

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Instituto René Rachou**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Tese de Doutorado**

Avaliação da taxa de infecção *in vitro* de células-tronco humanas derivadas da medula óssea por *Leishmania infantum* e o impacto da infecção na hematopoese e no perfil fenotípico-funcional das progênes

por

Raquel Carvalho Gontijo

Belo Horizonte  
2017

## RAQUEL CARVALHO GONTIJO

Avaliação da taxa de infecção *in vitro* de células-tronco humanas derivadas da medula óssea por *Leishmania infantum* e o impacto da infecção na hematopoese e no perfil fenotípico-funcional das progênes

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias e no grupo Parasite Diseases do Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto

**Orientação:** Dr<sup>a</sup>. Andréa Teixeira de Carvalho

**Coorientação:** Dr. Olindo Assis Martins Filho

Belo Horizonte  
2017

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB/6 1975

G641a Gontijo, Raquel Carvalho.  
2017

Avaliação da taxa de infecção in vitro de células-tronco humanas derivadas da medula óssea por *Leishmania infantum* e o impacto da infecção na hematopoese e no perfil fenotípico-funcional das progênies/Raquel Carvalho Gontijo – Belo Horizonte, 2017

XIX, 109 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 90-107

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

1. Leishmaniose Visceral 2. Hematopoese 3. Células-tronco/virologia I. Título. II. Carvalho, Andréa Teixeira (Orientação). III. Martins Filho, Olindo Assis (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936

## RAQUEL CARVALHO GONTIJO

Avaliação da taxa de infecção *in vitro* de células-tronco humanas derivadas da medula óssea por *Leishmania infantum* e o impacto da infecção na hematopoese e no perfil fenotípico-funcional das progênes

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias e no grupo Parasite Diseases do Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto

Banca examinadora:

Dra. Andréa Teixeira de Carvalho (IRR-FIOCRUZ) – Orientadora/Presidente

Dr. Edward José de Oliveira (IRR-FIOCRUZ) – Titular

Dra. Soraya Torres Gaze Jangola (IRR-FIOCRUZ) – Titular

Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes (UFMG) – Titular

Dra. Liliane Martins dos Santos (UFMG) – Titular

Dra. Jacqueline Araújo Fiuza (IRR-FIOCRUZ) – Suplente

Tese defendida e aprovada em: Belo Horizonte 05/06/2017



**Dedico este trabalho à minha mãe, que esteve presente em todos os momentos da minha vida, com todo seu apoio, dedicação e amor incondicional.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela oportunidade de realizar este trabalho e principalmente por me amparar nessa jornada e me fortalecer para que eu chegasse até aqui.

Às agências de fomento que financiaram este trabalho: FAPEMIG, CNPq, FIOCRUZ e CsF e Universidade do Porto.

Ao Instituto René Rachou, pela infraestrutura e apoio logístico.

À Biblioteca do IRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências dessa dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

À minha orientadora Dra. Andréa Teixeira de Carvalho pela dedicação do seu tempo e compartilhamento de seus conhecimentos.

Ao meu coorientador, Dr. Olindo Assis pela sua dedicação e paixão pelo o trabalho desenvolvido.

Aos amigos do GIPB pelo companheirismo e apoio ao longo dessa jornada.

Às amigas “Quase Doutoradas” por estarem presentes em todos os momentos e por todos os momentos alegres vividos durante esses anos de convivência diária.

Aos amigos do nosso “antigo” LALEI, pelas risadas constantes e por todo apoio que foi dado em todos os momentos.

À Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo, minha primeira orientadora, pelo exemplo de profissional e por ter me iniciado na carreira científica.

À Dra. Vanessa Peruhype, por compartilhar seus conhecimentos, pela sua amizade, dedicação e paciência em todos os momentos.

À Dra. Patrícia Quaresma pela amizade e companheirismo e pela colaboração durante a realização do projeto.

À Plataforma de Citometria do IRR por disponibilizar os subsídios necessários para realização dos experimentos.

À Dra. Anabela Cordeiro por me receber tão bem em seu laboratório e por todos os esforços realizados para a realização do estudo.

À Dra. Diana Moreira pela colaboração no estudo durante sua estadia no Brasil e também em Portugal, por estar sempre disposta a ajudar em todos os momentos.

Aos amigos do grupo *Parasite Diseases*, além de todo conhecimento compartilhado, fizeram minha estadia no Porto mais agradável todos os dias.

Ao Dr. Matheus Fernandes pela sua colaboração na implementação deste projeto.

À Dra. Cláudia Franco e à Clínica Hematológica pela colaboração e doação das amostras utilizadas neste estudo.

Aos meus avós que continuam presentes em meu coração. Vocês também fizeram parte dessa conquista.

À minha mãe por permitir que esse sonho se tornasse real. Por tudo que fez por mim, dedicando sua vida e seu amor infinito, muito obrigada por me proporcionar mais essa vitória.

Ao meu pai pela ajuda nas horas difíceis e pelo apoio constante.

Ao meu marido, André, por caminhar comigo e viver meus sonhos.

Aos meus sogros, Helton e Expedita, por ser minha segunda família.

À todos os meus amigos que tornaram essa jornada mais amena e agradável.

Aos amigos do CGB pelas boas risadas de todo dia e por todo apoio na reta final dessa longa jornada.

## **COLABORAÇÕES**

*Dr<sup>a</sup>. Célia Maria Ferreira Gontijo: Grupo de Estudos em Leishmanioses, Instituto René Rachou - FIOCRUZ.*

*Dr<sup>a</sup>. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal: Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou - FIOCRUZ.*

*Dr<sup>a</sup>. Patrícia Flávia Quaresma: Laboratório de Leishmanioses, Instituto René Rachou - FIOCRUZ.*

*Dr<sup>a</sup>. Cláudia Maria Franco Ribeiro: Hematológica Clínica de Hematologia.*

*Dr<sup>a</sup>. Anabela Cordeiro da Silva: Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Portugal.*

*Dr<sup>a</sup>. Diana Raquel Moreira: Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Portugal.*

*Dr<sup>a</sup>. Mariana Rezende: Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Portugal.*

*Dr<sup>a</sup>. Denise da Silveira Lemos Giunchetti: Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou - FIOCRUZ*

*Dr. Matheus Fernandes Costa e Silva: Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou – FIOCRUZ.*

## RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença letal, de caráter zoonótico que atinge milhares de pessoas no Brasil. Existem diversos fatores que aumentam a susceptibilidade à LV e a imunossupressão é um fator de risco bem estabelecido. A leishmaniose pós-imunossupressão é caracterizada por um aumento no número de parasitos na medula óssea com consequentes desordens hematopoéticas, além de manifestações clínicas não convencionais. No presente estudo, utilizamos uma nova abordagem, infectando células-tronco hematopoéticas humanas derivadas da medula óssea com *Leishmania (Leishmania) infantum*. Utilizando esta estratégia, mostramos através da citometria de fluxo, que as CTH são capazes de fagocitar formas promastigotas de *L. (L.) infantum* e produzir as citocinas IL-4, IL-10 IFN- $\gamma$  e principalmente TNF- $\alpha$ . Além disso, os resultados deste estudo demonstraram que a infecção por *L. (L.) infantum* aumenta a hematopoese *in vitro*, favorecendo o desenvolvimento de colônias da linhagem eritroide, por meio de um mecanismo ainda desconhecido que parece envolver a expressão de SIRT1. No presente estudo, observamos também que a infecção de CTH por *L. (L.) infantum* altera o perfil fenotípico das progênies celulares, modificando a expressão de marcadores de superfície das linhagens eritroide e mieloide nas células, após a diferenciação. Além disso, ao avaliar a expressão gênica de SIRT6, observamos que o gene que codifica esta proteína está aumentado nos momentos iniciais da infecção, sugerindo fortemente sua contribuição nos eventos de diferenciação celular e na expressão de TNF- $\alpha$  pelas células infectadas. Assim, com a realização deste trabalho foi possível concluir que a infecção por *L. (L.) infantum* é capaz de induzir alterações na hematopoese e no perfil fenotípico das progênies, interferindo no número de progênies derivadas da linhagem eritroide. Concluímos ainda que a expressão de citocinas e sirtuínas é importante na criação de um microambiente que, ao mesmo tempo, favorece a hematopoese e a manutenção da infecção.

**Palavras-Chave:** Leishmaniose Visceral; hematopoese; células-tronco.

## ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) is a lethal zoonosis that affect thousands of people in Brazil. There are many factors that increase susceptibility to disease and immunosuppression is a well-established risk factor. Post-immunosuppression leishmaniasis are characterized by the increase of parasite burden, hematopoietic disorders and unusual clinical manifestations. In the present study, we use a new approach infecting human bone marrow derived stem cells with *L. (L.) infantum*. Using this strategy, we demonstrated, by flow cytometry, that human hematopoietic stem cells (hHSC) are able to phagocytize *L. (L.) infantum* promastigotes and release modulatory and pro-inflammatory cytokines, mainly TNF- $\alpha$ . Moreover, our results demonstrated that *L. (L.) infantum* infection enhances *in vitro* hematopoiesis, favoring the development of erythrocytic lineage through an unknown mechanism, that seems to be related with SIRT1 expression. Furthermore, we found that *in vitro* hematopoiesis of *L. (L.) infantum* infected cells also alters phenotypic profile of their progenies, modifying the expression of surface markers on both differentiated erythroid and myeloid lineages. Regarding the evaluation of SIRT6 expression, we observed that the gene that encode this protein is increased at early times of *L. (L.) infantum* infection, suggesting strongly the role of this sirtuin in cell differentiation and TNF- $\alpha$  release. In conclusion, *L. (L.) infantum* is capable to induce hematopoietic and phenotypic profile alterations, interfering in the number of erythroid colonies. Moreover, the cytokine and sirtuin expressions may play a pivotal role in creating a microenvironment that favor both hematopoiesis and infection maintenance.

**Keywords:** Visceral Leishmaniasis; hematopoiesis; stem cell.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo biológico de <i>Leishmania spp.</i> .....	22
<b>Figura 2:</b> Principais eventos imunológicos relacionados à LV clássica.....	31
<b>Figura 3:</b> Desenho esquemático das células do sangue e seus precursores na hematopoese. .....	35
<b>Figura 4:</b> Desenho esquemático das funções de desacetilação e ADP-ribosilação das sirtuínas.....	38
<b>Figura 5:</b> Esquema ilustrativo da seleção e marcação de formas promastigotas vivas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> . ....	47
<b>Figura 6:</b> Desenho experimental da estratégia utilizada para realização das culturas de curta duração.....	48
<b>Figura 7:</b> Visualização de colônias leucocitoides (brancas) e eritroides (vermelhas), ao final de 14 dias de cultivo, em microscópio óptico invertido no aumento de 500x. ....	53
<b>Figura 8:</b> Análise representativa da capacidade fagocítica de células-tronco hematopoéticas derivadas da medula óssea.....	54
<b>Figura 9:</b> Análise representativa da expressão de marcadores de superfície em concentrado de leucoaférese. ....	55
<b>Figura 10:</b> Análise representativa da expressão de HLA-DR na população de células CD14 <sup>+</sup> . .....	56
<b>Figura 11:</b> Análise representativa da produção de citocinas intracitoplasmáticas por células-tronco hematopoéticas, avaliada por citometria de fluxo.....	57
<b>Figura 12:</b> Análise representativa da produção de citocinas intracitoplasmáticas por subpopulações de células CD45 <sup>+</sup> .....	58
<b>Figura 13:</b> (A) Curva de crescimento de <i>L. infantum</i> (PP75) (B) Modificação da expressão gênica de <i>Histona H4</i> em relação ao dia 4 de crescimento do parasito (C) Modificação da expressão gênica de <i>SHERP</i> em relação ao dia 4 de crescimento do parasito (D) Modificação da expressão gênica de <i>Meta 1</i> em relação ao dia 4 de crescimento do parasito. ....	62
<b>Figura 14:</b> Avaliação da capacidade de células-tronco hematopoéticas (CTH) de fagocitar formas promastigotas fixadas (Leish-F) e vivas (Leish-V) de <i>L. infantum</i> marcadas com Alexa Flúor 647 .....	63
<b>Figura 15:</b> Análise da expressão das citocinas (A) IFN- $\gamma$ , (B) IL-10, (C) IL-4, e (D) TNF- $\alpha$ por células-tronco hematopoéticas (CTH) na ausência (CT) ou presença de promastigotas de <i>L. infantum</i> fixadas (Leish-F) e vivas (Leish-V).. ....	66
<b>Figura 16:</b> Análise da expressão da citocinas (A) IFN- $\gamma$ , (B) IL-10, (C) IL-4 e (D) TNF- $\alpha$ por subpopulações de células CD45 <sup>+</sup> (linfócitos, monócitos e granulócitos) na ausência (CT) ou presença de promastigotas de <i>L. infantum</i> fixadas (Leish-F) e vivas (Leish-V) .....	67
<b>Figura 17:</b> Análise do fenótipo celular de subpopulações de células CD45 <sup>+</sup> estimuladas com formas promastigotas vivas (Leish-V) ou fixadas (Leish-F) de <i>L. (L.) infantum</i> , nos tempos T0 (2 horas de interação parasito/célula) e T14 (pós-hematopoese <i>in vitro</i> ).....	70

- Figura 18:** Análise da expressão dos marcadores de superfície CD33 (A) e CD13 (B), estimuladas com formas promastigotas vivas (Leish-V) ou fixadas (Leish-F) de *L. infantum*, nos tempos T0 (2 horas de interação parasito/célula) e T14 (pós-hematopoeise *in vitro*).71
- Figura 19:** Análise da expressão dos marcadores de superfície CD14 (A) e HLA-DR (B), estimuladas com formas promastigotas vivas (Leish-V) ou fixadas (Leish-F) de *L. infantum*, nos tempos T0 (2 horas de interação parasito/célula) e T14 (pós-hematopoeise *in vitro*).72
- Figura 20:** Análise da expressão dos marcadores de superfície CD41a (A) e CD235a (B), estimuladas com formas promastigotas vivas (Leish-V) ou fixadas (Leish-F) de *L. infantum*, nos tempos T0 (2 horas de interação parasito/célula) e T14 (pós-hematopoeise)..... 73
- Figura 21:** Análise da expressão dos marcadores de superfície CD19 (A) e CD10 (B), estimuladas com formas promastigotas vivas (Leish-V) ou fixadas (Leish-F) de *L. infantum*, nos tempos T0 (2 horas de interação parasito/célula) e T14 (pós-hematopoeise *in vitro*)74
- Figura 22:** Aspecto das colônias formadas ao final de 14 dias de cultivo.. ..... 75
- Figura 23:** Contagem do número total de colônias (A). Contagem das colônias brancas e vermelhas após 14 dias de cultivo, na ausência (CT) ou presença de promastigotas vivas de *L. infantum* (Leish).. ..... 76
- Figura 24:** Perfil de expressão gênica de SIRT 1 por células-tronco hematopoéticas durante a hematopoeise *in vitro*, nos tempos T0, T10 e T14 na presença ou ausência de formas promastigotas vivas de *L. infantum* (Leish)..... 77
- Figura 25:** Perfil de expressão gênica de *SIRT6* por células-tronco hematopoéticas durante a hematopoeise *in vitro*, nos tempos T0, T10 e T14 na presença ou ausência de formas promastigotas vivas de *L. infantum* (Leish). ..... 78
- Figura 26:** Desenho esquemático do resumo dos resultados obtidos na avaliação da taxa de fagocitose e produção de citocinas em células-tronco hematopoéticas (CTH), monócitos e granulócitos derivados da medula óssea, após estímulo de *L. (L.) infantum*. ..... 82



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina Difosfato – <i>Adenosine Diphosphate</i>
Akt	Proteína Quinase B – <i>Protein Kinase B</i>
ALAS2	Delta-aminolevulinato sintase 2 - <i>Delta-aminolevulinate synthase 2</i>
AMPK	Proteína AMP Quinase Ativada – <i>AMP-activated Protein Kinase</i>
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato – <i>Adenosin Triphosphate</i>
APC	Célula Apresentadora de Antígenos – <i>Antigen Presenting Cell</i>
BFA	Brefeldina A – <i>Brefeldin A</i>
BSA	Albumina Bovina Sérica – <i>Bovine Seric Albumine</i>
CDC	Centro de Controle de Doenças – <i>Center for Disease Control</i>
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CD	Grupos de Diferenciação – <i>Cluster of Differentiation</i>
CCL8	Quimiocina CC Ligante 8
CXCL9	Quimiocina CXC Ligante 9
CXCL10	Quimiocina CXC Ligante 10
CXCL12	Quimiocina CXC Ligante 12
CFU-E	Unidade Formadora de Colônia Eritride – <i>Colonie Forming Unit</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CsF	Ciência sem Fronteiras
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
CTH	Células-tronco hematopoéticas
CTE	Células-tronco Embrionárias

DAT	Teste de Aglutinação Direta - Fast Agglutination Screening Test
DNA	Ácido desoxirribonucleico – <i>Desoxiribonucleic Acid</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína – <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FL-1	Fluorescência 1
FL-2	Fluorescência 2
FL-3	Fluorescência 3
FL-4	Fluorescência 4
FSC	Tamanho Celular – <i>Forward Scatter</i>
FW	Sequência <i>Forward</i>
g	Grama
G-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos – <i>Granulocytic Colony Stimulating Factor</i>
GIPB	Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores
GM-CSF	Fator de Estimulação de Colônias Granulocíticas Macrofágicas – <i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano - <i>Human Leukocyte Antigen</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana – <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
H3-K9	Resíduo de lisina da Histona H3
H4-K16	Resíduo de lisina da Histona H4
H1-K26	Resíduo de lisina da Histona H1
IMF	Intensidade Média de Fluorescência
IRF	Fator Regulador de Interferon – <i>Interferon-Regulator Factor</i>
IFAT	Teste de Fluorescência Indireta de Anticorpo - <i>Indirect Fluorescence Antibody Test</i>

IFN- $\gamma$	Interferon Gamma
I $\kappa$ B	Inibidor de NF- $\kappa$ B
IL	Interleucina
IgG	Imunoglobulina G
kDa	Quilo Daltons
K39	Kinesina 39
LV	Leishmaniose Visceral
LT	Leishmaniose Tegumentar
LPS	Lipopolissacarídeo
LH	Linfoma de Hodgkin
LPG	Lipofosfoglicano - <i>Lipophosphoglican</i>
L	Litro
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ M	Micromolar
mL	Mililitro
mg	Miligrama
MM	Mieloma Múltiplo
mRNA	RNA mensageiro
MFF	Solução Fixadora
mM	milimolar
MHC II	Complexo de Histocompatibilidade Principal II – <i>Major Histocompatibility Complex II</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived Supressor Cells</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos - <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo – <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>

NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Hidrogenada - <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen</i>
NAM	Nicotinamida
NMN	Nicotinamida Mononucleotídeo
Nampt	Nicotinamida Fosforribosiltransferase
Nmnat	Nicotinamina Mononucleotídeo Adenililtransferase
Nanog	Fator de Transcrição
NNN	Meio de cultura <i>Neal, Novy, Nicolle</i>
NF-kB	Fator Nuclear kappa B – <i>Nuclear Factor kappa B</i>
NO	Óxido Nítrico – <i>Nitric Oxide</i>
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
Oct4	Fator de Transcrição - <i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase – <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PI3K	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase - <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
p53	Proteína 53
PGC-1 $\alpha$	Co-ativador transcricional PGC-1 $\alpha$
PPAR $\gamma$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PBS-W	Tampão Fosfato Salino 0,015M, pH 7,4 contendo 0,5% de albumina bovina sérica e 0,1% de azida sódica
PBS-P	Tampão Fosfato Salino 0,015M, pH 7,4 contendo 0,5% de albumina bovina sérica, 0,1% de azida sódica e saponina
pH	Potencial Hidrogeniônico
PE	Ficoeritrina - <i>Phycoerithryn</i>
PerCP	Proteína Peridinina Clorofila – <i>Peridinin Chlorophyll Protein</i>
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
PBS 1X	Tampão Fosfato Salino 0,015M, pH 7,4
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta

RNA	Ácido Ribonucleico – <i>Ribonucleic Acid</i>
ROI	Intermediários Reativos de Oxigênio – <i>Reactive Oxygen Intermediates</i>
RNI	Intermediários Reativos de Nitrogênio – <i>Reactive Nitrogen Intermediates</i>
RPMI	Meio de Cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio – <i>Reactive Oxygen Species</i>
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa – <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
STAT6	Transdutor de Sinal e Ativador de transcrição 6 - <i>Signal transducer and activator of transcription 6</i>
STAT1	Transdutor de Sinal e Ativador de transcrição 1 - <i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
SSC	Granulosidade Celular – <i>Side Scatter</i>
Sox2	Fator de Transcrição - <i>Sex Determining Region Y</i>
SMF	Sistema Mononuclear Fagocitário
SIRT1	Sirtuína 1
SIRT6	Sirtuína 6
TLR	Receptores do tipo Toll – <i>Toll Like Receptors</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
WHO	Organização mundial da Saúde – <i>World Health Organization</i>
Wnt	Proteínas de Transdução de Sinal Wnt
WHO	Organização mundial da Saúde – <i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	20
3.1. Aspectos epidemiológicos das leishmanioses .....	23
3.2 Manifestações clínicas da LV .....	25
3.3 Diagnóstico e tratamento da LV.....	26
3.4 Aspectos imunológicos da LV .....	28
3.5 As leishmanioses e a imunossupressão .....	32
3.6 Hematopoese .....	34
3.7 Sirtuínas – aspectos gerais e seu papel durante a infecção por <i>L. infantum</i> .....	37
3.7.1 <i>Sirtuína 1 – SIRT1 – e a infecção de células-tronco hematopoéticas por L. infantum</i> .....	38
3.7.2 <i>Sirtuína 6 – SIRT6 - e a infecção de células-tronco hematopoéticas por L. infantum</i> .....	40
2 OBJETIVOS .....	42
2.1. Objetivo geral.....	42
2.2 Objetivos específicos.....	42
3 METODOLOGIA .....	42
3.1 Obtenção de Células-Tronco Hematopoéticas .....	42
4.2 Avaliação da Viabilidade Celular .....	44
4.3 Obtenção, marcação e controle de qualidade dos parasitos .....	44
4.3.1 <i>Obtenção das culturas de L. (L.) infantum</i> .....	44
4.3.2 <i>Controle de qualidade das culturas de L. infantum</i> .....	45
4.3.3 <i>Marcação de L. (L.) infantum com Alexa Fluor 647</i> .....	46
4.4 Infecção e cultivo de células-tronco hematopoéticas .....	47
4.4.1 <i>Preparação das células e culturas de curta duração</i> .....	47
4.4.2 <i>Avaliação da taxa de infecção das células-tronco hematopoéticas por L. (L.) infantum e marcação de superfície</i> .....	48
4.4.3 Avaliação da expressão de citocinas intracelulares.....	50
4.4.3 <i>Ensaio de hematopoese in vitro, contagem das colônias e imunofenotipagem</i> .....	52
4.5 Estratégias de análise dos dados de citometria de fluxo .....	53
4.5.1 <i>Análise da capacidade de células-tronco hematopoéticas em fagocitar formas promastigotas de Leishmania (L.) infantum</i> .....	53
4.5.3. <i>Análise da produção de citocinas intracitoplasmáticas pós-estimulação in vitro por células-tronco hematopoéticas derivadas da medula óssea</i> .....	56

4.5.4. <i>Análise da produção de citocinas intracitoplasmáticas por subpopulações de células CD45<sup>+</sup> (linfócitos, monócitos e granulócitos), após estimulação in vitro, com formas promastigotas vivas e fixadas de L. (L.) infantum</i> .....	57
4.6 Avaliação da expressão Sirtuínas por PCR em tempo real quantitativo – qPCR.....	59
4.6.1 <i>Extração de RNA total e síntese de cDNA</i> .....	59
4.6.2 <i>Ensaio de qPCR</i> .....	59
4.6 Análises estatísticas.....	60
5 RESULTADOS.....	60
5.1 Controle de qualidade das culturas de L. infantum (PP75) para utilização nos ensaios de infecção .....	60
5.2 Avaliação da capacidade de células-tronco hematopoéticas derivadas da medula óssea de fagocitar formas promastigotas vivas de L. infantum .....	62
5.3 Avaliação da expressão de citocinas intracelulares por células-tronco hematopoéticas (CTH) e subpopulações celulares CD45 <sup>+</sup> (linfócitos, monócitos e granulócitos) na ausência ou presença de formas promastigotas de L. infantum.....	64
5.4 Análise do impacto da infecção por L. (L.) infantum no fenótipo celular de células-tronco hematopoéticas derivadas da medula óssea antes e após hematopoese in vitro.....	69
5.4.2 <i>Avaliação do impacto da infecção por L. (L.) infantum na hematopoese</i> .....	74
5.4 Avaliação da expressão gênica de SIRT1 e SIRT6 nas células-tronco hematopoéticas infectadas com L. (L.) infantum antes e após hematopoese in vitro .....	76
6 DISCUSSÃO.....	78
7 CONCLUSÃO .....	89
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
9 ANEXOS.....	108

## 1 INTRODUÇÃO

No Novo Mundo, as leishmanioses são um grupo de doenças de caráter zoonótico causadas por parasitos da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (Ross, 1903), transmitidos ao homem e outros mamíferos domésticos e silvestres pela picada de fêmeas de insetos dípteros conhecidos como flebotomíneos (Psychodidae: Phlebotominae). Estimativas apontam que cerca de 12 milhões de pessoas em 98 países estejam infectadas e 350 milhões em risco de se infectar (WHO, 2016). A prevalência das leishmanioses depende de vários fatores de risco, como a migração, o desmatamento, a urbanização e mudanças na susceptibilidade do homem à infecção, como por exemplo, a desnutrição e a imunossupressão (DESJEUX, 2001).

Nas últimas décadas, as leishmanioses têm sido consideradas infecções oportunistas para os pacientes imunocomprometidos, incluindo os infectados pelo HIV, os receptores de órgãos sólidos e/ou tecidos, portadores de doenças autoimunes e aqueles que estão em uso de terapia imunossupressora (ANTINORI et al., 2008; JOS et al., 2004). Apesar da coinfeção *Leishmania*/HIV ser considerada de grande importância epidemiológica, a imunossupressão por uso de medicamentos tem sido considerada um dos fatores de risco mais importantes, pois além de predispor o paciente a novas infecções, pode alterar o curso da doença, desencadear a reativação de infecções latentes, modificar as manifestações clínicas e dificultar o diagnóstico e a resposta ao tratamento (VAN GRIENSVEN et al., 2014).

A terapia imunossupressora pós-transplante tem por finalidade a diminuição da resposta imunológica do organismo contra o enxerto, amenizando episódios de rejeição. Embora nesses casos a imunossupressão constitua um procedimento obrigatório e esteja presente também em várias terapias contra o câncer e doenças autoimunes, a sua utilização está associada a uma série de efeitos colaterais indesejáveis como, por exemplo, o risco aumentado de ocorrência de infecções (FISHER; WOODLE; THISTLETHWAITE, 2002; KRENSKY, 2001). A imunossupressão em pacientes assintomáticos infectados por tripanossomatídeos pode resultar na reativação da infecção latente com feições clínicas mais graves do que as habitualmente vistas. As infecções dessa natureza são caracterizadas pelo número elevado de parasitos, importantes alterações hematopoéticas e por desencadear manifestações atípicas e aberrantes destas doenças, dificultando o diagnóstico clínico.



Estudos anteriores têm chamado atenção para a infecção de células-tronco da medula óssea por *Leishmania*, com consequentes alterações na hematopoese (ALLAHVERDIYEV et al., 2011; COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000). O contexto dessas infecções, bem como a sobrevivência e a multiplicação desses parasitos nesse sítio precisa ser melhor compreendida. Sabe-se que a medula óssea é um sítio de privilégio imunológico, assim, o padrão de resposta das células diante da infecção pelo parasito poderia estar alterado, favorecendo a manutenção da infecção. Dessa forma, mecanismos intracelulares, como por exemplo, a produção de citocinas, a expressão e o papel das sirtuínas na regulação da apoptose de células parasitadas necessitam ser melhor elucidados.

Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de células-tronco hematopoéticas de se infectar com *L. (L.) infantum* após a interação *in vitro*. Além disso, avaliamos a consequência desta infecção na hematopoese de células infectadas e no perfil fenotípico das progênies celulares obtidas. Por fim, avaliamos também os mecanismos desencadeados após a infecção, como a produção de citocinas e a expressão gênica de sirtuínas.

A hipótese do nosso estudo é que a infecção células-tronco por *L. (L.) infantum* alterará significativamente a hematopoese *in vitro* e o perfil fenotípico-funcional das progênies.

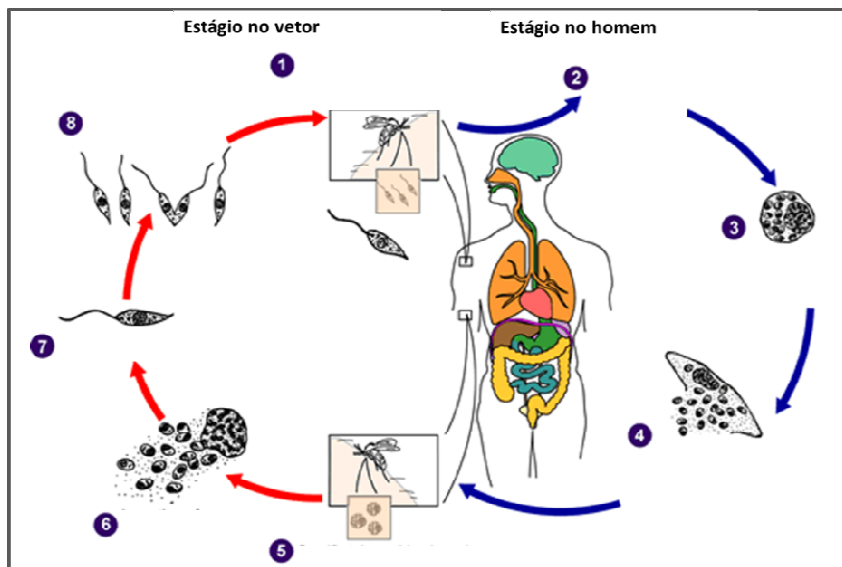
É importante ressaltar que em nosso estudo tivemos a rara oportunidade de trabalhar com células-tronco humanas derivadas da medula óssea. Tal fato é de extrema relevância, uma vez que a grande maioria dos estudos é realizada em modelos murinos ou em linhagens celulares específicas cultivadas em laboratório.

