quantificação de NO, a absorbância foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 554nm. Os resultados foram calculados a partir de uma curva-padrão (NaNO<sub>2</sub>) e expressos em µM.

### **11.13 . Análise estatística**

Em todas as variáveis foram testadas distribuição normal e variância homogênea. O teste de D'Agostino-Pearson foi utilizado para avaliar a normalidade de todas as variáveis. Nos casos de distribuição não gaussiana de dados, utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon para análise de variáveis pareadas. As comparações múltiplas como mais de uma família de variáveis relativas às medianas de valores para mais de dois grupos foram feitas usando o teste não paramétrico de Twoway Anova seguido pelo teste de Tukey. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (5%). A análise estatística foi realizada utilizando o software Graphpad Prism (GraphPad Software 6.0, La Jolla, CA, EUA).

## 12. RESULTADOS

### 12.1... FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO RS1801274 NA CIDADE DE PARACATU, MINAS GERAIS BRASIL (resultados compartilhados com projeto anterior do grupo)

Com o objetivo de entender se existe associação entre o polimorfismo e a doença, foi analisada a distribuição genotípica em indivíduos controle e afetados. Dentre os afetados 7 (9,3%) foram homocigotos para o alelo A, 45 (60,0%) heterocigotos e 23 (30,7%) homocigotos para o alelo G. O grupo controle apresentou 21 (16,7%) indivíduos com genótipo AA, 53 (42,1%) com o genótipo AG e 52 (41,3%) com o genótipo GG. Houve uma maior frequência de indivíduos heterocigotos no grupo afetados em relação ao grupo controle ( $\chi^2$ :  $p=0,0421^*$ ) e pode-se observar que o genótipo AG se mostrou associado à doença quando comparado ao GG pois apresentou valor de Odds ratio com intervalo de confiança maior que 1 (ORAG x GG=1,9 – IC=1,021 – 3,610; ORAG x AA=2,6 – IC=0,991 – 6,543) (Tabela 1).

Polimorfismo		Afetados	Controles	Total	$\chi^2$ , p
<b>FCGR2A(His131Arg) rs1801274</b>	<b>AA</b>	7 (9,3%)	21 (16,7%)	28 (13,9%)	<b>0,0421*</b>
	<b>AG</b>	45 (60,0%)	53 (42,1%)	98 (48,8%)	
	<b>GG</b>	23 (30,7%)	52 (41,3%)	75 (37,3%)	
	<b>A</b>	39,3%	37,7%	38,3%	0,3880
	<b>G</b>	60,7%	62,3%	61,7%	

NOTA.  $\chi^2$ , P referente aos grupos Afetados e controles

\* ORAG x GG=1,9 – IC=1,021 – 3,610; ORAG x AA=2,6 – IC=0,991 – 6,543 (dados não publicados oriundo do trabalho de tese de doutorado realizado por nosso grupo)

## 12.2... ESTUDO FUNCIONAL

Para determinação do grupo de estudo os indivíduos foram genotipados e agrupados de acordo com os genótipos como mostra a figura abaixo. Os pontos em azul representando os indivíduos homocigotos para o alelo 2 (GG), em verde os heterocigotos (AG) e em vermelho os indivíduos homocigotos para o alelo 1 (AA).

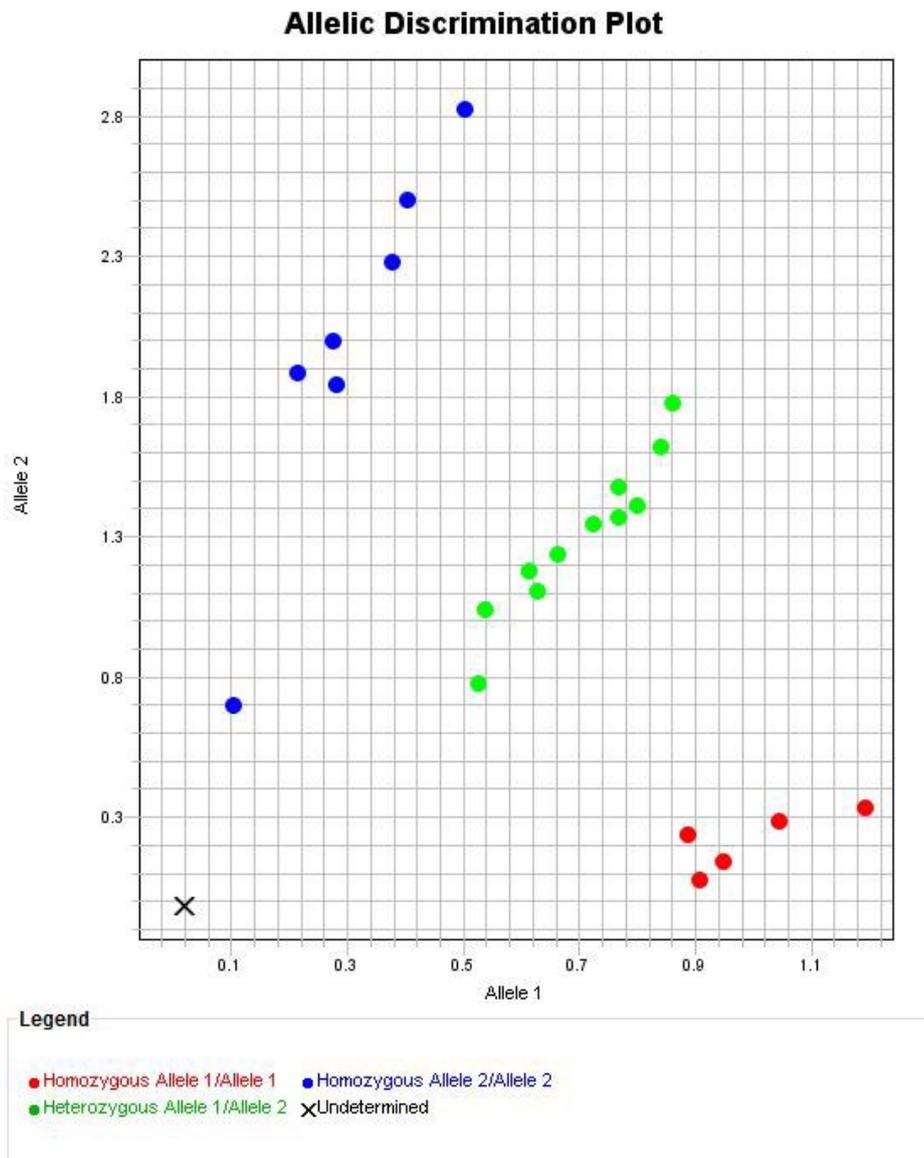


Figura 2: Plot de discriminação gerado pelo aparelho de PCR em tempo real Stepone. Os pontos azuis representam indivíduos homocigotos para alelo 2 (genótipo GG), os pontos verdes os heterocigotos (AG) e em vermelhos homocigotos para alelo 1 (AA).

### Frequência genotípica e alélica do polimorfismo do gene *FCGR1A* em indivíduos do estudo funcional

Foi estudado o polimorfismo rs1801274 do gene *FCGR1A* em indivíduos clinicamente saudáveis. O genótipo mais frequente foi o AG (52,2%), seguido de GG (29,9%) e o menos frequente o AA (17,9%) (Tabela 2). A análise mostrou frequência aumentada do genótipo AG dentro do grupo estudado, assim como na população estudada na área endêmica demonstrada na tabela acima

<b>Polimorfismo</b>	<b>Genótipo/Alelo</b>	<b>Indivíduos</b>
<b>FCGR2A(H131R) Rs1801274</b>	<b>AA (H/H)</b>	12 (17,9%)
	<b>AG (H/R)</b>	35 (52,2%)
	<b>GG (R/R)</b>	20 (29,9%)
	<b>A</b>	44,03%
	<b>G</b>	55,97%

Tabela 2-Distribuição genotípica e frequências de alelos em indivíduos do estudo funcional para o polimorfismo H131R do gene *FCGR1A*.

### 12.3 ... Avaliação da taxa de fagocitose

Após o procedimento de diferenciação de macrófagos derivados do sangue periférico e infecção realizada *in vitro* como promastigotas de *L. infantum*, foi analisada a taxa de fagocitose, através de contagem de porcentagem de macrófagos que realizaram fagocitose. Isso foi possível devido a marcação dos parasitos com FITC segundo o protocolo descrito em matérias e métodos. Macrófagos com marcação verde difusa no citoplasma fagocitaram e processaram as promastigotas de *L. infantum*. (Figura 3)

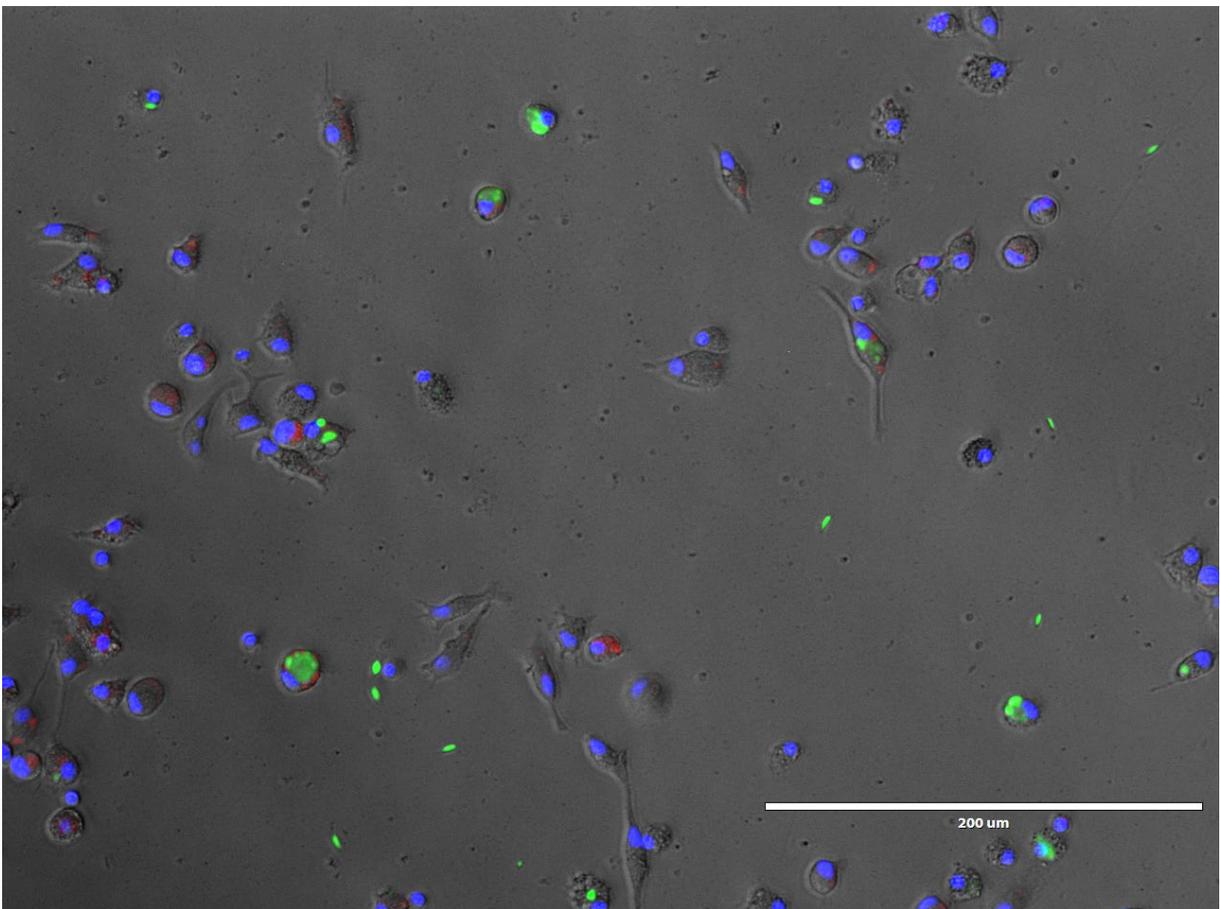


Figura 3: Demonstração da contagem de macrófagos que realizaram fagocitose de promastigotas marcadas com FITC

#### 12.4... Comparação da taxa de fagocitose em condições distintas de opsonização

A porcentagem de macrófagos que fagocitaram *Leishmania* foi avaliada sem a condição de opsonização, opsonizadas com IgG purificada, com CRP, ou com ambas as condições de opsonização e com soro rico em CRP depletado (SCRIP) de IgG. Ainda, a fagocitose foi avaliada em macrófagos estimulados ou não por LPS.

Macrófagos de indivíduos com o genótipo H/H e H/R fagocitam com maior intensidade quando reconhecem *leishmania* opsonizadas com IgG anti-*leishmania*, quando comparado com os genótipos R/R na condição de cultura onde as *leishmania* foram opsonizadas com IgG específicas. Não houve diferença significativa quando comparado macrófagos do indivíduo H/H e H/R. Entretanto, quando foi avaliado a taxa de fagocitose por macrófagos estimulados com o LPS indivíduos H/H, apresentaram taxa de fagocitose significativamente superior aos indivíduos H/R e R/R (figura 4 C).

Quando comparamos a taxa de fagocitose, na condição em que os parasitos foram opsonizados com CRP, houve também uma variação na taxa de fagocitose quando comparamos grupos com diferentes genótipos. Diferente do observado com opsonização com IgG, o grupo R/R, apresentou uma taxa de fagocitose significativamente maior quando comparado aos outros dois genótipos, sendo esse fenômeno observado apenas nos macrófagos estimulados com LPS. Esse efeito foi observado utilizando duas fontes de CRP, ela purificada, ou soro humano depletado de IgG. Esta observação evidencia a ação efetiva da CRP purificada como descrito na secção de matérias e métodos (figura 4 B, D).

A taxa de fagocitose de *Leishmanias* não opsonizadas foi semelhante nos três genótipos analisados, independente da estimulação com LPS (figura 4A). Da mesma forma um ganho homogêneo dos três genótipos foi observado quando as duas formas de opsonização foi utilizada (figura 4 E).

