



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ICS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DANIELLE CHRISTINE CHAVES TEIXEIRA

**DANIELLE CHRISTINE CHAVES TEIXEIRA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**INTERAÇÃO NEUROENDÓCRINA, PERFIL DE  
CITOCINAS E ADIPOCINAS EM PACIENTES  
COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

**SALVADOR - BAHIA**

**2015**

INTERAÇÃO NEUROENDÓCRINA, PERFIL DE CITOCINAS E  
ADIPOCINAS EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

DANIELLE CHRISTINE CHAVES TEIXEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**INTERAÇÃO NEUROENDÓCRINA, PERFIL DE  
CITOCINAS E ADIPOCINAS EM PACIENTES  
COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Prof. Dra. Gyselle C. Baccan.

Salvador, BA

2015

T266 Teixeira, Danielle Christine Chaves  
Interação neuroendócrina, perfil de citocinas e adipocinas em pacientes com  
leishmaniose visceral. / Danielle Christine Chaves Teixeira. – Salvador, 2015.  
68f.

Orientadora: Dra. Gyselle C. Baccan

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da  
Saúde. Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2014.

1. Endócrina – regulação 2. Citocinas 3. Adipocinas 4. Leishmaniose Visceral –  
pacientes I. Universidade Federal da Bahia II. Baccan, Gyselle C. III. Título.

CDU 616.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



TERMO DE APROVAÇÃO

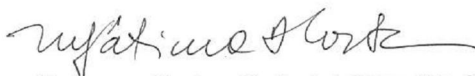
"Regulação endócrina, perfil de citocinas e adipocinas na leishmaniose visceral humana"

Mestranda Danielle Christine Chaves Teixeira  
Orientadora - Profa. Dra. Gyselle Chrystina Baccan

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia como requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

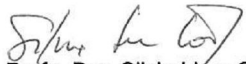
BANCA EXAMINADORA

  
Professora Doutora Gyselle Chrystina Baccan  
PPGIm/ICS-UFBA

  
Professora Doutora Maria de Fátima Dias Costa  
PPGIm/ICS-UFBA

  
Professor Doutor Petter Franco Entringer  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Salvador, 20 de julho de 2015

  
Profa. Dra. Silvia Lima Costa  
Coordenadora do PPGIm  
ICS-UFBA

Dedico este trabalho às mulheres da minha  
vida: Marise Teixeira e Gildeth Chaves.

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus a permissão de realizar mais esse sonho na minha vida, a ele, Meishu Sama e todos meus antepassados minha profunda gratidão.*

*Agradeço ao meu esposo, Alexandre Mimoso, por toda sua dedicação e esforço para que meu sonho se realizasse.. sem você nada aconteceria!*

*A meus familiares, em especial meus irmãos por toda união e força.*

*A minha orientadora Dr<sup>a</sup> Gyselle baccan, pelo exemplo de profissionalismo e humanidade..*

*A minha co-orientadora Dr<sup>a</sup> Rosângela de Lima, pelas orientações e força*

*A minhas colegas-amigas do LNEI por todo companheirismo e foga*

*A coordenadora do PPGIM Dr<sup>a</sup> Sílvia Costa, por todo carinho, força, incentivo e exemplo de profissionalismo.*

*As secretarias do PPGIM por toda dedicação e carinho.*

*A minha sobrinha Clara Mimoso, por toda dedicação para a finalização deste trabalho.*

*Mantenha o foco no objetivo, centralize a força para lutar, utilize a fé para vencer.*

## LISTA DE TABELAS E FÍGURAS

- FIGURA 1** - Imune regulation during chronic visceral leishmaniasis .Pag.20
- FIGURA 2** - Eixo HPA- interação neuroendócrina Pag.21
- TABELA 1** - Concentrações plasmáticas de citocinas em Pág. 33  
pacientes (LV) e controles (CTL)
- FIGURA 3** - Concentrações plasmáticas de cortisol, ACTH e Pág.34  
DHEA em pacientes com LV.
- FIGURA 4-** Correlações do cortisol e ACTH com parâmetros Pág.35  
clínicos e citocinas em pacientes com LV
- FIGURA 3A** - Concentrações plasmáticas de adipocinas e Pág.49  
citocinas em pacientes com LV
- FIGURA 4A** - Correlações entre adiponectina plasmática e Pág.50  
parâmetros clínicos em pacientes com LV