### **As Leishmanioses**

As leishmanioses compreendem um espectro de doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Esses protozoários têm um ciclo de vida digenético complexo, exigindo um hospedeiro vertebrado susceptível e um inseto vetor permissivo para efetivar a infecção (SAVOIA, 2015). A transmissão ocorre através da picada de fêmeas de insetos do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo durante seu repasto sanguíneo (Figura 1). São parasitos intracelulares obrigatórios que se reproduzem por divisão binária, dentro do sistema fagocítico mononuclear de mamíferos suscetíveis (DAVID; CRAFT, 2009; LAINSON; RYAN; SHAW, 1987). Os protozoários do

gênero *Leishmania* apresentam duas formas principais: uma promastigota, flagelada, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra amastigota sem flagelo aparente, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (Figura 1). As amastigotas são formas intracelulares obrigatórias das células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Em relação à taxonomia do gênero *Leishmania*, (LAINSON et al., 1987) propuseram a organização das espécies que parasitam o homem em dois subgêneros: subgênero *Leishmania* e *Viannia*. No Brasil, as principais espécies que causam a doença humana são *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum*, sendo as três primeiras dermatrópicas e associadas à leishmaniose tegumentar (LT) e a última associada à leishmaniose visceral (LV) (KUHLS et al., 2013). Além dessas, outras espécies dermatrópicas de *Leishmania* foram recentemente descritas: *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, com poucos casos no Pará e *L. (V.) shawi*, encontrada nos estados do Pará e Amazonas (JENNINGS et al., 2014).



**Figura 1:** Ciclo biológico de *Leishmania spp.* (1) A fêmea do inseto flebotomíneo inocula formas promastigotas metacíclicas, através da picada durante o repasto sanguíneo. (2) as promastigotas são fagocitadas por macrófagos ou outras células do sistema mononuclear fagocitário; (3) as promastigotas se transformam em amastigotas; (4) as amastigotas se multiplicam em células de vários tecidos e infectam novas células; (5) fêmeas de flebotomíneos fazem o repasto sanguíneo; (6) ocorre ingestão de células parasitadas; (7) as amastigotas se transformam em promastigotas no intestino do vetor; (8) as promastigotas se multiplicam e migram para a probólide. Adaptado de: *Centers for Disease Control and Prevention – CDC, 2013.*

### 3.1. Aspectos epidemiológicos das leishmanioses

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, estima-se que aproximadamente 12 milhões de pessoas estejam atualmente infectadas e que cerca de 310 milhões encontram-se em risco de adquirir a doença, com incidência anual estimada em cerca de 1 milhão de casos para a forma tegumentar e 300 mil casos para a forma visceral (WHO, 2016).

As leishmanioses apresentam duas principais formas clínicas no homem, a LV e a LT, com um amplo espectro de manifestações. Nas leishmanioses, a forma clínica é altamente dependente da espécie de *Leishmania* envolvida e do *status* imunológico do hospedeiro. Assim, existem as espécies dermatrópicas, que acometem pele e mucosas e as espécies viscerotrópicas, que possuem afinidade pelo tecido linfóide e órgãos como fígado e baço (WHO, 2016).

A LV tem como principal agente etiológico no Brasil a *Leishmania (Leishmania) infantum*, espécie de caráter viscerotrópico. A doença é endêmica em 62 países e ocorrem cerca de 200 a 400 mil novos casos por ano (DESJEUX, 1996; WHO, 2016). Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em seis países: Índia, Somália, Etiópia, Sudão, Sudão do Sul e Brasil. No Brasil, são notificados cerca de 1.980 casos/ano e 90% desses casos ocorrem no Nordeste do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A Leishmaniose Visceral é uma doença de caráter zoonótico, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que tem o cão como principal reservatório doméstico, enquanto raposas e outros animais desempenham importante papel na transmissão silvestre (BRAGA et al., 1986; LAINSON et al., 1990). A *L. (L.) infantum*, pertencente ao complexo *Donovani*, é o agente etiológico da LV em países endêmicos do sul da Europa, norte da África, Ásia central e ocidental e das Américas. No continente americano, a LV tem sido documentada do norte da Argentina ao sul dos Estados Unidos (GRIMALDI; TESH; MCMAHON-PRATT, 1989; ROMERO; BOELAERT, 2010; WHO, 2016).

Conhecida também como Calazar, a LV é a doença mais mortal depois da malária e aflige centenas de milhares de indivíduos que vivem na pobreza em países tropicais (SAVOIA, 2015). No Brasil, os casos de LV representam 90% do total de

casos das Américas. Entre 1980 e 2015, cerca de 90.000 casos foram registrados em 26 estados brasileiros, principalmente na região Nordeste (WERNECK, 2010; WHO, 2016). Na região sudeste, dos 538 casos registrados em 2015, 418 ocorreram em Minas Gerais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Apesar de inicialmente ter um caráter predominantemente rural, diversos surtos registrados em grandes centros urbanos como Belo Horizonte (MG) e Rio de Janeiro (RJ), demonstram a urbanização da LV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Assim, a LV torna-se uma das doenças mais importantes da atualidade dada a sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados, crianças desnutridas e em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). Infelizmente, a mortalidade por LV atinge números ainda inaceitáveis, chegando a 95% dos casos não tratados (DA SILVA JUNIOR; GUARDÃO BARROS; DE FRANCESCO DAHER, 2014). Dessa forma, diversos estudos têm direcionado seus esforços em compreender os fatores de risco associados à letalidade por LV. Recentemente, um estudo epidemiológico realizado na Índia observou que fatores como tratamento gratuito e de fácil acesso, diagnóstico rápido (menor que 30 dias) e realização do programa completo de tratamento pelo paciente são indicadores de mortalidade menor na LV (DAS et al., 2016). Além disso, alguns sinais clínicos são considerados fatores de risco associados à óbito, como por exemplo, infecção secundária, trombocitopenia, neutropenia severa, hipoalbuminemia, dispneia, dentre outros (ASSUMPÇÃO MOURÃO et al., 2014; COURA-VITAL et al., 2014; DRUZIAN et al., 2015).

No Brasil, a LV inicialmente tinha um caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte. Desde a década de 80 grandes centros urbanos têm relatado um número significativo de casos, como Belo Horizonte, Campo Grande, Natal, dentre outros (JERONIMO et al., 1994; OLIVEIRA et al., 2006). Em Belo Horizonte, de 1994 a 2014 foram registrados 1656 casos, com uma média de incidência de 4,1 casos por 100.000 habitantes no período de 2008 a 2014 (Secretaria de Saúde de Belo Horizonte, PBH, 2014). De acordo com dados do Ministério da Saúde (2014), a doença é mais frequente em crianças menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em menores de 5 anos. Isso ocorre devido à imaturidade imunológica, maior predisposição à desnutrição e maior exposição ao vetor no peridomicílio. Em adultos, o sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (60%).

O ambiente característico e propício à ocorrência da LV está associado a um baixo nível socioeconômico e pobreza, ambiente prevalente no meio rural e na periferia das grandes cidades. Entretanto, estas características vêm se modificando, principalmente, nos estados das regiões Sudeste e Centro-Oeste, onde a LV se encontra urbanizada.

### **3.2 Manifestações clínicas da LV**

A LV possui um amplo espectro de manifestações clínicas que vai desde a infecção assintomática a casos graves que levam à óbito. No Brasil, alguns estudos relatam que existem de 8 a 18 casos de LV assintomática para cada caso clínico descrito (BADARÓ et al., 1986; COSTA et al., 2002). Em áreas endêmicas a prevalência desses casos pode chegar a até 73% (MICHEL et al., 2011). Porém, é importante ressaltar que a prevalência de casos assintomáticos é de difícil estimativa, por se tratar de casos sem sinais clínicos ou sintomas que só são identificados e devidamente diagnosticados em estudos clínico/epidemiológicos.

Os fatores de risco para o desenvolvimento da LV são apenas parcialmente compreendidos. Alguns estudos sugerem que a susceptibilidade à LV pode ser determinada geneticamente, outros destacam pobreza, desnutrição, presença de animais no peridomicílio, condições inadequadas de saneamento, dentre outros fatores (COSTA et al., 2005; DYE; WILLIAMS, 1993; JERONIMO et al., 2007).

Após um período de incubação que varia geralmente de 2 a 6 meses, a fase aguda da doença se manifesta através de sinais e sintomas como febre irregular ou remitente, tosse, cansaço, fraqueza, perda de apetite e de peso, aumento dos gânglios linfáticos, hepatomegalia e esplenomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia (CHAPPUIS et al., 2007a). Após o período da fase aguda, os sinais e sintomas podem variar de paciente para paciente durante a evolução da doença. Alguns indivíduos sequer exibem quaisquer sinais, outros apresentam agravamento dos sintomas iniciais (BADARÓ et al., 1986; HOLADAY et al., 1993).

Nos casos de diagnóstico e tratamento inadequados, a doença evolui para o período final. Essa fase é caracterizada por febre contínua, desnutrição, edema dos membros inferiores, hemorragias (epistaxe, gengivorragia e petéquias), icterícia e ascite. Nestes pacientes, o óbito geralmente ocorre por infecções secundárias e/ou sangramento intermitente (COSTA et al., 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

### 3.3 Diagnóstico e tratamento da LV

O diagnóstico precoce e o tratamento adequado são cruciais na sobrevivência do indivíduo infectado e no controle da LV (ROMERO; BOELAERT, 2010). De acordo com o Ministério da Saúde (2014), a confirmação dos casos clinicamente suspeitos deverá preencher no mínimo um dos seguintes critérios:

- Encontro do parasito nos exames parasitológicos direto ou cultura;
- Reação de imunofluorescência reativa com título de 1:80 ou mais, desde que excluídos outros diagnósticos;
- Testes imunocromatográficos, comumente conhecidos como testes rápidos, que utilizam antígenos recombinantes.

Além disso, pacientes clinicamente suspeitos, sem confirmação laboratorial, provenientes de área com transmissão de LV, mas com resposta favorável à terapia também são considerados portadores de LV.

Os testes parasitológicos baseiam-se no encontro do parasito em exame direto ou cultura de aspirado de medula óssea, baço ou linfonodos. A realização destes procedimentos requer mão de obra qualificada e profissionais extremamente treinados, além de serem técnicas bastante invasivas (MACHADO DE ASSIS; RABELLO; WERNECK, 2012). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2010) um dos grandes problemas relacionados aos testes parasitológicos para LV é a baixa sensibilidade, que varia de 53 a 86%.

A Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é o diagnóstico imunológico mais utilizado, uma vez que a intradermorreação de Montenegro, ao contrário do que ocorre na LT, é sempre negativa durante o período de estado da doença. Ela torna-se positiva após a cura clínica, na maioria dos pacientes, em um período de seis meses a três anos após o término do tratamento.

O método molecular utilizado em alguns casos particulares de diagnóstico complicado devido à sua alta sensibilidade é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), baseado na busca do DNA do parasito em amostras de sangue ou tecido.

Além das técnicas convencionais têm sido desenvolvidos testes rápidos de diagnóstico da LV, baseados na reatividade antígeno/anticorpo. Uma destas descobertas foi a identificação do antígeno K39 de *Leishmania*, membro da família das kinesinas. A detecção de anticorpos IgG anti-K39 tem se mostrado bastante sensível e específica para diagnóstico de LV (SUNDAR et al., 2006). A Organização Mundial da Saúde considera 2 testes rápidos apropriados para diagnóstico em programas de controle de LV: o Teste

de Aglutinação Direta (DAT) e o rK39-ICT (CHAPPUIS et al., 2006, 2007b; MEREDITH et al., 1995). Além destes, no Brasil, tem sido utilizado o teste rápido IT LEISH (*Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France*), que utiliza uma gota de sangue proveniente um pequeno furo no capilar digital, também com sensibilidade e especificidade estimadas em 92-93% e 92-98%, respectivamente (WHO, 2016).

No Brasil, os medicamentos à base de antimônio (antimoniato de metilglucamina) são, no, utilizados como primeira escolha na terapêutica das leishmanioses. O composto é obtido sinteticamente a partir do ácido antimônico e da N-metilglucamina, sendo a última obtida previamente a partir da adição de grupamentos amino redutores da glicose em presença de metilamina. O composto é solúvel em água e pouco solúvel em solventes orgânicos (PASTORINO et al., 2002; RATH; JARDIM; DÓREA, 1997).

A Organização Mundial de Saúde preconiza que as doses de antimoniais não devem ultrapassar 20 mg/kg/dia, não se ultrapassando o limite de 850 mg de antimônio, devido à sua elevada toxicidade. Alguns efeitos colaterais são frequentes nos indivíduos submetidos ao tratamento, como mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). As dificuldades quanto à administração e a duração do tratamento (aplicações diárias durante aproximadamente 20 dias), paralelamente aos efeitos colaterais, têm estimulado pesquisadores do mundo todo a buscar novas formas farmacêuticas para esse fármaco.

No Brasil, como tratamento alternativo, são utilizadas a Anfotericina B e suas formulações lipossomais (anfotericina B – lipossomal e anfotericina B – dispersão coloidal), as pentamidinas e em alguns casos, imunomoduladores são utilizados como coadjuvantes no tratamento (GONTIJO; MELO, 2004). A anfotericina B é a única opção no tratamento de gestantes e de pacientes que tenham contraindicações ou que manifestem toxicidade ou refratariedade relacionada ao uso dos antimoniais pentavalentes (MISHRA et al., 1994). Além disso, outras medidas concomitantes ao tratamento específico devem ser tomadas com o objetivo de corrigir e amenizar as manifestações clínicas inerentes à doença, tais como, anemia, desnutrição, fenômenos hemorrágicos e possíveis infecções secundárias.

Os critérios de cura são essencialmente clínicos e os primeiros sinais de resposta costumam ser inespecíficos como a melhora do apetite e do estado geral. Podemos destacar também, logo nas primeiras semanas, o desaparecimento da febre, redução do volume do baço e do fígado. A partir da segunda semana, os parâmetros hematológicos

apresentam melhora, já o processo de normalização das proteínas séricas ocorre de forma lenta, podendo durar meses. Dessa forma, é recomendado que após o fim do tratamento o paciente ainda seja acompanhado por 6 meses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; NYAKUNDI et al., 1994). Ao final desse período, se o estado do paciente permanecer estável, poderá ser considerado clinicamente curado.

### 3.4 Aspectos imunológicos da LV

Os aspectos clínicos da LV estão intimamente relacionados com a resposta imunológica do hospedeiro. A infecção sistêmica, com propagação dos parasitos no baço, fígado, linfonodos, medula óssea e outros órgãos é caracterizada por altos títulos de anticorpos circulantes e uma supressão da resposta do Tipo 1, mediada por células T, acompanhada de uma diminuição na produção de IFN- $\gamma$  e IL-12. Por outro lado, observa-se um aumento na produção de IL-4 e IL-10, que são citocinas anti-inflamatórias/moduladoras (BACELLAR et al., 1996; ZWINGENBERGER et al., 1990).

A resposta imune protetora anti-*Leishmania* é mediada por células (Figura 2). A resposta do Tipo 1 está relacionada com resistência, enquanto a resposta do Tipo 2 está relacionada com susceptibilidade à infecção (SRIVASTAVA et al., 2012). Porém, vários fatores influenciarão a resistência/susceptibilidade ao parasito, incluindo a cepa, genética do hospedeiro, fatores ambientais e fatores imunológicos (BACELLAR; CARVALHO, 2005; KUMAR; NYLÉN, 2012). Existem várias evidências de que a resposta imune inata desempenhe um papel fundamental na resistência do hospedeiro contra infecções parasitárias. Em regiões em que a LV é endêmica a forma clínica assintomática é bastante comum. Esse perfil de resistência é caracterizado pelo padrão de resposta do Tipo 1, que além de controlar o crescimento do patógeno, age no direcionamento da produção de citocinas (DE GOUVÊA VIANA et al., 2008; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2005).

Os primeiros eventos imunológicos ocorrem quando fêmeas de flebotomíneos infectados, durante o repasto sanguíneo, depositam saliva contendo formas promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro. Além de conter propriedades anticoagulantes, algumas proteínas presentes na saliva irão desencadear uma inflamação local, promovendo o recrutamento de células para o sítio da infecção (COLLIN et al., 2009). Grande parte dos parasitos inoculados na picada será destruída pela ação do sistema complemento. Os parasitos restantes serão fagocitados pelos macrófagos e



transformados em amastigotas. Além dos macrófagos, alguns parasitos podem ser fagocitados por neutrófilos, células dendríticas e mastócitos. A infecção dos neutrófilos pode facilitar o escape dos parasitos da lise mediada pelo complemento, mecanismo conhecido como “Cavalo de Tróia” (CECÍLIO et al., 2014; SHAPIRA; ZINOVIEV, 2011).

As manifestações da LV humana vão desde a infecção assintomática até a doença fatal. Em estudo realizado por Carvalho et al (2002), foi demonstrado que células mononucleares do sangue periférico de portadores de LV assintomática respondem ao estímulo com antígeno de *Leishmania spp.* e produzem IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-12, enquanto as células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LV ativa não proliferam ou produzem IFN- $\gamma$  em resposta ao antígeno.

Inicialmente, pensava-se que a LV estaria associada apenas com um perfil Tipo 2 com níveis elevados de produção de IL-4 e/ou IL-13 (NYLÉN; SACKS, 2007; SUNDAR et al., 1997). Porém, muitos estudos mostram que não há um direcionamento claro para a resposta do Tipo 2 na LV humana, visto que a LV típica está associada com um aumento na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Alguns trabalhos relatam que pacientes com LV apresentam níveis plasmáticos elevados de IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IFN- $\gamma$ , CXCL10, CXCL9 e TNF- $\alpha$  (ANSARI et al., 2011; KURKJIAN et al., 2006; NYLÉN; SACKS, 2007). Além disso, níveis elevados de mRNA de IFN- $\gamma$  foram encontrados no baço e medula óssea de pacientes durante a fase aguda de infecção (NYLÉN; SACKS, 2007). Essas observações sugerem que o desenvolvimento da LV não é dirigido apenas pela resposta Tipo 2, mas também por outros mecanismos que contribuem para a patogênese da doença (KUMAR; NYLÉN, 2012).

Alguns trabalhos mostram que pacientes com LV ativa possuem níveis elevados de IL-10 no soro, assim como no baço, linfonodos e medula óssea (ANSARI et al., 2011; NYLÉN et al., 2007). O papel principal da IL-10 na patogênese da LV é a modulação de macrófagos, tornando-os não-responsivos, fazendo com que a produção de TNF- $\alpha$  e NO seja diminuída, impedindo a morte de amastigotas. Peruhype-Magalhães et al., (2005) ressaltaram a importância da resposta do Tipo 2 nos momentos iniciais da infecção, no qual a alta produção de IL-10 suprime a síntese de IL-12, contribuindo para o estabelecimento e progressão da doença.

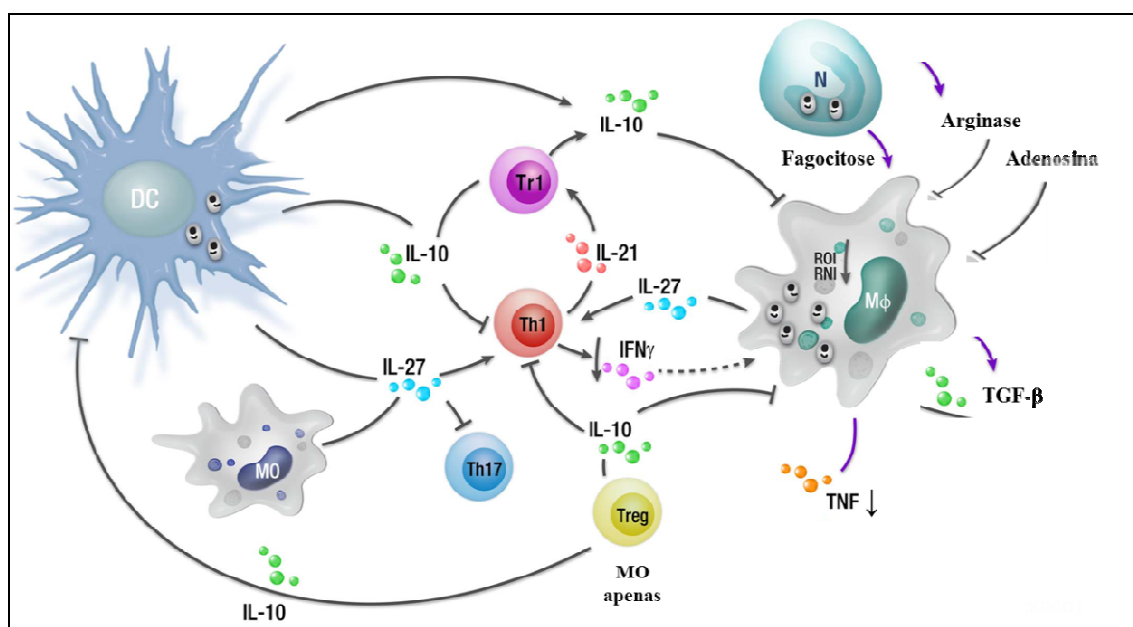
Outra citocina importante que contribui na patogenia e progressão da LV humana é o TGF- $\beta$  (BARRAL-NETTO et al., 1992; SAHA et al., 2007). Essa citocina

possui efeitos moduladores em macrófagos e seu bloqueio demonstrou uma diminuição na proliferação de parasitos nessas células (REED, 1999; RODRIGUES; SANTANA DA SILVA; CAMPOS-NETO, 1998). Um dos mecanismos que desencadeiam a produção de TGF- $\beta$  é através da cathepsina B presente em *L. donovani*, que pode ativar a produção dessa citocina, causando um impacto negativo sobre a atividade de macrófagos, através da redução da produção de óxido nítrico (GANTT et al., 2003; SOMANNA; MUNDODI; GEDAMU, 2002).

Na LV sabe-se que a não ativação de macrófagos é um evento crucial no estabelecimento e evolução da doença (CARVALHO et al., 1989). Um dos fatores importantes que impede a ativação dessas células é a diminuição da produção de IL-12 por células NK. A liberação de IL-12 direciona a ativação de células T para o perfil de resposta do Tipo 1 (MANETTI et al., 1993). Assim, as células T ativadas produzem IFN- $\gamma$ , ativam macrófagos e, conseqüentemente, mecanismos de morte dos parasitos intracelulares, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), além de inibir outras células a produzirem citocinas moduladoras, como IL-4 e IL-10 (MANETTI et al., 1993; MURRAY; HARIPRASHAD, 1995). BACELLAR et al. (1996) ao adicionar IL-12 a culturas de células T de indivíduos portadores de LV observaram a produção de altos níveis de IFN- $\gamma$  e um aumento na capacidade citotóxica de células NK. Por outro lado, na ausência de IL-12, o perfil do Tipo 2 é predominante, com produção de altos níveis de IL-10, suprimindo mecanismos pró-inflamatórios importantes na resolução da infecção (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2005).

Fazendo-se um apanhado geral dos eventos imunológicos que permeiam a LV clássica, podemos destacar algumas subpopulações celulares que são fontes de citocinas capazes de dirigir a resposta imune, favorecendo o estabelecimento da infecção (Figura 2). Durante o estabelecimento da LV, uma subpopulação de células dendríticas reguladoras do baço pode produzir IL-10, o que estimula a expansão de células T reguladoras também produtoras de IL-10 (Tr1), inibindo mecanismos antimicrobianos em macrófagos e em outros fagócitos (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008). A citocina IL-27 produzida pelas células dendríticas reguladoras e pelos macrófagos, em conjunto com a IL-21 produzida por células T, podem induzir a diferenciação de células Th1 em células T reguladoras do tipo I (Tr1), além de inibir o desenvolvimento de células Th17 que estão relacionadas com um perfil de resistência (PITTA et al., 2009). A IL-10 produzida pelas células Tr1 tem também a capacidade de bloquear a apresentação de antígenos, contribuir para a disfunção de células T, além de diminuir a produção de

IFN- $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup>. Além disso, existem relatos de que a IL-10 também pode ser produzida por células T reguladoras (Treg) na medula óssea de portadores de LV (RAI et al., 2012). Apesar das citocinas desempenharem um papel importante no curso da LV, ainda existem outros fatores relevantes que contribuem para a manutenção da infecção. ABEBE et al. (2013) detectaram altos níveis de arginase, uma enzima relacionada com imunossupressão, em portadores de LV e sua principal fonte foram os neutrófilos. Outro imunossupressor endógeno associado à LV é a adenosina, gerada a partir da hidrólise de Adenosina Trifosfato (ATP) por enzimas específicas. Este marcador também apresenta-se elevado em indivíduos com LV ativa e contribui para a evolução da doença (PALETTA-SILVA; MEYER-FERNANDES, 2012).



**Figura 2:** Principais eventos imunológicos relacionados à LV clássica. Durante a infecção por *L. donovani* uma subpopulação de células dendríticas reguladoras no baço podem produzir IL-10 que promove a expansão de células T reguladoras produtoras de IL-10 (Tr1), inibindo mecanismos microbicidas em macrófagos e em outros fagócitos (incluindo supressão da geração intermediários de oxigênio e nitrogênio – ROI e RNI). A citocina IL-27 produzida por células dendríticas reguladoras e macrófagos em conjunto com a IL-21 derivada de células T, podem conduzir a diferenciação de células Th1 em células Tr1, bem como inibir o desenvolvimento de células Th17. Já a IL-10 produzida pelas células Tr1 pode suprimir a apresentação de antígenos, contribuindo

para a disfunção das células T e diminuição da expressão de IFN- $\gamma$ . *Adaptado de FALEIRO et al. (2014).*

A resposta imune humoral e o papel dos linfócitos B na LV humana têm sido pouco estudados. Sabe-se que a LV clássica é caracterizada por uma ativação policlonal de linfócitos B, seguida de produção exacerbada de imunoglobulinas, levando ao quadro de hipergamaglobulinemia e indução de formação de imunocomplexos (GALVÃO-CASTRO et al., 1984). Apesar dos altos títulos de anticorpos serem muito importantes no diagnóstico da doença, seu papel na patogênese da LV ainda não é muito claro. A alta produção de anticorpos pode contribuir para a formação de imunocomplexos, através da ligação destes a receptores Fc em macrófagos, levando à produção de IL-10, contribuindo para a manutenção da doença (BUXBAUM; SCOTT, 2005).

### **3.5 As leishmanioses e a imunossupressão**

A imunossupressão consiste na diminuição da resposta imune do indivíduo e pode ser patológica ou medicamentosa. Na maioria dos casos, a imunossupressão causada pelo uso de medicamentos ocorre após a realização de transplantes. Isso se dá pelo fato de que a diminuição da resposta imunológica diminui as chances de rejeição do enxerto. Nas últimas décadas, os estudos de transplantes associados com doenças infecciosas estão recebendo maior atenção. A população de hospedeiros imunocomprometidos também está aumentando, assim como o número de transplantes realizados anualmente (KOTTON, 2007). Embora a imunossupressão constitua um procedimento obrigatório após transplantes de órgãos e seja um elemento presente também em várias terapias contra câncer e doenças autoimunes, a sua utilização está associada a uma série de efeitos colaterais indesejáveis como, por exemplo, o risco aumentado de ocorrência de infecções (FISHER; WOODLE; THISTLETHWAITE, 2002; KRENSKY, 2001).

As leishmanioses são um complexo de doenças tipicamente de hospedeiros imunocompetentes (KOMITOPOULOU et al., 2014). Entretanto, o número de casos da doença associados à imunossupressão tem aumentado nos últimos 20 anos (PITTALIS et al., 2006). Nas últimas décadas, tem sido relatado o aparecimento de casos de reagudização de doenças infecto-parasitárias, como a LV e LT em pacientes transplantados tratados com imunossupressores (GONTIJO et al., 2002; KOTTON, 2007). A LV é especialmente identificada como infecção oportunista em pacientes

portadores do vírus HIV e pacientes que receberam transplante de órgãos sólidos ou medula óssea (ALVAR et al., 1997; DE GOUVÊA VIANA et al., 2008; FERNÁNDEZ-GUERRERO et al., 1987). A ausência de parasitos circulantes na corrente sanguínea nesses pacientes antes do estado de imunossupressão leva a crer que tais protozoários têm utilizado sítios de privilégio imunológico para sua manutenção e multiplicação, sem que haja manifestação da doença nas condições imunológicas normais (COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000). Dessa forma, o grupo de pacientes assintomáticos constitui uma preocupação crescente dos serviços de saúde envolvidos com pacientes imunocomprometidos, sobretudo em área endêmica para LV, uma vez, que a qualquer momento, pode haver o escape do parasito do controle imunológico, sua rápida multiplicação e o estabelecimento da forma sintomática de difícil tratamento e alta taxa de mortalidade (JOS et al., 2004).

A infecção por *Leishmania spp.* em imunossuprimidos pode ocorrer de três formas principais: Na primeira delas a infecção é adquirida após a imunossupressão, com rápido desenvolvimento das manifestações clínicas. Essa situação geralmente acontece em pacientes residentes em locais onde não ocorre a doença, que viajam para áreas endêmicas (ANTINORI et al., 2008). Um segundo mecanismo alternativo é a reativação de uma infecção preexistente, latente, induzida pelo uso de drogas imunossupressoras. Esse mecanismo tem sido demonstrado em pacientes submetidos à transplante de fígado e células-tronco hematopoéticas e moradores de área endêmica para doença (BASSET et al., 2005). A terceira possibilidade seria a aquisição iatrogênica da infecção por *Leishmania spp.*, diretamente pelo órgão transplantado. Essa forma de aquisição foi observada em um caso de LV fatal na Macedônia, após transplante renal com órgão de doador indiano (FERNÁNDEZ-GUERRERO et al., 1987).