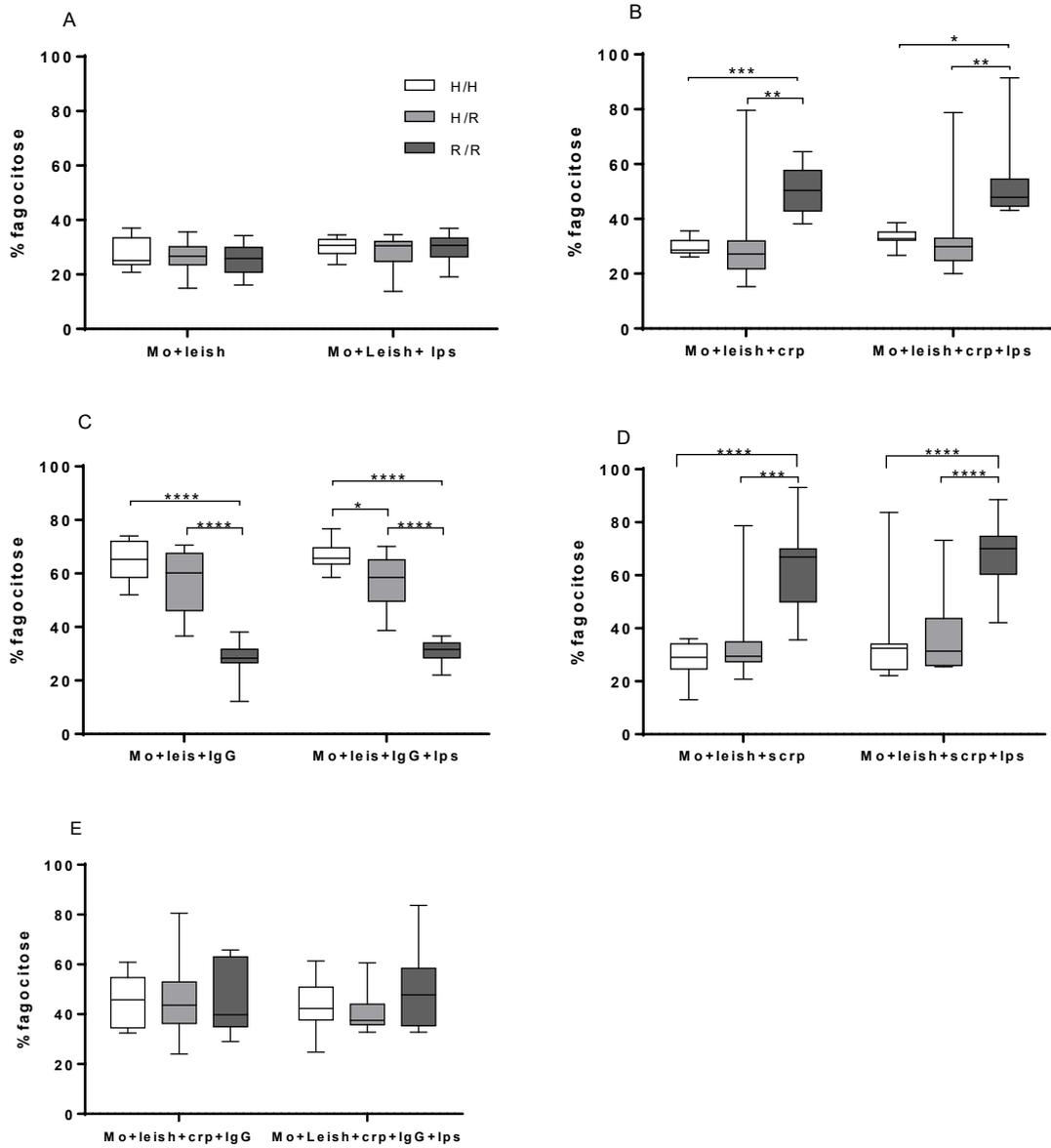


Figura 4: Porcentagem de fagocitose de *L. infantum* por macrófagos de indivíduos com diferentes genótipos para os polimorfismos H/R 131 do gene FCGR1A, de acordo com as condições estabelecidas nas legendas \*Tway Anova significativo  $p < 0,05$ .

## 12.5... Análise da produção de citocinas

### Análise da produção de IL-10 intergenotípica, entre condições distintas de opsonização

Os níveis de produção de IL-10, 24 horas em cultura após a infecção *in vitro* foram avaliados sem a condição de opsonização, opsonizadas com IgG purificada, com CRP e com ambas as condições de opsonização. A produção desta citocina foi comparada entre os diferentes genótipos.

Foi observado uma tendência no aumento na produção desta citocina nos macrófagos de indivíduos H/R em comparação com o grupo R/R, na condição de infecção que continha apenas o *Leishmania* e estimulação com LPS embora o resultado não tenha sido significativo. Quando comparamos os mesmos grupos na condição em que os macrófagos foram apenas estimulados com LPS o grupo H/R demonstra uma produção significativamente maior quando comparado ao grupo R/R (como demonstrado na figura 5A)

A condição de opsonização com CRP não apresentou nenhuma alteração na produção desta citocina, quando a mesma condição é realizada com presença de LPS os níveis de IL-10 não sofrem variações significativas em nenhum dos grupos (figura 5 B). Ao contrário do que acontece quando os mesmos grupos são estimulados apenas na presença apenas de LPS, sugerindo uma possível modulação negativa provocada pela infecção por parasitos opsonizados com CRP.

De acordo com os dados encontrados, observamos que ocorre um aumento de produção IL-10 por macrófagos dos indivíduos pertencentes ao grupo H/R infectados *in vitro* por *L.infantum* opsonizada com IgG quando comparado com o grupo RR, isso só foi evidenciado com os macrófagos estavam pré estimulados com LPS (figura 5C), o mesmo resultado foi observado com macrófagos de indivíduos H/R não infectados que foram estimulados com LPS.

As demais condições de cultura que continha opsonização CRP-IgG combinado, e soro CRP (SCRIP) não foram observados ganho significativo na produção desta citocina, nem mesmo com estimulação dos macrófagos com LPS. Portanto pode estar ocorrendo inibição de produção desta citocina promovido pela infecção *in vitro* como já destacado acima.

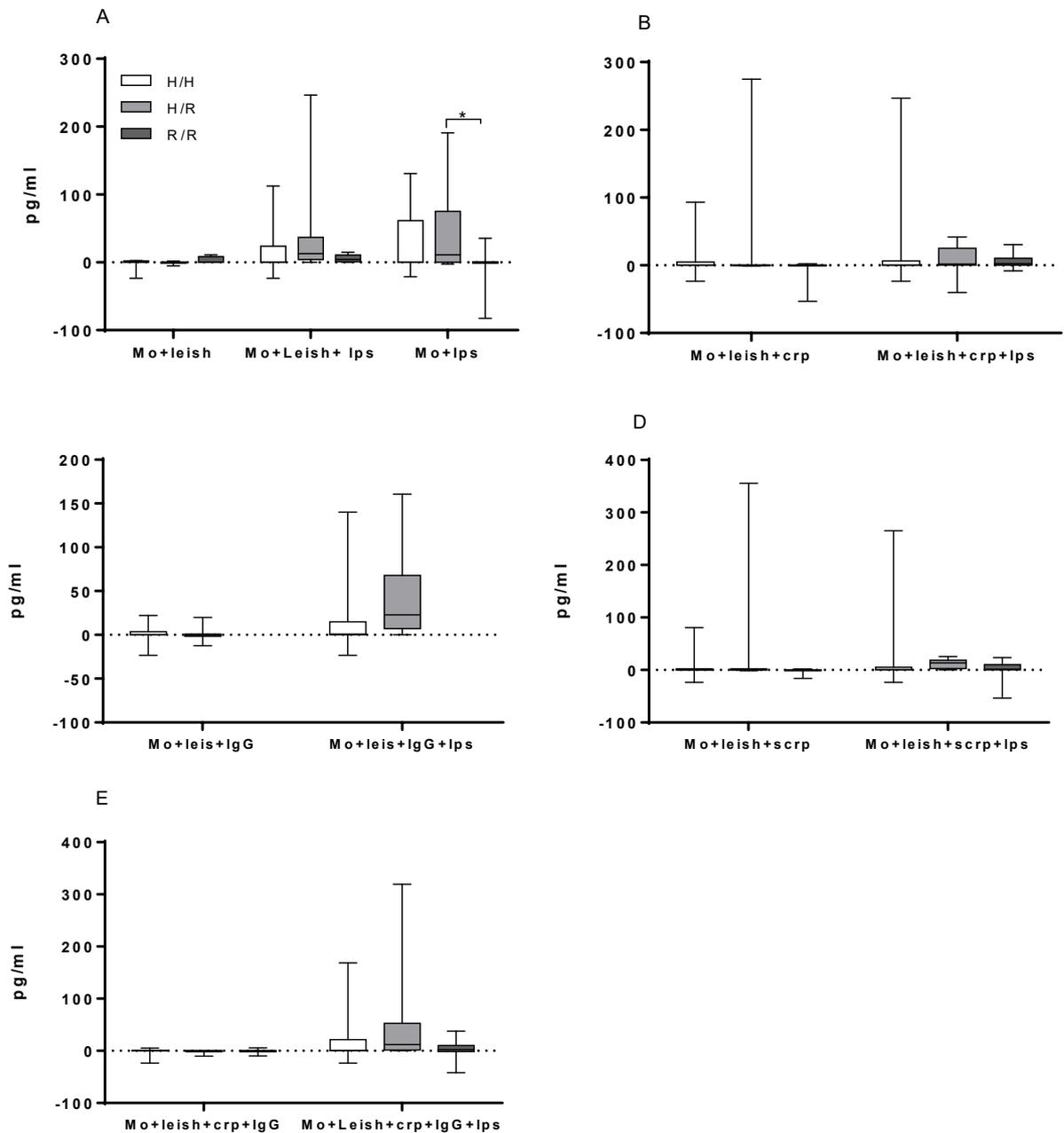


Figura 5: Macrófagos de diferentes genótipos, foram infectados com *L. infantum* opsonizadas e estimulados ou não com LPS, foi analisado os níveis de IL-10 (descontando o valor da produção basal do Mo sem infecção). (A) Infecção sem opsonização na presença ou não de LPS e Mo estimulado e não infectado, (B) opsonização por CRP estimulados ou não com LPS, (C) opsonização por IgG na presença ou não de LPS, (D) opsonização por CRP-IgG combinados na presença ou não de LPS e (E) opsonização por SCRP na presença ou não de LPS (E).

### **Análise da produção de IL-10 intra genotípica em condições distintas de opsonização**

Analizamos a produção de IL-10 dentro do mesmo genótipo em condições distintas de opsonização, para observar se ocorre modulação intra genotípica devido a internalização de leishmania por moléculas opsonizantes diferentes, devido a afinidade de ligação com as mesmas, provocada pela alteração na proteína em decorrente da modificação de bases no gene do receptor.

Quando analisamos os indivíduos pertencentes ao genótipo H/H nas condições descritas acima, observamos que não houve modulação na produção da IL-10 dentro deste grupo, independentemente das condições de opsonização ou da presença de LPS (Figura: 6 A, B).

Quando analisamos os níveis de IL-10 no grupo H/R, e observamos que na ausência de LPS não ocorre variações significativas na produção desta citocina dentro deste grupo em nenhuma das condições de opsonização, assim a infecção sem opsonização não promovendo modulação nos níveis de IL-10. No entanto, quando comparamos o mesmo grupo na presença de LPS, os macrófagos que estão internalizando parasitos opsonizados com IgG demonstram um produção de IL-10 elevada em comparados com a condição de opsonização na presença de SCRP. Importante notar que a condição de opsonização com CRP que também foi menor que a IgG, porém com valor de p de aproximadamente de 0,1452. Demonstrando assim que a internalização via imunocomplexo formado por parasito-IgG promove um ganho de produção de IL-10 nesse genótipo quando comparado com a outra via de opsonização. (Figura 6 C, D)

No grupo formado por indivíduos do genótipo R/R, os níveis de produção de IL-10 não aparecem de forma elevada em nenhuma das condições de opsonização quando não ocorre uma pr ativação com LPS. No entanto, com comparamos o mesmo grupo com a presença de LPS, podemos observar que houve uma elevada produção de IL-10 no grupo onde os macrófagos foram desafiados com o parasito, e na condição com opsonização com CRP em comparação aos grupos onde os macrófagos foram desafiados com Leishmania opsonizada com IgGo, portando esse genótipo mais responsivo a produção desta citocina devida a internalização via CRP. No entanto os níveis são bem menores que os produzidos pelo genótipo H/R na condição de opsonização com IgG, isso é provavelmente devido a menor afinidade do receptor expresso por esse grupo à molécula de IgG. (Figura 6 E, F)