**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ACTH</b>	Hormônio adrenocorticotrófico
<b>ADP-R1</b>	Receptor de adiponectina 1
<b>ADP-R2</b>	Receptor de adiponectina 2
<b>AMPK</b>	Adenosina monofosfato quinase
<b>CBA</b>	Cytometric Bead Array
<b>DALYs</b>	Disability-adjusted life years
<b>DHEA/S – DHEA</b>	Hormônio Dehidroepiandrosterona
<b>ELISA</b>	Enzyme linked immunosorbent assays
<b>FR</b>	Frequência respiratória
<b>GH</b>	Hormônio do crescimento
<b>GnRH</b>	Hormônio liberador de gonadotrofina
<b>HCV</b>	Hepatite C viral
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>HPA</b>	Hipotálamo-hipófise-adrenal

<b>HPG</b>	Hipófise-gonadal-hipotalâmico
<b>HPT</b>	Hipófise-hipotálamo-tireoide
<b>HPV</b>	Papilomavírus humano
<b>IMC</b>	Índice de massa corporal
<b>LC</b>	Leishmaniose cutânea
<b>LCL</b>	Leishmaniose cutânea localizada
<b>LM</b>	Leishmaniose mucocutânea
<b>LV</b>	Leishmaniose visceral
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>SER</b>	Sistema Retículo-Endotelial
<b>SFM</b>	Sistema fagocítico mononuclear
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso central
<b><i>T. cruzi</i></b>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>VHS</b>	Velocidade de hemossedimentação
<b>VIP</b>	Peptídeo intestinal vasoativo

## SUMÁRIO

1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
2. <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 AGENTE ETIOLÓGICO E TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE.....	157
2.2 EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES.....	18
2.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	20
2.4 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	20
2.5 REGULAÇÃO NEUROENDÓCRINA NA LV.....	22
2.5.1 Regulação neuroendócrina da resposta imune.....	22
2.5.2 Alterações hormonais na leishmaniose.....	24
2.6 RESPOSTA IMUNE DO TECIDO ADIPOSEO.....	24
2.6.1 Adipocinas.....	24
2.6.2 Leptina.....	25
2.6.3 Adiponectina.....	26
3. <b>OBJETIVO</b> .....	28
4. <b>CAPÍTULO 1: Artigo científico 1 : Ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal em pacientes com leishmaniose visceral</b> .....	30
4.1 RESUMO.....	30
4.2 ABSTRACT.....	31
4.3 INTRODUÇÃO.....	32
4.4 MATERIAI E MÉTODOS.....	33

4.4.1 População em estudo.....	33
4.4.2 Aspectos éticos.....	34
4.4.3 Dosagem de hormônios e citocinas.....	34
4.4.4 Análise estatística.....	34
4.5 RESULTADOS.....	34
4.6 DISCUSSÃO.....	38
4.7 REFERÊNCIAS.....	41
5. <b>CAPÍTULO 2:</b> Artigo científico : Adipocinas e leishmaniose visceral: associações entre adiponectina e marcadores hematológicos.....	45
5.1 RESUMO.....	45
5.2 INTRODUÇÃO.....	46
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
5.3.1 População em estudo.....	48
5.3.2 Aspectos éticos.....	48
5.3.3 Dosagem de citocinas e adipocinas.....	48
5.3.4 Análise estatística.....	49
5.4 RESULTADOS.....	50
5.5 DISCUSSÃO.....	53
5.6 REFERÊNCIAS.....	56
6.0 <b>REFERÊNCIAS</b> .....	58
7.0 <b>ANEXOS</b> .....	68

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças não contagiosas causadas por diferentes espécies de parasitos do gênero *Leishmania*. Elas apresentam ampla distribuição geográfica, atingindo 98 países com um número anual de 1,6 milhões de casos, e possuem variadas manifestações clínicas, sendo que, nos humanos, podem apresentar-se nas formas de: leishmaniose cutânea, mucocutânea e leishmaniose visceral ou calazar (CONCEIÇÃO, 2014).