Em hospedeiros imunocomprometidos, as leishmanioses se manifestam de forma grave, com formas não usuais e testes diagnósticos persistentemente negativos (BASSET et al., 2005). Tais infecções são caracterizadas pelo número elevado de parasitos, alterações hematopoéticas e por desencadear manifestações atípicas destas doenças, dificultando o diagnóstico clínico. Estudos recentes, em modelo murino, demonstraram a capacidade de *Leishmania donovani* de infectar e se multiplicar em macrófagos de linhagens estromais (COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000). Segundo COTERREL et al (2012), na infecção experimental de camundongos com *L. donovani*, há persistência de parasitos no baço e na medula óssea, e sua expansão nesses

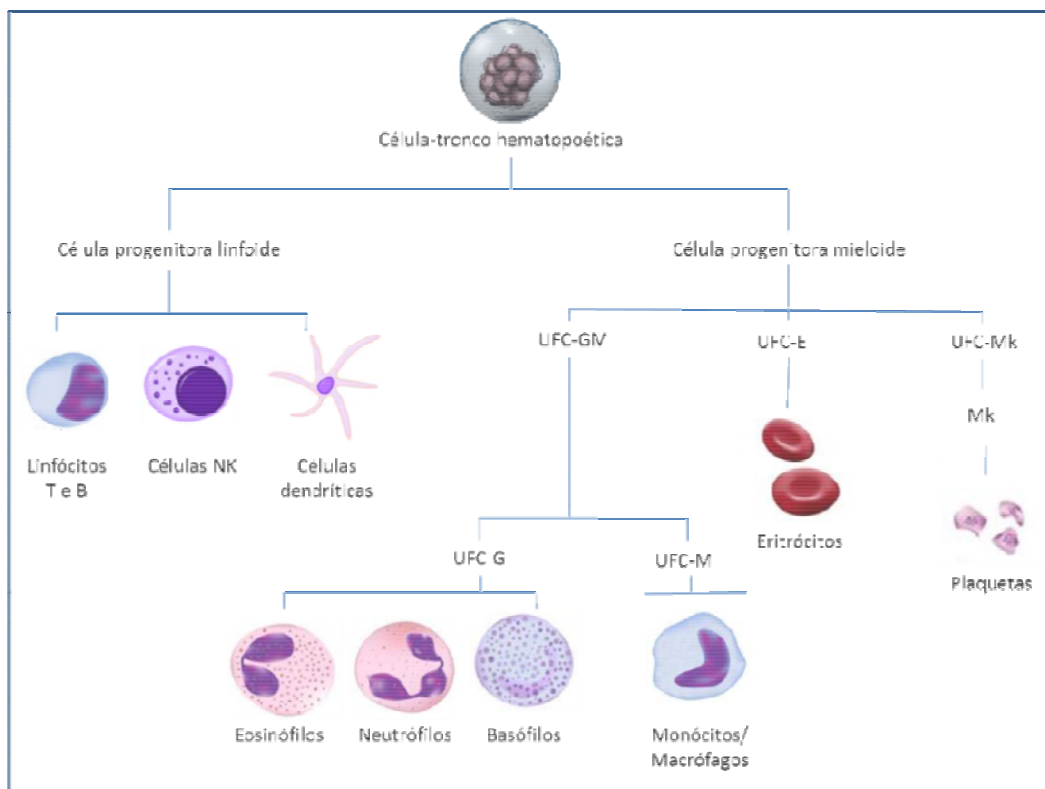
locais está associada ao aumento da atividade hematopoética. Tal fato pode estar relacionado a alterações na função das células estromais, que controlam a hematopoese, através da produção de quimiocinas, como CXCL12 e CCL8, moléculas de adesão e fatores de crescimento (NGUYEN HOANG et al., 2010). A forma visceral é a apresentação clínica mais comum e ocorre em 86% dos pacientes infectados em terapia imunossupressora pós-transplante (MORONI; BOSSI, 1995). Em alguns casos, a forma visceral pode ocorrer concomitantemente com a forma cutânea, havendo também relatos de manifestações oculares (GONTIJO et al., 2002).

O diagnóstico das leishmanioses em indivíduos imunossuprimidos geralmente é feito através de aspirado de medula óssea, seguido de exame microscópico direto. Naqueles diagnósticos considerados mais complicados utiliza-se a PCR, em busca do DNA do parasito em fragmentos de tecido como baço, fígado e medula óssea e em sangue periférico (ANTINORI et al., 2008).

### **3.6 Hematopoese**

A hematopoese é um sistema altamente organizado responsável pela produção das células sanguíneas. O controle da proliferação, diferenciação e maturação destas células é feito através de uma complexa interação molecular das células com o microambiente da medula óssea. Devido às células sanguíneas maduras terem predominantemente duração curta, as células-tronco são necessárias para reabastecer progenitores de linhagens múltiplas e progenitores acometidos com linhagens hematopoéticas individuais.

Células-tronco hematopoéticas são células residentes, raras na medula óssea em mamíferos adultos, sendo produtoras de precursores sanguíneos destinados à diferenciação de linhagem única e da produção de células sanguíneas maduras, incluindo células sanguíneas vermelhas, megacariócitos, células mieloides (monócitos/macrófagos e neutrófilos) e linfócitos (KONDO et al., 2003; WEISSMAN, 2000) (Figura 3).



**Figura 3:** Desenho esquemático das células do sangue e seus precursores na hematopoese. O processo de diferenciação começa a partir da célula-tronco hematopoética, que dá origem às células progenitoras linfóides e mielóides. Estas células darão origem respectivamente a células da linhagem linfóide (Linfócitos, células NK e células dendríticas), e a unidades formadoras de colônia (UFC) granulocítica/macrofágica (GM), eritrocítica (E), megacariocítica (Mk), granulocítica (G) e macrofágica (M). As UFC por sua vez, darão origem às diferentes linhagens celulares do sangue, os eosinófilos, neutrófilos, basófilos, monócitos/macrófagos, eritrócitos e megacariócitos/plaquetas.

A regulação da atividade hematopoética resulta de diversas interações entre células e a matriz extracelular e também de interações célula/célula, com uma variedade de populações de células do estroma, células-tronco hematopoéticas e células progenitoras (CLARK; KAMEN, 1987; CROCKER; GORDON, 1985). Assim como todas as outras células-tronco, as células-tronco hematopoéticas são capazes de auto-renovação, de modo que a composição celular da medula permaneça constante em condições normais de saúde (KONDO et al., 2003).

As células precursoras são capazes de responder a fatores de crescimento hematopoético com aumento de produção seletiva de uma ou outra linhagem celular de acordo com suas necessidades. Os fatores de crescimento hematopoéticos regulam a proliferação e a diferenciação das células progenitoras hematopoéticas e a função das células sanguíneas maduras. Tais fatores podem causar não só proliferação celular, mas também estimular diferenciação, maturação, prevenir apoptose e afetar as funções de células maduras (KAUSHANSKY, 2006). Dentre estes fatores, podemos citar os fatores estimuladores de colônias granulocítico-macrofágicas (GM-CSF), eritropoetina e trombopoetina.

A ação dos fatores de crescimento ocorre em sinergia com algumas citocinas. A formação de granulócitos e monócitos, por exemplo, pode ser estimulada por infecção ou inflamação por meio da liberação de IL-1 $\beta$  e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), os quais, por sua vez, estimulam células do estroma à produção de fatores de crescimento em uma rede interativa (BROXMEYER; WILLIAMS, 1988; LARDON et al., 1997). Dessa forma, é importante destacar que o microambiente de citocinas é essencial na diferenciação celular e na manutenção do mecanismo de auto-regulação.

Apesar de escassos na literatura, alguns trabalhos relatam que a hematopoese pode ser extremamente influenciada por infecções causadas por microrganismos intracelulares, como por exemplo, *Leishmania spp.* Cotterell et al (2000) demonstraram a capacidade de macrófagos estromais de se infectar com *L. donovani*, induzindo a liberação de grandes níveis de GM-CSF e TNF- $\alpha$ , o que gerou incapacidade do estroma na regulação da hematopoese. Durante a infecção experimental de camundongos BALB/c com *L. donovani* observou-se também uma rápida e transitória mobilização de células progenitoras na circulação, acompanhada de níveis elevados de GM-CSF (COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000). Em estudos com cães infectados por *L. chagasi* também observou-se um aumento na mielopoiese, acompanhado de anemia e redução na contagem de progenitores eritroides (NICOLATO et al., 2013; TROPIA DE ABREU et al., 2011). Além disso, sabe-se que além de citocinas e fatores de crescimento, as quimiocinas também contribuem na formação de um microambiente capaz de desregular a hematopoese durante a infecção por *Leishmania*. Na LV experimental, por exemplo, a produção aberrante de CCL8 por células estromais do baço infectadas por *L. donovani* modifica a capacidade de recrutamento de células progenitoras hematopoéticas e prejudica sua diferenciação em células dendríticas reguladoras, favorecendo a manutenção da infecção (NGUYEN HOANG et al., 2010).



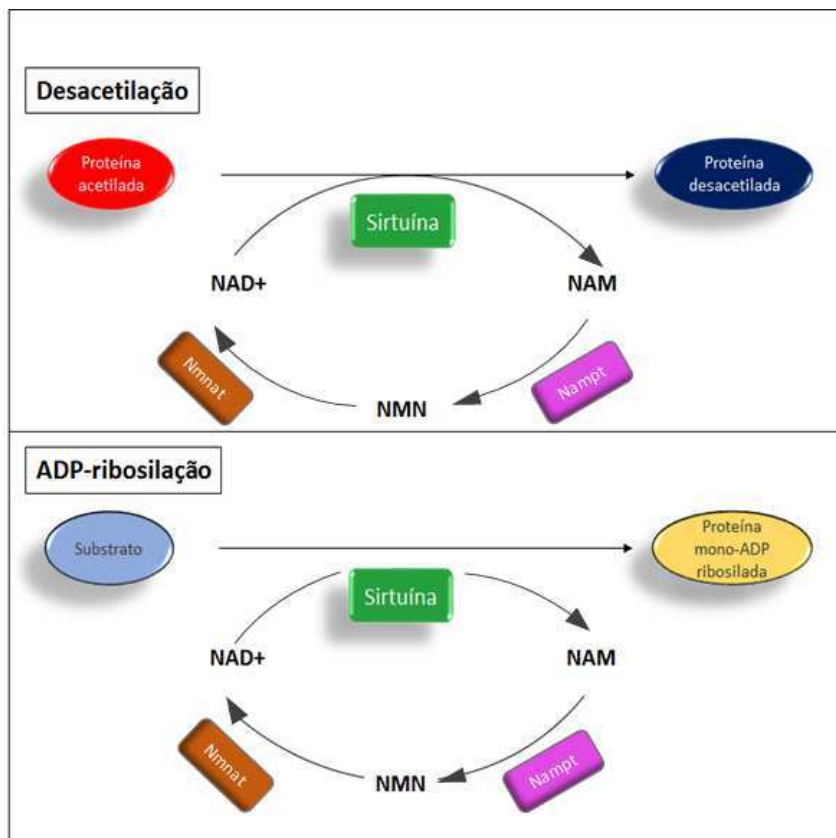
### 3.7 Sirtuínas – aspectos gerais e seu papel durante a infecção por *L. infantum*

Na relação parasito-hospedeiro sabe-se que o controle da homeostase celular tem um papel crucial na sobrevivência ou morte das células do hospedeiro. Uma das famílias de proteínas que participam dos mecanismos associados com esse processo é a família das sirtuínas. As proteínas sirtuínas, também designadas por SIR2 (*Silent Information Regulator 2*), pertencem a uma família dependente da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) com atividade de desacetilase e/ou ADP-ribosiltransferase (BLANDER; GUARENTE, 2004) (Figura 4). A dependência de NAD coloca-as no centro de diversos processos metabólicos, sendo desta forma, o estado energético e a disponibilidade de nutrientes da célula, moduladores da sua atividade (razão NAD<sup>+</sup>/NADH) (BAO; SACK, 2010).

A função biológica destas proteínas tem sido relacionada com a promoção da longevidade, regulação do processo de apoptose, reparação de danos no DNA, participação em processos inflamatórios e modulação do metabolismo energético, sendo consideradas como principal alvo terapêutico no combate a doenças proliferativas, neurodegenerativas e metabólicas (YAMAMOTO; SADOSHIMA, 2011). Nos mamíferos, até o momento, encontram-se descritas sete sirtuínas (SIRT 1-7).

No contexto da infecção por *Leishmania*, as sirtuínas poderão influenciar a sobrevivência ou morte das células do hospedeiro. A manipulação da apoptose em células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos e células dendríticas, é um dos mecanismos de evasão da *Leishmania spp.* à resposta imunológica por parte do hospedeiro (HARDER et al., 2006). Desta forma, o sucesso da infecção está dependente da capacidade da *Leishmania* em retardar a apoptose dos macrófagos e neutrófilos (KIMA, 2007).

A *Leishmania spp.* durante o processo de infecção confere aos macrófagos e células dendríticas a capacidade de resistir a estímulos de apoptose, através da modulação de diferentes vias intracelulares, como o NF-κB, *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) e PI3K/Akt, (NEVES et al., 2010). Essas vias encontram-se também moduladas pelas sirtuínas. O controle da sobrevivência/morte das APC poderá ser crucial durante os períodos iniciais de infecção, o que poderá interferir no desenvolvimento da resposta imune adaptativa contra o parasito, que é altamente dependente de imunidade celular e do ambiente de citocinas (DA-CRUZ et al., 1994; PIRMEZ et al., 1993).



**Figura 4:** Desenho esquemático das funções de desacetilação e ADP-ribosilação das sirtuínas. Na desacetilação, as sirtuínas clivam  $\text{NAD}^+$  e produzem nicotinamida (NAM). Já na ADP-ribosilação o grupo acetil é transferido do substrato para a fração ADP-ribose de  $\text{NAD}^+$  para gerar O-acetil-ADP ribose e o substrato desacetilado. A NAM gerada é um inibidor endógeno de sirtuínas e é normalmente convertido em nicotinamida mononucleotídeo (NMN) pela enzima da via de salvamento de NAD, nicotinamida fosforribosil-transferase (Nampt). Subsequentemente, a nicotinamida mononucleotídeo adeniltransferase (Nmnat) regenera  $\text{NAD}^+$  para uma nova reação. *Adaptado de:* NAKAGAWA; GUARENTE (2011).

### 3.7.1 Sirtuína 1 – SIRT1 – e a infecção de células-tronco hematopoéticas por *L. infantum*

A sirtuína 1 (SIRT1) é a mais estudada dentre as 7 descritas, e regula diversos aspectos fisiológicos do organismo como diferenciação, sobrevivência e metabolismo celular (ANASTASIOU; KREK, 2006). Em relação ao metabolismo celular, SIRT1 atua como desacetilase de histonas e regula a transcrição de H3-K9, H4-K16 e H1-K26, além de proteínas não-histonas p53, FOXO1/3, PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$  e NF-kB (MORRIS,

2013). Além disso, SIRT1 também participa na regulação do metabolismo de glicose e lipídios (GUARENTE, 2006). Ao direcionar essas proteínas, SIRT1 é capaz de regular grande número de vias de sinalização vitais, incluindo reparo de DNA, apoptose, diferenciação de músculos e gordura, neurogênese, biogênese mitocondrial, homeostase de glicose e insulina, secreção hormonal, estresse celular e ritmos circadiano (MORRIS, 2013).

Diversos estudos apontam um importante papel de SIRT 1 durante a diferenciação celular, devido ao seu envolvimento na transcrição de reguladores do desenvolvimento em células-tronco (CALVANESE et al., 2010; HAIGIS; SINCLAIR, 2010; LU et al., 2011). Estudos revelam que células-tronco embrionárias deficientes em SIRT1 mostram sensibilidade elevada ao estresse oxidativo, acúmulo de dano no DNA e instabilidade genômica (OBERDOERFFER et al., 2008). Além disso, SIRT1 tem sido relacionada à diferenciação comprometida de células-tronco embrionárias em células da linhagem hematopoética (HAN et al., 2008).

Diferente das células já diferenciadas, as células-tronco possuem alta capacidade de auto-renovação e de prevenção da diferenciação prematura. Estudos têm demonstrado que SIRT 1 é altamente expressa nas células-tronco embrionárias (CTE), em nível de mRNA e proteico, e essa expressão é diminuída durante a diferenciação embrionária (YU; DANG, 2016a). Nas CTE deficientes para SIRT1 a expressão de marcadores relacionados a células pluripotentes é diminuída, sugerindo que SIRT1 é responsável pelo programa de diferenciação celular (CALVANESE et al., 2010; TANG et al., 2014). Além disso, SIRT1 previne CTE da apoptose induzida por estresse oxidativo, regulando a autofagia e a função mitocondrial (OU; LEE, 2014). Assim, SIRT1 regula não apenas o programa de transcrição durante a diferenciação celular, mas também controla a resposta da célula ao estresse intrínseco e extrínseco durante a diferenciação (YU; DANG, 2016b).

Os níveis de expressão de SIRT1 são regulados pelo estresse oxidativo, em contrapartida, como mecanismo regulador, esta sirtuína pode suprimir as espécies reativas de oxigênio e a inflamação (FORD; JIANG; MILNER, 2005; HOWITZ et al., 2003; KOJIMA et al., 2008). Além disso, SIRT1 é capaz de diminuir os efeitos do LPS na morte celular e na produção de ROS, sugerindo que esta proteína tenha um papel protetor na inflamação aguda (LIU et al., 2014). A inibição da inflamação via SIRT1 ocorre através da regulação de NF- $\kappa$ B, um fator de transcrição que desempenha um papel importante na resposta inflamatória, induzindo a expressão de citocinas como IL-

6, IL-1 $\beta$ , e TNF- $\alpha$  (GHOSH; HAYDEN, 2008). NF-kB está presente no citoplasma, como parte de uma proteína membro do complexo I $\kappa$ B e em resposta a diversos estímulos, como citocinas, danos no DNA, proteínas virais, NF-kB é ativado e transloca para o núcleo, induzindo a expressão de genes envolvidos na apoptose, adesão celular e inflamação (BAEUERLE; BALTIMORE, 1988; BALDWIN, 1996; KARIN et al., 2002; NAKANISHI; TOI, 2005).

O estudo do papel de SIRT1 em condições de estresse, como por exemplo, durante uma infecção, é ainda pouco estudado. Sabe-se que a presença de parasitos intracelulares, como *Leishmania sp.* induz mecanismos de morte intracelular do parasito, como formação de ROS e NO, causando grande estresse celular. Em contrapartida, como mecanismo de sobrevivência, o parasito é capaz de manipular vias metabólicas da célula. A Proteína Kinase AMP ativada (AMPK) é um eixo central da sinalização celular envolvida na regulação da homeostase energética, sugerida como um alvo potencial da manipulação por patógenos (BRUNTON et al., 2013). Na infecção por *L. infantum*, AMPK age em parceria com SIRT1 na mudança do perfil metabólico da célula, partindo de uma fase breve aeróbia glicolítica para o metabolismo mitocondrial, e esta mudança é essencial para a sobrevivência do parasito (MOREIRA et al., 2015).

Assim, uma vez que SIRT1 possui um papel bem definido no processo de diferenciação celular, além de participar ativamente na regulação da inflamação é de grande relevância o estudo dessa proteína durante a infecção de células-tronco hematopoéticas por *L. infantum*.

### **3.7.2 Sirtuína 6 – SIRT6 - e a infecção de células-tronco hematopoéticas por *L. infantum***

A SIRT6 é uma ADP-ribosiltransferase encontrada no núcleo celular. Recentemente, foi demonstrado que além da sua atividade enzimática principal, esta sirtuína também é capaz de remover o grupo acetil da cadeia pesada de ácidos graxos, regulando a secreção de TNF- $\alpha$  (JIANG et al., 2013). Dentre as principais funções, podemos citar que SIRT6 participa diretamente do metabolismo celular, regulação da transcrição, estabilidade do genoma, metabolismo e no processo de envelhecimento.

Alguns estudos demonstram que a ausência de SIRT6 provoca a morte de camundongos 4 semanas após o nascimento, devido à um fenótipo prematuro de envelhecimento, hipoglicemia, aumento da captação de glicose, hipertrofia e

insuficiência cardíaca e instabilidade genômica (MAO et al., 2012; SUNDARESAN et al., 2012).

Assim como SIRT1, SIRT6 também participa no processo de diferenciação celular. Durante o desenvolvimento, as células-tronco embrionárias diferenciam-se em células das linhagens somática ectodérmica, endodérmica e mesodérmica. A pluripotência das CTE é mantida por reguladores transcricionais, como Oct4, Sox2 e Nanog, suprimidos ao longo da diferenciação. ETCHEGARAY et al. (2015) descobriram recentemente que a desacetilação de histona dependente de SIRT6 é essencial nesse processo de diferenciação, pois suprime a expressão dos genes relacionados à pluripotência, direcionando estas células para o comprometimento com diferentes linhagens celulares.

Um estudo realizado por WANG et al. (2016), revelou que SIRT6 é importante na preservação da capacidade de auto-renovação a longo prazo das células-tronco hematopoéticas (CTH). Isso ocorre através da desacetilação de H3K56, em que SIRT6 suprime a transcrição de genes via Wnt, um regulador chave na homeostase de CTH. Além disso, a deleção de SIRT6 em CTH levou à quiescência reduzida, um estado crítico para a manutenção a longo prazo de *pools* de células-tronco (TASSELLI; ZHENG; CHUA, 2017).

A participação de SIRT6 na regulação da expressão de TNF- $\alpha$ , coloca esta molécula também no contexto inflamatório. Já foi demonstrado que animais deficientes para SIRT 6 têm a expressão de TNF- $\alpha$  bastante reduzida, o mesmo ocorre *in vitro*, ao tratar culturas de linhagens celulares com inibidores de SIRT6 (VAN GOOL et al., 2009).

Dessa forma, em conjunto os dados obtidos no presente estudo, como a avaliação do perfil fenotípico/funcional das células-tronco hematopoéticas infectadas por *Leishmania spp.*, o estudo da expressão das sirtuínas nessas células e a consequência dessa expressão na regulação da apoptose de células parasitadas, será de grande importância para o entendimento dos mecanismos de escape do parasito, do estabelecimento e evolução da infecção em células-tronco.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a taxa de infecção *in vitro* de células-tronco humanas derivadas da medula óssea por *L. (L.) infantum* e o impacto dessa infecção na hematopoese *in vitro* e no perfil fenotípico-funcional das progênies.

### 2.2 Objetivos específicos

- Investigar a capacidade de células-tronco indiferenciadas da medula óssea em fagocitar *L. (L.) infantum*;
- Avaliar a taxa de fagocitose de subpopulações de leucócitos (monócitos e granulócitos);
- Avaliar o perfil funcional de células-tronco hematopoéticas, após internalização de *L. (L.) infantum*, através da análise da expressão de citocinas;
- Avaliar o perfil fenotípico de células-tronco e de suas progênies, após internalização de *L. (L.) infantum*, através da análise da expressão de marcadores de superfície celular;
- Avaliar o impacto da infecção de células-tronco hematopoéticas por *L. (L.) infantum* na hematopoese *in vitro*;
- Avaliar o papel das sirtuínas 1 e 6 durante a hematopoese *in vitro* de células-tronco infectadas ou não com *L. (L.) infantum*.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Obtenção de Células-Tronco Hematopoéticas

Para a realização do presente estudo, células-tronco hematopoéticas, destinadas a descarte, foram cedidas pela Clínica Hematológica em Belo Horizonte, Minas Gerais. Estas células foram coletadas e armazenadas pela Clínica Hematológica durante o tratamento de pacientes portadores de doença hematológica. As amostras de células-tronco hematopoéticas criopreservadas têm uma validade de dois anos para transplante e, embora mantenham uma viabilidade apropriada por um período mais prolongado,

após este prazo não podem mais ser empregadas em nenhum procedimento médico. A coleta, armazenamento, utilização e descarte das células-tronco são realizados pela clínica Hematológica, de acordo com a Resolução - RDC nº 56, de 16 de dezembro de 2010. As coletas realizadas na Clínica Hematológica são feitas por leucoaférese, procedimento no qual uma máquina ligada ao paciente separa uma fração de leucócitos, contendo as células-tronco, presentes na circulação, após terem deixado o compartimento medular do doador por estímulo da administração prévia de G-CSF. Neste procedimento, o sangue passa através de uma máquina especial que remove os leucócitos e retorna o restante das células sanguíneas e de plasma de volta para a corrente sanguínea. Durante o procedimento, o paciente pode ficar deitado ou sentado. São necessárias duas linhas intravenosas, uma por onde o sangue é retirado, e outro por onde é devolvido ao corpo. Algumas vezes, um único cateter é colocado no pescoço para o procedimento, ao invés das duas linhas intravenosas (DE SANTIS et al., 2011; GANZEL et al., 2012). Após a coleta as células são criopreservadas em freezer -80°C, utilizando uma solução comercial de hidroxietilamido 60% (HES), albumina 40% e Dimetilsulfóxido 10% (DMSO), que garante alta viabilidade das células após descongelamento.

A utilização das células-tronco foi condicionada à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que consta nos anexos deste documento, pelo participante do estudo ou responsável. Foram avaliadas amostras de 18 doadores caracterizados na tabela abaixo.

**Tabela 1:** Perfil dos doadores e características das amostras de células-tronco hematopoéticas

ID	Sexo	Idade	Diagnóstico	% CD34	LGC/mm <sup>3</sup>
V01	M	55	MM	0.20	313,750
V02	M	51	MM	0.19	318,750
V03	F	52	MM	0.17	297,500
V04	M	46	MM	0.27	314,500
V05	M	40	MM	7.23	242,500
V06	F	45	MM	0.45	278,400
V07	M	48	S	0.56	280,200
V08	F	42	S	0.22	256,300

V09	M	55	MM	0.22	260,000
V10	F	50	LH	2.09	278,250
V11	F	66	MM	0.18	162,500
V12	F	73	MM	0.45	232,500
V13	M	61	MM	1.06	232,250
V14	M	55	MM	0.18	125,000
V15	M	52	LH	1.05	262,250
V16	M	42	S	0.12	296,250
V17	M	67	MM	0.14	300,000
V18	F	64	MM	0.77	298,750

V- Voluntário M- Masculino, F- Feminino, MM- Mieloma Múltiplo, S - Saudável, LH- Linfoma de Hodgkin, LGC- Contagem Global de Leucócitos

O percentual de células CD34<sup>+</sup> foi obtido pelos profissionais da clínica Hematológica. A contagem foi feita por citometria de fluxo de acordo com protocolo ISHAGE estabelecido por Sutherland et al (1996).

#### 4.2 Avaliação da Viabilidade Celular

As células-tronco hematopoéticas obtidas foram avaliadas quanto à viabilidade celular utilizando-se a coloração por azul de Tripán e o aparelho de contagem automatizada de células - Countess™ (*ThermoFisher Scientific*). A viabilidade ideal para utilização das células deve ser maior ou igual a 85%.

#### 4.3 Obtenção, marcação e controle de qualidade dos parasitos

##### 4.3.1 Obtenção das culturas de *L. (L.) infantum*

Para os ensaios de infecção *in vitro* de células-tronco hematopoéticas foi utilizada a cepa referência MHOM/BR/74/PP75 (*L. infantum*) obtida do biorrepositório do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) e cultivadas em meio líquido *Schneider's Drosophila Medium* suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) e meio sólido NNN (Novy, MacNeal, Nicolle). As culturas foram mantidas em B.O.D. a 24°C, expandidas e utilizadas até a sétima passagem.



#### 4.3.2 Controle de qualidade das culturas de *L. infantum*

Com o objetivo de caracterizar e monitorar o perfil de expansão das culturas de *L. infantum* do biorrepositório do GIPB, construímos uma curva de crescimento partindo de  $1 \times 10^5$  parasitos em 10 mL de meio *Schneider's* suplementado com 20% de SFB. Durante 9 dias os parasitos de duas culturas independentes foram contados no mesmo horário, em microscópio óptico utilizando-se uma câmara de Neubauer.

O surgimento das formas promastigotas metacíclicas, que se dá pelo processo de metaciclogênese do parasito dentro do vetor, foi descrito primeiramente para as espécies *L. major* e *L. mexicana* por SACKS; PERKINS (1985). Neste processo, as formas promastigotas sofrem uma série de mudanças na expressão gênica, na morfologia e no lipofosfoliglicano (LPG) presente na superfície do parasito (SARAIVA et al., 1995). A metaciclogênese também ocorre durante o cultivo dos parasitos em culturas axênicas *in vitro*, onde as formas promastigotas procíclicas da fase logarítmica do crescimento transformam-se em formas metacíclicas, durante a fase estacionária (SILVA; SACKS, 1987). Para selecionar o dia para a utilização dos parasitos de acordo com o período de maior número de promastigotas metacíclicas, quantificamos alguns genes relacionados ao processo de metaciclogênese (*SHERP*, *Metal* e *Histona4*) por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) como descrito por Santarém et al (2014). O RNA total foi extraído de  $1 \times 10^7$  parasitos de duas culturas independentes nos dias 4, 5, 7 e 9 após o início do cultivo, pelo método de extração em Trizol (Invitrogen), conforme descrito pelo fabricante, e estocado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o uso. O cDNA foi sintetizado a partir de 1  $\mu\text{g}$  de RNA total utilizando-se o kit NZY First-Strand cDNA Synthesis (Nzytech). Para as reações de qPCR, as amostras foram corridas em duplicata na plataforma BioRad My iCycler iQ5 em um volume total de 20  $\mu\text{L}$  contendo iQ SYBR Green Supermix (BioRad), cDNA e os primers em suas concentrações determinadas, conforme descrito na Quadro 2. O gene constitutivo do parasito, *rRNA45*, foi utilizado como normalizador.