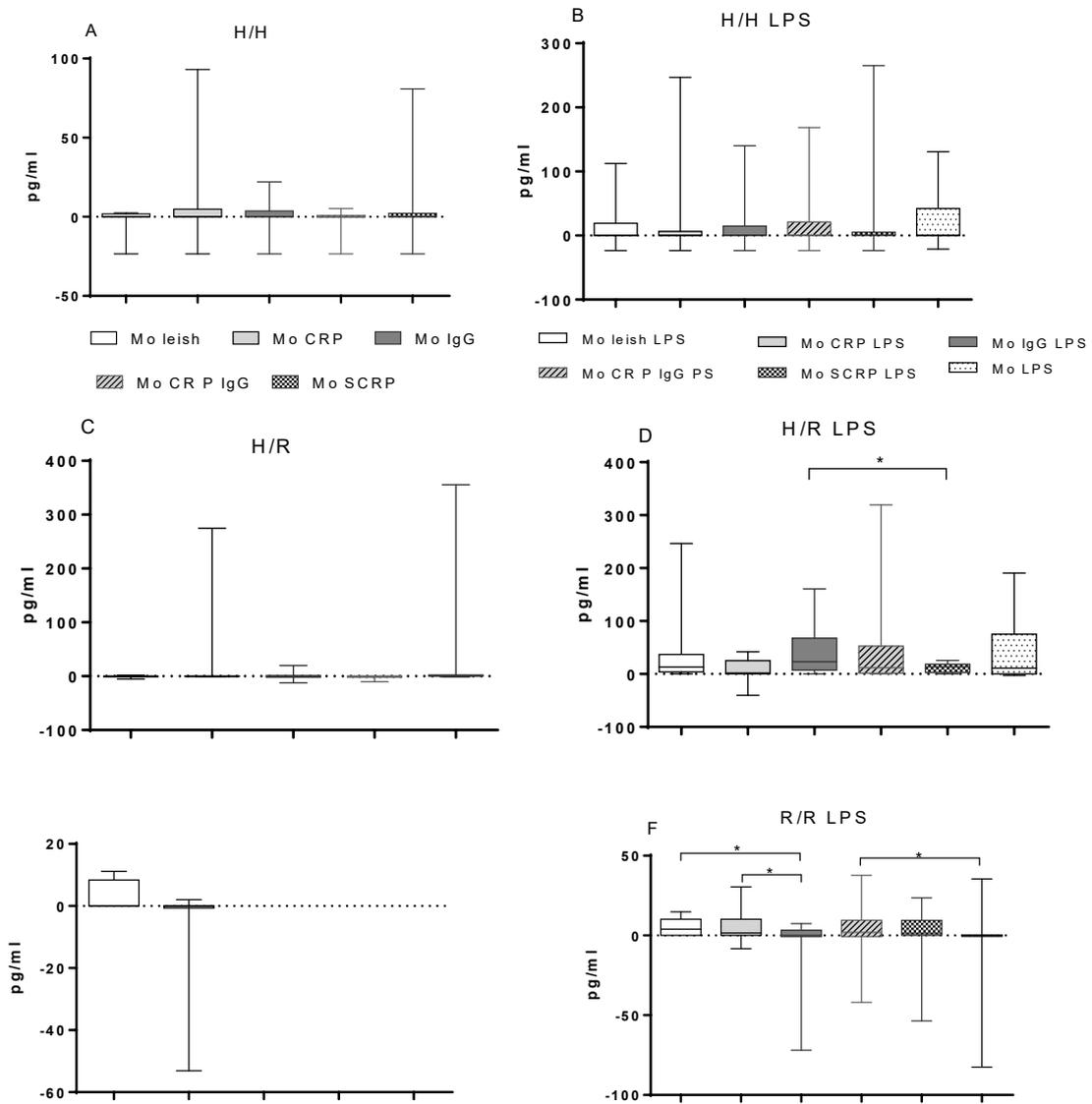


Figura 6: Macrófagos de diferentes genótipos, foram infectados com *L. infantum* opsonizadas com diferentes moléculas e estimulados ou não com LPS. E então analisado a produção de IL-10 (descontando o valor da produção basal de Mo sem infecção). (A, B) grupo H/H estimulado ou não com LPS respectivamente, (C, D) grupo H/R estimulado ou não com LPS e (E, F) grupo R/R estimulado ou não com LPS.

### **Análise da produção de IL-6 intergenotípica e entre condições distintas de opsonização**

A produção de IL-6 pelos macrófagos foi feita utilizando as condições descritas em Materiais e Métodos. Quando analisado macrófagos desafiados com promastigotas de leishmania sem nenhuma opsonização, foi observado uma tendência no aumento nos níveis de produção de IL-6 no grupo H/R quando comparado com os demais. Porém não apresentou diferença estatística, talvez devido ao tamanho amostral. (Figura 7 A).

Na segunda condição de cultura onde a CRP foi usada como opsonizante das promastigotas de leishmania, não houve variação na produção desta citocina entre os grupos analisados. Foi observado uma pequena produção desta citocina diante do uso desta molécula como agente opsonizante mesmo quando houve um pré ativação dos macrófagos com uso de LPS. O mesmo fenômeno ocorre quando usamos a segunda fonte de CRP o SCRIP como opsonizante, baixos níveis na produção de IL-6 mesmo na presença de LPS. (Figura 7 B, C)

Ao contrário do observado acima, quando usamos IgGs anti-leishmania como opsonizante, o grupo H/R apresenta diferença significativa na produção de IL-6 quando comparado aos demais grupo H/H e R/R. Porém na realização dos pós teste de Tukey's o valor de p não foi forte o suficiente para demonstrar onde ocorria a diferença entre os grupos. Observando os valores de média dos rank podemos sugerir que a diferença ocorra entre os grupos H/R e R/R. (Figura 7 D).

Na última condição a ser analisada, onde foi utilizado uma combinação das duas moléculas opsonizantes, novamente observamos uma tendência em aumento da produção desta citocina no grupo H/R quando compramos com os outros grupos. Porém como o valor de p que observamos não é possível observamos uma clara diferença significativa. (Figura 7 E).

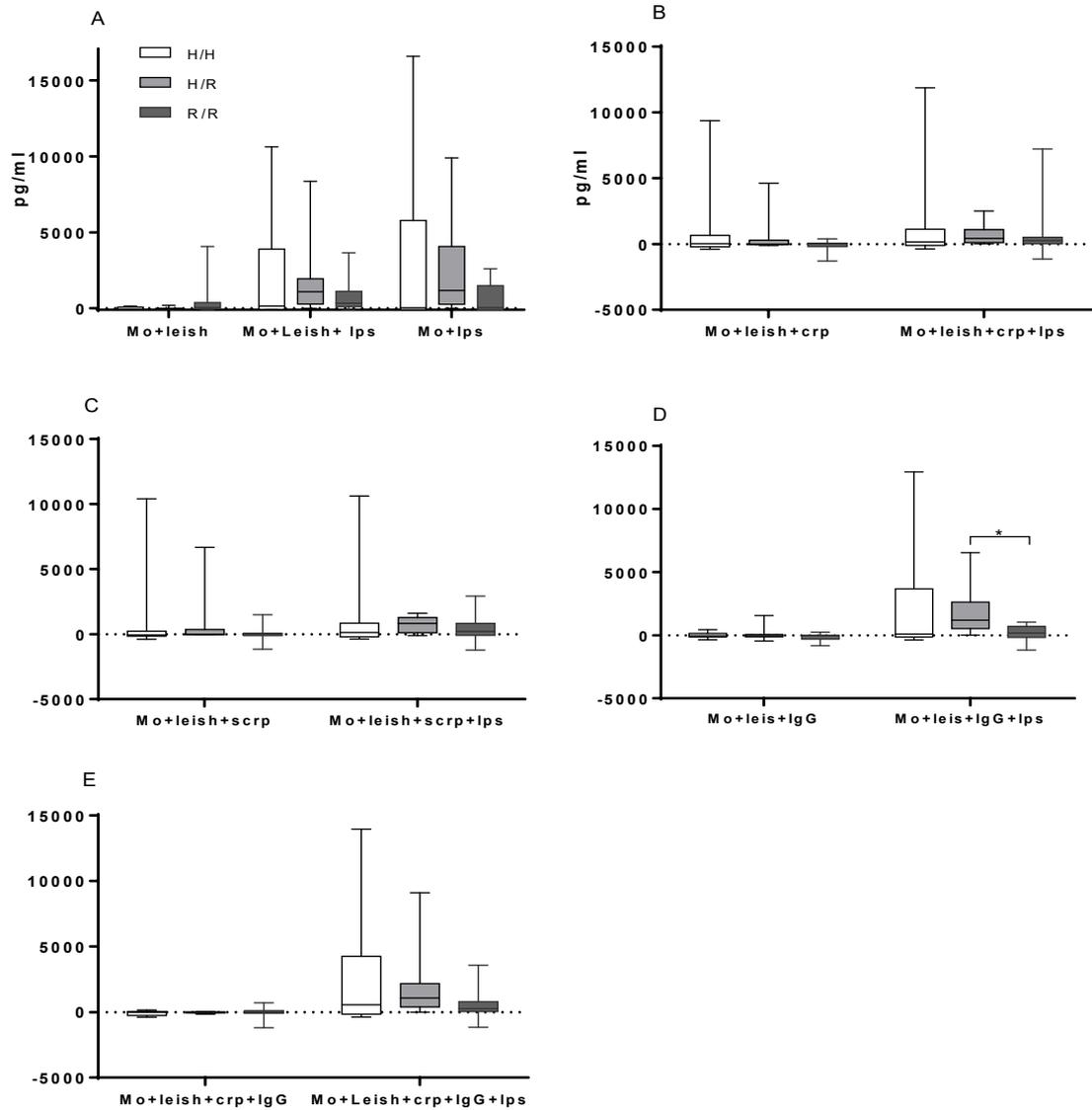


Figura 7: Macrófagos de diferentes genótipos, foram infectados com *L. infantum* opsonizadas e estimulados ou não com LPS, foi analisado os níveis de IL-6 (descontando o valor da produção basal do Mo sem infecção). (A) Infecção sem opsonização na presença ou não de LPS e Mo estimulado e não infectado, (B) opsonização por CRP estimulados ou não com LPS, (C) opsonização por IgG na presença ou não de LPS, (D) opsonização por CRP-IgG combinados na presença ou não de LPS e (E) opsonização por SCRP na presença ou não de LPS (E).

### **Análise da produção de IL-6 intra genotípica em condições distintas de opsonização**

Para observarmos se houve variação na produção de IL-6 intra-genotípica devido a alguma condição de opsonização específica, analisamos de forma pareada o mesmo grupo nas condições pré-estabelecidas na presença e na ausência de LPS e os achados estão descritos abaixo.

O grupo H/H, qual codifica o receptor com maior afinidade para moléculas IgG, não apresentou diferença significativa quando analisados nas diferentes condições de opsonização na ausência de LPS com baixos níveis na produção desta citocina. Em contrapartida, quando esse mesmo grupo foi analisado na presença de uma pré ativação fornecida pela presença de LPS nas condições de cultura, foi observado uma diferença entre a condição de cultura onde os dois opsonizantes foram utilizados em comparação com a condição em que foi usado como fonte de CRP ou SCRIP com opsonina (figura 8 B). Também observamos uma tendência em aumento da produção desta citocina na condição em que IgG foi utilizada como opsonizante, no entanto o valor de p não foi forte o suficiente para inferirmos que houve diferença no grupo em questão, novamente um maior n amostral pode tornar mais claro a expressividade desse dado.

No grupo H/R observamos diferença significativa quando comparamos as condições que apresentam IgG como opsonina e SCRIP, e uma tendência de diferença quando comparamos a condição IgG com a condição CRP, ambas as diferenças observadas na presença de LPS (figura 7 D). Outro dado que cabe ressaltarmos o grupo CRP teve uma produção de IL-6 significativamente menor que o grupo que não foi infectado também na presença de LPS em cultura (figura 8 D). Quando observamos o grupo H/R em todas as condições de cultura na ausência de LPS não observamos diferença na produção desta citocina.

Analisando o R/R na presença e na ausência de LPS, não observamos variação significativa de produção destas citocinas em nenhuma das condições de cultura já descritas. No entanto, na presença de LPS ocorre um aumento na produção de forma homogênea em todas as condições. Porém os níveis de IL-6 foram menores do que os observados no grupo H/R na mesma situação de pre-ativação pela adição de LPS a cultura.

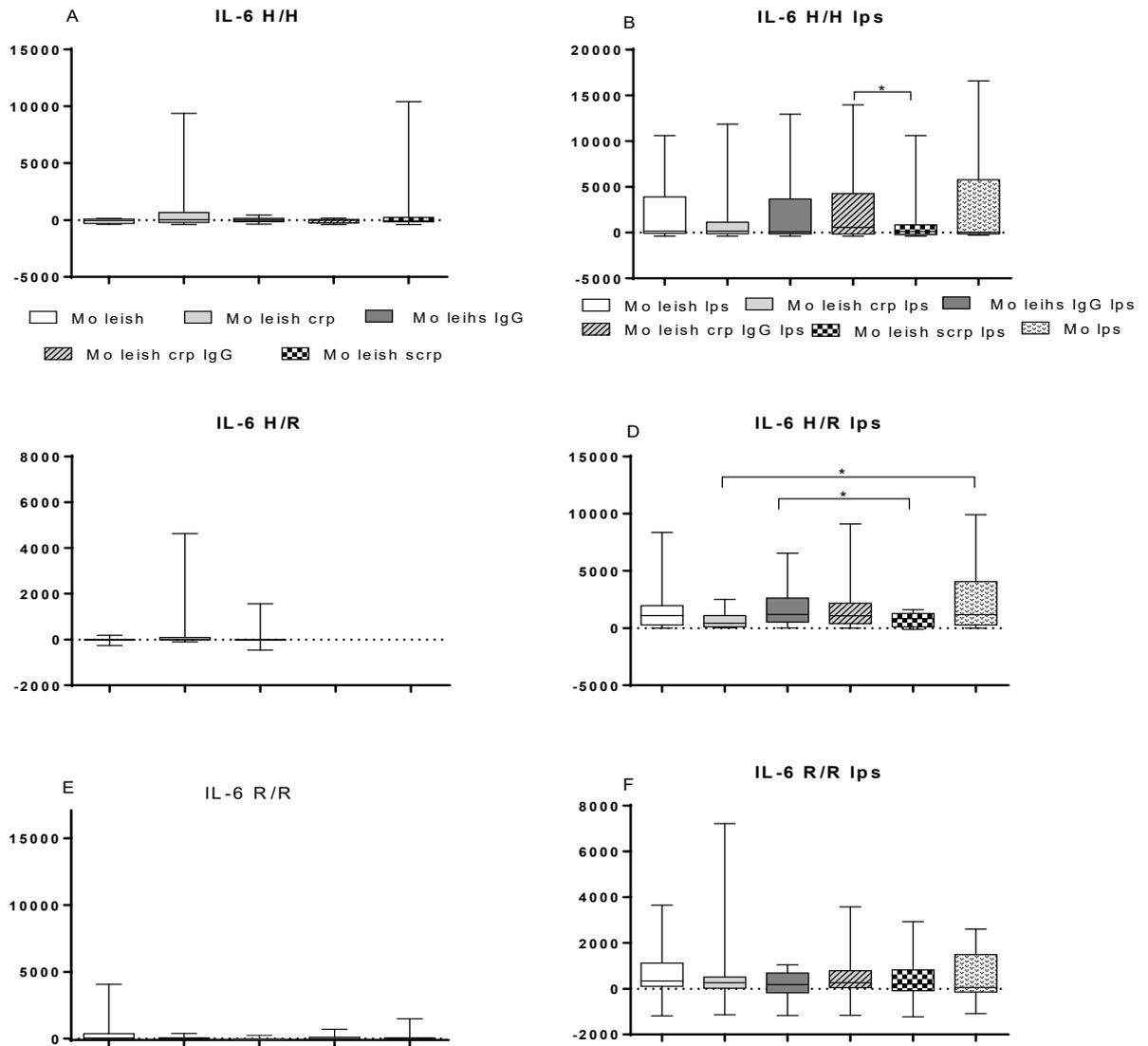


Figura 8: Macrófagos de diferentes genótipos, foram infectados com *L. infantum* opsonizadas com diferentes moléculas e estimulados ou não com LPS. E então analisado a produção de IL-6 (descontando o valor da produção basal de Mo sem infecção). (A, B) grupo H/H estimulado ou não com LPS respectivamente, (C, D) grupo H/R estimulado ou não com LPS e (E, F) grupo R/R estimulado ou não com LPS.