Nas últimas duas décadas, a leishmaniose visceral (LV), reapareceu no mundo de forma preocupante (COLLIN et al., 2004). Sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), uma das maiores epidemias parasitárias do mundo, atingindo cerca de 500.00 pessoas/ano em 65 países. Quase 90% desses casos ocorrem em regiões pobres da Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil.

A doença é causada por protozoários pertencentes ao complexo *Leishmania Donovanii*. A *Leishmania Chagasi* é reconhecida como a espécie responsável pela doença em nosso país. Sua apresentação clínica habitual costuma ser febre prolongada (mais de 2 semanas), perda de peso, hepatoesplenomegalia e pancitopenia. Uma das preocupações atuais com a LV é sua alta letalidade: segundo dados da vigilância epidemiológica, quase 100% dos pacientes não tratados e, mesmo com a instituição do tratamento, cerca de 1 a 5% dos afetados morrem. As manifestações clínicas refletem o desequilíbrio entre a multiplicação dos parasitas no sistema fagocítico mononuclear (SFM), resposta imunitária e processo inflamatório subjacente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Segundo Brysson (2005), pacientes com LV desenvolvem uma resposta imunológica do tipo Th2 com elevada produção de citocinas como a IL-4 e IL-10, o que favorece a multiplicação parasitária e disseminação da doença. Acredita-se que, devido a isso, há elevada taxa de mortalidade em caso de não tratamento, diferente do que ocorre na leishmaniose cutânea.

Pacientes com leishmaniose também exibem alterações no perfil hormonal. Galindo-Sevilla (2007) mostrou que pacientes com leishmaniose difusa causada por *L. mexicana* apresentaram redução nos níveis plasmáticos de cortisol e DHEA quando comparados com pacientes com leishmaniose localizada ou indivíduos não infectados. Em estudo conduzido por Baccan et al., 2011, pacientes com leishmaniose cutânea localizada apresentaram redução nas concentrações plasmáticas de DHEA/S, prolactina e testosterona. Não foram observadas alterações nos níveis de cortisol e estradiol, mas a concentração desses hormônios estava associada com marcadores clínicos e imunológicos. Cortisol e estradiol correlacionaram-se positivamente com o tamanho da lesão e com a dose de Glucantime utilizada no tratamento e o cortisol com níveis de IFN- $\gamma$ . Esses resultados indicam que,

durante a leishmaniose cutânea localizada, as alterações hormonais parecem ser benéficas ao hospedeiro.

Verde e col (2011) detectaram alterações hormonais em pacientes com leishmaniose visceral, mas não as correlacionaram com parâmetros imunológicos. Em relação ao cortisol, eles encontraram que os pacientes apresentavam níveis mais elevados que os controles.

O tecido adiposo, além de funções como a termogênese e armazenamento energético, possui uma importante função endócrina. Como órgão secretor, ele apresenta particularidades, encontra-se disperso pelo organismo, em depósitos sem ligação física, com atividade secretória controlada por mecanismos humorais e hormonais. Tal tecido secreta uma variedade de proteínas sintetizadas e liberadas pelos adipócitos, denominadas adipocinas cujas diferentes funções são: regulação de apetite e balanço energético, imunidade, sensibilidade à insulina, angiogênese e inflamação. Dentre as adipocinas mais conhecidas, estão: leptina, adiponectina e resistina (SILVEIRA et al., 2009).