**Quadro 2:** Genes relacionados à metaciclogênese de *Leishmania* sp

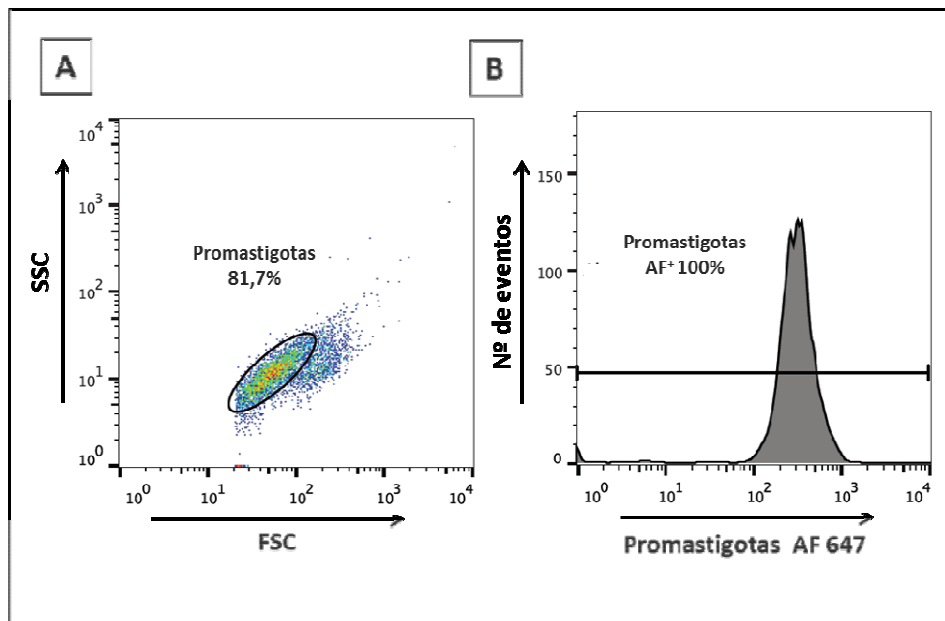
Gene	Seq. Primers	Concentração	Referência
SHERP	FW: 5'CAATGCGCACAACAAGATCCAG 3'	250 nM	Moreira et al.,

	RV:5'TACGAGCCGCCGCTTATCTTGTC 3'		2012
Meta 1	FW: 5'GGGCAGCGACGACCTGAT 3' RV: 5'CGTCAACTTGCCGCCGTC 3'	500 nM	Cunha et al., 2013
Histona H4	FW: 5'ACACCGAGTATGCG 3' RV: 5'TAGCCGTAGAGGATG 3'	500 nM	Moreira et al., 2012
rRNA 45	FW: 5'CCTACCATGCCGTGTCCTTCTA 3' RV: 5'AACGACCCCTGCAGCAATAC 3'	250 nM	Ouakad et al., 2007

As mudanças na expressão gênica foram analisadas usando o software iQ5 Optical system software v2.1 (Bio-Rad laboratories, Inc). Os resultados foram normalizados usando o gene referência rRNA45 e a quantificação foi feita de forma relativa ao dia 4 de cultivo dos parasitos utilizando-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### 4.3.3 Marcação de *L. (L.) infantum* com Alexa Fluor 647

Ao final do tempo estabelecido para o cultivo, os parasitos foram transferidos para tubos cônicos de polipropileno e lavados com PBS 1X suplementado com 10% de SFB, contados em câmara de Neubauer e ajustados para  $1 \times 10^6$  parasitos/mL. Em seguida, foi feita a marcação dos parasitos utilizando-se o fluorocromo Alexa Fluor 647 na concentração 3,2 µg/mL. Após incubação por 30 minutos a 37°, a suspensão foi lavada duas vezes e ressuspensa em PBS 1X. Em nossos experimentos, nós utilizamos parasitos vivos e fixados. Para a fixação, após a segunda lavagem do protocolo de fixação, os parasitos foram ressuspensos com a solução FACS fix (10.0 g/l de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6.63 g/l de cloreto de sódio e 0.01% de azida sódica -Sigma Chemical- pH 7.2) e armazenados a 4°C até o uso conforme descrito por Vitelli-Avelar et al. (2007). Foi retirada uma alíquota para avaliação em citômetro de fluxo, para assegurar a qualidade da marcação (Figura 5).



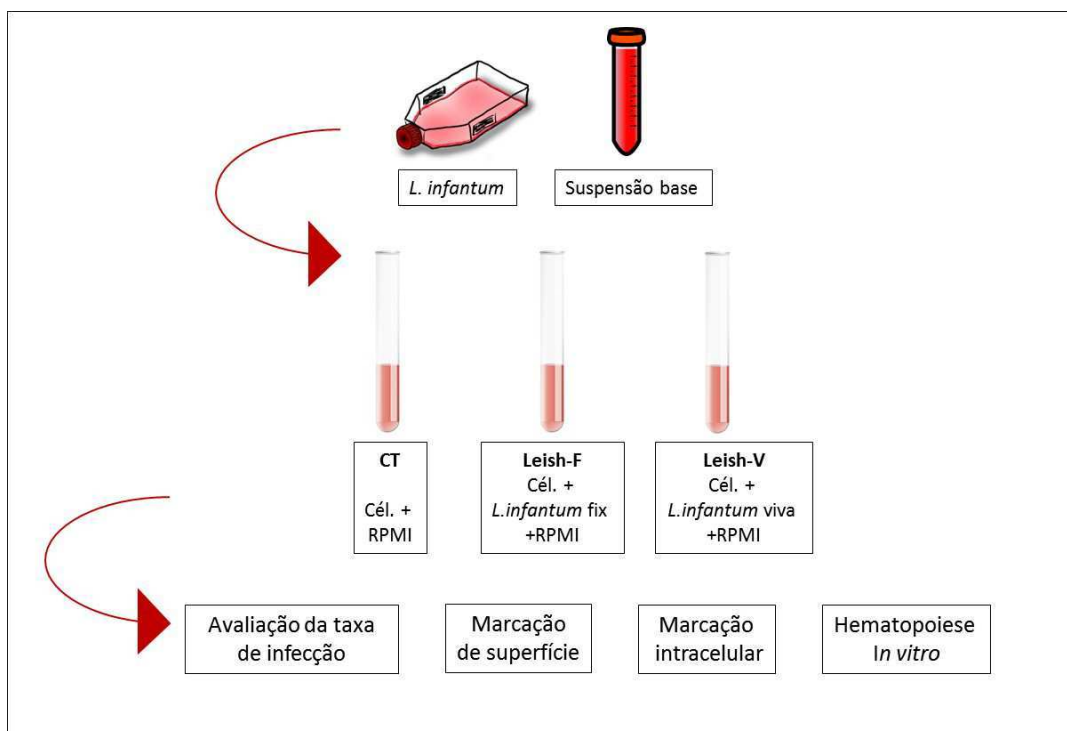
**Figura 5:** Esquema ilustrativo da seleção e marcação de formas promastigotas vivas de *Leishmania (L.) infantum*. A figura 2A representa o perfil de promastigotas de *L. (L.) infantum*, selecionadas na janela “gate” Promastigotas, em gráfico de densidade do tipo pseudocolor de tamanho (Forward scatter-FSC) versus granulosidade (Side scatter-SSC). A figura 2B representa em gráfico do tipo histograma a intensidade média de fluorescência apresentada pelos parasitos após a marcação com Alexa Fluor 647 (AF 647).

#### 4.4 Infecção e cultivo de células-tronco hematopoéticas

##### 4.4.1 Preparação das células e culturas de curta duração

Após atestar a viabilidade celular, as células-tronco hematopoéticas, foram ajustadas para  $1 \times 10^7$  células de acordo com o percentual de células viáveis. A suspensão-base de células foi preparada em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 0,5% do anticoagulante heparina sódica para evitar agregação plaquetária. As células foram preparadas de acordo com cada condição a ser avaliada (Cultura controle contendo apenas meio de cultura-CT, Cultura na presença de *L. infantum* fixada-Leish-F e *L. (L.) infantum* viva-Leish-V e submetidas à cultura de

curta duração como mostrado no desenho experimental (Figura 6). As culturas foram incubadas por 2 horas, em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C, sob agitação, para avaliação da taxa de infecção por *L. infantum*, imunofenotipagem, marcação intracelular e para a realização do ensaio de hematopoese *in vitro*.



**Figura 6:** Desenho experimental da estratégia utilizada para realização das culturas de curta duração.

#### 4.4.2 Avaliação da taxa de infecção das células-tronco hematopoéticas por *L. (L.) infantum* e marcação de superfície

Após a incubação por 2 horas na presença ou ausência dos parasitos marcados, as células foram incubadas com EDTA 20mM por 10 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz e, em seguida, foram lavadas com PBS 1X contendo 0,5% de albumina bovina sérica e 0,1% de azida sódica (PBS-W). Após este procedimento, as células foram marcadas com os anticorpos descritos na Quadro 3. As culturas foram incubadas com os anticorpos por 30 minutos ao abrigo da luz, lavadas com PBS-W e os eritrócitos foram lisados com solução de lise comercial (exceto o tubo contendo a marcação para CD235a). Em seguida, as células foram ressuspendidas em solução fixadora Max FACS Fix solution (MFF -10 g/L de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67 g/L de

cloreto de sódio, pH 7,2) e 50.000 eventos foram adquiridos em citômetro de fluxo FACSCalibur™ (BD – Biosciences).

**Quadro 3:** Anticorpos utilizados na marcação de superfície para seleção da população de células-tronco hematopoéticas, suas respectivas diluições e funções.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Diluição	Fonte/Função
Anti-CD45	FITC	2D1	1:50	Todas as células hematopoéticas/Tirosina fosfatase, aumenta sinalização pelo receptor de antígeno de células T e B.
Anti-CD34	PERCP	8G12	1:50	Precursos hematopoéticos, endotélio capilar/Ligante para CD62L (L-selectina).
Anti-CD33	FITC	HIM3-4	1:50	Células mieloides progenitoras, monócitos/Ligação a sialoconjugados.
Anti-CD13	PE	WM15	1:50	Células mielomonocíticas/Zinco metaloproteínase.
Anti-HLA-DR	FITC	G46-6	1:50	Molécula de MHC de classe II expressa na superfície de células humanas.
Anti-CD14	PE	M5E2	1:50	Células mielomonocíticas/Receptor para complexo de lipopolissacarídeo e proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP).
Anti-CD41a	FITC	HIP8	1:50	Plaquetas, megacariócitos/Integrina $\alpha$ IIb, associa-se a CD61 para formar GPIIb, liga-se a fibrinogênio, fibronectina,

				fator de von Willebrand e trombospondina.
Anti-CD235a	PE	GA-R2	1:2500	Células eritroides/Principal sialoglicoproteína rica em carboidratos da membrana dos eritrócitos humanos que apresentam os determinantes antigênicos para o grupo sanguíneo MN e Ss. Seguimento N-terminal, glicosilado que se localiza fora da membrana dos eritrócitos.
Anti-CD10	FITC	HI10a	1:25	Precursores de células T e B, células do estroma da medula óssea/Zinco metaloproteínase, marcador para leucemia linfática aguda de células pré-B.
Anti-CD19	PE	HIB19	1:25	Células B/Forma complexo com CD21 (CR2) e CD81 (TAPA-1); correceptor para células B. O domínio citoplasmático liga-se às tirosina quinases citoplasmáticas e às P3-quinases.

Fonte: Imunobiologia de Janeway, 2010, 7ª edição.

#### 4.4.3 Avaliação da expressão de citocinas intracelulares

Para escolha do melhor tempo de incubação das culturas de células-tronco na presença de *L. infantum* para avaliação das citocinas intracitoplasmáticas, foi realizado um experimento de cinética da expressão de citocinas. Neste experimento as células-tronco foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C, na presença de promastigotas vivas de *L. infantum* marcadas com Alexa flúor 647, nos tempos 6, 12 e 24 horas após estímulo. Estas culturas foram também estimuladas com PMA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetato) e ionomicina e acrescidas de Brefeldina-A (BFA) para inibir a secreção das citocinas sintetizadas para o meio extracelular. Após a aquisição dos dados em citômetro de fluxo FACSCalibur™ (BD – Biosciences), o tempo de 6 horas de

interação foi escolhido como ideal para essa avaliação, uma vez que nos tempos 12 e 24 horas o percentual de células produtoras de citocinas foi menor que 1%.

Assim, 2 horas após a interação parasito/célula, as culturas foram acrescidas de BFA e incubadas por mais 4 horas nas mesmas condições. Ao final da incubação, as células foram lavadas com PBS-W, incubadas em EDTA 20mM e lavadas novamente. Em seguida, foi feita a marcação de superfície com os anticorpos anti-CD45 e anti-CD34 descritos na Tabela 3, nas mesmas condições citadas no item 4.4.2. Os eritrócitos foram lisados e as células foram permeabilizadas com PBS 1X contendo 0,5% de albumina bovina sérica, 0,1% de azida sódica e saponina (PBS-P), e incubadas por 30 minutos ao abrigo da luz com os anticorpos anti-citocinas (Quadro 4). Após incubação, as culturas foram novamente lavadas com PBS-P e PBS-W, respectivamente, e ressuspendidas em solução fixadora MFF. Foram adquiridos 50.000 eventos por tubo em citômetro de fluxo FACSCalibur™ (BD – Biosciences).

**Quadro 4:** Anticorpos utilizados nas marcações de citocinas intracelulares e suas respectivas diluições

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Diluição	Funções/Fontes
Anti-IL-4	PE	8D4-8	1:20	Ativação de células B, mudança para IgE, induz diferenciação em células Tipo 2. Produzida principalmente por células T e mastócitos.
Anti-IL-10	PE	JES3-19F1	1:25	Potente supressor das funções dos macrófagos. Produzida principalmente por células T e macrófagos.
Anti-IFN- $\gamma$	PE		1:50	Ativação de macrófagos, aumento da expressão de moléculas MHC e dos componentes do

		B27		processamento de antígenos, mudança de classe de Ig, supressão de resposta Tipo 2. Produzido principalmente por células T e células NK.
Anti-TNF- $\alpha$	PE	MAb11	1:50	Inflamação local, ativação endotelial. Produzido principalmente por macrófagos, células NK e células T.

Fonte: Imunobiologia de Janeway, 2010, 7ª edição.

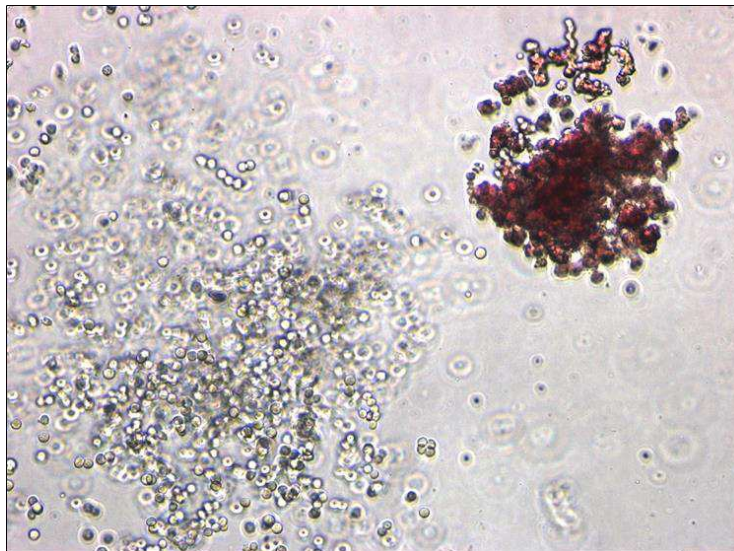
#### 4.4.3 Ensaio de hematopoese in vitro, contagem das colônias e imunofenotipagem

Parte restante da suspensão de células, na presença ou ausência dos parasitos marcados, após 2 horas de interação parasito/célula foi designada para a avaliação do impacto de *L. (L.) infantum* na hematopoese *in vitro*. Para isso  $5 \times 10^6$  células foram incorporadas ao meio de cultura tridimensional, MethoCult H4034 (Metil celulose, soro fetal bovino, albumina bovina sérica, 2-mercaptoetanol, fatores de crescimento recombinantes e suplementos), específico para hematopoese. As suspensões celulares foram transferidas para placa de seis poços, com auxílio de uma seringa acoplada à agulha de ponta romba. O espaço entre os poços foi preenchido com água MilliQ estéril e as placas armazenadas em um recipiente plástico para evitar a perda de umidade. As culturas foram mantidas em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C por 14 dias, tempo necessário para diferenciação das células. Foram adquiridos 50.000 eventos por tubo em citômetro de fluxo FACSCalibur™ (BD – Biosciences).

Após os 14 dias de cultivo, as colônias leucocitoides (brancas) e eritroides (vermelhas) foram contadas e fotografadas em microscópio invertido (Axio Observer.A1 – Zeiss) (Figura 7). Após este procedimento, as colônias foram recuperadas e durante a recuperação as placas foram mantidas em gelo e o meio de cultura MethoCult solubilizado em PBS-W com auxílio de uma pipeta Pasteur. As



colônias foram lavadas para completa remoção do meio de cultura e foram feitos todos os procedimentos descritos no item 4.4.2 para marcação de superfície com os anticorpos da Quadro 3.



**Figura 7:** Visualização de colônias leucocitoides (brancas) e eritroides (vermelhas), ao final de 14 dias de cultivo, em microscópio óptico invertido no aumento de 50x.

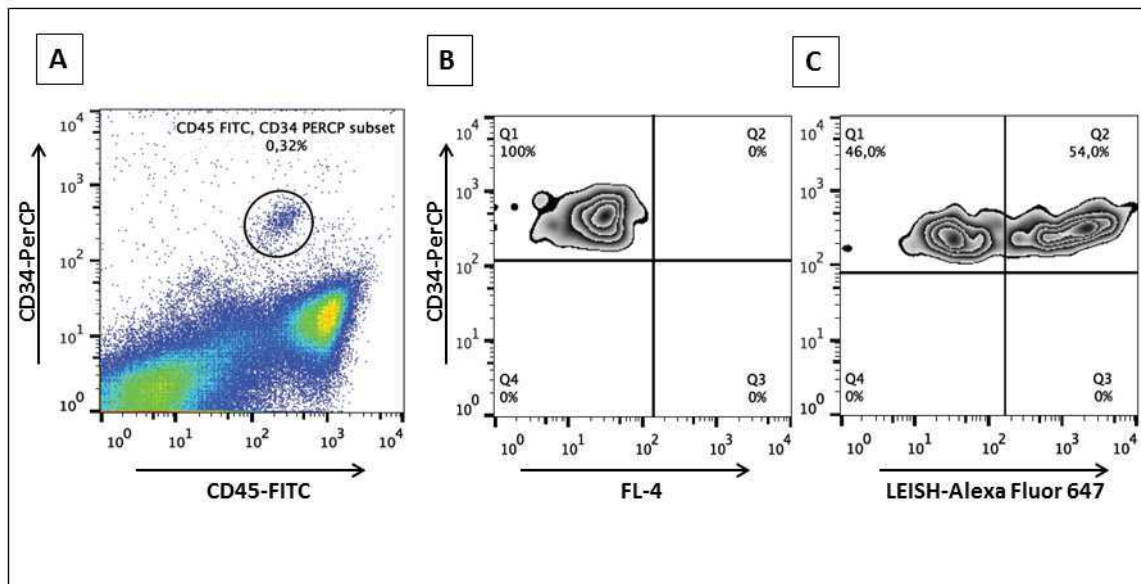
#### 4.5 Estratégias de análise dos dados de citometria de fluxo

##### 4.5.1 Análise da capacidade de células-tronco hematopoéticas em fagocitar formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*

Para análises da população celular de interesse e determinação da capacidade fagocítica de células-tronco hematopoéticas utilizou-se o software FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software, versão 10.07).

A Figura 8 representa, de forma esquemática, a estratégia utilizada para análise dos resultados. Para selecionar a população de interesse, foram construídos gráficos de densidade de fluorescência 1 (CD45-FITC) *versus* fluorescência 3 (CD34-PerCP). A população de células-tronco hematopoéticas foi selecionada através de uma janela - “gate” com base na densidade de expressão dos marcadores CD45 e CD34, característica das células-tronco hematopoéticas indiferenciadas (alta expressão de CD34 e expressão intermediária de CD45) (Figura 8A). Construindo-se gráficos de densidade de fluorescência 4 *versus* fluorescência 3 (CD34-PerCP) foi possível avaliar a

capacidade fagocítica das células-tronco, como pode ser observado nas figuras 8B e 8C, na ausência e na presença de formas promastigotas de *L. (L.) infantum* marcadas com Alexa Fluor 647, respectivamente.



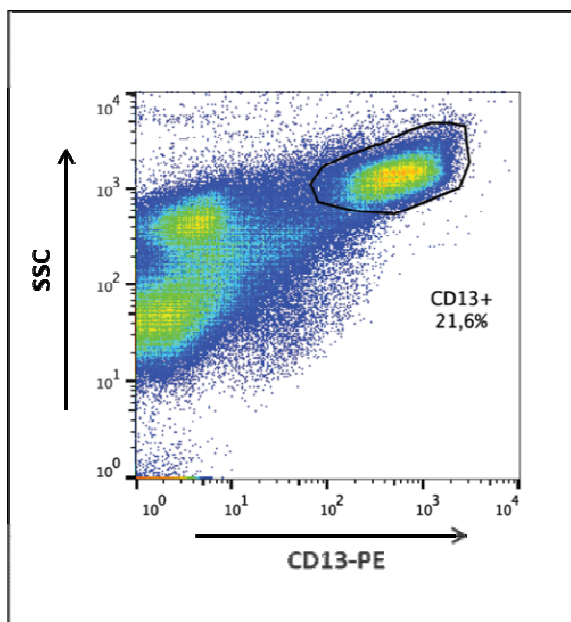
**Figura 8:** Análise representativa da capacidade fagocítica de células-tronco hematopoéticas derivadas da medula óssea. A figura 8A representa o perfil celular da população de células-tronco hematopoéticas, selecionada na janela “gate” em gráfico de densidade de fluorescência-1 (CD45-FITC) *versus* fluorescência-3 (CD34-PerCP). A figura 8B representa o perfil de análise da população de células-tronco hematopoéticas na ausência de formas promastigotas de *L. (L.) infantum* em gráfico de densidade de fluorescência-4 (FL-4) *versus* fluorescência-3 (CD34-PerCP). A figura 8C representa o perfil de análise da população de células-tronco hematopoéticas na presença de formas promastigotas de *L. (L.) infantum* marcadas com Alexa Fluor 647, indicando no quadrante duplo positivo (Q2) o percentual de células-tronco que fagocitaram o parasito-AF 647 em gráfico de densidade de fluorescência-4 (LEISH-Alexa Fluor 647) *versus* fluorescência-3 (CD34-PerCP).

#### 4.5.2. Análise do fenótipo celular de células-tronco hematopoéticas derivadas da medula óssea

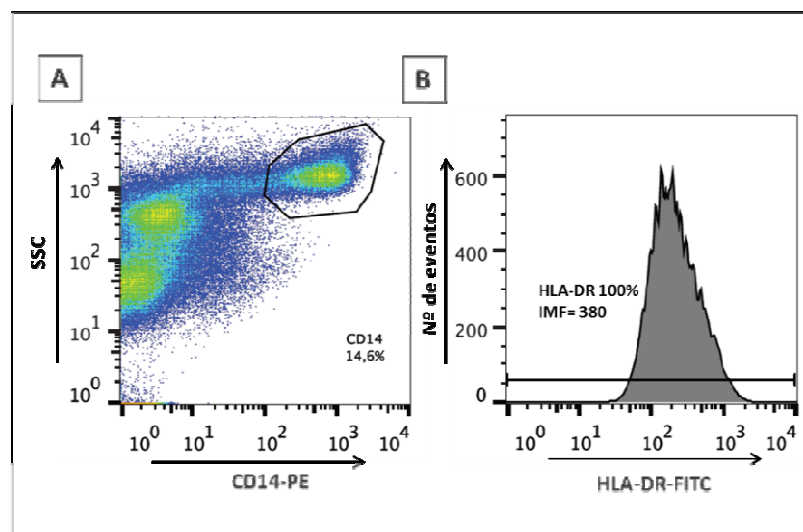
A identificação da população celular de interesse e a determinação do valor percentual/intensidade média de fluorescência (IMF) dos marcadores fenotípicos avaliados foram realizadas utilizando-se o software FlowJo (versão 10.07).

Para a análise de marcadores que não são expressos constitutivamente, a população de interesse foi selecionada construindo-se gráficos de densidade de fluorescência 1 ou 2 (FL 1/FL2, marcador de superfície-FITC/PE) *versus* granulosidade (SSC), como mostrado na Figura 9.

Para análise da molécula de ativação HLA-DR foi utilizada a seguinte estratégia exemplificada na Figura 10. Primeiramente, foi construído um gráfico de densidade de fluorescência 1 (FL-1, CD14-PE) *versus* granulosidade (SSC), em seguida a população CD14<sup>+</sup> foi selecionada através de uma janela “gate”. O segundo passo, foi avaliar por intensidade média de fluorescência (IMF) a expressão de HLA-DR pela construção de um histograma dentro do “gate” de células CD14<sup>+</sup>, selecionando-se a população de interesse por um marcador específico (Figura 10B).



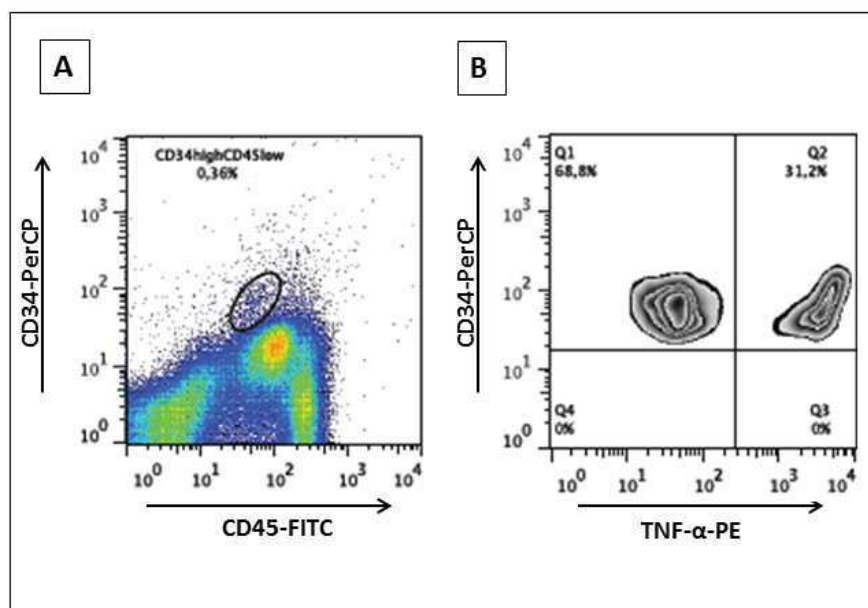
**Figura 9:** Análise representativa da expressão de marcadores de superfície em concentrado de leucoaférese. A figura representa a população de células CD13<sup>+</sup> selecionadas através de uma janela “gate”, em gráfico de densidade de fluorescência-2 (FL2, CD13-PE) *versus* granulosidade (SSC).



**Figura 10:** Análise representativa da expressão de HLA-DR na população de células CD14<sup>+</sup>. A figura 10A representa o perfil celular da população de células CD14<sup>+</sup> selecionadas na janela “gate”, em gráfico de densidade de fluorescência-2 (CD14-PE) *versus* granulosidade (SSC). A figura 10B representa, em gráfico de histograma, a intensidade média de fluorescência do marcador de ativação HLA-DR na população de células CD14<sup>+</sup>.

#### 4.5.3. Análise da produção de citocinas intracitoplasmáticas pós-estimulação *in vitro* por células-tronco hematopoéticas derivadas da medula óssea

A identificação da população celular de interesse e a determinação do valor percentual de citocinas intracitoplasmáticas avaliadas foram realizadas utilizando-se o software FlowJo (versão 10.07). A Figura 11A representa a seleção da população de células-tronco hematopoéticas em gráficos de densidade de fluorescência 1 (CD45-FITC) *versus* densidade de fluorescência 3 (CD34-PerCP). A população de células-tronco foi selecionada através de uma janela -“gate” com base na densidade de expressão dos marcadores CD45 e CD34 (Alta expressão de CD34 e expressão intermediária de CD45). A Figura 11B ilustra, no quadrante duplo positivo (Q2), a detecção intracitoplasmática da citocina TNF- $\alpha$  na população de células-tronco, em gráfico de densidade de fluorescência-2 (FL2, TNF- $\alpha$ -PE) *versus* fluorescência-3 (FL3, CD34-PerCP).



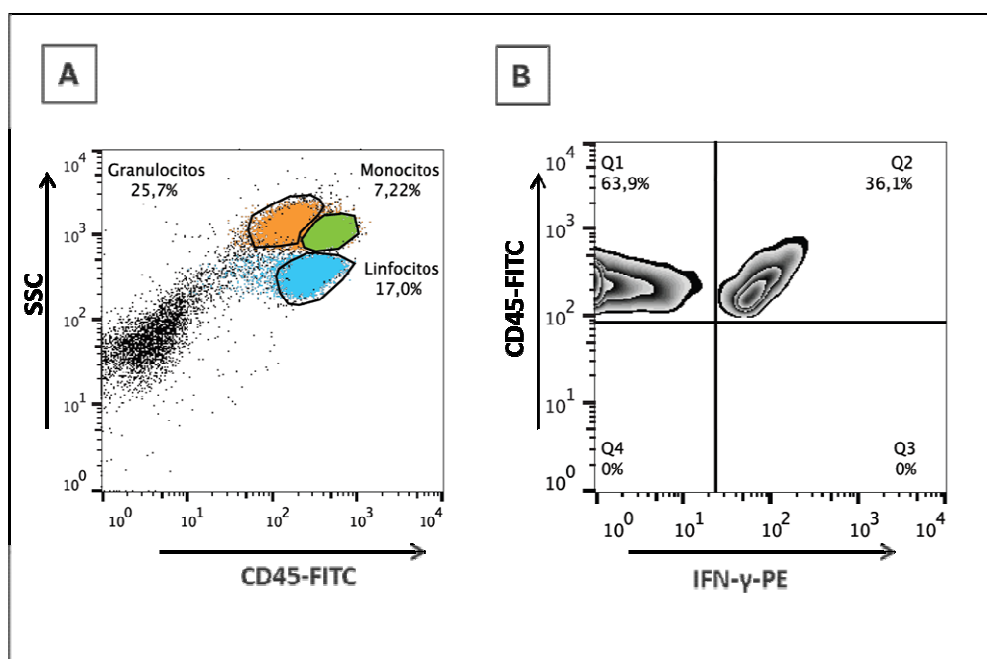
**Figura 11:** Análise representativa da produção de citocinas intracitoplasmáticas por células-tronco hematopoéticas, avaliada por citometria de fluxo. A figura 11A representa o perfil celular da população de células-tronco, selecionada na janela “gate” como a população celular apresentando o fenótipo  $CD34^{high}/CD45^{intermediário}$ , em gráfico de densidade de fluorescência-1 (CD45-FITC) *versus* fluorescência 3 (CD34-PerCP). A figura 11B representa o perfil de análise da população de células-tronco positivas para a citocina TNF- $\alpha$  no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de zebra de fluorescência-2 (TNF- $\alpha$ -PE) *versus* fluorescência-3 (CD34-PerCP), após o estímulo com formas promastigotas vivas de *L. (L.) infantum*.