### **Análise da produção de TNF- $\alpha$ intergenotípica e entre condições distintas de opsonização**

Para analisar a produção de TNF- $\alpha$  entre os grupos e o quanto o tipo de molécula influencia na produção desta citocina, dosamos e comparamos entre os grupos genotípicos os níveis de TNF- $\alpha$  sem a condição de opsonização, opsonizadas com IgG purificada, com Proteína C reativa ou ambas as condições de opsonização. Em adição a produção de TNF- $\alpha$  foi avaliada em macrófagos estimulados ou não por LPS.

Foi observado que não houve diferença significativa entre os grupos genotípicos analisados em nenhuma das condições testadas após 24 horas de cultura. A presença de LPS promoveu aumento na produção desta citocina em todas as condições testadas, mas em nenhuma delas houve diferença estatística. Embora alguns grupos apresentem uma tendência de aumento, mas sem força estatística. (Figura 9).

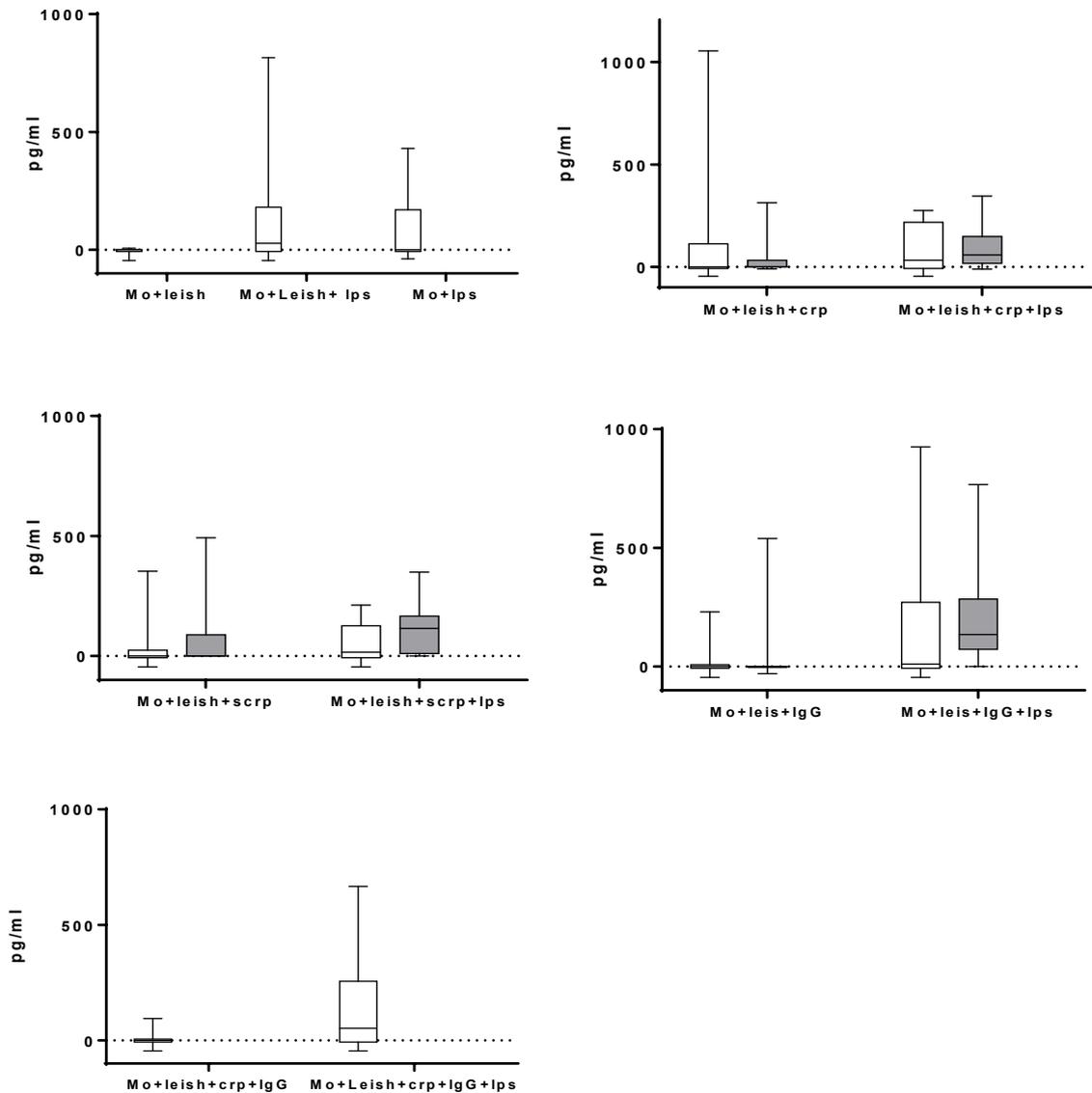


Figura 9: Macrófagos de diferentes genótipos, foram infectados com *L. infantum* opsonizadas e estimulados ou não com LPS, foi então analisado os níveis de TNF- $\alpha$  (descontando o valor da produção basal do Mo sem infecção). (A) Infecção sem opsonização na presença ou não de LPS e Mo estimulado e não infectado, (B) opsonização por CRP estimulados ou não com LPS, (C) opsonização por IgG na presença ou não de LPS, (D) opsonização por CRP-IgG combinados na presença ou não de LPS e (E) opsonização por SCRIP na presença ou não de LPS (E).

### **Análise da produção de TNF- $\alpha$ intra genotípica em condições distintas de opsonização**

Realizamos uma nova análise como as condições de cultura onde foram utilizadas diferentes moléculas opsonizantes influenciaram na produção de TNF- $\alpha$  dentro do mesmo genótipo, tanto na presença e na ausência de LPS, os resultados seguem descritos abaixo com valores de  $P < 0,05$  sendo considerados como significativo.

O grupo de genótipo H/H (que expressa receptores com maior afinidade para IgG) na ausência de LPS quando comparado entre as condições de opsonização distintas não apresentou variação na produção dessa citocina que pudessem ser colocados com significativas. No entanto na presença de LPS nas condições de culturas, observou-se estatística quando comparamos a condição CRP-IgG com a condição em que macrófagos foram apenas estimulados com LPS (figura 10 B).

Quando analisamos o grupo heterozigoto H/R (que apresenta co-expressão dos receptores) na ausência de LPS novamente não houve variação significativa na produção de TNF- $\alpha$  entre as condições já citadas. Em contrapartida, com a mesma análise foi realizada desta vez com a presença de LPS em cultura, notamos diferença significativa na produção desta citocina nos grupos IgG e CRP-IgG, quando comparado ao grupo Mo-LPS, semelhante ao que ocorre no grupo H/H (figura 10 D). As condições com presença de CRP ou SCRIP para esse genótipo não apresentaram diferença quando comparadas com as demais condições.

O grupo R/R (qual expressa o receptor com perda de afinidade para IgG e ganho para CRP) mais uma vez como apresentado nos demais grupos quando comparamos a produção de TNF entre as condições de cultura já citados e na ausência de LPS não apresentam diferença nos níveis desta citocina. Porém fazendo a análise na presença de LPS, evidenciamos que a condição CRP-IgG e SCRIP apresentaram um aumento significativo quando comparado com o a condição IgG (figura 10 F). A condição CRP apresentada uma tendência a ser estatisticamente maior que a condição IgG embora o valor de  $p$  não é significativo, possivelmente devido ao valor do  $n$  amostral.

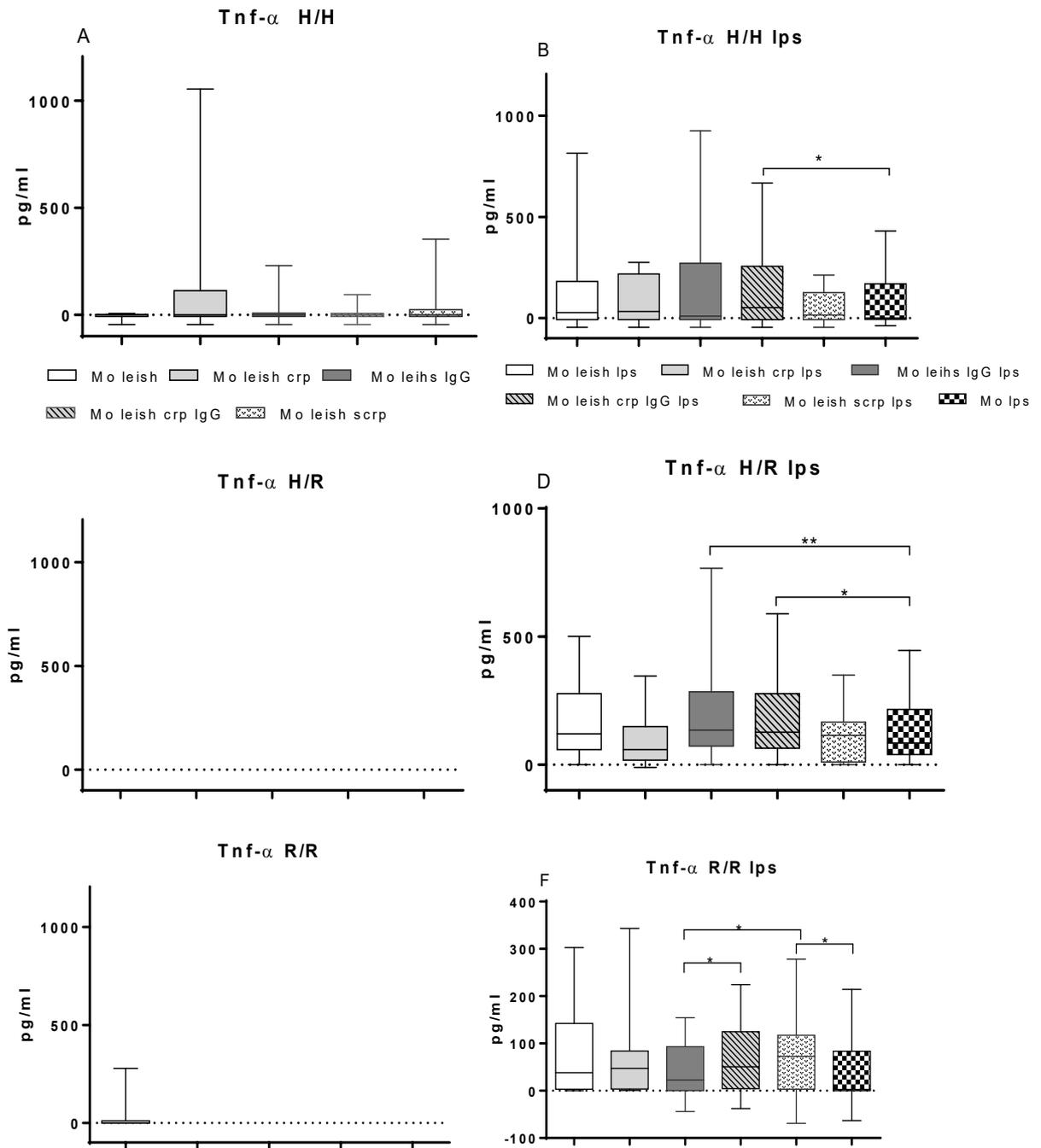


Figura 10: Macrófagos de diferentes genótipos, foram infectados com *L. infantum* opsonizadas com diferentes moléculas e estimulados ou não com LPS. E então analisado a produção de TNF- $\alpha$  (descontando o valor da produção basal de Mo sem infecção). (A, B) grupo H/H estimulado ou não com LPS respectivamente, (C, D) grupo H/R estimulado ou não com LPS e (E, F) grupo R/R estimulado ou não com LPS.

### **Análise da produção de IL-8 entre condições distintas de opsonização**

Para analisar a produção de IL-8 entre os grupos e o quanto o tipo de opsonina influencia na produção desta citocina, dosamos e comparamos entre macrófagos de diferentes genotípicos os níveis de IL-8 produzidos nas condições já descritas, estimulados ou não com LPS.

Observamos que não houve diferença significativa entre os grupos genotípicos analisados em nenhuma das condições de opsonização utilizadas, após 24 horas de cultura. O grupo R/R apresenta uma tendência a ser mais responsivo a produção de IL-8 quando realiza a fagocitose do parasito exceto quando o faz com a presença de opsonização com IgG. A fagocitose mediada por IgG parece promover uma modulação negativa na produção desta citocina embora não exista força estatística no para inferir que realmente aconteça essa modulação nesse tipo de análise (figura 11 C). A presença de LPS promove uma modulação positiva na produção desta citocina no grupo H/R em todas as condições de opsonização utilizadas, mas em nenhuma das condições analisadas houve diferença estatística evidenciada. (Figura 11).