A primeira adipocina descoberta foi a leptina (1995). Também conhecida como “hormônio da saciedade”, essa proteína tem como função mais esclarecida controlar o apetite e seus níveis correlacionam-se com a massa de tecido adiposo corporal. Nos últimos anos, estudos vêm demonstrando funções imunomoduladoras para leptina: regulação da proliferação e diferenciação de linfócitos T (alteração para padrão Th1), regulação da ativação, capacidade fagocítica e produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 em monócitos e macrófagos (FAGGIONI et al., 2001; FANTUZZI et al., 2005).

A adiponectina é uma proteína plasmática relativamente abundante, que é secretada especificamente pelo tecido adiposo, sendo sua expressão maior no tecido adiposo subcutâneo do que no visceral. Seu principal papel metabólico consiste em aumentar a sensibilidade dos tecidos à insulina. Ao contrário de outras adipocinas, seus efeitos imunológicos são principalmente anti-inflamatórios, inibindo a produção de TNF- $\alpha$  e de IL-6 e estimulando a liberação de IL-10 e IL-1 (MASAKI et al., 2004; WOLF et al., 2004).

Diante da importância epidemiológica e do impacto socioeconômico da LV, demos continuidade à investigação da regulação neuroendócrina nas leishmanioses, abordando agora a LV (em estudo prévio foram avaliados pacientes com leishmaniose cutânea localizada). Além de correlacionar o perfil hormonal dos pacientes com marcadores clínicos e imunológicos, também pretendemos investigar alterações nos níveis plasmáticos de

adipocinas e a relevância dessas alterações na manifestação clínica da doença.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 AGENTE ETIOLÓGICO E TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE

As leishmanioses são causadas por diversas espécies do protozoário do gênero *Leishmania* (ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*), parasita intracelular obrigatório das células do SFM, com uma forma flagelada ou promastigota; as quais desencadeiam um amplo espectro clínico que varia desde lesões ulceradas na pele até a forma visceral (SILVA et al., 2007).

Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem. No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). No Brasil, as raposas foram encontradas infectadas nas regiões Nordeste, Sudeste e Amazônica. Os marsupiais didelfídeos foram encontrados infectados no Brasil e na Colômbia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A principal forma de transmissão do parasita para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de dípteros da família *Psychodidae*, sub-família *Phebotominae*, conhecidos genericamente por flebotomíneos. A *Lutzomyia longipalpis* é a principal espécie transmissora da *L. chagasi* no Brasil. (GONTIJO et al., 2004).

No Brasil, a forma de transmissão é através da picada dos vetores – *L. longipalpis* ou *L. cruzi* – infectados pela *Leishmania (L.) chagasi*. A transmissão ocorre enquanto houver o parasitismo na pele ou no sangue periférico do hospedeiro. Alguns autores admitem a hipótese da transmissão entre a população canina através da ingestão de carrapatos infectados e, mesmo, através de mordeduras, cópula e ingestão de vísceras contaminadas, porém não existem evidências sobre a importância epidemiológica desses mecanismos de transmissão para humanos ou na manutenção da enzootia. Não ocorre transmissão direta da LV de pessoa a pessoa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A infecção do vetor se dá quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas

amastigotas da *Leishmania*. No trato digestivo anterior, acontece o rompimento dos macrófagos liberando essas formas. Reproduzem-se por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes – promastigotas metacíclicas. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas. Após esse período, as fêmeas infectantes, ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva do inseto. Na epiderme do hospedeiro, essas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o seu rompimento, ocorrendo a liberação dessas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; MONTEIRO, et al., 2005).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

As zoonoses são consideradas um grande problema de saúde pública, pois representam 75% das doenças infecciosas negligenciadas em todo mundo. Estudos demonstram que 60% (849/1.415) dos patógenos humanos são zoonóticos e que 80% dos patógenos animais têm múltiplos hospedeiros. A disseminação dessas doenças está diretamente relacionada com a capacidade de o agente etiológico manter-se em condições viáveis na fonte de infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

As leishmanioses são consideradas primariamente como uma zoonose, podendo acometer o homem quando ele entra em contato com o parasita, transformando-se em uma antropozoonose. Atualmente, essa parasitose encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A globalização econômica e o aumento da migração de indivíduos não imunes para áreas endêmicas favoreceram a expansão da distribuição geográfica da leishmaniose. A LV é endêmica em 98 países e atinge principalmente África, Ásia, Américas do Sul e Central. São cerca de 1,6 milhões de casos novos em todo mundo anualmente, sendo 1,2 milhões de leishmaniose cutânea e 400 mil de leishmaniose visceral (ALVAR et al, 2012; WHO, 2013).