#### 4.5.4. Análise da produção de citocinas intracitoplasmáticas por subpopulações de células $CD45^+$ (linfócitos, monócitos e granulócitos), após estimulação *in vitro*, com formas promastigotas vivas e fixadas de *L. (L.) infantum*

A identificação das subpopulações celulares de interesse e a determinação do valor percentual de citocinas intracitoplasmáticas avaliadas foram realizadas utilizando-se o software FlowJo (versão 10.07).

Através de gráfico de densidade de fluorescência 1 ( $CD45$ -FITC) *versus* granulosidade (*Side Scatter* - SSC) foram selecionadas através de janelas “gates” específicos as 3 subpopulações de interesse (linfócitos, monócitos e granulócitos) com

base nas características fenotípicas destas células e de acordo com trabalho previamente publicado (SUTHERLAND et al., 2009). Para assegurar que as populações fossem corretamente selecionadas, foram construídos também gráficos de tamanho (*Forward Scatter* - FSC) *versus* granulosidade (SSC), fazendo-se uma sobreposição sobre os gráficos CD45-FITC *versus* SSC (dados não mostrados). Como mostrado na Figura 12A, as cores azul, verde e laranja representam as populações de linfócitos, monócitos e granulócitos, respectivamente. Em seguida, conforme a necessidade, foram feitos pequenos ajustes nas janelas/“*gates*” das subpopulações de interesse. A Figura 12B ilustra, no quadrante duplo positivo (Q2), a detecção intracitoplasmática da citocina IFN- $\gamma$  na população de linfócitos, em gráfico de densidade de fluorescência-2 (FL2, IFN- $\gamma$ -PE) *versus* fluorescência-1 (FL1, CD45-FITC)



**Figura 12:** Análise representativa da produção de citocinas intracitoplasmáticas por subpopulações de células CD45<sup>+</sup>. A figura 12A representa a estratégia de seleção das três subpopulações de células CD45<sup>+</sup> (linfócitos - cor azul, monócitos - cor verde e granulócitos - cor laranja) selecionadas por janelas/“*gates*” em gráfico de distribuição pontual de fluorescência-1 (CD45-FITC) *versus* granulosidade (SSC). A figura 12B representa o perfil de análise da população de células-tronco positivas para a citocina IFN- $\gamma$  no quadrante duplo positivo (Q2) em gráfico de zebra de fluorescência-2 (IFN- $\gamma$ -

PE) *versus* fluorescência-1 (CD45-FITC), após o estímulo com formas promastigotas vivas de *L. (L.) infantum*.

#### 4.6 Avaliação da expressão Sirtuínas por PCR em tempo real quantitativo – qPCR

##### 4.6.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Para avaliação da expressão das sirtuínas 1 e 6 primeiramente foi feita a extração de RNA total da suspensão celular após cultivo de 2h (T0), das colônias de células após 10 dias de hematopoese in vitro (T10) e ao final da hematopoese (T14). As células foram armazenadas em tampão do kit RNeasy mini Kit (Qiagen) acrescido de  $\beta$ -mercaptoetanol, a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração. O procedimento de extração foi feito conforme recomendado pelo fabricante do kit. Ao final da extração o RNA foi dosado em Nanodrop e convertido em cDNA utilizando-se o kit NZY First-Strand cDNA Synthesis (Nzytech). O cDNA obtido foi dosado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

##### 4.6.2 Ensaio de qPCR

Para a realização dos passos de amplificação e quantificação, foram utilizados iniciadores/*primers* das sirtuínas 1 e 6, desenhados pelo grupo de pesquisas da Dra. Anabela Cordeiro (Quadro 4) e o sistema SYBRGreen®. O gene constitutivo codificador da proteína  $\alpha$ -tubulina humana foi escolhido como controle endógeno da reação. Para o preparo do mix utilizado na reação de amplificação foi utilizado 10  $\mu\text{L}$  de SYBRGreen Master Mix – *BioRad* 1x, 0,5  $\mu\text{L}$  de primer forward na concentração 0,2 pmol, 0,5  $\mu\text{L}$  de primer reverse na concentração 0,2 pmol, 4  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O e 5  $\mu\text{L}$  de cDNA *template*. As amplificações foram feitas no equipamento BioRad iQ5 PCR System. As condições de ciclagem foram:  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, 40 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos e  $59^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto. Ao final dos 40 ciclos foi feita a análise da curva de dissociação para cada iniciador, para esta etapa o método de corrida foi de 15 segundos a  $95^{\circ}\text{C}$ , 1 minuto a  $60^{\circ}\text{C}$ , 30 segundos a  $95^{\circ}\text{C}$  e 15 segundos a  $60^{\circ}\text{C}$ . Variações na expressão gênica em relação ao gene referência e ao tempo 0 da cultura controle foram analisadas utilizando a plataforma *iQ5 Optical system software v2.1 (BioRad)* e calculadas pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ .



**Quadro 5:** Iniciadores utilizados nas reações de qPCR

Gene	Sequência	T anel. (°C)
<i>SIRT 1</i>	FW: TGCGGGAATCCAAAGGATAATTCAGTGTC	84
	RV: CTCATCTTTGTCATACTTCATGGCTCTATG	86
<i>SIRT 6</i>	FW: GTCGGGCATCCCTGCCTCAAAGC	76
	RV: GGAACCCTGTCTGCCATCACGTCAG	80
<i>BTUBULINA</i>	FW: TCA TCA CAG GCA AGG AAG ATG CTG	58
	RV: CTT GGA CTT CTT GCC ATA ATC AAC TGA G	58

#### 4.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prism (San Diego, E.U.A., versão 5.00). Para a análise comparativa entre dois grupos foi empregado o teste T de Student para dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Para a análise comparativa entre três grupos foi empregado o teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey, para dados paramétricos e o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn para dados não paramétricos. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o valor de  $p$  foi menor ou igual a 0,05.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Controle de qualidade das culturas de *L. infantum* (PP75) para utilização nos ensaios de infecção

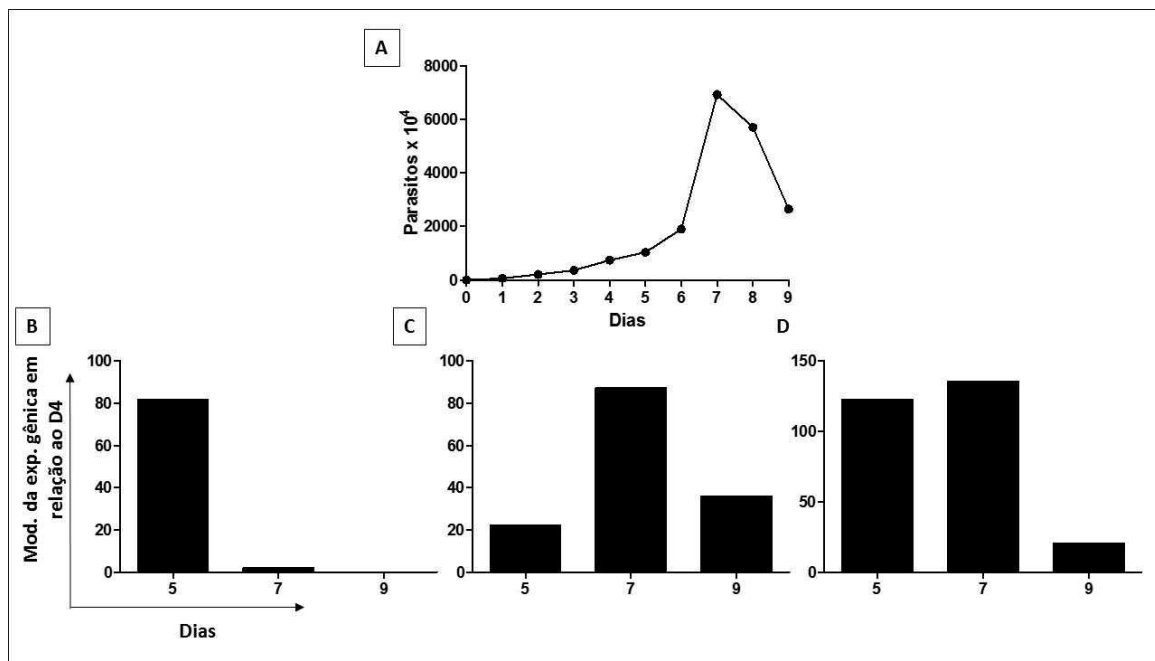
Diversas técnicas têm sido descritas para isolamento e expansão de culturas de *Leishmania* sp. *in vitro* (NOGUEIRA; GALATI, 2006). As condições de isolamento, armazenamento e cultivo influenciam diretamente no perfil de expansão do parasito. Para otimizar os ensaios de infecção das células-tronco hematopoéticas por *L. infantum*,



caracterizamos nossas culturas de acordo com o perfil de crescimento e a expressão de genes relacionados à metaciclo gênese.

A curva de crescimento demonstrou que os parasitos encontram-se em fase logarítmica de crescimento até o sétimo dia, onde há um pico do número de parasitos após o início do cultivo. A partir do sétimo dia, inicia-se um declínio rápido no número de parasitos até o nono dia da curva (Figura 13A).

A análise da expressão de genes relacionados à metaciclo gênese demonstrou uma diminuição drástica na expressão de *Histona H4* nos dias 7 e 9 de cultivo (Figura 9B). Já a análise da expressão de *SHERP* e *Metal* demonstrou um aumento na expressão destes genes no sétimo dia de cultivo (Figura 13C e 13D respectivamente). Uma vez que a expressão de Histona H4 está relacionada com divisão celular e, conseqüentemente, com a proliferação de parasitos, ao final da fase logarítmica e início da fase estacionária espera-se que a expressão deste gene esteja diminuída (KUMAR et al., 2012; MOREIRA et al., 2012). Já *SHERP*, gene que codifica uma proteína presente na face citosólica do retículo endoplasmático da *Leishmania*, é considerado essencial no processo de metaciclo gênese por participar na etapa denominada auto-fagocitose (BESTEIRO et al., 2006). O gene *Metal* é conhecido por ter sua sequência bastante conservada entre as espécies de *Leishmania* do Velho e Novo mundo. O gene codifica uma proteína de 112 aminoácidos que é expressa cerca de 20 vezes mais durante a metaciclo gênese (NOURBAKHS; ULIANA; SMITH, 1996). Diante das características de expressão de cada um dos genes e dos resultados obtidos na curva de crescimento e na análise da expressão gênica, selecionamos o sétimo dia de cultivo para realização dos ensaios de infecção de células-tronco hematopoéticas.



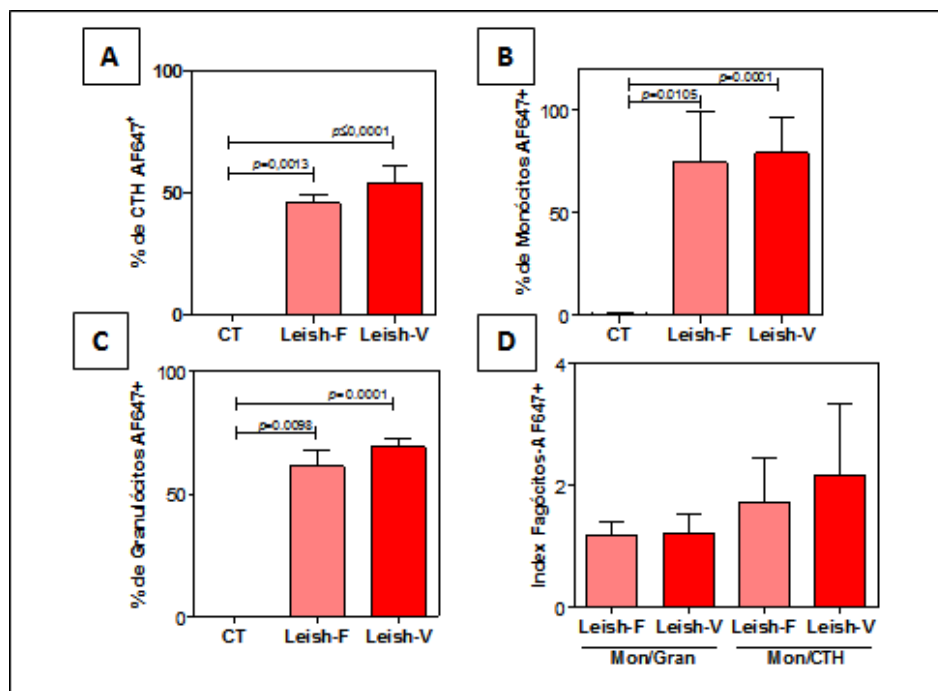
**Figura 13:** (A) Curva de crescimento de *L. infantum* (PP75) (B) Modificação da expressão gênica de *Histona H4* em relação ao dia 4 de crescimento do parasito (C) Modificação da expressão gênica de *SHERP* em relação ao dia 4 de crescimento do parasito (D) Modificação da expressão gênica de *Meta 1* em relação ao dia 4 de crescimento do parasito.

## 5.2 Avaliação da capacidade de células-tronco hematopoéticas derivadas da medula óssea de fagocitar formas promastigotas vivas de *L. infantum*

A internalização de parasitos, por um processo denominado fagocitose, envolve uma diversidade de moléculas e ocorre após adesão destes microrganismos na superfície de células do sistema mononuclear fagocitário (AWASTHI; KUMAR; SAHA, 2004). Após serem fagocitadas, as formas promastigotas de *Leishmania spp.* se transformam em amastigotas, desencadeando uma série de eventos imunológicos cruciais para o estabelecimento e evolução da infecção. Dessa forma, o processo de fagocitose pode engatilhar mecanismos de morte intracelular do parasito, porém, este processo pode favorecer a sobrevivência e multiplicação do mesmo dentro da célula (CECÍLIO et al., 2014; KIMA, 2007).

Dessa forma, o primeiro objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade de células-tronco hematopoéticas derivadas da medula óssea de fagocitar formas promastigotas fixadas (Leish-F) e vivas (Leish-V) de *L. infantum* marcadas com Alexa Fluor 647. Este parâmetro foi avaliado pelo percentual de células

CD34<sup>high</sup>CD45<sup>intermediário</sup> (CTH) FL-4<sup>+</sup>, uma vez que a dupla positividade para o marcador Alexa Flúor 647 e para a população de células avaliada indica que a *Leishmania* foi fagocitada (Figura 14A). Além disso, avaliamos também a capacidade de monócitos e granulócitos, fagócitos clássicos, em internalizar as formas promastigotas de *L. infantum* (Figura 14B e 14C).



**Figura 14:** Avaliação da capacidade de células-tronco hematopoéticas (CTH) de fagocitar formas promastigotas fixadas (Leish-F) e vivas (Leish-V) de *L. infantum* marcadas com Alexa Flúor 647 (A, B e C) e avaliação do índice fagocítico de monócitos/granulócitos e monócitos/CTH (D). Os resultados estão apresentados como média e erro padrão do percentual de células-tronco hematopoéticas FL-4<sup>+</sup> (CTH-FL-4<sup>+</sup>) em gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Leish-F e Leish-V em relação ao grupo sem estímulo (CT) estão representadas pelas barras conectoras com seus respectivos valores de *p*.

A avaliação da capacidade de CTH de fagocitar promastigotas vivas e fixadas de *L. (L.) infantum* demonstrou um maior percentual de células CTH-FL-4<sup>+</sup> nas culturas estimuladas com promastigotas fixadas (Leish-F) e promastigotas vivas (Leish-V) quando comparadas com a cultura de células-tronco sem estímulo (CT) (Figura 14A). A mesma diferença significativa foi observada quando avaliamos o percentual de monócitos e granulócitos que internalizaram formas promastigotas fixadas e vivas de *L.*

*(L.) infantum*, porém em maior magnitude, comparadas às CPH. Tendo em vista o expressivo percentual de monócitos-FL-4<sup>+</sup>, nós calculamos um índice, a razão entre os percentuais de fagocitose de culturas estimuladas de monócitos/culturas estimuladas de granulócitos e culturas estimuladas de CTH, para visualizar a proporção da taxa de infecção nessas células. Com este cálculo, observamos que cerca de 1,5 vezes mais monócitos fagocitaram *L. infantum* em relação aos granulócitos e cerca de 2 vezes mais monócitos internalizaram promastigotas do que as CTH (Figura 14D).

Alguns trabalhos na literatura relatam a capacidade de células-tronco hematopoéticas, células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo e células do estroma, como macrófagos estromais de se infectar com *Leishmania spp.* (ALLAHVERDIYEV et al., 2011; BIBAS; DEL NONNO, 2011; COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000). Indivíduos imunocomprometidos, portadores de HIV ou em uso de terapias imunossupressoras estão sob alto risco de adquirir ou reativar infecções, como a LV, com feições mais graves do que as usuais. Essas infecções são caracterizadas por distúrbios hematopoéticos, número elevado de parasitos e manifestações clínicas incomuns (GONTIJO et al., 2002; KOTTON, 2007). O fato de *L. infantum* ser capaz de infectar CTH, porém em menor proporção em relação a outros fagócitos clássicos, parece ser vantajoso para a manutenção da infecção assintomática, uma vez que a medula óssea é um dos sítios imunologicamente privilegiados do corpo humano. Já foi extensamente relatado que uma das formas que a *Leishmania* tem de driblar o sistema imune e permanecer viva na célula infectada é o bloqueio ou atraso de diferentes vias de apoptose, como a via apoptótica mitocondrial e morte ativada por ATP extracelular (AKARID et al., 2004; KOLLI et al., 2008). Assim, o processo de fagocitose e os mecanismos desencadeados pelo parasito que garantem sua sobrevivência, através da sobrevivência da célula parasitada, são eventos de grande importância que poderão favorecer a manutenção da infecção.

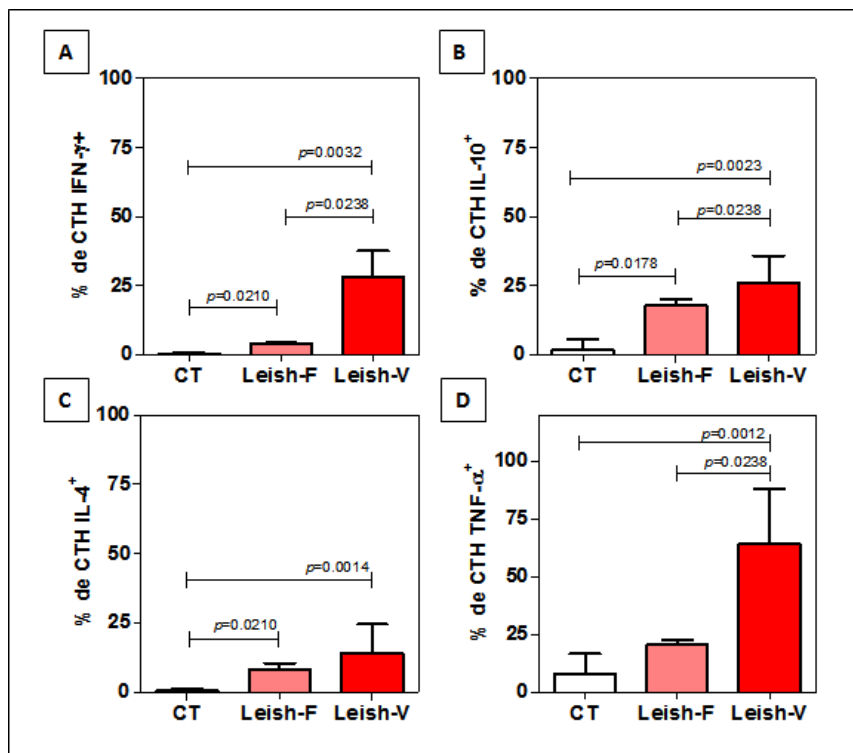
### **5.3 Avaliação da expressão de citocinas intracelulares por células-tronco hematopoéticas (CTH) e subpopulações celulares CD45<sup>+</sup> (linfócitos, monócitos e granulócitos) na ausência ou presença de formas promastigotas de *L. infantum***

Diante de uma infecção por microrganismos intracelulares, como *Leishmania spp.*, as citocinas desempenham um papel importante no direcionamento da resposta

imune, através da criação de um microambiente capaz de contribuir para a evolução da infecção ou para eliminação do patógeno. Além disso, nos momentos iniciais da infecção, a produção e secreção de citocinas e quimiocinas promovem o recrutamento e ativação de células do sistema imune para o foco inflamatório (BARATTA-MASINI et al., 2007).

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil funcional das CTH derivadas da medula óssea e de subpopulações de células CD45<sup>+</sup> (linfócitos, monócitos e granulócitos), por meio da avaliação da produção das citocinas intracitoplasmáticas IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  na ausência ou presença de formas promastigotas vivas ou fixadas de *L. infantum* (Figura 15).

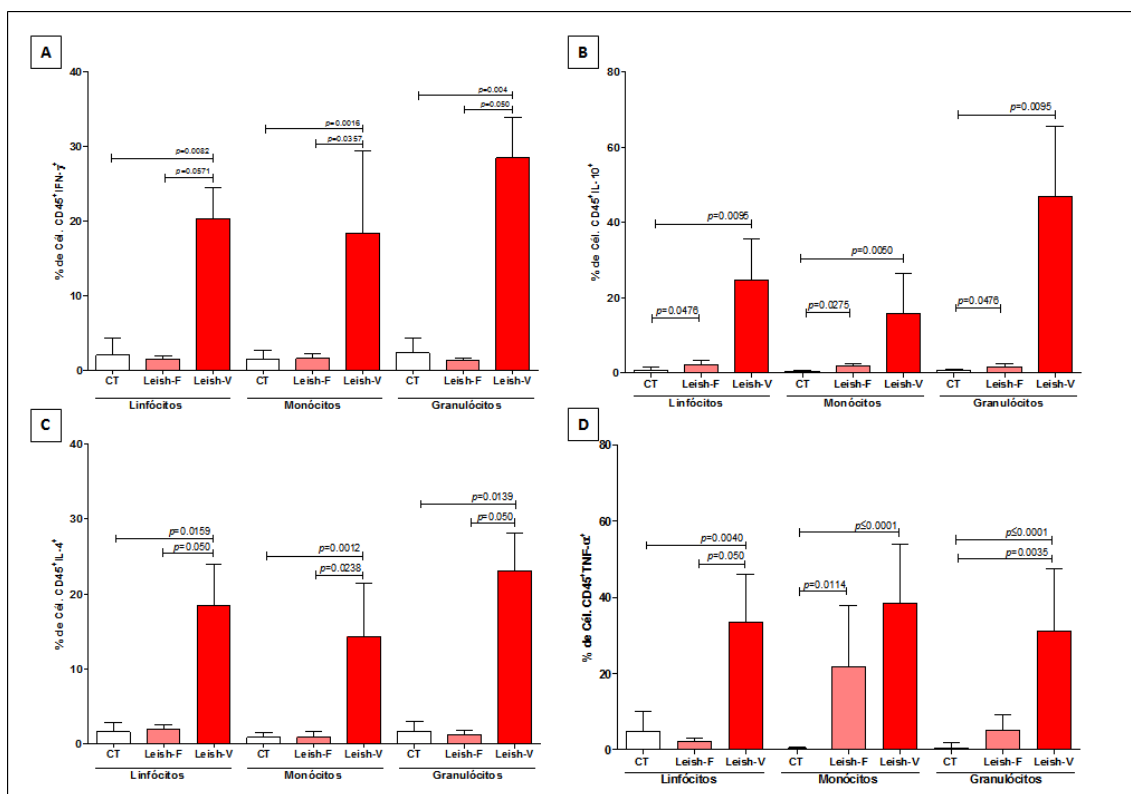
A análise do perfil de citocinas por células-tronco hematopoéticas (CTH) demonstrou um aumento estatisticamente significativo no percentual de CTH IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> nas culturas estimuladas com promastigotas vivas (Leish-V) e fixadas (Leish-F) de *L. infantum*, quando comparadas com a cultura de células sem estímulo (CT) (Figura 15A). Um aumento significativo foi observado também no percentual de CTH IL-10<sup>+</sup>, comparando-se as culturas Leish-V com Leish-F, Leish-V e Leish-F com CT (Figura 15B). Quanto avaliamos o perfil de CTH IL-4<sup>+</sup>, observamos um aumento no percentual dessas células, comparando as culturas Leish-V e Leish-F com a cultura CT (Figura 15C). Por fim, a avaliação da produção de TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> demonstrou um percentual elevado de células CTH TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> na cultura Leish-V quando comparadas com a cultura sem estímulo e um aumento significativo na cultura Leish-F em relação à CT (Figura 15D).



**Figura 15:** Análise da expressão das citocinas (A) IFN- $\gamma$ , (B) IL-10, (C) IL-4, e (D) TNF- $\alpha$  por células-tronco hematopoéticas (CTH) na ausência (CT) ou presença de promastigotas de *L. infantum* fixadas (Leish-F) e vivas (Leish-V). Os resultados estão apresentados por média e erro padrão do percentual de células CTH<sup>+</sup>Citocinas<sup>+</sup> em gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas entre o grupo Leish-V, Leish-F e CT estão representadas pelas barras conectoras com seus respectivos valores de *p*.

Ao avaliarmos o perfil de produção das citocinas intracitoplasmáticas IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4, e TNF- $\alpha$  por subpopulações de células CD45<sup>+</sup>, foi observado um aumento estatisticamente significativo no percentual de linfócitos, monócitos e granulócitos IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> na cultura estimulada com *L. infantum* viva (Leish-V), quando comparada com a cultura de células sem estímulo (CT) (Figura 16A). Já a análise do percentual de células IL-10<sup>+</sup>, demonstrou um aumento significativo no percentual de linfócitos, monócitos e granulócitos, quando comparamos as culturas Leish-V e Leish-F com as culturas CT (Figura 16B). A análise de linfócitos, monócitos e granulócitos IL-4<sup>+</sup>, demonstrou um maior percentual dessas células apenas nas culturas estimuladas com promastigotas vivas (Leish-V), quando comparadas com as culturas CT (Figura 16C). Curiosamente, observamos novamente um grande percentual de células TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, inclusive linfócitos, quando comparamos as culturas estimuladas com Leish-V em comparação com as culturas CT (Figura 16D).

A resposta imune na LV já foi classicamente caracterizada por uma modulação na resposta do Tipo 1, pró-inflamatória, acompanhada de um aumento na produção de IL-4 e IL-10 (BACELLAR et al., 1996; ZWINGENBERGER et al., 1990). O aumento no percentual de células produtoras de IL-4, observado neste estudo, principalmente monócitos, após estímulo de promastigotas vivas de *L. infantum*, reforça o importante papel das citocinas anti-inflamatórias/moduladoras no estabelecimento e manutenção da LV. Por outro lado, alguns estudos abordam o papel da citocina IL-4 agindo em sinergia com IFN- $\gamma$  na ativação de mecanismos leishmanicidas, como a produção de NO intracelular (VOULDOUKIS et al., 1994). BARATTA-MASINI et al. (2007) também encontraram altos níveis de IL-4, acompanhado de níveis elevados de nitrito e nitrato em indivíduos assintomáticos residentes em área endêmica para leishmaniose tegumentar, reforçando a participação desta citocina em atuar no controle da infecção.



**Figura 16:** Análise da expressão da citocinas (A) IFN- $\gamma$ , (B) IL-10, (C) IL-4 e (D) TNF- $\alpha$  por subpopulações de células CD45<sup>+</sup> (linfócitos, monócitos e granulócitos) na ausência (CT) ou presença de promastigotas de *L. infantum* fixadas (Leish-F) e vivas (Leish-V). Os resultados estão apresentados por média e erro padrão do percentual de células CD45<sup>+</sup>citocinas<sup>+</sup> em gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas entre o grupo Leish-V e CT das subpopulações

de linfócitos, monócitos e granulócitos estão representadas por barras conectoras com seus respectivos valores de  $p$ .

Nas leishmanioses, diversas células podem contribuir para produção de IL-10, incluindo células dendríticas, macrófagos e células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) (CAMPANELLI et al., 2006; CARVALHO et al., 2012). No presente estudo, o percentual de monócitos, linfócitos e granulócitos que foram capazes de produzir IL-10 em resposta ao estímulo de Leish-V foi semelhante. Sabe-se que na LV a produção de IL-10 é de extrema importância no estabelecimento da infecção, uma vez que esta citocina é capaz de impedir a ativação de macrófagos, contribuindo assim para a sobrevivência do parasito intracelular (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2005).

O perfil de resistência à LV é caracterizado pelo padrão de resposta do Tipo 1, que além de controlar o crescimento do patógeno, age no direcionamento da produção de citocinas pró-inflamatórias (CARVALHO et al., 1989; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2005). Apesar da LV clássica ser caracterizada por um perfil de resposta do Tipo 2, com níveis elevados de citocinas moduladoras, existem relatos de níveis elevados de mRNA de IFN- $\gamma$  encontrados no baço e medula óssea de pacientes durante a fase aguda de infecção (NYLÉN; SACKS, 2007). Até o momento, nossos achados demonstraram que linfócitos, monócitos e granulócitos são capazes de produzir IFN- $\gamma$  após o estímulo de promastigotas vivas de *L. (L.) infantum*.

Na avaliação do perfil de produção da citocina TNF- $\alpha$ , foi observado um aumento estatisticamente significativo no percentual de linfócitos, monócitos e granulócitos TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> na cultura estimulada com promastigotas vivas de *L. (L.) infantum* (Leish-V), quando comparada com a cultura de células sem estímulo (CT) (Figura 16).