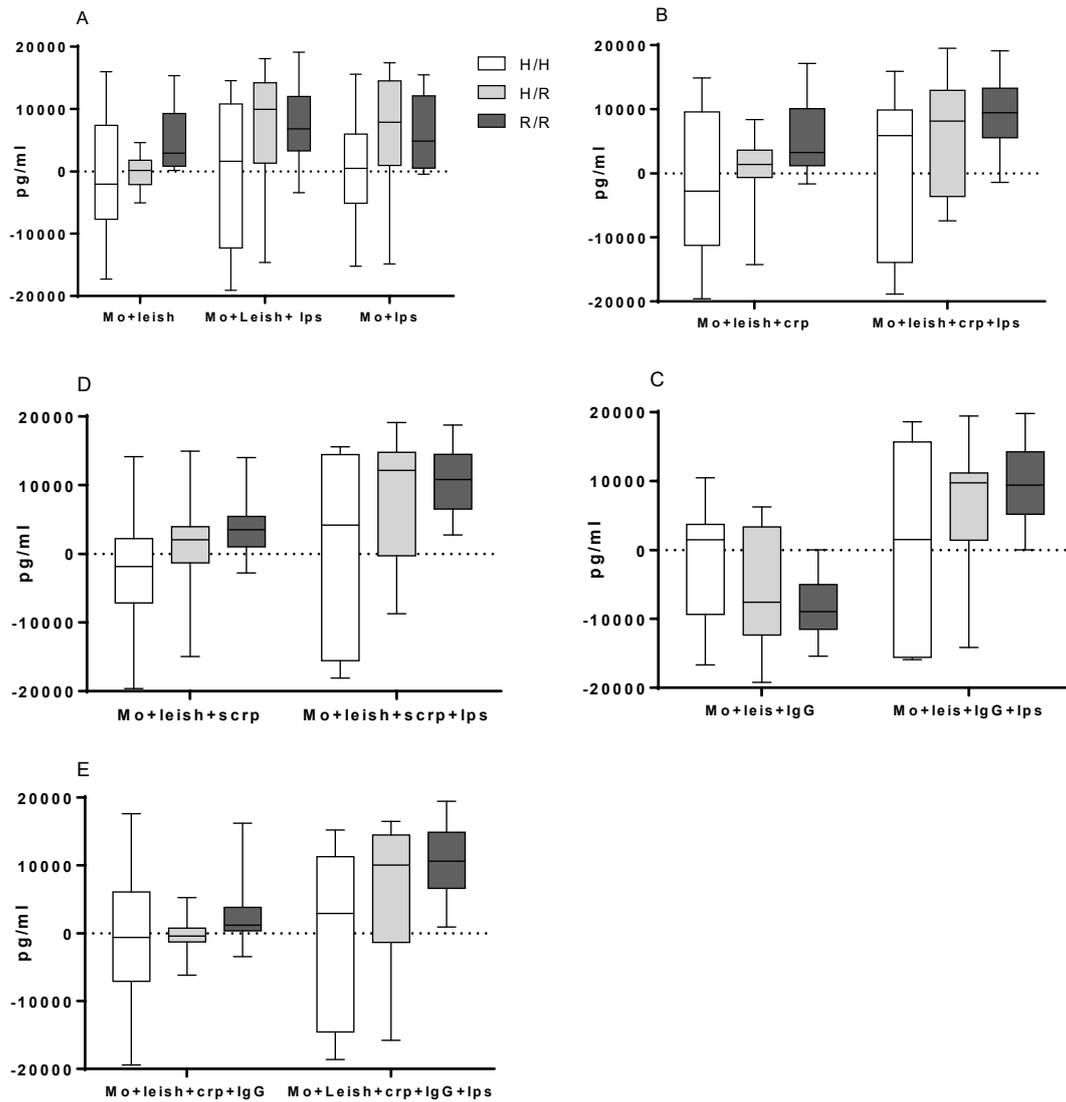


Figura 11: Macrófagos de diferentes genótipos, foram infectados com *L.infantum* opsonizadas e estimulados ou não com LPS, foi então analisado os níveis de IL-8 (descontando o valor da produção basal do Mo sem infecção). (A) Infecção sem opsonização na presença ou não de LPS e Mo estimulado e não infectado, (B) opsonização por CRP estimulados ou não com LPS, (C) opsonização por IgG na presença ou não de LPS, (D) opsonização por CRP-IgG combinados na presença ou não de LPS e (E) opsonização por SCRIP na presença ou não de LPS (E).

### **Análise da produção de IL-8 intra genotípica em condições distintas de opsonização**

Realizamos uma nova análise com o objetivo de comparar como as condições de cultura onde foram utilizadas diferentes moléculas opsonizantes influenciaram na produção de IL-8 em macrófagos com o mesmo genótipo, estimulados ou não com LPS os resultados seguem descritos abaixo com valores de  $P < 0,05$  sendo considerados como significativo.

Analisando grupo H/H podemos observar que não ocorre diferença significativa entre as condições de cultura entre as diferentes condições de opsonização. E observamos que na grande maioria das condições o valor da mediana se encontra abaixo da linha do 0 demonstrando uma produção menor que a produção basal dos macrófagos não infectados. Sugerindo uma modulação negativa provocando pela infecção desse grupo em questão, exceto na condição em que a opsonização foi realizada com CRP. A adição de LPS nas condições de cultura para esse grupo provocaram uma pequena elevação da produção da citocina em questão, porém não é evidenciado aumento significativo em nenhuma das condições de cultura.

Quando analisamos grupo H/R, podemos observar que na ausência de LPS ocorre fenômeno semelhante ao primeiro grupo analisado, com todas as medianas muito próxima do valor 0, sendo da mesma forma não evidenciado nenhuma alteração significativa entre as condições de opsonização. Quando analisamos o mesmo grupo agora com a presença de LPS, podemos observar um aumento significativo entre as condições SCRP e CRP-IgG (figura 12 E), importante notar um possível diferença entre SCRP e IgG ainda que o valor de  $p$  não tenha apresentado força estatística suficiente para evidenciar a diferença entre as condições, novamente devido ao tamanho do  $n$  amostral.

A análise do grupo R/R, nos permitiu evidenciar um fenômeno deveras interessante uma inibição significativa na produção de IL-8 na condição de opsonização por IgG quando comparada com todas as demais condições (figura 12 C). Evidenciada apenas na ausência de LPS nas condições de cultura. Ressaltando a produção elevada dessa citocina nas demais condições apresentadas por esse grupo em questão nas outras condições de cultura. A adição de LPS nas condições de cultura promoveu um aumento na produção desta citocina inclusive na condição de opsonização com IgG, porém não foi evidenciada diferença significativa entre as condições de cultura na situação em questão.

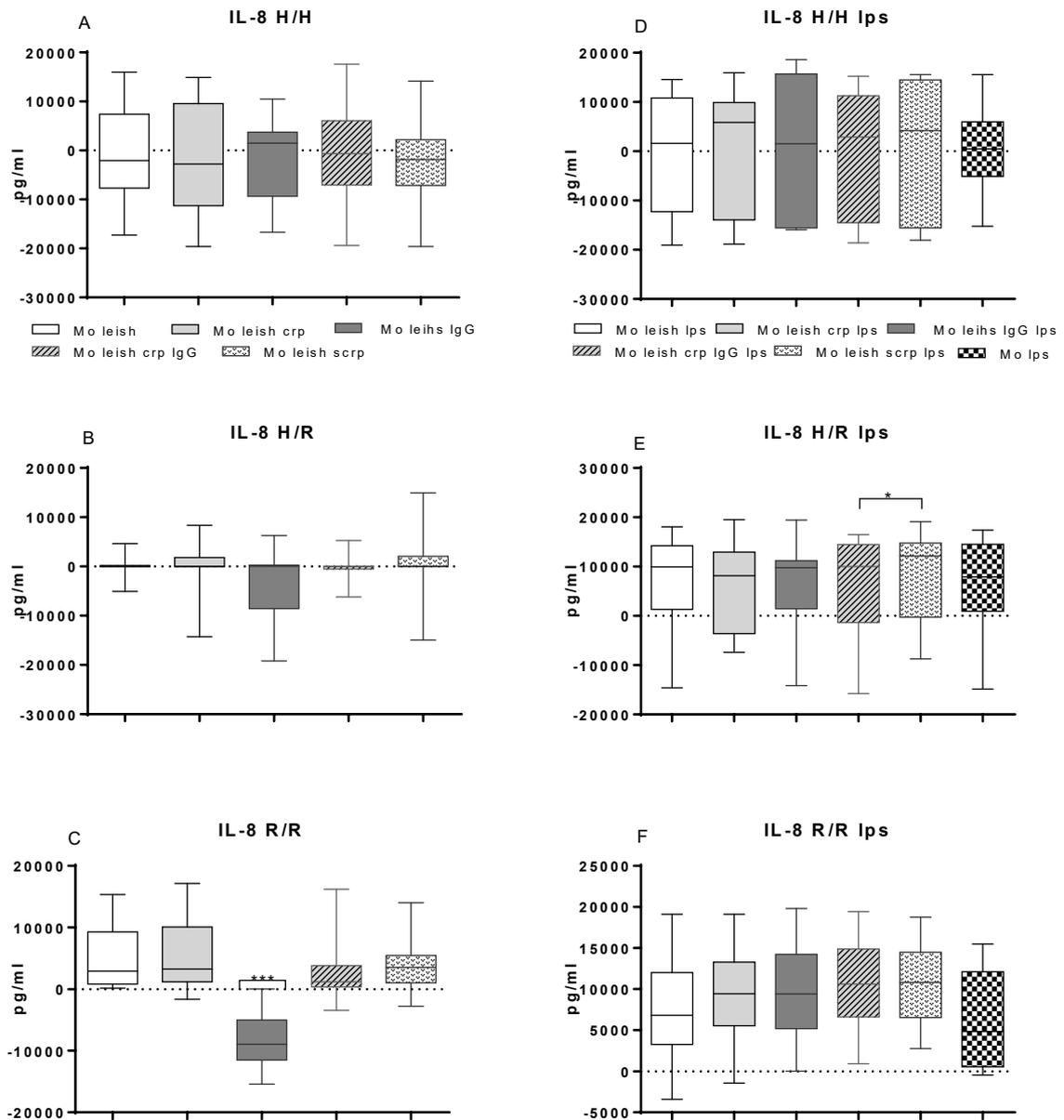


Figura 12: Macrófagos de diferentes genótipos, foram infectados com *L. infantum* opsonizadas com diferentes moléculas e estimulados ou não com LPS. E então analisado a produção de IL-8 (descontando o valor da produção basal de Mo sem infecção). (A, B) grupo H/H estimulado ou não com LPS respectivamente, (C, D) grupo H/R estimulado ou não com LPS e (E, F) grupo R/R estimulado ou não com LPS.

### 13. DISCUSSÃO

O mecanismo de suscetibilidade para doenças infecciosas, dentre elas a leishmaniose visceral, é um processo complexo que envolve a interação entre o agente invasor e o hospedeiro e uma série de fatores relacionados com a destruição do patógeno e alterações imunopatológicas. Onde fatores genéticos intrínsecos do hospedeiro e dos patógenos desempenham um papel de extrema importância no resultado da infecção. (BUCHETON; ABEL; KHEIR; MIRGANI *et al.*, 2003).

Vários autores têm investigado o papel da imunogenética nos mecanismos relacionados com a suscetibilidade em desordens complexas como as doenças infecciosas (CABRERA; SHAW; SHARPLES; WILLIAMS *et al.*, 1995; COURTIN; ARGIRO; JAMONNEAU; N'DRI *et al.*, 2006). Muitos destes estudos adotam abordagens populacionais e estudos familiares e de mapeamento genético de regiões relacionadas com suscetibilidade a infecção por microrganismos. Dentre estes, os estudos familiares têm fornecido informações evolucionárias e sugerido que doenças infecto contagiosas podem agir com grande força na seleção de diversidade genética humana (FLINT; HARDING; BOYCE; CLEGG, 1998; KWIATKOWSKI, 2005).

Muitos destes trabalhos, com identificação de genes candidatos, identificaram muitos polimorfismos genéticos, alguns deles relacionados aos produtos da resposta imunológica. Diante dessa informação, se torna plausível que alguns genótipos/haplótipos específicos possam ser de alguma forma vantajosos durante a infecção por patógenos específicos. Tais fenômenos, relacionados com a amplificação ou mesmo regulação da resposta imunológica orquestrados diante desafio por agentes parasitários (CAMPINO; KWIATKOWSKI; DESSEIN, 2006).

Desta forma, conhecer melhor os mecanismos de defesa intrínsecos do hospedeiro, são essenciais para o desenvolvimento de novas abordagens visando o controle das doenças parasitárias. Isto pode ser alcançado com a elucidação de interações genéticas na resistência e suscetibilidade para doenças infecciosas e parasitárias mediada por uma herança poligênica associada, a plasticidade genica do patógeno e a fatores ambientais (CAMPINO; KWIATKOWSKI; DESSEIN, 2006; CLEMENTI; DI GIANANTONIO, 2006).

Em um trabalho recente realizado por nosso grupo na cidade de Paracatu, Minas Gerais Brasil, como o objetivo de associar polimorfismos em componentes da resposta imune, importantes no processo de controle do parasito e também relacionados com a imunopatologia

da doença, encontramos associação de alguns dos alvos analisados em paciente que apresentavam leishmaniose visceral, dentre eles o gene do receptor de imunoglobulinas *FCGR1IA*. (Oliveira, R.F, .2014).

Outros grupos já demonstraram a importância dos FcγRs e de imunoglobulinas na internalização de *Leishmania* sp, e associado com o desenvolvimento de um perfil imune no desafio diante desse patógeno. (MILES; CONRAD; ALVES; JERONIMO; MOSSER, 2005) demonstraram que camundongos BALB/c que apresentam naturalmente um fenótipo de suscetibilidade, quando infectados com *L. major*, após sofrerem um deleção genica no locus da cadeia (J), desta forma falhando na produção IgG, controlam melhor a infecção quando comparado com os BALB/c selvagem. Mecanismo mediado pela diminuição da expressão de IL-10 nos animais com a cadeia (J) deletada. Em outro trabalho (KIMA; CONSTANT; HANNUM; COLMENARES *et al.*, 2000) demonstram que camundongos que falham na produção de cadeia γ comum aos FcRs são igualmente refratários a infecção com amastigotas do complexo *Leishmania mexicana*.

Estudos genéticos em outras doenças complexas como a malária, permite a descoberta de fatores relacionados com a proteção e patogênese em doenças infecciosas. Dentre esses fatores a família de receptores de imunoglobulinas em destaque o CD32/FCGR1IA, parece ter papel importante na imunidade contra a doença, e diferenças nos padrões de resposta mediada por esses receptores parecem estar associadas à capacidade de ligar com opsoninas com diferentes graus de afinidade. Estudos revelam que essa afinidade é alterada por polimorfismo que ocorre no gene do receptor no qual a 62 omozigose para o variante R131 este está associado baixo risco de desenvolver malária comparado à heterozigose (SHI; NAHLEN; KARIUKI; URDAHL *et al.*, 2001).

Neste trabalho, a partir dos dados encontrados na área endêmica, realizamos um estudo funcional na tentativa de elucidar a real participação do polimorfismo no gene *FCGR1IA* no complexo mecanismo de suscetibilidade/resistência a leishmaniose visceral humana, causada por *L. infantum*.

Analizamos a frequência do polimorfismo rs1801274 His13Arg em indivíduos voluntários não residente em área endêmica, e encontramos uma destruição de frequência genótípicas diferentes das encontradas em Afro-americanos e também com europeus, assim como descrito em “Hapmap/Applied Bisystem”, os indivíduos com genótipo GG foram mais frequentes que os indivíduos AA, que são considerados alelo ancestrais

Também analisamos a taxa de fagocitose por macrófagos desafiados com o parasito na presença de diferentes opsoninas, que apresentam diferentes perfis de interação com as isoformas gerados por esse polimorfismo, e ainda analisamos a produção de citocinas e óxido nítrico produzido por macrófagos de cada genótipo, a fim de contextualizar a resposta imune inicial orquestrada diante da alteração genética.

O FcγRIIA, desempenha um papel de grande importância na interação com microrganismos estranhos e também na remoção de imunocomplexos da circulação sanguínea (HIBBS; HOGARTH; MCKENZIE, 1985). Este receptor é amplamente distribuído em células da resposta imune e apresenta expressão diferencial de acordo com a linhagem celular que está sendo analisada, dentre elas monócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos.

Alterações genótípicas na posição His131Arg derivadas do polimorfismo do gene *FCGR2A* tem sido associada a diversas doenças de ordens complexos como, malária, infecções virais, tuberculose e leishmaniose tegumentar americana (MAGLIONE; XU; CASADEVALL; CHAN, 2008; SALMON; MILLARD; SCHACHTER; ARNETT *et al.*, 1996; SHI; NAHLEN; KARIUKI; URDAHL *et al.*, 2001).

Receptores de Imunoglobulina G tem um papel importante como mediadores da resposta imune humoral, o FCGR2A, um receptor dito de baixa afinidade, faz um *link* entre os dois braços da resposta imunológica, humoral e celular, por mediar a fagocitose de microrganismos opsonizados por IgG e por CRP. Este receptor tem sido descrito como ligante de diferentes classes de IgG e até então o único que se associa com o isótipo IgG2. Esta capacidade de interação é criticamente influenciada pela alteração genética predita pelo polimorfismo (SCHULDT; ESSER; EVANS; MAY *et al.*, 2010).

No nosso trabalho a análise de fagocitose forneceu evidências claras para inferir que macrófagos de indivíduos com diferentes genótipos para o FcγRIIA, portanto com alteração de afinidade por diferentes opsoninas com descrito acima no trabalho de (SCHULDT; ESSER; EVANS; MAY *et al.*, 2010), têm a capacidade de interagir e internalizar o parasito, com maior avidéz de acordo com a molécula que está associado a superfície celular do parasito.

Observamos que indivíduos do genótipo H/H131 descritos tendo maior afinidade com IgG2 e IgG3, apresentaram uma porcentagem significativamente maior de macrófagos que internalizaram os parasitos quando opsonizados com IgG-leishmania específico. A avaliação da produção de citocinas nestas células mostrou para este polimorfismo um aumento nos níveis de IL-6 na condição em que os parasitos foram duplamente opsonizados com CRP e IgG quando

comparado com SCRP. Além disso um aumento de TNF- $\alpha$  também foi evidenciado com comparamos a condição de dupla opsonização contra o macrófago estimulado apenas com LPS, sugerindo uma modulação positiva na produção destas citocinas na presença da dupla opsonização ou em grande parte devido a presença de IgG como via de internalização do parasito.

Os grupos H/H131 expressam o receptor com maior afinidade para subclasses de imunoglobulinas IgG2 e IgG3, sendo assim, de acordo com os trabalhos de (BUXBAUM; SCOTT, 2005; MILES; CONRAD; ALVES; JERONIMO; MOSSER, 2005), espera-se uma maior produção de citoninas anti-inflamatórias como IL-10, fenômeno que não foi evidenciado no nosso estudo funcional. (GALLO; GONÇALVES; MOSSER, 2010) demonstrou que transduções de sinais derivadas de receptores Fc presente em macrófagos, varia em função da força do sinal, e que uma moderada densidade de IgG ou de imunocomplexos, promove uma eficiente fagocitose e retira de imunocomplexos na ausência de alteração na produção de citoninas. Assim ainda que um ligeiro aumento na densidade de IgG associado a esses receptores promovem uma diminuição da produção de IL-12 e induz altos níveis de produção de IL-10. E que a indução de IL-10 é devido ao recrutamento e ativação de MAPK e ERK, qual promove alterações na cromatina e indução da região promotora de IL-10.

Sugerindo assim que macrófagos com H/H131 qual expressa apenas o receptor que reconhece imunocomplexos formado por IgG2 e IgG3, necessitam de uma densidade maior parasitos associados com essas imunoglobulinas para alterar os níveis de produção de IL-10 e se tornar um macrófago com fenótipo dito regulador. Já o contrário pode ocorrer com grupo H/R131 que expressa os dois receptores assim um número menor dos receptores H131, desta forma, a densidade de imunocomplexos utilizado no experimento pode ter sido necessário para alterar a transdução de sinais do mesmo e aumentar seu nível de expressão de IL-10, como visto nas análises realizadas nesse grupo como descrito abaixo.

No grupo que apresentava a variante genotípica H/R131, observou-se um perfil de fagocitose semelhante ao grupo H/H131, demonstrando um aumento significativo na internalização dos parasitos quando opsonizados com IgG-leishmania específico, quando comparado as condições de cultura que apresentavam CRP, ou uma combinação das duas opsoninas. Fato interessante tento em vista que esse receptor apresenta um herança de codominância, R131 e H131, qual difere a habilidade que este receptores apresentam de associar a IgG2 e IgG3 (SALMON; MILLARD; SCHACHTER; ARNETT *et al.*, 1996).

O aumento de fagocitose do grupo H/R131 como maior intensidade através da opsonização com IgG na presença de LPS promoveu uma modulação positiva significativa na produção de IL-6 e IL-10 quando comparados aos demais genótipos e quando comparado dentre as demais condições de forma pareada, quando comparado a condições de dupla condições em que apresentavam CRP como via de internalização do parasito. Houve também uma modulação significativa na produção de TNF- $\alpha$  quando comparado com o a condição que o macrófago foi apenas na presença de LPS.

Foi demonstrado que a citocina IL-10 está relacionada com a manutenção da infecção e agravamento da doença, dentre eles um trabalho executado em modelo animal por (BUXBAUM; SCOTT, 2005) demonstra que *L. mexicana* opsonizada com anticorpos induz em macrófagos a produção de IL-10 in vitro, relacionando a ligação de anticorpos aos Fc $\gamma$ Rs como um mecanismo envolvido na produção de IL-10 durante a infecção. Em contrapartida animais interleucina 10<sup>-/-</sup> tinha as lesões curadas e associadas com aumento da produção de IFN- $\gamma$ .

MILES; CONRAD; ALVES; JERONIMO e MOSSER (2005) em outro trabalho com modelos experimentais demonstra que animais da linha Jh que falham na produção de IgG devido à deleção no fragmento gênico responsável por parte da cadeia pesada da imunoglobulina, está mais resistente a infecção com *L. major*. Apresentando redução no tamanho da lesão, e que quando administra passivamente IgG anti-leishmania o animal perde o fenótipo de resistência e desenvolve lesões de mesmo tamanho comparado ao animal selvagem, e que a administração é correlacionada com aumento de IL-10, o fenótipo de resistência é recuperado quando o receptor desta citocina é bloqueado com anticorpos específicos para o mesmo.

GERBER e MOSSER (2001) trabalhando com macrófagos humanos mostraram que macrófagos humanos estimulados via Fc $\gamma$ Rs diminuía a produção de citocinas inflamatórias após estimulados com LPS mediado por ação autocrina de IL-10, a ação sinérgica dos dois receptores amplificando a produção de IL-10 de forma rápida e suprimindo a ativação celular.

Sugerindo que as observações realizadas no grupo H/R131 pode estar associada uma um mecanismo de regulação imune mediada por ativação de produção de IL-10 por altas densidades de imunocomplexos de forma coordenada com a ativação de Toll like receptor 4 via LPS amplificando a produção desta citocina e favorecendo assim a permanência do parasito e manutenção da doença. Desta forma justificando a maior frequência deste genótipo em pacientes afetados por LV em Paracatu, área endêmica para doença.

Encontramos também um aumento da interleucina-6 no mesmo grupo e em condições de opsonização semelhantes as quais encontramos diferenças em IL-10. IL-6 é uma citocina produzida em uma grande variedade de estímulos inflamatórios, é considerada uma citocina inflamatória, porém em certos modelos vem sendo reportada por apresentar um perfil regulador sobre a ativação de macrófagos (BERMUDEZ; WU; PETROFSKY; YOUNG, 1992).

Em pacientes com leishmaniose visceral, IL-6 demonstra um aumento progressivo em seus níveis circulantes (ANSARI; SALUJA; SALOTRA, 2006), e pode estar atuando de 3 formas, como um mecanismo antileishmanicida, como defesa do hospedeiro afim atenuar o processo inflamatório ou como ação supressora. (MURRAY, 2008) demonstrou em modelos experimentais usaram camundongos IL-6<sup>-/-</sup> infectados com *Leishmania donovani* e também animais selvagem, e mostraram um melhora no controle parasitário, como rápida morte dos parasitos nos animais IL-6<sup>-/-</sup> com acentuada resposta TH1, mediada por aumento dos níveis de INF- $\gamma$  e formação de granulomas mantidos pela produção de TNF- $\alpha$ . Caracterizando assim que em modelos de LV a IL-6 aparece por ser uma citocina de perfil supressor, atuando na diminuição de ativação de macrófagos.

Corroborando com os dados de IL-10 encontrados também para o grupo H/R131 no estudo funcional e com sua maior prevalência dentro da população afetado no estudo realizado na área endêmica.

Os níveis de TNF- $\alpha$  no grupo H/R como citado acima só apresentam diferença significativa na análise pareada na presença de opsonização por IgG, na presença de LPS, quando comparado com o macrófago estimulado apenas com LPS. Alguns autores demonstram que durante doença ativa, TNF- $\alpha$  é também elevado. Provavelmente correlacionado com outras citocinas, sua ação pro-inflamatória, associado com INF- $\gamma$ , estaria relacionada a ativação de macrófagos e morte do parasito. Em contrapartida isso necessariamente não remete aos níveis desta citocina no sitio de infecção (PERUHYPE-MAGALHÃES; MARTINS-FILHO; PRATA; SILVA *et al.*, 2006), e altos níveis de TNF- $\alpha$  no soro de pacientes pode estar relacionado com alterações clinicas devido ao seu efeito sistêmico deletério.(BACELLAR; LESSA; SCHRIEFER; MACHADO *et al.*, 2002; KINRA; DUTTA, 2013)

O grupo R/R131 apresentou uma alteração na taxa de fagocitose, devido à alteração no receptor provocado pelo polimorfismo, estes indivíduos expressam apenas receptores que não reconhecem IgG2 e IgG3 com grande eficiência, em contrapartida a afinidade pela CRP é aumentada. Fato evidenciado no nosso experimento, onde indivíduos os receptores R/R

fagocitaram com maior intensidade os parasitos recobertos com a CRP de forma significativa como evidenciado no experimento.

BODMAN-SMITH; MBUCHI; CULLEY; BATES e RAYNES (2002) demonstram que em linhagem diferenciada de macrófagos U397 e em macrófagos derivados de sangue periférico que a opsonização com CRP promove um ganho na internalização de parasitos do gênero *Leishmania*. Quando comparada a fagocitose de parasito não opsonizados, porém nesse mesmo trabalho não foi evidenciado alteração na sobrevivência do parasito após a fagocitose, associação realizada devida a não alteração nos níveis de TNF- $\alpha$  produzidos por essas células após a captação do parasito

Essa maior afinidade para CRP evidenciada nesse grupo, é refletida também na produção de citocinas após a internalização do parasito. Quando comparamos de forma pareada esse grupo em diferentes condições, ficou evidente um aumento da produção de TNF- $\alpha$  quando os parasitos eram fagocitados via CRP/SCRIP quando comparado com a opsonização via IgG. Sugerindo que essa via de internalização no grupo em questão o torna mais responsivo para produção desta citocina. Desta forma, é possível que, por apresentar capacidade de fagocitar via CRP, este grupo apresenta uma vantagem na resposta contra o parasito, em comparação com os demais grupos deste estudo. Além disso, em nosso estudo houve menor produção de IL-10 e IL-6 em relação aos outros genótipos, citocinas essas que adotam perfil de modulação de macrófagos de acordo com o modelo de infecção previamente citados

Outro fenômeno observado dentro deste grupo em questão é uma marcada inibição na produção de IL-8, quando este entra em contato com parasitos opsonizados com IgG anti-leishmania, em comparação com as demais condições de cultura na ausência de LPS. A IL-8 é uma quimiocina com caráter inflamatório e produzida por diversas células da resposta imune inclusive por células e tecidos sobre processo de inflamação, possui dentre suas principais atividades o recrutamento de células para o sítio de inflamação tendo como principal alvo os neutrófilos (JUNDI; GREENE, 2015).