Além de ser uma citocina pró-inflamatória potente, que atua de forma importante em conjunto com o IFN- $\gamma$  na ativação de macrófagos, o TNF- $\alpha$  pode contribuir para a formação de monócitos e granulócitos, atuando nas células do estroma juntamente com a IL-1 $\beta$ , estimulando a produção e secreção de fatores de crescimento (Broxmeyer & Williams 1988; Lardon et al., 1997). No presente trabalho, observamos um percentual bastante expressivo de células produtoras de TNF- $\alpha$  após estímulo de promastigotas vivas de *L. (L.) infantum*, principalmente monócitos, que constituem a sua principal fonte durante a hematopoese *in vitro* na presença de *L. (L.) infantum* e que são células de extrema importância na resposta anti-*Leishmania*, devido à sua capacidade fagocítica.



## 5.4 Análise do impacto da infecção por *L. (L.) infantum* no fenótipo celular de células-tronco hematopoéticas derivadas da medula óssea antes e após hematopoese *in vitro*

### 5.4.1 Impacto da infecção por *L. (L.) infantum* no perfil fenotípico das células-tronco antes e após hematopoese

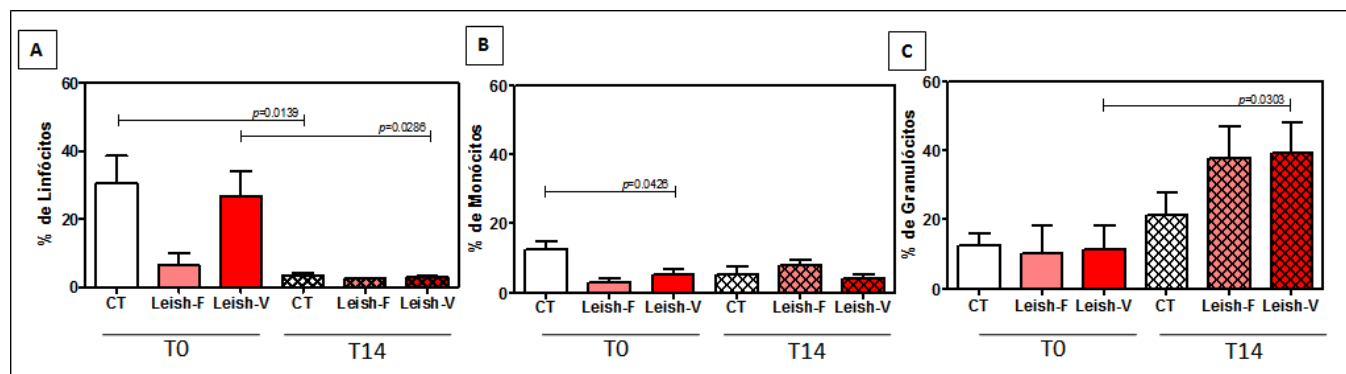
A hematopoese é o processo pelo qual uma célula-mãe dá origem a diferentes linhagens celulares do sangue. A regulação desse processo resulta de diversas interações entre células e a matriz extracelular e também de interações célula/célula, com uma variedade de populações de células do estroma, células-tronco hematopoéticas e células progenitoras (CLARK; KAMEN, 1987; CROCKER; GORDON, 1985).

Assim, um dos objetivos deste estudo foi caracterizar o perfil fenotípico celular de células-tronco hematopoéticas derivadas da medula óssea, na presença ou ausência de promastigotas de *L. infantum*, após duas horas de interação e após hematopoese *in vitro*. Foi avaliada a expressão de diferentes marcadores de superfície relacionados a diferentes linhagens celulares do sangue (Figura 17 a Figura 21):

- ☐ CD45/CD34 – Células-tronco indiferenciadas;
- ☐ CD13/CD33 – Linhagem granulocítica;
- ☐ CD14/HLA-DR – Linhagem monocítica;
- ☐ CD41a – Linhagem plaquetária;
- ☐ CD235 – Linhagem eritrocítica;
- ☐ CD10/CD19 – Linhagem linfocítica.

O antígeno comum de linfócito (CD45) é uma proteína tirosina fosfatase ligada a receptores que é expressa em todos os leucócitos e que desempenha um papel crucial na função destas células. Nas células T, o domínio extracelular de CD45 é expresso em várias isoformas diferentes, estas particularidades de expressão dependem da subpopulação celular e do seu estado de maturação e ativação. A análise das subpopulações de células CD45<sup>+</sup>, linfócitos, monócitos e granulócitos demonstrou um maior percentual de linfócitos no T0 (2 horas de cultivo) nas culturas CT e Leish-V quando comparadas com as mesmas culturas no T14 (pós-hematopoese *in vitro*). Já os

monócitos tiveram seu percentual reduzido, quando comparamos a cultura controle com a cultura Leish-V no T0. Ao contrário, os granulócitos tiveram seu percentual aumentado quando comparamos a cultura Leish-V no T0 com a cultura Leish-V no T14.

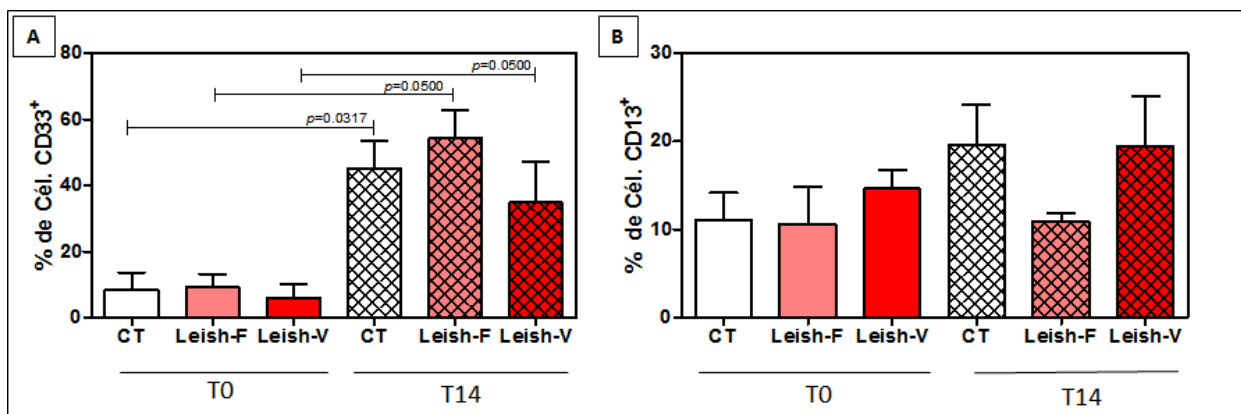


**Figura 17:** Análise do fenótipo celular de subpopulações de células CD45<sup>+</sup> estimuladas com formas promastigotas vivas (Leish-V) ou fixadas (Leish-F) de *L. (L.) infantum*, nos tempos T0 (2 horas de interação parasito/célula) e T14 (pós-hematopoese *in vitro*). Os resultados estão apresentados em gráficos de barras, com média e erro padrão do percentual de células positivas para os marcadores de superfície em gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas na expressão dos marcadores das culturas estimuladas ou não quando comparadas entre si estão representados pela letra pelas barras conectoras com os respectivos valores de *p*.

A molécula de superfície CD33 (gp67 ou siglec-3) é uma proteína transmembranar glicosilada de 67 kDa que é um membro da família de lectinas tipo imunoglobulina de ligação ao ácido siálico (siglec) (CROCKER; MCMILLAN; RICHARDS, 2012). CD33 é expresso em precursores granulocíticos, como por exemplo mieloblastos, em fase inicial de diferenciação (GORCZYCA et al., 2011). Ao avaliar o percentual de células positivas para CD33 em culturas estimuladas ou não nos tempos T0 e T14, observamos um aumento estatisticamente significativo na expressão deste marcador, comparando os grupos CT, Leish-F e Leish-V no T14 com os respectivos correspondentes no T0 (Figura 18A).

A molécula de superfície CD13 é uma proteína de 150 kD, com um domínio citoplasmático curto, uma região transmembrana hidrofóbica, e um domínio extracelular grande contendo a sua região de atividade enzimática. Além disso, CD13 é expresso em

células hematopoéticas da linhagem mieloide, porém sua função nestas células é ainda incerta (WINNICKA et al., 2010). Avaliando o percentual de células CD13<sup>+</sup> em nosso estudo, não observamos diferenças estatisticamente significativas na expressão dessa molécula (Figura 18B).

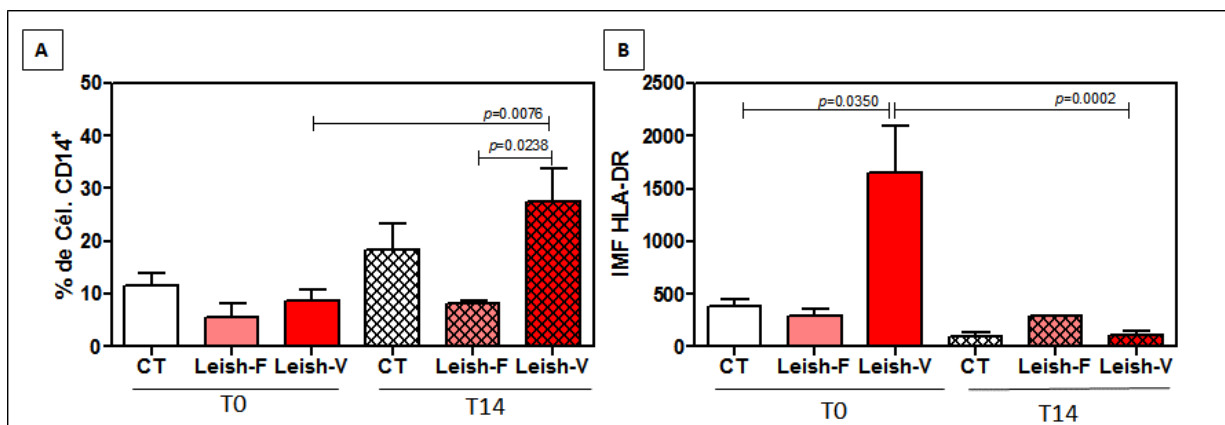


**Figura 18:** Análise da expressão dos marcadores de superfície CD33 (A) e CD13 (B), estimuladas com formas promastigotas vivas (Leish-V) ou fixadas (Leish-F) de *L. infantum*, nos tempos T0 (2 horas de interação parasito/célula) e T14 (pós-hematopoese *in vitro*). Os resultados estão apresentados em gráficos de barras, com média e erro padrão do percentual de células positivas para os marcadores de superfície em gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas na expressão dos marcadores das culturas estimuladas ou não quando comparadas entre si estão representados pelas barras conectoras com os respectivos valores de *p*.

A diferenciação de células mielomonocíticas, de células-tronco hematopoéticas para monócitos/macrófagos maduros é acompanhada por uma variedade de alterações, incluindo a expressão de novos antígenos de superfície celular. Uma destas moléculas, CD14, uma glicoproteína de 55 kD, é expressa preferencialmente na superfície de células maduras da linhagem monocítica. Com o objetivo de avaliar a expressão de marcadores de superfície relacionados à linhagem monocítica, nós avaliamos a expressão de CD14 antes e após hematopoese *in vitro*, na presença ou ausência de *L. infantum*. As análises dos resultados demonstraram um aumento significativo do percentual de células CD14<sup>+</sup> nas culturas estimuladas com *L. infantum* viva no tempo T14, quando comparamos com a cultura estimulada com *L. infantum* fixada no mesmo tempo e quando comparamos com a cultura Leish-V no tempo T0 (Figura 19A).

O HLA-DR (*human leukocyte antigen*) é um receptor de monócitos e macrófagos do complexo de histocompatibilidade tipo II (MHC II). Sua expressão está

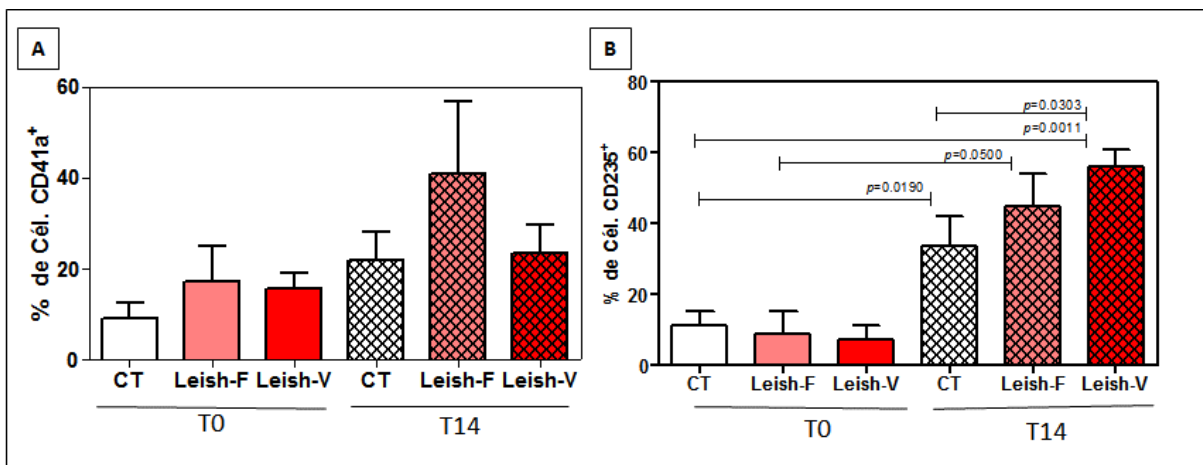
relacionada à ativação de monócitos/macrófagos, ou seja, a capacidade destas células de produzir citocinas em resposta à algum estímulo. Dessa forma, avaliamos dentro da população de células CD14+, a expressão do marcador HLA-DR. As análises demonstraram um aumento significativo desta molécula nas culturas Leish-V no tempo T0, comparando-se com a cultura controle e com a cultura Leish-V no tempo T14, após hematopoese *in vitro* (Figura 19B).



**Figura 19:** Análise da expressão dos marcadores de superfície CD14 (A) e HLA-DR (B), estimuladas com formas promastigotas vivas (Leish-V) ou fixadas (Leish-F) de *L. infantum*, nos tempos T0 (2 horas de interação parasito/célula) e T14 (pós-hematopoese *in vitro*). Os resultados estão apresentados em gráficos de barras, com média e erro padrão do percentual e da intensidade média de fluorescência (IMF) de células positivas para os marcadores de superfície em gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas na expressão dos marcadores das culturas estimuladas ou não quando comparadas entre si estão representados pelas barras conectoras com os respectivos valores de  $p$ .

Além dos marcadores das linhagens monocítica e granulocítica, avaliamos também possíveis diferenças na expressão de marcadores das linhagens plaquetária e eritrocítica. A molécula CD41a, também conhecida como Integrina  $\alpha IIb$ , é normalmente expressa em plaquetas e megacariócitos. Em nossos resultados, não observamos diferenças estatisticamente significativas na comparação entre as diferentes culturas nos tempos avaliados (Figura 20A). Para avaliação de células da linhagem eritroide, avaliamos a expressão de CD235a, conhecida também como Glicoforina A, expressa por precursores eritroides e eritrócitos maduros. As análises demonstraram um aumento

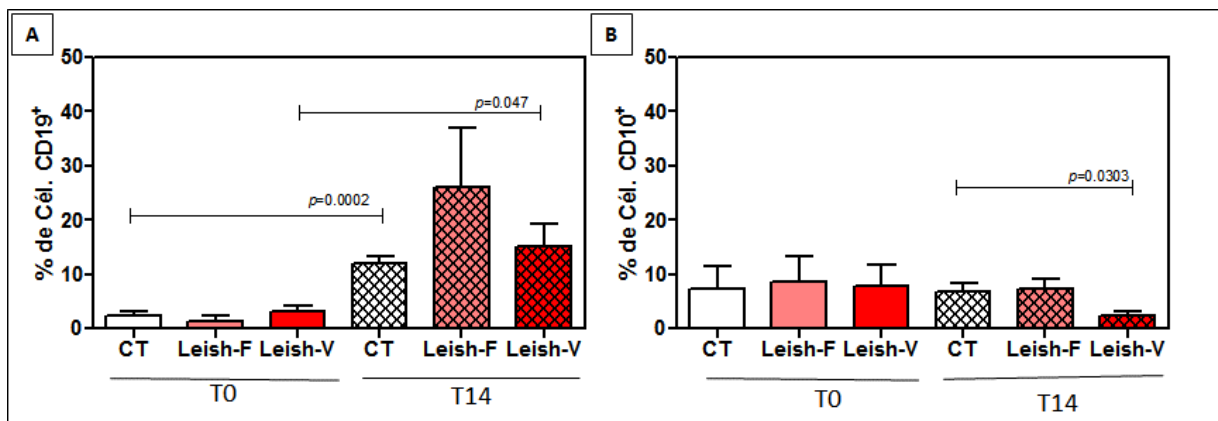
significativo deste marcador em todas as culturas, após hematopoese *in vitro* em relação às culturas correspondentes no tempo T0, além de um aumento nas culturas estimuladas (Leish-V) comparando-se com a cultura controle no tempo T14 (Figura 20B).



**Figura 20:** Análise da expressão dos marcadores de superfície CD41a (A) e CD235a (B), estimuladas com formas promastigotas vivas (Leish-V) ou fixadas (Leish-F) de *L. infantum*, nos tempos T0 (2 horas de interação parasito/célula) e T14 (pós-hematopoese). Os resultados estão apresentados em gráficos de barras, com média e erro padrão do percentual de células positivas para os marcadores de superfície em gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas na expressão dos marcadores das culturas estimuladas ou não, quando comparadas entre si, estão representados pelas barras conectoras com os respectivos valores de  $p$ .

Por último, avaliamos a expressão de marcadores de superfície relacionados à linhagem linfocítica antes e após hematopoese, na presença ou ausência do estímulo de *L. infantum*. A análise da expressão de CD19, ou antígeno de linfócitos B, demonstrou um aumento significativo nas células positivas para este marcador, quando comparamos as culturas Leish-V dos tempos T14 e T0. Observamos também um aumento de células CD19<sup>+</sup> na cultura controle do T14 comparada à mesma cultura no T0 (Figura 21A).

A avaliação da expressão de CD10 demonstrou uma diminuição no percentual de células positivas para este marcador, comparando-se a cultura Leish-V com a cultura controle no tempo T14 (Figura 21B).

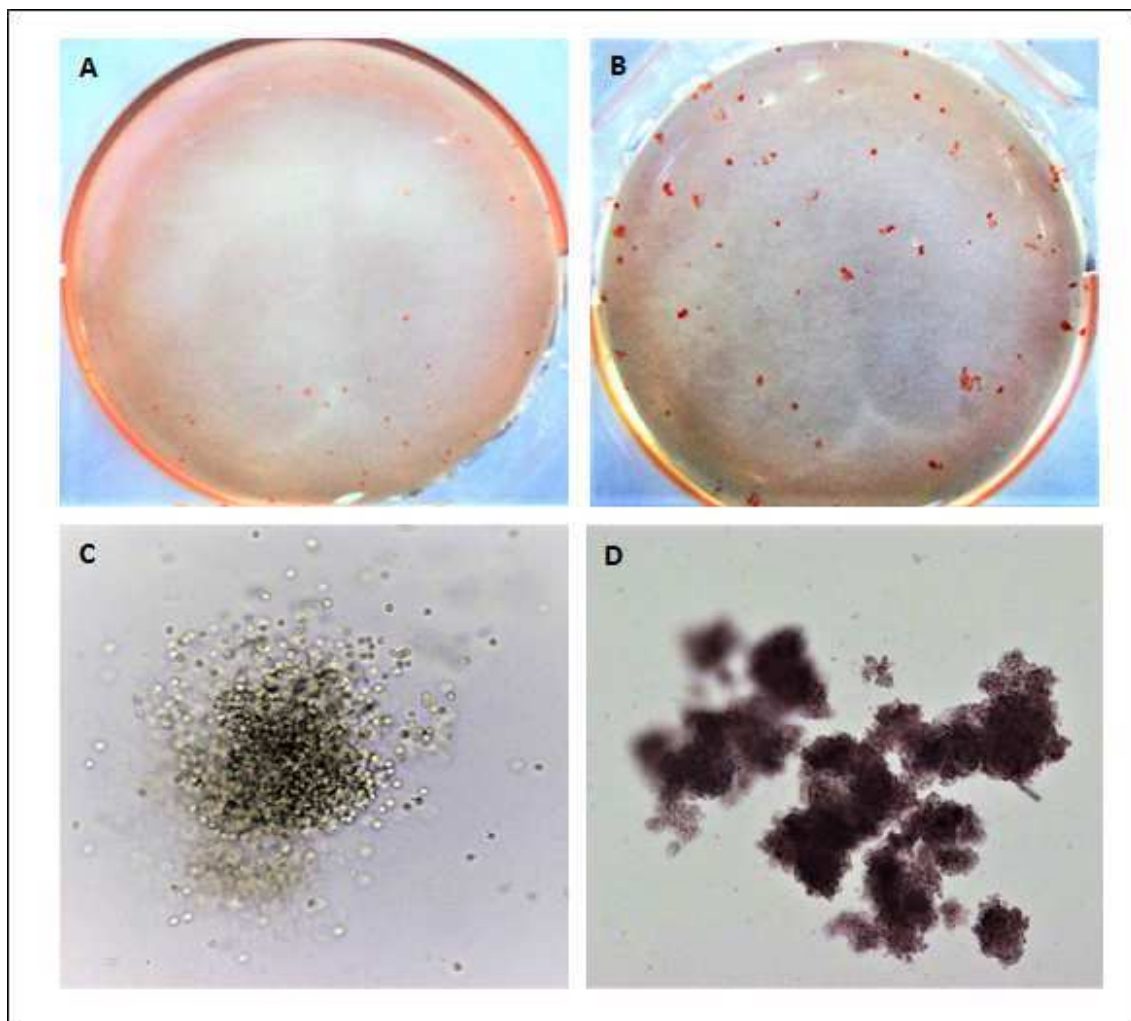


**Figura 21:** Análise da expressão dos marcadores de superfície CD19 (A) e CD10 (B), estimuladas com formas promastigotas vivas (Leish-V) ou fixadas (Leish-F) de *L. infantum*, nos tempos T0 (2 horas de interação parasito/célula) e T14 (pós-hematopoese *in vitro*). Os resultados estão apresentados em gráficos de barras, com média e erro padrão do percentual de células positivas para os marcadores de superfície em gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas na expressão dos marcadores das culturas estimuladas ou não quando comparadas entre si estão representados pelas barras conectoras com os respectivos valores de *p*.

#### 5.4.2 Avaliação do impacto da infecção por *L. (L.) infantum* na hematopoese

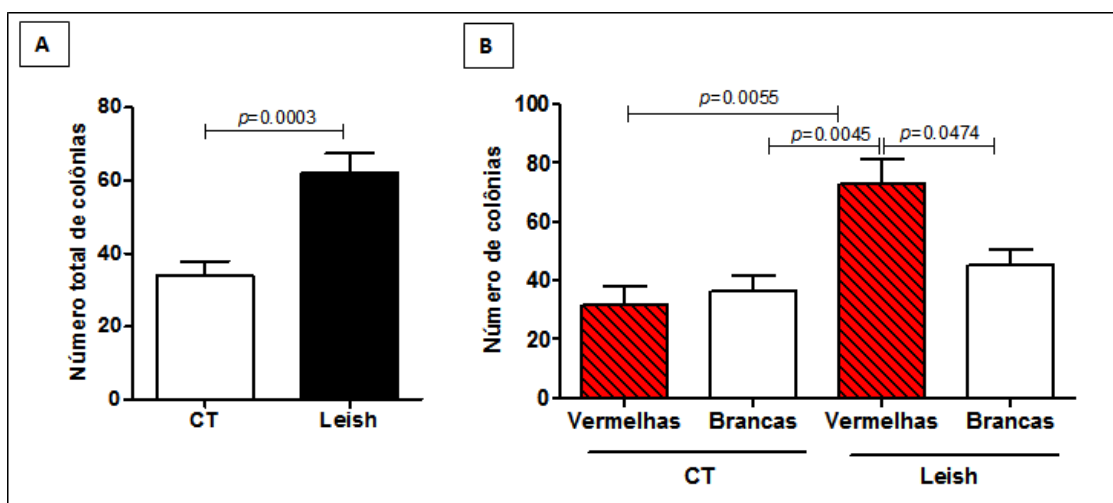
Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o impacto da infecção de células-tronco hematopoéticas derivadas da medula óssea por *L. infantum*, na hematopoese após 14 dias de cultivo.

Após serem cultivadas por 14 dias nas condições descritas no item 4.6, as colônias foram classificadas, contadas e fotografadas em microscópio invertido (AxioObserver.A1 – Zeiss) (Figura 22 e Figura 23).



**Figura 22:** Aspecto das colônias formadas ao final de 14 dias de cultivo. Em A: poço da placa de cultivo na ausência de *L. infantum*. Em B: poço da placa na presença de *L. infantum*. Em C: colônia da linhagem leucocitoide em aumento de 125x. Em D: colônias eritroides em aumento de 125x.

A contagem do número total de colônias demonstrou um aumento significativo nas culturas de células diferenciadas na presença de *L. infantum* (Leish) quando comparadas com a cultura controle (CT) (Figura 23A). Já a contagem do número de colônias leucocitoides (brancas) e eritroides (vermelhas) demonstrou um número significativamente maior de colônias da linhagem eritrocítica nas culturas estimuladas com *L. infantum*, quando comparadas com o número de colônias brancas das culturas estimuladas ou não e também quando comparadas com o número de colônias vermelhas da cultura controle (Figura 23B).



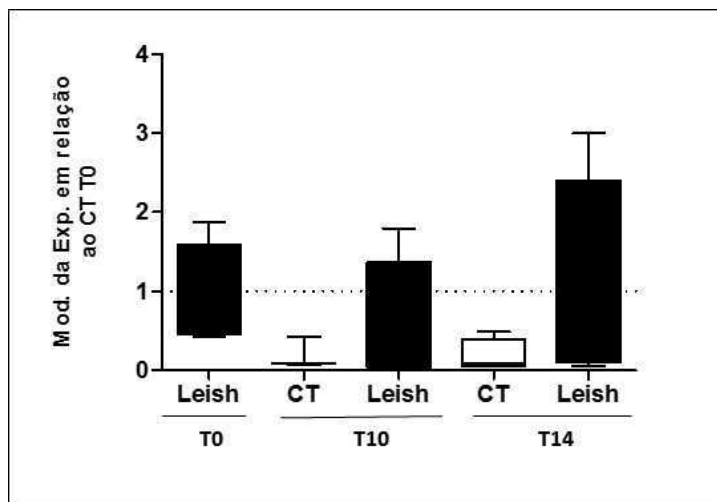
**Figura 23:** Contagem do número total de colônias (A). Contagem das colônias brancas e vermelhas após 14 dias de cultivo, na ausência (CT) ou presença de promastigotas vivas de *L. infantum* (Leish). Os resultados estão apresentados por média e erro padrão do número de colônias em gráficos de barras. As diferenças estatisticamente significativas entre as culturas estimuladas (Leish) e as culturas sem estímulo (CT) estão representadas pelas linhas conectoras e seus respectivos valores de  $p$ .

#### 5.4 Avaliação da expressão gênica de SIRT1 e SIRT6 nas células-tronco hematopoéticas infectadas com *L. (L.) infantum* antes e após hematopoese in vitro

Diante do papel que *SIRT1* desempenha durante a diferenciação celular e também sua participação em processos inflamatórios, um dos objetivos deste estudo foi avaliar a expressão gênica dessa sirtuína durante a hematopoese de células-tronco

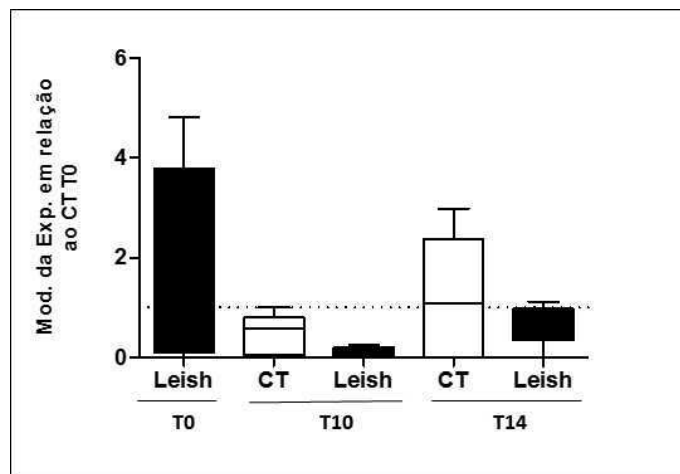


infectadas por *L. infantum*. A análise da quantificação relativa da expressão gênica de *SIRT1* foi maior nas culturas na presença de *L. infantum* nos tempos 0, 10 e 14 em relação à cultura controle no tempo 0 (Figura 24).



**Figura 24:** Perfil de expressão gênica de SIRT 1 por células-tronco hematopoéticas durante a hematopoese *in vitro*, nos tempos T0, T10 e T14 na presença ou ausência de formas promastigotas vivas de *L. infantum* (Leish). Os resultados estão apresentados em gráficos de boxes, com mediana, valores mínimo, máximo e intervalo interquartil da expressão do gene da SIRT 1 relativa ao T0 da cultura controle.

Diante do papel que SIRT6 desempenha durante processos inflamatórios e seu papel regulador da expressão de TNF- $\alpha$ , um dos objetivos deste estudo foi avaliar a expressão gênica dessa sirtuína durante a hematopoese de células-tronco infectadas por *L. infantum*. A análise da quantificação relativa da expressão gênica de *SIRT6* foi maior na cultura na presença de *L. infantum* no tempo 0 e na cultura controle no T14 em relação à cultura controle no tempo 0 (Figura 25).