O papel desta citocina é bem descrito, porém na leishmaniose visceral o real motivo da elevação desta citocina e ação dos neutrófilos recrutados para o sítio de infecção permanece como um ponto a ser mais explorado. Neutrófilos são as primeiras células recrutadas em infecções com parasitos do gênero *Leishmania*, ainda não está clara sua função. Entretanto, alguns trabalhos descrevem sua importância no controle parasitário, porém em determinadas situações, a degranulação do conteúdo citoplasmático pode colaborar com o processo de

patogênese. (CARLSEN; LIANG; SHELITE; WALKER *et al.*, 2015; CONCEIÇÃO; DAVIS; CARNEIRO; GIUDICE *et al.*, 2016; SAFAIYAN; BOLHASSANI; NYLEN; AKUFFO; RAFATI, 2011)

Na tentativa de caracterizar a ativação e a real função do neutrófilos na leishmaniose visceral, (YIZENGAW; GETAHUN; TAJEBE; CRUZ CERVERA *et al.*, 2016) demonstrou que durante a doença ativa os neutrófilos apresentam uma taxa de ativação elevada, vista por aumento nos níveis de arginase, mieloperoxidase e elastaseproteínas presentes em grânulos de neutrófilos imaturos. Demonstraram ainda que neutrófilos presentes nessas pacientes são incapazes de realizar NETosis (capacidade de expor o DNA para o ambiente extracelular, em forma de rede), sugerindo que neutrófilos imaturos podem contribuir para a patogênese da leishmaniose visceral.

Diante dos resultados apresentados para no estudo na área endêmica onde o polimorfismo analisado se encontra fortemente associado com os indivíduos afetados. E em adição os achados no presente trabalho, onde foi evidenciado que o polimorfismo promove uma alteração nos padrões de produção de citocinas em macrófagos desafiados com *L. infantum*, consequente no perfil de polarização desta células. Sendo estas células uma das principais apresentadoras de antígenos e a principal célula efetora da imunidade mediado por células, tal mecanismo pode vir a contribuir com o perfil de ativação da resposta imune adaptativa, desta forma influenciando no resultado da infecção. Sendo desta forma necessário mais trabalhos para elucidar de forma o mecanismo de uma forma mais concreta. Desta forma permitindo encontrar possíveis pontos críticos no processo de infecção, assim sendo possível o desenvolvimento de estratégias capaz de impedir a manutenção e erradicação da infecção.

## 14. CONCLUSOES

1. Nos indivíduos estudados os genótipos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e houve maior frequência do genótipo AG(H/R).
2. Indivíduos com isoforma H/R tem elevada taxa de fagocitose, e a taxa de fagocitose é opsonina dependente.
3. A produção de IL-10, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  apresentaram padrões distintos no diferentes genótipos e condições de opsonização. Com os Indivíduos com a isoforma H/R apresentado elevada produção de IL-10, IL-6 que indicam alta susceptibilidade a infecção com *L. infantum*.

## 15. REFERENCIAS

- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; GUTIÉRREZ-SOLAR, B.; JIMÉNEZ, M. *et al.* Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clinical microbiology reviews**, 10, n. 2, p. 298-319, 1997.
- ANDERSON C. F.; OUKKA. M.; KUCHROO. V. J.; SACKS, D. CD4(?)CD25(- Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.*;204:285– 97, 2007.
- ANSARI, N. A.; SALUJA, S.; SALOTRA, P. Elevated levels of interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, 119, n. 3, p. 339-345, 2006.
- AUJLA, S. J.; CHAN, Y. R.; ZHENG, M.; FEI, M.; ASKEW, D. J.; POCIASK, D. A.; REINHART, T. A.; MCALLISTER, F.; EDEAL, J.; GAUS, K.; HUSAIN, S.; KREINDLER, J. L.; DUBIN, P. J.; PILEWSKI, J. M.; MYERBURG, M. M.; MASON, C. A.; IWAKURA, Y.; KOLLS, J. K. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med.* 14:275–281, 2008.
- AUJLA, S. J.; DUBIN, P. J.; KOLLS, J. K. Th17 cells and mucosal host defense. *Semin Immunol.* 19:377–382, 2007.
- BABALOO, Z.; KAYE, P. M.; ESLAMI, M. B. Interleukin-13 in Iranian patients with visceral leishmaniasis: relationship to other Th2 and Th1 cytokines. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygien.* 95: 85–88, 2001.
- BACELLAR, O.; BRODSKYN, C.; GUERREIRO, J.; BARRALNETTO, M.; COSTA, C. H.; COFFMAN, R. L.; JOHNSON, W. D.; CARVALHO, E. M. Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases.* 173:1515-1518, 1996.
- BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P. *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and immunity**, 70, n. 12, p. 6734-6740, 2002.
- BADARO, R.; JONES, T. C.; CARVALHO, E. M.; SAMPAIO, D. *et al.* New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, 154, n. 6, p. 1003-1011, 1986.
- BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A. Human\_Leishmaniasis@cytokines.bahia.br. *Brazilian journal of medical and biological research.* 31: 149–155, 1998.
- BEE, A.; CULLEY, F. J.; ALKHALIFE, I. S.; BODMAN-SMITH, K. B. *et al.* Transformation of *Leishmania mexicana* metacyclic promastigotes to amastigote-like forms mediated by binding of human C-reactive protein. **Parasitology**, 122, n. Pt 5, p. 521-529, 2001.
- BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E. M.; SACKS, D. L. CD4? CD25? regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature.* 420:502–7, 2002.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441:235–238.

BERMUDEZ, L. E.; WU, M.; PETROFSKY, M.; YOUNG, L. S. Interleukin-6 antagonizes tumor necrosis factor-mediated mycobacteriostatic and mycobactericidal activities in macrophages. **Infection and immunity**, 60, n. 10, p. 4245-4252, 1992.

BLACKWELL, J. M. et al. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. *Parasite immunology*, v. 31, n. 5, p. 254-266, 2009.

BLACKWELL, Jenefer M. et al. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. *Cellular microbiology*, v. 3, n. 12, p. 773-784, 2001.

BODMAN-SMITH, K. B.; MBUCHI, M.; CULLEY, F. J.; BATES, P. A.; RAYNES, J. G. C-reactive protein-mediated phagocytosis of *Leishmania donovani* promastigotes does not alter parasite survival or macrophage responses. **Parasite immunology**, 24, n. 9-10, p. 447-454, 2002.

BOGDAN, C.; GESSNER, A.; ROLLINGHOFF, M. Cytokines in leishmaniasis: a complex network of stimulatory and inhibitory interactions. *Immunobiology*. 189: 356–396, 1993.

BRADLEY, D. J. et al. Regulation of *Leishmania* populations within the host. III. Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. *Clinical and experimental immunology*, v. 37, n. 1, p. 7, 1979.

BUCHETON, B.; ABEL, L.; EL-SAFI, S.; KHEIR, M. M.; PAVEK, S.; LEMAINQUE, A., DESSEIN, A. J. A major susceptibility locus on chromosome 22q12 plays a critical role in the control of kala-azar. *The American Journal of Human Genetics*. 73(5):1052-60, 2003. (B)

BUCHETON, B.; ABEL, L.; KHEIR, M. M.; MIRGANI, A. *et al.* Genetic control of visceral leishmaniasis in a Sudanese population: candidate gene testing indicates a linkage to the NRAMP1 region. **Genes and immunity**, 4, n. 2, p. 104-109, 2003.

BUXBAUM, L. U.; SCOTT, P. Interleukin 10- and Fcγ receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. **Infection and immunity**, 73, n. 4, p. 2101-2108, 2005.

CABRERA, M.; SHAW, M. A.; SHARPLES, C.; WILLIAMS, H. *et al.* Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. **The Journal of experimental medicine**, 182, n. 5, p. 1259-1264, 1995.

CAMPINO, S.; KWIATKOWSKI, D.; DESSEIN, A. Mendelian and complex genetics of susceptibility and resistance to parasitic infections. **Seminars in immunology**, 18, n. 6, p. 411-422, 2006.

CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O.; BROWNELL, C.; RÉGIS, T.; COFFMAN, R. L.; REED, S. G. Restoration of IFN-γ production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *The Journal of Immunology*. 152: 5949–5956, 1994.

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BARRAL-NETTO, M.; BADARÓ, R.; ROCHA, H.; JOHNSON, W. D. JR . Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. *Journal of Infectious Diseases* 165: 535–540, 1992.

CARLSEN, E. D.; LIANG, Y.; SHELITE, T. R.; WALKER, D. H. *et al.* Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. **Clinical and experimental immunology**, 182, n. 2, p. 109-118, 2015.

CASTELLANO, L. R.; ARGIRO, L.; DESSEIN, H.; DESSEIN, A. *et al.* Potential Use of Interleukin-10 Blockade as a Therapeutic Strategy in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of immunology research**, 2015, p. 152741, 2015.

Chang, K. P. 1981. Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30:322-333.

CLEMENTI, M.; DI GIANANTONIO, E. Genetic susceptibility to infectious diseases. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, 21, n. 4, p. 345-349, 2006.

CONCEIÇÃO, J.; DAVIS, R.; CARNEIRO, P. P.; GIUDICE, A. *et al.* Characterization of Neutrophil Function in Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. **PLoS neglected tropical diseases**, 10, n. 5, 2016.

COURTIN, D.; ARGIRO, L.; JAMONNEAU, V.; N'DRI, L. *et al.* Interest of tumor necrosis factor- $\alpha$  -308 G/A and interleukin-10 -592 C/A polymorphisms in human African trypanosomiasis. **Infection, Genetics and Evolution**, 6, n. 2, p. 123-129, 2006.

CRAIG, A.; FERNANDEZ-REYES, D.; MESRI, M.; MCDOWALL, A. *et al.* A functional analysis of a natural variant of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1Kilifi). **Human molecular genetics**, 9, n. 4, p. 525-530, 2000.

CULLEY, F. J.; HARRIS, R. A.; KAYE, P. M.; MCADAM, K. P.; RAYNES, J. G. C-reactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increases uptake into human macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 156, n. 12, p. 4691-4696, 1996.

D'OLIVEIRA JA, COSTA SRM, BARBOSA AB, ORGE MGO, CARVALHO EM. Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 92: 15-20, 1997.

DATASUS. Ministério da Saúde. Disponível em "<http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>"<http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>. Acesso em 10 de Agosto de 2006.

DESSEIN, A. J.; CHEVILLARD, C.; MARQUET, S.; HENRI, S. *et al.* Genetics of parasitic infections. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, 29, n. 4 Pt 2, p. 484-488, 2001.

EVANS, T. G.; TEIXEIRA, M. J.; MCAULIFFE, I. T.; VASCONCELOS, I. *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **The Journal of infectious diseases**, 166, n. 5, p. 1124-1132, 1992.

FAGHIRIZ, TABELSZ, TAHERIF (1995) Study of the association of HLA class I antigens with kala-azar. *Hum Hered* 45:258-261

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. Aspectos Clínicos de Cães com Leishmaniose Visceral no Município de Araçatuba, São Paulo, Brasil. *Clínica Veterinária*. 5:28, 36-44, 2000.

FLINT, J.; HARDING, R. M.; BOYCE, A. J.; CLEGG, J. B. The population genetics of the haemoglobinopathies. **Bailliere's clinical haematology**, 11, n. 1, p. 1-51, 1998.

FLORI, L.; DELAHAYE, N. F.; IRAQI, F. A.; HERNANDEZ-VALLADARES, M. *et al.* TNF as a malaria candidate gene: polymorphism-screening and family-based association analysis of mild malaria attack and parasitemia in Burkina Faso. **Genes and immunity**, 6, n. 6, p. 472-480, 2005.

GALLO, P.; GONÇALVES, R.; MOSSER, D. M. The influence of IgG density and macrophage Fc (gamma) receptor cross-linking on phagocytosis and IL-10 production. **Immunology letters**, 133, n. 2, p. 70-77, 2010.

GANTT, K. R.; SCHULTZ-CHERRY, S.; RODRIGUEZ, N.; JERONIMO, S. M. B.; NASCIMENTO, E. T.; GOLDMAN, T. L.; RECKER, T. J.; MILLER, M. A.; WILSON, M. E. Activation of TGF- $\beta$  by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *The Journal of Immunology*. 170: 2613–2620, 2003.

GHALIB, H. W.; PIUVEZAM, M. R.; SKEIKY, Y. A.; SIDDIG, M.; HASHIM, F. A. M.; EL-HASSAN, A.; RUSSO, D. M.; REED, S. G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *The Journal of Clinical Investigation*. 92: 324–329, 1993.

GHALIB, H. W.; WHITTLE, J. A.; KUBIN, M.; HASHIM, F. A.; EL-HASSAN, A. M.; GRABSTEIN, K. H.; TRINCHIERI, G.; REED, S. G. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. *The Journal of Immunology*. 154: 4623–4629, 1995.

GERBER, J. S.; MOSSER, D. M. Stimulatory and inhibitory signals originating from the macrophage Fc $\gamma$  receptors. **Microbes and infection**, 3, n. 2, p. 131-139, 2001.

HERMOSO, T.; FISHELSON, Z.; BECKER, S. I.; HIRSCHBERG, K.; JAFFE, C. L. Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. **The EMBO journal**, 10, n. 13, p. 4061-4067, 1991.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet (London, England)**, 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.

HIBBS, M. L.; HOGARTH, P. M.; MCKENZIE, I. F. The mouse Ly-17 locus identifies a polymorphism of the Fc receptor. **Immunogenetics**, 22, n. 4, p. 335-348, 1985.

HIRAYAMA, K. Genetic factors associated with development of cerebral malaria and fibrotic schistosomiasis. **The Korean journal of parasitology**, 40, n. 4, p. 165-172, 2002.

JAMIESON, S. E.; MILLER, E. N.; PEACOCK, C. S.; FAKIOLA, M.; WILSON, M. E.; BALES-HOLST, A.; SHAW, M. A.; SILVEIRA, F.; SHAW, J. J.; JERONIMO, S. M.; BLACKWELL, J. M. Genome-wide scan for visceral leishmaniasis susceptibility genes in Brazil. *Genes and Immunity*. 8(1):84-90, 2007.

JERONIMO, Selma MB *et al.* Genes at human chromosome 5q31. 1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. *Genes and immunity*, v. 8, n. 7, p. 539-551, 2007.

JUNDI, K.; GREENE, C. M. Transcription of Interleukin-8: How Altered Regulation Can Affect Cystic Fibrosis Lung Disease. **Biomolecules**, 5, n. 3, p. 1386-1398, 2015.

KARPLUS, Theresa M. et al. Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. *Infection and immunity*, v. 70, n. 12, p. 6919-6925, 2002.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol**, 9, n. 8, p. 604-615, Jul 11 2011.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? **Journal of global infectious diseases**, 2, n. 2, p. 177-185, 2010.

KIMA, P. E.; CONSTANT, S. L.; HANNUM, L.; COLMENARES, M. *et al.* Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. **The Journal of experimental medicine**, 191, n. 6, p. 1063-1068, 2000.

KINRA, P.; DUTTA, V. Serum TNF alpha levels: a prognostic marker for assessment of severity of malaria. **Tropical biomedicine**, 30, n. 4, p. 645-653, 2013.

KORN, T.; BETTELLI, E.; GAO, W.; AWASTHI, A.; JAGER, A.; STROM, T. B.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K.. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*. 448:484-487, 2007.

KWIATKOWSKI, D. P. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. **American journal of human genetics**, 77, n. 2, p. 171-192, 2005.

LAINSON, R.; READY, P. D.; SHAW, J. J. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian 'uta', as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, 206, n. 1164, p. 307-318, 1979.

LARA, M. L.; LAYRISSE, Z.; SCORZA, J. V.; GARCIA, E. *et al.* Immunogenetics of human American cutaneous leishmaniasis. Study of HLA haplotypes in 24 families from Venezuela. **Human immunology**, 30, n. 2, p. 129-135, 1991.

LUONI, G.; VERRA, F.; ARCÀ, B.; SIRIMA, B. S. *et al.* Antimalarial antibody levels and IL4 polymorphism in the Fulani of West Africa. **Genes and immunity**, 2, n. 7, p. 411-414, 2001.

LAUFS H, MULLER K, FLEISCHER J, REILING N, JAHNKE N, JENSENIUS JC, et al.. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun*. 2002;70(2):826-35. 10.1128/IAI.70.2.826-835.2002

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitology today (Personal ed.)**, 14, n. 3, p. 119-124, 1998.

MAEKAWA, Y.; TSUKUMO, S.-I.; CHIBA, S.; HIRAI, H. *et al.* Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4+ T cells. **Immunity**, 19, n. 4, p. 549-559, 2003.

MAGLIONE, P. J.; XU, J.; CASADEVALL, A.; CHAN, J. Fc gamma receptors regulate immune activation and susceptibility during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 180, n. 5, p. 3329-3338, 2008.

MANGAN PR, HARRINGTON LE, O'QUINN DB, HELMS WS, BULLARD DC, ELSON CO, HATTON RD, WAHL SM, SCHOEB TR, WEAVER CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006;441:231–234.

MAROOF, A.; BEATTIE, L.; ZUBAIRI, S.; SVENSSON, M.; STAGER, S.; KAYE, P. M. Posttranscriptional regulation of IL10 gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function. *Immunity*. 29:295–305, 2008.

MARZOCHI, K.B.F.; MARZOCHI, M.C.A.; SCHUBACH, A.O. Leishmaniose visceral : interação hospedeiro-parasito e determinismo das formas clínicas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32, supl. 2, p. 59, 1999.

MCCONVILLE MJ, TURCO SJ, FERGUSON MA, SACKS DL. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J* (1992) 11(10):3593–600.

MCMAHON-PRATT, D & ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunological Reviews*. 201: 206–224, 2004.

MEDDEB-GARNAOUI A, GRITLI S, GARBOUJ S, BEN FADHEL M, EL KARES R, MANSOUR L, KAABI B, CHOUCANE L, BEN SALAH A, DELLAGI K (2001) Association analysis of HLA-Class II and Class III gene polymorphisms in the susceptibility to Mediterranean visceral leishmaniasis. *Hum Immunol* 62:509–517

MILES, S. A.; CONRAD, S. M.; ALVES, R. G.; JERONIMO, S. M.; MOSSER, D. M. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **The Journal of experimental medicine**, 201, n. 5, p. 747-754, 2005.

MILES, SUZANNE A. ET AL. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *The Journal of experimental medicine*, v. 201, n. 5, p. 747-754, 2005.

MILLER, E. N.; FADL, M.; MOHAMED, H. S.; ELZEIN, A.; JAMIESON, S. E.; CORDELL, H. J.; PEACOCK, C. S.; FAKIOLA, M.; RAJU, M.; KHALIL, E. A.; ELHASSAN, A.; MUSA, A. M.; IBRAHIM, M. E.; BLACKWELL, J. M. Y-chromosome lineage- and village-specific genes on chromosomes 1p22 and 6q27 control visceral leishmaniasis in Sudan. *PLoS Genetics*. 3(5): 679–688, 2007.

MIRALLES, G. D.; STOECKLE, M. Y.; MCDERMOTT, D. F.; FINKELMAN, F. D.; MURRAY, H. W. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*. 62: 1058–1063, 1994.

MIYAGAWA, N.; OKAMOTO, Y.; NAKANO, H. Effect of C-reactive protein on peritoneal macrophages. II. Human C-reactive protein activates peritoneal macrophages of guinea pigs to release superoxide anion in vitro. **Microbiology and immunology**, 32, n. 7, p. 721-731, 1988.

MOHAMED, H. S.; IBRAHIM, M. E.; MILLER, E. N.; PEACOCK, C. S. *et al.* Genetic susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan: linkage and association with IL4 and IFNGR1. **Genes and immunity**, 4, n. 5, p. 351-355, 2003.

MOHAMED, HIBA SALAH et al. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan. *European Journal of Human Genetics*, v. 12, n. 1, p. 66-74, 2004.

MORAHAN, G.; BOUTLIS, C. S.; HUANG, D.; PAIN, A. *et al.* A promoter polymorphism in the gene encoding interleukin-12 p40 (IL12B) is associated with mortality from cerebral malaria and with reduced nitric oxide production. **Genes and immunity**, 3, n. 7, p. 414-418, 2002.

MÜLLER, K.; BISCHOF, S.; SOMMER, F.; LOHOFF, M. *et al.* Differential production of macrophage inflammatory protein 1gamma (MIP-1gamma), lymphotactin, and MIP-2 by CD4(+) Th subsets polarized in vitro and in vivo. **Infection and immunity**, 71, n. 11, p. 6178-6183, 2003.

MURRAY, H. W. Accelerated control of visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin-6-deficient mice. **Infection and immunity**, 76, n. 9, p. 4088-4091, 2008.

NEVES, D. P. Leishmaniose Visceral Americana. In: \_\_\_\_\_. *Parasitologia Dinâmica*. São Paulo: Atheneu, p 101-12, 2003.

NURIEVA, R.; YANG, X. O.; MARTINEZ, G.; ZHANG, Y.; PANOPOULOS, A. D.; MA, L.; SCHLUNS, K.; TIAN, Q.; WATOWICH, S. S.; JETTEN, A. M.; DONG, C. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*. 448:480–483, 2007.

NIETO, A.; BERAÚN, Y.; COLLADO, M. D.; CABALLERO, A. *et al.* HLA haplotypes are associated with differential susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Tissue antigens**, 55, n. 3, p. 195-198, 2000.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, 22, n. 1, p. 1-13, 1996. PEARSON, R. D., AND R. T. STEIGBIGEL. 1981. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 127:1438-1443.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; MARTINS-FILHO, O. A.; PRATA, A.; SILVA, L. D. A. D. A. *et al.* Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. **Clinical and experimental immunology**, 146, n. 1, p. 124-132, 2006.

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

PHAROAH, P. D.; ANTONIOU, A.; BOBROW, M.; ZIMMERN, R. L. *et al.* Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. **Nature genetics**, 31, n. 1, p. 33-36, 2002.

PISSETTI, C. W.; CORREIA, D.; DE OLIVEIRA, R. F.; LLAGUNO, M. M. M. *et al.* Genetic and functional role of TNF-alpha in the development *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS neglected tropical diseases**, 5, n. 3, 2011.

PRATA, A. [Clinical & laboratory picture of kala-azar]. **Arquivos brasileiros de medicina naval**, 18, n. 65, p. 5773-6022, 1957.

PUENTES, S. M.; DA SILVA, R. P.; SACKS, D. L.; HAMMER, C. H.; JOINER, K. A. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 145, n. 12, p. 4311-4316, 1990.

REY, L. Leishmânia e Leishmanioses: O Parasito; O Complexo *Leishmania donovani* e a Leishmaniose Visceral. In: \_\_\_\_\_. *Parasitologia*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 182-92; 215-26, 1991.

RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R. P.; LESSA, H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 31: 143–148, 1998.

SACKS, DAVID L. et al. An analysis of T cell responsiveness in Indian kala-azar. *The Journal of immunology*, v. 138, n. 3, p. 908-913, 1987.

SAFAIYAN, S.; BOLHASSANI, A.; NYLEN, S.; AKUFFO, H.; RAFATI, S. Contribution of human neutrophils in the development of protective immune response during in vitro *Leishmania major* infection. **Parasite immunology**, 33, n. 11, p. 609-620, 2011.

SIMPLÍCIO, A.C.R.; FURTADO, J.B.V.; MONTEIRO, P.S.; GARRETT, D. Leishmaniose visceral no Brasil: análise epidemiológica nos últimos 16 anos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, supl. 1, p. 298, 2002.

SALMON, J. E.; MILLARD, S.; SCHACHTER, L. A.; ARNETT, F. C. *et al.* Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. **The Journal of clinical investigation**, 97, n. 5, p. 1348-1354, 1996.

SCHULDT, K.; ESSER, C.; EVANS, J.; MAY, J. *et al.* FCGR2A functional genetic variant associated with susceptibility to severe malarial anaemia in Ghanaian children. **Journal of medical genetics**, 47, n. 7, p. 471-475, 2010.

SCHUMANN, R. R. Host cell-pathogen interface: molecular mechanisms and genetics. **Vaccine**, 22 Suppl 1, p. 4, 2004.

SHI, Y. P.; NAHLEN, B. L.; KARIUKI, S.; URDAHL, K. B. *et al.* Fc gamma receptor IIa (CD32) polymorphism is associated with protection of infants against high-density *Plasmodium falciparum* infection. VII. Asembo Bay Cohort Project. **The Journal of infectious diseases**, 184, n. 1, p. 107-111, 2001.

SOMECH, R.; AMARIGLIO, N.; SPIRER, Z.; RECHAVI, G. Genetic predisposition to infectious pathogens: a review of less familiar variants. **The Pediatric infectious disease journal**, 22, n. 5, p. 457-461, 2003.

STÄGER, S.; MAROOF, A.; ZUBAIRI, S.; SANOS, S. L.; KOPF, M.; KAYE, P. M. Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against *Leishmania donovani* and the expansion of IL-10+ CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 36(7):1764-71, 2006.

SVENSSON M, MAROOF A, ATO M, KAYE PM. Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells. *Immunity*. 2004;21:805–16.

TISHKOFF, S. A.; WILLIAMS, S. M. Genetic analysis of African populations: human evolution and complex disease. **Nature reviews. Genetics**, 3, n. 8, p. 611-621, 2002.

TRINCHIERI, G. Regulatory role of T cells producing both interferon gamma and interleukin 10 in persistent infection. **The Journal of experimental medicine**, 194, n. 10, p. 7, 2001.

VELDHOEN, M.; HOCKING, R. J.; ATKINS, C. J.; LOCKSLEY, R. M.; STOCKINGER, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**. 24:179–189, 2006.

WARMERDAM, P. A.; VAN DE WINKEL, J. G.; VLUG, A.; WESTERDAAL, N. A.; CAPEL, P. J. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 147, n. 4, p. 1338-1343, 1991.

WEATHERALL, D. J.; BELL, J. I.; CLEGG, J. B.; FLINT, J. *et al.* Genetic factors as determinants of infectious disease transmission in human communities. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, 321, n. 1207, p. 327-348, 1988.

WEIRATHER, J. L.; DUGGAL, P.; NASCIMENTO, E. L.; MONTEIRO, G. R. *et al.* Comprehensive candidate gene analysis for symptomatic or asymptomatic outcomes of Leishmania infantum infection in Brazil. **Ann Hum Genet**, 81, n. 1, p. 41-48, Jan 2017.

WHITE JR, A. CLINTON *et al.* Leishmania chagasi antigens recognized in cured visceral leishmaniasis and asymptomatic infection. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 46, n. 2, p. 123-131, 1992.

WHO. **Leishmaniasis**. 2018.

WILSON, MARY E.; JERONIMO, SELMA; PEARSON, RICHARD D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing Leishmania species. **Microbial pathogenesis**, v. 38, n. 4, p. 147-160, 2005.

WRIGHT SD, SILVERSTEIN SC. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. **Journal of Experimental Medicine**. 1983;158:2016–2023.

YAZDANBAKHSH, M.; SARTONO, E.; KRUIZE, Y. C.; KURNIAWAN, A. *et al.* HLA and elephantiasis in lymphatic filariasis. **Human immunology**, 44, n. 1, p. 58-61, 1995.

YIZENGAW, E.; GETAHUN, M.; TAJEBE, F.; CRUZ CERVERA, E. *et al.* Visceral Leishmaniasis Patients Display Altered Composition and Maturity of Neutrophils as well as Impaired Neutrophil Effector Functions. **Frontiers in immunology**, 7, p. 517, 2016.

ZIJLSTRA, E. E.; ALI, M. S.; EL-HASSAN, A. M.; EL-TOUM, I. A. *et al.* Kala-azar in displaced people from southern Sudan: epidemiological, clinical and therapeutic findings. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 85, n. 3, p. 365-369, 1991.

ZIJLSTRA, E. E.; EL-HASSAN, A. M. Leishmaniasis in Sudan. Visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 95 Suppl 1, p. 58, 2001.

ZHOU, L.; SPOLSKI IVANOV, R.; MIN, R.; SHENDEROV, K.; EGAWA, T.; LEVY, D. E.; LEONARD, W. J.; LITTMAN, D. R. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nat Immunol**. 8:967–974, 2007.