**Figura 25:** Perfil de expressão gênica de *SIRT6* por células-tronco hematopoéticas durante a hematopoese *in vitro*, nos tempos T0, T10 e T14 na presença ou ausência de formas promastigotas vivas de *L. infantum* (Leish). Os resultados estão apresentados em gráficos de boxes, com mediana, valores mínimo, máximo e intervalo interquartil da expressão do gene da *SIRT6* relativa ao T0 da cultura controle.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de células-tronco hematopoéticas de se infectar com *L. infantum* e o perfil fenotípico e funcional dessas células pós-infecção. Para isso infectamos, *in vitro*, as células-tronco hematopoéticas com formas promastigotas de *L. infantum*. Após a interação parasito/célula, avaliamos diversos parâmetros pós infecção, como por exemplo, a taxa de fagocitose, o perfil fenotípico e a produção de citocinas intracitoplasmáticas e expressão gênica de sirtuínas. Além disso, avaliamos também as consequências dessa infecção no curso da diferenciação celular e o impacto da presença do parasito nas progênes obtidas pós hematopoese *in vitro*.

A Leishmaniose Visceral em indivíduos imunocomprometidos é caracterizada por manifestações clínicas atípicas, muitas vezes aberrantes, com ausência de resultados positivos em alguns testes clínicos importantes e rápida evolução para óbito. Esse cenário dificulta o diagnóstico rápido e preciso, que é crucial para que o paciente seja tratado a tempo. A presença de parasitos na medula óssea e alterações hematopoéticas são achados comuns na Leishmaniose após imunossupressão. Além disso, alguns estudos, principalmente relatos de caso, encontraram *Leishmania* spp. em locais: como humor vítreo e baço. Estes achados mostram que estes parasitos procuram locais de

privilégio imunológico para a sua manutenção e multiplicação, um mecanismo de defesa, para que o sistema imunológico não seja capaz de eliminá-los. Em nosso estudo, avaliamos a capacidade de células-tronco hematopoéticas de se infectar com *L. infantum* e o perfil fenotípico e funcional dessas células pós-infecção. Além disso, avaliamos também as consequências dessa infecção no curso da hematopoese e o impacto da presença do parasito nas progênes celulares.

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório, ou seja, necessita ser rapidamente fagocitado por células do hospedeiro para sua manutenção e sobrevivência (CUMMINGS; TULADHAR; SATOSKAR, 2010; SACKS; SHER, 2002). Estudos apontam que o parasito é preferencialmente fagocitado por células dendríticas e monócitos/macrófagos, porém os neutrófilos executam um papel crucial, impedindo que o parasito se depare ações efetoras do sistema imune nos momentos iniciais da infecção (JOHN; HUNTER, 2008; PETERS et al., 2008). O fato do parasito ser internalizado pelas células do sistema imune pode ser encarado de duas maneiras 1) por ser intracelular obrigatório, para sua sobrevivência o parasito precisa ser fagocitado; 2) a fagocitose desencadeia diversos mecanismos efetores do sistema imune em resposta à presença do parasito dentro da célula. No entanto, esse processo de resolução não é tão simples e diversos fatores têm sido associados à evolução da infecção, como por exemplo, os diversos mecanismos que a *Leishmania* tem para escapar do sistema imune do hospedeiro (BELKAID; BUTCHER; SACKS, 1998; VON STEBUT, 2007), além da presença de mutações em indivíduos infectados, que podem afetar gravemente a expressão e função de citocinas cruciais para um perfil pró-resolutivo da doença (CASTELLUCCI et al., 2006; RAMASAWMY et al., 2010).

No presente trabalho, avaliamos, por citometria de fluxo, a taxa de fagocitose de CTH e observamos que cerca de 50% dessas células fagocitaram formas promastigotas vivas e fixadas de *L. infantum*. Usando modelos murino e linhagens celulares primárias, trabalhos anteriores demonstraram a capacidade de *L. donovani* e *L. infantum* em infectar macrófagos estromais da medula-óssea e células do baço, mas não células-tronco hematopoéticas (COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000; LECLERCQ et al., 1996). Estes estudos sugerem que as células estromais serviriam de reservatório, mantendo o parasito abrigado durante a infecção. Além disso, ALLAHVERDIYEV et al., (2011) sugerem que células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo poderiam servir como hospedeiras na infecção latente por *Leishmania*.

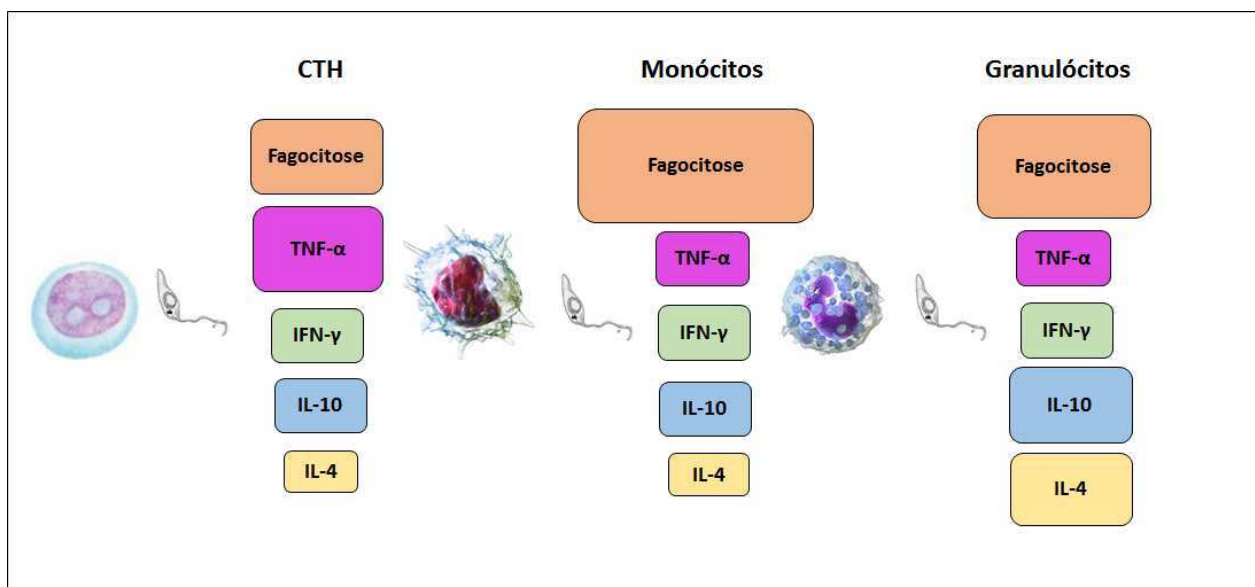
É sabido que a *Leishmania* pode sobreviver em diferentes órgãos e tecidos durante décadas, mesmo após tratamento específico. Assim, o fato de CTH serem capazes de se infectar com *L. infantum* parece ser vantajoso para a manutenção de uma infecção assintomática, uma vez que a medula óssea é um dos sítios imunologicamente privilegiados do corpo humano. Além disso, as CTH tendem a permanecer no compartimento medular até sua completa diferenciação, fazendo com que as células infectadas permaneçam nesse ambiente protegido. De forma interessante, nossos resultados também apontaram que apesar da capacidade fagocítica das CTH, monócitos e granulócitos apresentam maior taxa de fagocitose. Calculando-se o índice do percentual de células que fagocitaram *L. infantum* observamos cerca de 2 vezes mais monócitos e granulócitos que internalizaram o parasito em comparação com as células-tronco indiferenciadas. BOGDAN et al. (2000) ao avaliarem linfonodos de camundongos em fase crônica de infecção por *L. major* observaram que fibroblastos também poderiam ser células hospedeiras para o parasito, porém com resposta efetora reduzida. Neste mesmo estudo, também foram achados macrófagos infectados capazes de responder normalmente à presença do parasito na célula. Estes dados sugerem fortemente que os fibroblastos podem compor um ambiente menos hostil para *L. major* do que os macrófagos e, assim, permitir a persistência dos parasitos. No entanto, a sobrevivência do parasito e a replicação estariam sujeitas ao controle por macrófagos vizinhos que seriam as células eficazes no controle da infecção dos fibroblastos e, assim, ajudariam a manter uma relação de equilíbrio entre parasito e hospedeiro, favorecendo a manutenção da infecção sem maiores danos ao indivíduo infectado.

O fato da *Leishmania* ser capaz de se evadir do sistema imune é de extrema importância epidemiológica. Diversos estudos relatam a reativação de infecções latentes ou assintomáticas após transplante de órgãos (FISHMAN, 2011; KOMITOPOULOU et al., 2014; KOTTON, 2007). Após procedimento cirúrgico para recebimento do enxerto é obrigatório que o receptor faça uso de medicação imunossupressora para evitar episódios de rejeição. Com o sistema imune debilitado, o paciente fica predisposto a adquirir novas infecções ou reativar infecções residuais já existentes (ANTINORI et al., 2008). Este assunto merece grande atenção principalmente em áreas endêmicas, onde a prevalência de infecção assintomática e o número de indivíduos que já foram infectados em algum momento da vida é alto.

Durante o processo de internalização/reconhecimento antigênico do parasito, os receptores do tipo Toll (TLR) ativam uma cascata de sinalização, via molécula adaptadora MyD88, os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B, ativador de proteína-1 (AP-1) e fator regulador de interferon (IRF) que promovem a transcrição e a síntese de várias citocinas pró-inflamatórias (BEUTLER et al., 2006; SINGH; SRIVASTAVA; SINGH, 2012). No presente trabalho, avaliamos a produção de citocinas pró-inflamatórias e moduladoras pelas CTH, linfócitos, monócitos e granulócitos, para compreender melhor o perfil funcional das células infectadas por *L. infantum*. Em nossos resultados, observamos que as CTH, apesar de indiferenciadas e não comprometidas com nenhuma linhagem celular específica, foram capazes de produzir citocinas em resposta à presença do parasito vivo, principalmente TNF- $\alpha$ . Em estudo realizado por Cotterell et al (2000), foi observado que a infecção de macrófagos estromais da medula-óssea de camundongos está relacionada com a produção dessa citocina, que teria papel fundamental, juntamente com GM-CSF na desregulação hematopoética durante a infecção por *L. donovani*. Estudos apontam que em alguns contextos, TNF- $\alpha$  participa como fator de crescimento durante a hematopoese, estimulando a diferenciação de células da linhagem mieloide (BROXMEYER; WILLIAMS, 1988; LARDON et al., 1997). Além disso, já foi relatado que TNF- $\alpha$ , produzido por células T CD8<sup>+</sup> derivadas de CTH da medula, aumenta a capacidade de regeneração, a proporção de progenitores multipotentes *in vitro* e previne a apoptose de CTH (REZZOUG et al., 2008). Este dado contribui imensamente com a nossa hipótese, uma vez que a produção e liberação de TNF- $\alpha$  favoreceria a manutenção das CTH, que seria uma importante célula hospedeira de *L. infantum* no contexto da infecção latente. É importante ressaltar que, em nossos achados, parece que o fato do parasito estar vivo no momento de sua internalização favorece a produção de citocinas. Isso poderia ocorrer pois a *Leishmania* é capaz de secretar moléculas antigênicas encapsuladas em microvesículas que poderiam servir de estímulo para uma resposta celular mediada por citocinas (ATAYDE et al., 2016; SANTARÉM et al., 2007).

Avaliando-se o perfil de citocinas nas CTH, monócitos e granulócitos, podemos perceber que estas células parecem desempenhar papéis distintos diante da presença do parasito. No desenho esquemático (Figura 26), representamos a magnitude da capacidade fagocítica e efetora (produção de citocinas) das células avaliadas em nosso estudo. Comparando as três populações entre si. As CTH possuem menor capacidade

fagocítica e maior produção de TNF- $\alpha$ . Já os monócitos possuem alta capacidade fagocítica e um perfil de citocinas mais pró-inflamatório em relação aos granulócitos. Por outro lado, os granulócitos apresentam maior produção de citocinas moduladoras e capacidade fagocítica moderada. Diante disso, podemos inferir que durante a infecção latente os papéis distintos das três populações seriam cruciais na construção de um sistema capaz de controlar o crescimento do parasito sem eliminar a infecção.



**Figura 26:** Desenho esquemático do resumo dos resultados obtidos na avaliação da taxa de fagocitose e produção de citocinas em células-tronco hematopoéticas (CTH), monócitos e granulócitos derivados da medula óssea, após estímulo de *L. (L.) infantum*.

O balanço entre as citocinas moduladoras e pró-inflamatórias tem sido identificado como uma chave no controle e cura da LV. É importante ressaltar que o papel desempenhado por cada citocina depende do microambiente e do contexto avaliado. Por muito tempo a IL-4, por exemplo, foi vista apenas como uma citocina anti-inflamatória. Hoje, sabe-se através de diversos estudos que esta citocina participa, por exemplo, na via de produção de óxido nítrico (NO), um potente leishmanicida (MOSSALAYI et al., 1999; PAUL-EUGÈNE et al., 1995; VOULDOUKIS et al., 1995). Interessantemente, apesar de matar parasitos intracelulares, o NO também apresenta um papel duplo, pois está envolvido na imunossupressão e apoptose de células T

(BRONTE; ZANOVELLO, 2005; RODRÍGUEZ; OCHOA, 2008). Em nossos resultados, nós não apenas observamos um alto percentual de CTH e subpopulações de células CD45<sup>+</sup> produtoras de IL-4, mas também um baixo percentual de linfócitos após hematopoese *in vitro* de células infectadas por *L. infantum*. Esses achados podem representar um importante mecanismo de regulação, uma vez que o mesmo NO que promove atividade leishmanicida também pode diminuir a atividade de linfócitos T, promovendo a manutenção da infecção.

Schmid et al. (2014) associaram a modulação de linfócitos T durante a infecção por *L. major* com células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSC – *Myeloid-derived Suppressor Cells*). Essas células são derivadas de precursores mielóides, mas não se diferenciam completamente, não sendo comprometidas com nenhuma linhagem (YOUN et al., 2008). Este fenótipo não foi avaliado em nosso estudo, mas poderia estar relacionado com alguns de nossos achados. As MDSC podem ser ativadas e expandidas através do reconhecimento via TLR e citocinas como IFN- $\gamma$  and IL-4, que ativam vias como STAT6, STAT1 and NF-kB. Estas células possuem capacidade de fagocitar *Leishmania*, produzir ROS e NO e aumentar a secreção de IL-10, importante citocina moduladora no contexto da VL (SCHMID et al., 2014). Em nosso estudo, observamos um aumento no percentual de CTH e subpopulações de células CD45<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup>, especialmente granulócitos. A modulação da resposta imune anti-*Leishmania* pelas MDSC poderia suportar a hipótese da manutenção da infecção assintomática residual na medula-óssea, com grande potencial de reativação em casos de pacientes imunossuprimidos.

Alterações hematopoéticas são um dos principais achados nos estudos de infecção de células da medula óssea por *Leishmania* e também em estudos que envolvem indivíduos imunossuprimidos portadores de LV. No presente trabalho, observamos que a presença de *L. infantum* altera a hematopoese *in vitro* e que há um número expressivo de colônias formadas após 14 dias de cultivo de células-tronco infectadas por promastigotas de *L. (L.) infantum*. Células-tronco hematopoéticas permanecem geralmente em um estado quiescente ou latente, mas podem ser estimuladas sob condições de estresse, como por exemplo, uma infecção. Nesse contexto, elas são capazes de se proliferarem e diferenciarem para reabastecer as progênes, após a morte celular ou apoptose (BALDRIDGE; KING; GOODELL, 2011). Dessa forma, a presença de células infectadas por *Leishmania* poderia servir como

estímulo, aumentando assim a diferenciação celular. Cotterell et al. (2000) encontraram níveis elevados de GM-CSF e mRNA da citocina TNF- $\alpha$  em culturas de células na presença de amastigotas de *L. donovani* na ausência de estímulo prévio com fatores de crescimento. O papel de TNF- $\alpha$  tem sido extensivamente investigado no contexto da LV como um potente agente pró-inflamatório. Esta citocina pode participar na regulação da hematopoese, porém seu papel nesse contexto ainda não é bem definido (BROXMEYER & WILLIAMS, 1988; LARDON et al., 1997). Sabe-se que, em estudos experimentais observou-se que TNF- $\alpha$  induzido pela infecção por *L. donovani* age em sinergia com GM-CSF na formação de colônias granulocítico-macrofágicas, porém TNF- $\alpha$  sozinho não possui qualquer efeito. Além disso, TNF- $\alpha$  produzido por linfócitos T derivados da medula, aumentam a proporção de células-tronco multipotentes e previne a apoptose das CTH (REZZOUG et al., 2008). Este achado, juntamente com os dados obtidos neste estudo, corrobora com nossa hipótese, de que *L. (L.) infantum* utiliza as CTH como um reservatório para se evadir do sistema imune, mantendo assim a infecção latente. Além disso, sugerimos que a expressão aumentada de TNF- $\alpha$  encontrada em nosso estudo, poderia estar também relacionada com as alterações hematopoéticas.

Após a hematopoese *in vitro*, observamos um grande número de colônias da linhagem eritroide após 14 dias, nas culturas de CTH infectadas por *L. (L.) infantum*, além de um percentual aumentado de células CD235<sup>+</sup>. Estudos experimentais relatam um aumento na mielopoiese em culturas de CTH estimuladas com *L. donovani* (COTTERELL et al., 2000). Nossos resultados corroboram com os achados de Lafuse et al (2013), que também observaram uma frequência aumentada de unidades formadoras de colônia eritrocítica (CFU-E), após infecção experimental de *L. donovani* em hamster dourado. É sabido que anemia é um dos principais achados clínicos durante a LV (COSTA et al., 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Assim, o aumento encontrado no número de colônias vermelhas após infecção por *L. (L.) infantum*, parece um resultado controverso. Porém, alguns estudos relatam que a anemia observada em pacientes com LV ocorre por uma falha na diferenciação de precursores eritroides. Alguns estudos revelam que análises de biópsias de pacientes portadores de LV indicam hiperplasia com presença de eritroblastos anormais, incluindo eritroblastos em tamanho maior que o normal, com lisossomos gigantes, núcleo contendo pouca cromatina condensada, além de eritroblastos multinucleares (KUMAR et al., 2007;



WICKRAMASINGHE; ABDALLA; KASILI, 1987). Além disso, a expressão diminuída de genes que promovem a diferenciação eritroide (alpha-globina, beta-globina e ALAS2) também tem sido relatada, indicando bloqueio na diferenciação de eritrócitos (LAFUSE et al., 2013). Dessa forma, apesar de números maiores de colônias eritroides observadas nas culturas na presença de *L. (L.) infantum*, uma falha na sua diferenciação poderia culminar em quadros de anemia frequentemente observados na LV.

Alterações hematopoéticas são um dos principais achados nos estudos de infecção de células da medula óssea por *Leishmania* e também em estudos que envolvem indivíduos imunossuprimidos portadores de LV. Na Parte I do presente trabalho, observamos que a presença de *L. (L.) infantum* altera a hematopoese *in vitro* e que existe um número expressivo de colônias eritroides formadas após 14 dias de cultivo de células-tronco infectadas por promastigotas de *L. (L.) infantum*. Células-tronco hematopoéticas permanecem geralmente em um estado quiescente, mas podem ser estimuladas sob condições de estresse, como por exemplo, durante uma infecção. Nesse contexto, elas são capazes de se proliferar e diferenciar para reabastecer as progênes, após a morte celular ou apoptose (BALDRIDGE et al., 2011). Dessa forma, a presença de células infectadas por *Leishmania* poderia servir como estímulo, aumentando assim a diferenciação celular. De acordo com as funções desempenhadas pelas sirtuínas, como o controle da homeostase celular por meio da apoptose, estas proteínas parecem ter um papel crucial na modulação da sobrevivência ou morte de células hospedeiras no contexto da infecção por *Leishmania*. Um dos mecanismos de evasão do sistema imune é a manipulação da apoptose em APCs, como macrófagos e células dendríticas, por *Leishmania spp.* (AKARID et al., 2004).

Cotterell et al. (2000) encontraram níveis elevados de GM-CSF e mRNA da citocina TNF- $\alpha$  em culturas de células na presença de amastigotas de *L. donovani*, na ausência de estímulo prévio com fatores de crescimento. O papel de TNF- $\alpha$  tem sido extensivamente investigado no contexto da LV como um potente agente pró-inflamatório. Esta citocina pode participar na regulação da hematopoese, porém seu papel nesse contexto ainda não é bem definido (BROXMEYER & WILLIAMS, 1988; LARDON et al., 1997). Sabe-se que, em estudos experimentais TNF- $\alpha$  induzido pela infecção por *L. donovani* age em sinergia com GM-CSF na formação de colônias granulocítico-macrofágicas, porém TNF- $\alpha$  sozinho não possui qualquer efeito. Além

disso, TNF- $\alpha$  produzido por linfócitos T derivados da medula, aumenta a proporção de células-tronco multipotentes e previne a apoptose das CTH (REZZOUG et al., 2008). No presente estudo, o alto percentual de fagocitose observado nas CTH, juntamente com a produção de TNF- $\alpha$  por essas células corroboram com a hipótese de que a *Leishmania* utiliza as CTH como reservatório para driblar o sistema imune, e a produção de TNF- $\alpha$  como consequência da infecção, altera o perfil de hematopoese e previne a morte das células infectadas, favorecendo a manutenção da infecção.

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, o estudo do papel das sirtuínas 1 e 6 no contexto da infecção de células-tronco hematopoéticas por *L. infantum* é bastante relevante, uma vez que observamos alterações no número de colônias obtidas ao final da hematopoese *in vitro* e um dos nossos principais achados foi o alto percentual de células-tronco produtoras de TNF- $\alpha$  pós-fagocitose. Durante a diferenciação celular, SIRT1 possui uma participação clara na prevenção da apoptose induzida por estresse oxidativo (OU et al., 2014). Assim, SIRT 1 regula não apenas o programa de transcrição durante a diferenciação celular, mas também controla a resposta da célula ao estresse intrínseco e extrínseco durante a diferenciação (YU; DANG, 2016a). Em nosso estudo, SIRT 1 parece desempenhar um importante papel nas células infectadas por *L. infantum* durante a hematopoese *in vitro*. Observamos que as células infectadas têm maior expressão do gene de SIRT 1, em relação ao gene de expressão constitutiva,  $\beta$ -tubulina, durante a hematopoese, sugerindo que a presença do parasito, modula a célula infectada favorecendo a sobrevivência da mesma e, conseqüentemente, o sucesso da infecção. Moreira et al (2015) demonstraram que a via de SIRT 1 está alterada na presença de *L. infantum*, e esta alteração é crucial para a sobrevivência do parasito, uma vez que altera o perfil bioenergético da célula. Em nosso trabalho, nós não avaliamos aspectos metabólicos, mas as alterações de expressão observadas nas células infectadas sugerem que esse mecanismo possa estar ocorrendo.

Além de SIRT1, SIRT6 também tem um papel bem definido durante a diferenciação celular. Além disso a participação de SIRT6 na regulação da expressão de TNF- $\alpha$ , coloca esta molécula também no contexto inflamatório. Uma vez que a presença de *Leishmania* na célula induz a ativação de diversos mecanismos pró-inflamatórios, como produção de ROS, liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios, foi de nosso interesse avaliar a expressão gênica de SIRT6 no contexto da diferenciação celular de células infectadas por *L. infantum*. De forma interessante, observamos que

esta sirtuína está bastante expressa no tempo 0 (T0), após duas horas de interação com o parasito, sugerindo que SIRT6 esteja participando na regulação positiva da expressão de TNF- $\alpha$  nos momentos iniciais da infecção, diferente de SIRT1, que parece atuar em todo o processo de hematopoese na presença de *L.infantum*. Já foi demonstrado que animais deficientes para SIRT6 tem a expressão de TNF- $\alpha$  bastante reduzida, o mesmo ocorre *in vitro*, ao tratar culturas de linhagens celulares com inibidores de SIRT6 (VAN GOOL et al., 2009). Em nosso estudo, observamos um alto percentual de células produtoras de TNF- $\alpha$  após 6 horas de cultivo celular na presença de *L. infantum* somado ao aumento na expressão gênica de SIRT6 no tempo 0, sugerindo fortemente a regulação dessa citocina por SIRT6 no contexto da infecção por *L. infantum*, dado ainda não reportado na literatura.

Diante disso, com os dados obtidos nessa parte do estudo, podemos sugerir que há participação das sirtuínas 1 e 6 no contexto da infecção de células-tronco hematopoéticas por *L.(L.) infantum*, pois a expressão gênica das mesmas encontra-se alterada ao longo da diferenciação celular nas culturas infectadas por *L. (L.) infantum*. Já foi relatado que durante a sepse experimental induzida por LPS via TLR4 em células THP-1, há participação de SIRT1 e SIRT6 em conjunto na mudança do perfil bioenergético da célula, promovendo a restauração da homeostase (LIU et al., 2012). Dessa forma, o presente estudo impulsiona a investigação mais profunda do papel dessas sirtuínas no contexto da infecção e do papel da *Leishmania* na modulação imunometabólica das células hospedeiras.

A avaliação da infecção de CTH por *Leishmania* e as consequências da presença do parasito no contexto funcional da medula óssea são extremamente importantes nos casos de LV em indivíduos imunocomprometidos. Além disso, avaliar estes aspectos utilizando amostras de células-tronco humanas é uma oportunidade rara de compreender melhor a dinâmica da infecção por *L. (L.) infantum*, enquanto a vasta maioria dos estudos utilizam apenas modelos murinos e linhagens celulares primárias. Diante de nossos resultados, podemos demonstrar que células-tronco da medula óssea, ainda que indiferenciadas, são capazes de fagocitar *L. infantum* e responder à infecção através da produção de citocinas. A citocina encontrada em maior percentual nas CTH foi TNF- $\alpha$ , que atuaria tanto em mecanismos efetores causando a morte do parasito, mas também contribuiria para a infecção, prevenindo a apoptose das CTH e aumentando sua proliferação. Observamos também que a alta expressão de SIRT6 nos momentos iniciais da infecção poderia estar relacionada com os níveis TNF- $\alpha$  encontrados.

Destacamos também que, monócitos e granulócitos apresentaram alta capacidade fagocítica, tornando-se importantes produtores de citocinas pró-inflamatórias e moduladoras. Interessantemente, a presença de *L. (L.) infantum* induziu um perfil distinto de hematopoese *in vitro*, favorecendo a proliferação de colônias eritroides e alterando o perfil fenotípico das progênies celulares. É importante ressaltar que SIRT1 parece estar relacionada com esse perfil distinto de diferenciação, uma vez que o gene que codifica esta enzima estaria mais expresso durante a diferenciação das células infectadas por *L. (L.) infantum*.

## 7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, o presente estudo mostrou que as CTH indiferenciadas, ou seja, aquelas que ainda não estão comprometidas com nenhuma linhagem celular específica, são capazes de fagocitar formas promastigotas de *L. (L.) infantum*. Vimos também que monócitos e granulócitos fagocitam *L. (L.) infantum* em menor proporção quando comparados com as CTH, reforçando a importância dessas células no contexto da infecção de células da medula óssea. Além disso, observamos que as CTH produzem citocinas pró-inflamatórias e moduladores, após a internalização de *L. (L.) infantum*, principalmente TNF- $\alpha$ . Interessantemente, vimos que o gene que codifica a SIRT6 também encontrou-se mais expresso nos momentos iniciais da infecção, indicando uma possível relação com a alta produção de TNF- $\alpha$ . Nós observamos que leucócitos derivados da medula-óssea, linfócitos, monócitos e granulócitos também produzem citocinas IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em resposta à infecção por *L. (L.) infantum*. Além disso, foi possível verificar que a infecção de CTH por *L. (L.) infantum* altera o perfil da hematopoese *in vitro*, aumentando o número de colônias da linhagem eritroide e que esta alteração pode estar relacionada com a expressão aumentada de *SIRT1* nas células infectadas por *L. (L.) infantum* durante a diferenciação celular. Por fim, observamos que a infecção de CTH por *L. (L.) infantum* altera o perfil fenotípico das progênies celulares, após hematopoese *in vitro*.

Com o estudo realizado, concluímos que a infecção por *L. (L.) infantum* foi capaz de induzir alterações significativas diferenciadas na hematopoese e no perfil funcional das progênies, interferindo no número de progênies derivadas da linhagem eritroide. Concluímos ainda que, a infecção por *L. (L.) infantum* altera a expressão de citocinas e sirtuínas e essas moléculas parecem desempenhar um papel importante na criação de um microambiente que, ao mesmo tempo, favorece a hematopoese e a manutenção da infecção.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEBE, T. et al. Arginase activity - a marker of disease status in patients with visceral leishmaniasis in ethiopia. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 7, n. 3, p. e2134, 2013.

AKARID, K. et al. Leishmania major-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. *Journal of leukocyte biology*, v. 76, n. 1, p. 95–103, 2004.

ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a new host cell in latent leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 85, n. 3, p. 535–9, set. 2011.

ALVAR, J. et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clinical microbiology reviews*, v. 10, n. 2, p. 298–319, 1997.

ANASTASIOU, D.; KREK, W. SIRT1: Linking Adaptive Cellular Responses to Aging-Associated Changes in Organismal Physiology. *Physiology*, v. 21, n. 6, p. 404–410, 2006.

ANSARI, N. A. et al. IL-27 and IL-21 are associated with T cell IL-10 responses in human visceral leishmaniasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 186, n. 7, p. 3977–3985, 2011.

ANTINORI, S. et al. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 8, n. 3, p. 191–199, 2008.

ASSIS, T. M. DE; GUIMARÃES, P. N.; OLIVEIRA, E. Acceptance and potential barriers to effective use of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in an urban area in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 49, n. 2, p. 241–244, 2016.

ASSUMPÇÃO MOURÃO, M. V. et al. Parasite load and risk factors for poor outcome among children with visceral leishmaniasis. A cohort study in Belo Horizonte, Brazil, 2010-2011. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 2, p. 147–153, 2014.

ATAYDE, V. D. et al. Leishmania exosomes and other virulence factors: Impact on

innate immune response and macrophage functions. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 7–18, 2016.

AWASTHI, A.; KUMAR, M. R.; SAHA, B. Immune Response to Leishmania infection. **Indian J. Med. Res.**, v. 119, n. JULY, p. 238–258, 2004.

BACELLAR, O. et al. Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 173, n. 6, p. 1515–1518, 1996.

BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral Immunopathogenesis of Visceral Leishmaniasis. v. 1, n. 1, p. 24–34, 2005.

BADARÓ, R. et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 154, n. 6, p. 1003–11, 1986.

BAEUERLE, P. A.; BALTIMORE, D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. **Science**, v. 242, n. 4878, p. 540–546, 1988.

BALDRIDGE, M. T.; KING, K. Y.; GOODELL, M. A. **Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells** *Trends in Immunology*, 2011.

BALDWIN, A. S. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. **Annual Review of Immunology**, v. 14, p. 649–683, 1996.

BAO, J.; SACK, M. N. Protein deacetylation by sirtuins: Delineating a post-translational regulatory program responsive to nutrient and redox stressors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 18, p. 3073–3087, 2010.

BARATTA-MASINI, A. et al. Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 12, p. 839–849, 2007.

BARRAL-NETTO, M. et al. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science (New York, N.Y.)**, v. 257, n. 5069, p. 545–548, 1992.

BASSET, D. et al. Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 7, n. 13, p.

1370–5, 2005.

BELKAID, Y.; BUTCHER, B.; SACKS, D. L. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. **European journal of immunology**, v. 28, n. 4, p. 1389–1400, 1998.

BESTEIRO, S. et al. Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 16, p. 11384–11396, 2006.

BEUTLER, B. et al. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. **Annu Rev Immunol**, v. 24, p. 353–389, 2006.

BIBAS, M.; DEL NONNO, F. Leishman-Donovan bodies in the bone marrow biopsy. **Blood**, v. 118, n. 1, p. 8–8, 2011.

BLANDER, G.; GUARENTE, L. The Sir2p family of protein deacetylases. **Annu Rev Biochem**, v. 73, p. 417–435, 2004.

BOGDAN, C. et al. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 12, p. 2121–2130, 2000.

BRAGA, R. R. et al. Leishmaniasis in Brazil. XXII: characterization of *Leishmania* from man, dogs and the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz et Neiva, 1912) isolated during an outbreak of visceral leishmaniasis in Santarem, Para State. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 3, p. 323–330, 1986.

BRONTE, V.; ZANOVELLO, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 8, p. 641–54, 2005.

BROXMEYER, H. E.; WILLIAMS, D. E. The production of myeloid blood cells and their regulation during health and disease. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 8, n. 3, p. 173–226, 1988.

BRUNTON, J. et al. Feeding Uninvited Guests: MTOR and AMPK Set the Table for Intracellular Pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, 2013.

BUXBAUM, L. U.; SCOTT, P. Interleukin 10- and Fcγ receptor-deficient mice



resolve *Leishmania mexicana* lesions. **Infection and immunity**, v. 73, n. 4, p. 2101–8, 2005.

CALVANESE, V. et al. Sirtuin 1 regulation of developmental genes during differentiation of stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 31, p. 13736–41, 2010.

CAMPANELLI, A. P. et al. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. **The Journal of infectious diseases**, v. 193, n. 9, p. 1313–22, 2006.

CARVALHO, E. M. et al. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. **Journal of Clinical Investigation**, v. 83, n. 3, p. 860–864, 1989.

CARVALHO, L. P. et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. OCT, p. 1–9, 2012.

CASTELLUCCI, L. et al. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **J Infect Dis**, v. 194, n. 4, p. 519–527, 2006.

CECÍLIO, P. et al. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. **Frontiers in immunology**, v. 5, n. October, p. 480, 2014.

CHAPPUIS, F. et al. Field validity, reproducibility and feasibility of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in rural Nepal. **Tropical Medicine and International Health**, v. 11, n. 1, p. 31–40, 2006.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat.Rev.Microbiol.**, v. 5, n. 1740–1534 (Electronic), p. 873–882, 2007a.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–82, 2007b.

CLARK, S. C.; KAMEN, R. The human hematopoietic colony-stimulating factors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 236, n. 4806, p. 1229–1237, 1987.

COLLIN, N. et al. Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a

natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 5, 2009.

COSTA, C. H. N. et al. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 99, n. 3, p. 229–236, 2005.

COSTA, C. H. N. et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 386–392, 2010.

COTTERELL, S. E.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with *Leishmania donovani*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 4, p. 1840–8, abr. 2000.

COUPER, K.; BLOUNT, D.; RILEY, E. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **Journal of immunology**, v. 180, n. 9, p. 5771–5777, 2008.

COURA-VITAL, W. et al. Prognostic Factors and Scoring System for Death from Visceral Leishmaniasis: An Historical Cohort Study in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, 2014.

CROCKER, P. R.; GORDON, S. Isolation and characterization of resident stromal macrophages and hematopoietic cell clusters from mouse bone marrow. **The Journal of experimental medicine**, v. 162, n. 3, p. 993–1014, 1985.

CROCKER, P. R.; MCMILLAN, S. J.; RICHARDS, H. E. **CD33-related siglecs as potential modulators of inflammatory responses** *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2012.

CUMMINGS, H. E.; TULADHAR, R.; SATOSKAR, A. R. **Cytokines and their STATs in cutaneous and visceral leishmaniasis** *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.

DA-CRUZ, A. M. et al. *Leishmania*-reactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 62, n. 6, p. 2614–2618, 1994.

DA SILVA JUNIOR, G. B.; GUARDÃO BARROS, E. J.; DE FRANCESCO DAHER,

**E. Kidney involvement in leishmaniasis-A review** *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2014.

DAS, A. et al. Epidemiologic Correlates of Mortality among Symptomatic Visceral Leishmaniasis Cases: Findings from Situation Assessment in High Endemic Foci in India. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 11, 2016.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Dermatological Therapy*, v. 22, n. 6, p. 491–502, 2009.

DE GOUVÊA VIANA, L. et al. Combined diagnostic methods identify a remarkable proportion of asymptomatic *Leishmania (Leishmania) chagasi* carriers who present modulated cytokine profiles. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 102, n. 6, p. 548–555, 2008.

DE SANTIS, G. C. et al. Therapeutic leukapheresis in patients with leukostasis secondary to acute myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Apheresis*, v. 26, n. 4, p. 181–185, 2011.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, v. 14, n. 5, p. 417–423, 1996.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 3, p. 239–243, 2001.

DRUZIAN, A. F. et al. Risk factors for death from visceral leishmaniasis in an urban area of Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 9, n. 8, 2015.

DYE, C.; WILLIAMS, B. G. Malnutrition, Age and the Risk of Parasitic Disease: Visceral Leishmaniasis Revisited. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 254, n. 1339, p. 33–39, 1993.

ETCHEGARAY, J.-P. et al. The histone deacetylase SIRT6 controls embryonic stem cell fate via TET-mediated production of 5-hydroxymethylcytosine. *Nature Cell Biology*, v. 17, n. 5, p. 545–557, 2015.

FALEIRO, R. J. et al. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 7, 2014.

FERNÁNDEZ-GUERRERO, M. L. et al. Visceral leishmaniasis in immunocompromised hosts. *The American Journal of Medicine*, v. 83, n. 6, p. 1098–1102, 1987.

FISHER, J. S.; WOODLE, E. S.; THISTLETHWAITE, J. R. Kidney transplantation: graft monitoring and immunosuppression. *World Journal of Surgery*, v. 26, n. 2, p. 185–193, 2002.

FISHMAN, J. A. Infections in Immunocompromised Hosts and Organ Transplant Recipients. *Essentials*. v. 17, n. 11, p. 34–37, 2011.

FORD, J.; JIANG, M.; MILNER, J. Cancer-specific functions of SIRT1 enable human epithelial cancer cell growth and survival. *Cancer Research*, v. 65, n. 22, p. 10457–10463, 2005.

GALVÃO-CASTRO, B. et al. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. *Clinical and experimental immunology*, v. 56, n. 1, p. 58–66, 1984.

GANTT, K. R. et al. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 170, n. 5, p. 2613–2620, 2003.

GANZEL, C. et al. Hyperleukocytosis, leukostasis and leukapheresis: Practice management. *Blood Reviews*, v. 26, n. 3, p. 117–122, 2012.

GHOSH, S.; HAYDEN, M. S. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 8, n. 11, p. 837–848, 2008.

GONTIJO, C. M. F. et al. Concurrent cutaneous, visceral and ocular leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a kidney transplant patient. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 5, p. 751–3, 2002.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 2004.

GORCZYCA, W. et al. *Immunophenotypic Pattern of Myeloid Populations by Flow Cytometry Analysis*. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. v. 103

GRIMALDI, G.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, n. 6, p. 687–725, 1989.

GUARENTE, L. Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 868–874, 2006.

GUIMARÃES CARVALHO, S. F. et al. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 3, p. 321–324, 2003.

HAIGIS, M. C.; SINCLAIR, D. A. Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 5, n. 1, p. 253–295, 2010.

HAN, M. K. et al. SIRT1 Regulates Apoptosis and Nanog Expression in Mouse Embryonic Stem Cells by Controlling p53 Subcellular Localization. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 3, p. 241–251, 2008.

HARDER, S. et al. Expression of a mitochondrial peroxiredoxin prevents programmed cell death in *Leishmania donovani*. **Eukaryotic cell**, v. 5, n. 5, p. 861–70, 2006.

HOLADAY, B. J. et al. Correlates of *Leishmania*-specific immunity in the clinical spectrum of infection with *Leishmania chagasi*. **J Infect Dis**, v. 167, n. 2, p. 411–417, 1993.

HOWITZ, K. T. et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**, v. 425, n. 6954, p. 191–196, 2003.

JENNINGS, Y. L. et al. Phenotypic characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in the lower Amazon region, western Pará state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* × *Leishmania* (*Viannia*) *shawi shawi*. **Parasite (Paris, France)**, v. 21, p. 39, 2014.

JERONIMO, S. M. B. et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 4, p. 386–388, 1994.

JERONIMO, S. M. B. et al. Genetic predisposition to self-curing infection with the

protozoan *Leishmania chagasi*: a genomewide scan. **The Journal of infectious diseases**, v. 196, n. 8, p. 1261–1269, 2007.

JIANG, H. et al. SIRT6 regulates TNF- $\alpha$  secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. **Nature**, v. 496, n. 7443, p. 110–113, 2013.

JOHN, B.; HUNTER, C. A. Neutrophil Soldiers or Trojan Horses? **Science**, v. 321, n. 5891, p. 917–918, 2008.

JOS, C. L. et al. Estudo Prospectivo de Doadores e Receptores e Proposta de Diagnóstico Precoce da Infecção em Área Endêmica. **Journal of Brazilian Nefrology**, v. 26, n. 1, p. 51–56, 2004.

KARIN, M. et al. NF- $\kappa$ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 301–310, 2002.

KAUSHANSKY, K. Hematopoietic growth factors, signaling and the chronic myeloproliferative disorders. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 17, n. 6, p. 423–30, 2006.

KIMA, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1087–96, 2007.

KOJIMA, K. et al. A role for SIRT1 in cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 and DU145 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 373, n. 3, p. 423–428, 2008.

KOLLI, B. K. et al. *Leishmania*-released nucleoside diphosphate kinase prevents ATP-mediated cytolysis of macrophages. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 158, n. 2, p. 163–175, 2008.

KOMITOPOULOU, A. et al. Is leishmaniasis an “unusual suspect” of infection in allogeneic transplantation? **Transplant Infectious Disease**, v. 16, n. 6, p. 1012–1018, 2014.

KONDO, M. et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. **Annual review of immunology**, v. 21, p. 759–806, 2003.

KOTTON, C. N. Zoonoses in Solid-Organ and Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 6, p. 857–866, 2007.

KRENSKY, A M. Immunologic tolerance. **Pediatric nephrology (Berlin, Germany)**, v. 16, n. 8, p. 675–9, 2001.

KUHLS, K. et al. Population Structure and Evidence for Both Clonality and Recombination among Brazilian Strains of the Subgenus *Leishmania* (*Viannia*). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, 2013.

KUMAR, D. et al. Histone H4 lysine 14 acetylation in *Leishmania donovani* is mediated by the MYST-family protein HAT4. **Microbiology**, v. 158, n. 2, p. 328–337, 2012.

KUMAR, P. V. et al. Visceral leishmaniasis: bone marrow biopsy findings. **Journal of pediatric hematology/oncology**, v. 29, n. 2, p. 77–80, 2007.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 1–10, 2012.

KURKJIAN, K. M. et al. Multiplex Analysis of Circulating Cytokines in the Sera of Patients with Different Clinical Forms of Visceral Leishmaniasis. **Cytometry Part A**, v. 358, n. April, p. 353–358, 2006.

LAFUSE, W. P. et al. *Leishmania donovani* Infection Induces Anemia in Hamsters by Differentially Altering Erythropoiesis in Bone Marrow and Spleen. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

LAINSON, R. et al. Cutaneous Leishmaniasis of man due to *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* Lainson and Shaw, 1989. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 65, p. 282–284, 1990.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. **Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1987.

LARDON, F. et al. Generation of dendritic cells from bone marrow progenitors using GM-CSF, TNF- $\alpha$ , and additional cytokines: antagonistic effects of IL-4 and IFN- $\gamma$  and selective involvement of TNF- $\alpha$  receptor-1. **Immunology**, v. 91, n. 4, p.

553–9, 1997.

LECLERCQ, V. et al. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. **The Journal of Immunology**, v. 157, n. 10, p. 4537–4545, 1996.

LIU, G. et al. SIRT1 limits the function and fate of myeloid-derived suppressor cells in tumors by orchestrating HIF-1 $\alpha$ -dependent glycolysis. **Cancer Research**, v. 74, n. 3, p. 727–737, 2014.

LU, L. et al. Modulations of hMOF autoacetylation by SIRT1 regulate hMOF recruitment and activities on the chromatin. **Cell Research**, v. 21, n. 8, p. 1182–1195, 2011.

MACHADO DE ASSIS, T. S.; RABELLO, A.; WERNECK, G. L. Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, v. 17, n. 10, p. 1202–1207, 2012.

MANETTI, R. et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 177, n. 4, p. 1199–1204, 1993.

MAO, Z. et al. Sirtuin 6 (SIRT6) rescues the decline of homologous recombination repair during replicative senescence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 29, p. 11800–11805, 2012.

MEREDITH, S. E. O. et al. Leish-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 7, p. 1742–1745, 1995.

MICHEL, G. et al. Luciferase-expressing *Leishmania infantum* allows the monitoring of amastigote population size, in vivo, ex vivo and in vitro. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 9, p. 1–7, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. [s.l.: s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Visceral (LV)**. Disponível em:



- <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-visceral-lv>>. Acesso em: 23 fev. 2017.
- MISHRA, M. et al. Amphotericin versus sodium stibogluconate in first-line treatment of Indian kala-azar. *Lancet*, v. 344, n. 8937, p. 1599–1600, 1994.
- MOREIRA, D. et al. Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 1, 2012.
- MOREIRA, D. et al. *Leishmania infantum* Modulates Host Macrophage Mitochondrial Metabolism by Hijacking the SIRT1-AMPK Axis. *PLoS Pathogens*, v. 11, n. 3, p. 1–24, 2015.
- MORONI, G.; BOSSI, L. **Don't forget visceral leishmaniasis in transplant patients***Nephrology Dialysis Transplantation*, 1995.
- MORRIS, B. J. **Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging***Free Radical Biology and Medicine*, 2013.
- MOSSALAYI, M. D. et al. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. *Parasitology today (Personal ed.)*, v. 15, n. 8, p. 342–5, ago. 1999.
- MURRAY, H. W.; HARIPRASHAD, J. Interleukin 12 is effective treatment for an established systemic intracellular infection: experimental visceral leishmaniasis. *The Journal of experimental medicine*, v. 181, n. 1, p. 387–91, 1995.
- NAKAGAWA, T.; GUARENTE, L. Sirtuins at a glance. *Journal of Cell Science*, v. 124, n. 6, p. 833–838, 2011.
- NAKANISHI, C.; TOI, M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nature reviews. Cancer*, v. 5, n. 4, p. 297–309, 2005.
- NEVES, B. M. et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and impairment of nuclear factor-kappaB: molecular mechanisms behind the arrested maturation/activation state of *Leishmania infantum*-infected dendritic cells. *The American journal of pathology*, v. 177, n. 6, p. 2898–2911, 2010.
- NGUYEN HOANG, A. T. et al. Stromal cell-derived CXCL12 and CCL8 cooperate to

support increased development of regulatory dendritic cells following *Leishmania* infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 185, n. 4, p. 2360–71, 15 ago. 2010.

NICOLATO, R. D. C. et al. Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

NOGUEIRA, Y. L.; GALATI, E. A. B. Reproduction of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in conditioned cell culture growth medium. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 147–150, 2006.

NOURBAKHS, F.; ULIANA, S. R. B.; SMITH, D. F. Characterisation and expression of a stage-regulated gene of *Leishmania major*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 76, n. 1–2, p. 201–213, 1996.

NYAKUNDI, P. M. et al. Relationship between direct agglutination test and splenic aspirate smear parasite load in visceral leishmaniasis at Baringo District, Kenya. **East African Medical Journal**, v. 71, n. 9, p. 598–600, 1994.

NYLÉN, S. et al. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 4, p. 805–817, 2007.

NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 9, p. 378–384, 2007.

OBERDOERFFER, P. et al. SIRT1 Redistribution on Chromatin Promotes Genomic Stability but Alters Gene Expression during Aging. **Cell**, v. 135, n. 5, p. 907–918, 2008.

OLIVEIRA, A. L. L. DE et al. Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 446–450, 2006.

OU, X.; LEE, M. R. SIRT1 positively regulates autophagy and mitochondria function in embryonic stem cells under oxidative stress. **Stem Cells**, p. 1183–1194, 2014.

PALETTA-SILVA, R.; MEYER-FERNANDES, J. R. Adenosine and immune imbalance in visceral leishmaniasis: The possible role of ectonucleotidases. **Journal of**

**Tropical Medicine**, v. 2012, p. 9–13, 2012.

PASTORINO, A. C. et al. Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. **Jornal de pediatria**, v. 78, n. 2, p. 120–127, 2002.

PAUL-EUGÈNE, N. et al. Ligation of CD23 activates soluble guanylate human monocytes cyclase in human monocytes via an L-arginine-dependent mechanism. v. 57, p. 160–167, 1995.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V. et al. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. **Scandinavian journal of immunology**, v. 62, n. 5, p. 487–495, 2005.

PERUHYPE-MAGALHAES, V.; MACHADO-DE-ASSIS, T. S.; RABELLO, A. Use of the Kala-Azar Detect (R) and IT-LEISH (R) rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **MEMORIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ**, v. 107, n. 7, p. 951–952, 2012.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science (New York, N.Y.)**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 2008.

PIRMEZ, C. et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 4, p. 1390–1395, 1993.

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

PITTALIS, S. et al. *Leishmania infantum* leishmaniasis in corticosteroid-treated patients. **BMC infectious diseases**, v. 6, p. 177, 2006.

RAI, A. K. et al. Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic site of human visceral leishmaniasis. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31551, 2012.

RAMASAWMY, R. et al. The -2518bp promoter polymorphism at CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 5, p. 607–613, 2010.

RATH, S.; JARDIM, W. F.; DÓREA, J. G. A simple spectrophotometric procedure for the determination of antimony (III) and (V) in antileishmanial drugs. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 358, n. 4, p. 548–550, 1997.

REED, S. G. TGF-beta in infections and infectious diseases. **Microbes.Infect.**, v. 1, n. 15, p. 1313–1325, 1999.

REZZOUG, F. et al. TNF-alpha is critical to facilitate hemopoietic stem cell engraftment and function. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, p. 49–57, 2008.

RODRIGUES, V.; SANTANA DA SILVA, J.; CAMPOS-NETO, A. Transforming growth factor beta and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 66, n. 3, p. 1233–6, 1998.

RODRÍGUEZ, P. C.; OCHOA, A. C. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: Mechanisms and therapeutic perspectives **Immunological Reviews**, 2008.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 1, p. e584, 2010.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Development of infective stage Leishmania promastigotes within phlebotomine sand flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, n. 3, p. 456–459, 1985.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, v. 3, n. 11, p. 1041–1047, 2002.

SAHA, S. et al. IL-10- and TGF-beta-mediated susceptibility in kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis: the significance of amphotericin B in the control of Leishmania donovani infection in India. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 179, n. 8, p. 5592–5603, 2007.

SANTARÉM, N. et al. Immune response regulation by Leishmania secreted and nonsecreted antigens. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2007, 2007.

SARAIVA, E. M. et al. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated

with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. **Parasitology**, v. 111 ( Pt 3, p. 275–287, 1995.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal of infection in developing countries**, v. 9, n. 6, p. 588–96, 2015.

SCHMID, M. et al. Myeloid-derived suppressor cell functionality and interaction with *Leishmania major* parasites differ in C57BL/6 and BALB/c mice. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 11, p. 3295–3306, 2014.

SHAPIRA, M.; ZINOVIEV, A. *Leishmania* parasites act as a Trojan horse that paralyzes the translation system of host macrophages. **Cell Host and Microbe**, v. 9, n. 4, p. 257–259, 2011.

SILVA, R.; SACKS, D. L. Metacyclogenesis Is a Major Determinant of *Leishmania* Promastigote Virulence and Attenuation. **Infection and immunity**, v. 55, n. 11, p. 2802–2806, 1987.

SINGH, R. K.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, N. **Toll-like receptor signaling: A perspective to develop vaccine against leishmaniasis** **Microbiological Research**, 2012.

SOMANNA, A.; MUNDODI, V.; GEDAMU, L. Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from *Leishmania donovani* complex: Evidence for the activation of latent transforming growth factor  $\beta$ . **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 28, p. 25305–25312, 2002.

SRIVASTAVA, A. et al. Identification of TLR inducing Th1-responsive *Leishmania donovani* amastigote-specific antigens. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 359, n. 1–2, p. 359–368, 2012.

SUNDAR, S. et al. Circulating T helper 1 (Th1) cell- and Th2 cell-associated cytokines in Indian patients with visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 56, n. 5, p. 522–5, 1997.

SUNDAR, S. et al. Rapid, noninvasive diagnosis of visceral leishmaniasis in India: Comparison of two immunochromatographic strip tests for detection of anti-K39 antibody. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 251–253, 2006.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony toxicity. **International journal of environmental research and public health**, v. 7, n. 12, p. 4267–77, 2010.

SUNDARESAN, N. R. et al. The sirtuin SIRT6 blocks IGF-Akt signaling and development of cardiac hypertrophy by targeting c-Jun. **Nature Medicine**, v. 18, n. 11, p. 1643–1650, 2012.

SUTHERLAND, D. R. et al. Use of a FLAER-based WBC assay in the primary screening of PNH clones. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 132, n. 4, p. 564–572, 2009.

TANG, S. et al. SIRT1-Mediated Deacetylation of CRABP II Regulates Cellular Retinoic Acid Signaling and Modulates Embryonic Stem Cell Differentiation. **Molecular Cell**, v. 55, n. 6, p. 843–855, 2014.

TASSELLI, L.; ZHENG, W.; CHUA, K. F. SIRT6: Novel Mechanisms and Links to Aging and Disease. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 28, n. 3, p. 168–185, 2017.

TROPIA DE ABREU, R. et al. Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with leishmania (*Leishmania chagasi*). **PLoS One**, v. 6, p. e18873, 2011.

VAN GOOL, F. et al. Intracellular NAD levels regulate tumor necrosis factor protein synthesis in a sirtuin-dependent manner. **Nature Medicine**, v. 15, n. 2, p. 206–210, 2009.

VAN GRIENSVEN, J. et al. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 4, p. 286–299, 2014.

VON STEBUT, E. Cutaneous *Leishmania* infection: Progress in pathogenesis research and experimental therapy. **Experimental Dermatology**, v. 16, n. 4, p. 340–346, 2007.

VOULDOUKIS, I. et al. CD23 and IgE expression during the human immune response to cutaneous leishmaniasis: possible role in monocyte activation. **Research in Immunology**, v. 145, p. 17–27, 1994.

VOULDOUKIS, I. et al. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the FcγR2 / CD23 surface antigen.

**Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. August, p. 7804–7808, 1995.

WANG, H. et al. SIRT6 Controls Hematopoietic Stem Cell Homeostasis through Epigenetic Regulation of Wnt Signaling. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 4, p. 495–507, 2016.

WEISSMAN, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 157–168, 2000.

WERNECK, G. L. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 4, p. 644–645, 2010.

WHO. **Visceral leishmaniasis - Epidemiology**. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/visceral\\_leishmaniasis/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/visceral_leishmaniasis/en/)>. Acesso em: 20 fev. 2017.

WICKRAMASINGHE, S. N.; ABDALLA, S. H.; KASILI, E. G. Ultrastructure of bone marrow in patients with visceral leishmaniasis. **Journal of clinical pathology**, v. 40, n. 3, p. 267–275, 1987.

WINNICKA, B. et al. CD13 is dispensable for normal hematopoiesis and myeloid cell functions in the mouse. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, n. 2, p. 347–359, 2010.

YAMAMOTO, T.; SADOSHIMA, J. Protection of the heart against ischemia/reperfusion by silent information regulator 1. **Trends Cardiovasc Med**, v. 21, n. 1, p. 27–32, 2011.

YOUN, J.-I. et al. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, n. 8, p. 5791–802, 2008.

YU, A.; DANG, W. Regulation of stem cell aging by SIRT1 - Linking metabolic signaling to epigenetic modifications. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2016a.

YU, A.; DANG, W. Regulation of stem cell aging by SIRT1 - Linking metabolic signaling to epigenetic modifications. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2016b.

ZWINGENBERGER, K. et al. Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis: evidence for predominance of endogenous interleukin 4 over interferon-gamma production. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 57, n. 2, p. 242–249, 1990.

## 9 ANEXOS

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

"Avaliação da taxa de infecção in vitro de células-tronco humanas derivadas da medula óssea por *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi* e o impacto da infecção na hematopoese e no perfil fenotípico-funcional das progênes"

Você está sendo convidado a participar como voluntário na pesquisa que tem como título: "Avaliação da taxa de infecção in vitro de células-tronco humanas derivadas da medula óssea por *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi* e o impacto da infecção na hematopoese e no perfil fenotípico-funcional das progênes". Este estudo pretende utilizar uma amostra de seu sangue que já foi coletada há alguns anos atrás e está guardada na Hematológica Clínica de Hematologia. Essa amostra do seu sangue, não poderá mais ser usada em procedimentos médicos, pois está com o prazo de validade vencido, e por isso será descartada pela clínica. Caso você autorize, esta amostra de sangue vencida será utilizada em nossa pesquisa que será realizada pelos pesquisadores do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ Minas. Para que você possa decidir se estamos autorizados a usar esta amostra para as investigações deste estudo, você precisa conhecer os objetivos deste projeto de pesquisa, os benefícios, possíveis riscos, conseqüências entre outras questões envolvidas na sua autorização. Após receber todas as informações abaixo você poderá fornecer seu consentimento por escrito através da sua assinatura.

O Centro de Pesquisas René Rachou realizará um estudo abordando a capacidade de células-tronco presentes no sangue humano de se infectar com os parasitos *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*, que são causadores das Leishmanioses e da Doença de Chagas. Iremos estudar o impacto que essa infecção pode causar nas células do sangue. Se você concordar com a utilização dessas amostras de sangue vencidas, que já foram coletadas no passado e estão armazenadas na Hematológica Clínica de Hematologia, os pesquisadores responsáveis pelo estudo consultarão seus dados clínicos e utilizarão uma parte deste sangue guardado para alguns testes que iremos realizar em nosso laboratório.



Não estão previstos riscos para você neste projeto de pesquisa pois, o sangue doado por você, já foi coletado. Você não será convidado em nenhum momento a fazer uma nova coleta de sangue ou de outro material biológico.

Este estudo não oferece benefícios diretos a você. O benefício principal da sua participação é possibilitar que no futuro, com os resultados alcançados com esse estudo, o diagnóstico e tratamento das Leishmanioses e Doença de Chagas sejam melhorados.

Se você concordar com o uso de uma parte de seu sangue já coletado que está guardado na Hematológica Clínica de Hematologia, é necessário esclarecer que você não terá nenhum custo ou forma de pagamento por autorizar esta utilização do sangue neste estudo. A participação no estudo é voluntária, e você não sofrerá nenhum dano, caso não autorize a utilização do seu sangue nesse estudo.

A equipe de pesquisa poderá conversar com você sobre os detalhes do estudo antes de você decidir se quer ou não participar. Você é livre para perguntar, a qualquer momento suas dúvidas. Seu nome e qualquer outra informação que o identifique serão mantidos em sigilo e apenas a equipe de pesquisa terá acesso a esses dados, que serão tratados como confidenciais, preservando sua privacidade. Qualquer publicação científica deste estudo não utilizará seu nome ou o identificará pessoalmente. Neste estudo, a sua participação será como voluntário, sem nenhum pagamento em dinheiro, consentindo a doação de uma amostra de sangue e autorizando a consulta de dados clínicos que já foram fornecidos por você em suas consultas na Clínica Hematológica. Você ou seu familiar, em caso de morte do doador, tem a liberdade de recusar ou retirar o consentimento a qualquer momento sem penalização, caso decida não colaborar neste estudo.

Este pesquisador responsável também se compromete em dar informações atualizadas durante o estudo, caso este seja o seu desejo. Você pode optar em tomar conhecimento ou não dos resultados da pesquisa realizada.

Nome do pesquisador responsável pelo projeto: Andréa Teixeira de Carvalho

Assinatura: \_\_\_\_\_

Endereço e telefone institucional do Pesquisador Principal:

Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto - Belo Horizonte (Cep: 30190-002)

Pesquisador Principal: Andréa Teixeira de Carvalho – Telefone: (31) 3349 7764

E-mail: andreat@cpqrr.fiocruz.br

Concordo em doar uma amostra de sangue já coletada e destinada à descarte para ser usada na Avaliação da taxa de infecção in vitro de células-tronco humanas derivadas da medula óssea por *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi* e o impacto da infecção na hematopoese e no perfil fenotípico-funcional das progênes e atesto que recebi uma cópia deste termo.

Nome do voluntário ou familiar:

\_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_ .

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do profissional que aplicou o TCLE:

\_\_\_\_\_

Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Telefone para contato:

\_\_\_\_\_

Endereço e telefone institucional do Comitê de Ética - CPqRR/FIOCRUZ/Minas:

Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto - Belo Horizonte (Cep: 30190-002)

Secretária: Bernadete Patrícia Santos – TeleFax: (31) 3349 7825

e-mail: cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br