No Brasil, a transmissão da doença ocorre em vários municípios, de todas as regiões do país, exceto na Região Sul. A doença tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominante em ambientes rurais e regiões periurbanas e, mais recentemente, em centros



urbanos como Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), entre outros. Atualmente, no Brasil, a LV está registrada em 19 das 27 unidades da federação, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone, sendo cerca de 90% dos casos registrados na região Nordeste (Ministério da saúde, 2010).

No Brasil, o agente etiológico da LV é *L. chagasi* e recentemente determinada sendo derivada de estirpes europeias de *L. infantum* (GONTIJO et al. (2004); SEGATTO et al., 2012).

O primeiro relato de LV no Brasil foi feito em 1934, quando foram encontradas amastigotas de *Leishmania* em cortes histológicos de fígado de pessoas que morreram com suspeita de febre amarela. Somente 20 anos depois é que seria registrado o primeiro surto da doença em Sobral, no Ceará (PENA et al, 1934 apud GONTIJO et al, 2004). A seguir, o *Lutzomyia longipalpis* foi incriminado como espécie vetora e foram descobertos os primeiros casos da infecção em cães (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

No Brasil, LV é endêmica e preocupa as organizações de saúde principalmente diante da sua alta letalidade – cerca de 100% nos casos não tratados e 10% nos tratados (SOUSA-GOMES et al., 2011). São observadas epidemias urbanas em várias cidades, apresentando-se em expansão geográfica, sendo que, a região endêmica do Maranhão, abrange cerca de 90% dos casos notificados (CALDAS A. et al., 2014).

No Maranhão, a LV teve seus primeiros casos diagnosticados em 1982 no município de São Luís. Estudo conduzido por Caldas AJ et al. (2002), em área endêmica de São Luís do Maranhão, encontrou uma frequência de 13,1% de infecção por *L. chagasi*. Já estudo realizado na mesma área, no ano de 2008, por Da Silveira registrou uma taxa de 18,9%, demonstrando um aumento da incidência da patologia nessa região.

A evolução da LV em São Luís está relacionada, entre outros fatores, às condições geográficas tais como relevo/topografia, mas principalmente a fatores climáticos como altas temperaturas e níveis pluviométricos e clima úmido, o que favorece os criadouros do mosquito, mas principalmente a migração de pessoas vindas de outros estados e também outros municípios de São Luís (SILVA, 2008).

Alguns estudos têm mostrado que no estado do Maranhão há uma maior taxa de infecção que em outras áreas da região Norte e Nordeste, como no estado do Ceará (4,5%), porém semelhante aos estados do Piauí (13,9%) e Bahia (16,1%) (FELIPE et al., 2011; MELO NORMA, 2004).

## 2.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL

A infecção pela *L. chagasi* caracteriza-se por um amplo espectro clínico, que pode variar desde as manifestações clínicas discretas (oligossintomáticas) e moderadas até às graves, que, se não tratadas, podem levar o paciente à morte. As manifestações clínicas refletem o desequilíbrio entre a multiplicação dos parasitas no SFM, resposta imunitária e processo inflamatório subjacente (PASTORINO et al., 2002).

Os sinais e sintomas irão depender da relação que se estabelece entre parasito e o hospedeiro. Em um dos polos, indivíduos hiperérgicos, capazes de destruir as leishmanias; em outro, pessoas anérgicas, nas quais o parasito se desenvolve, resultando nas manifestações sistêmicas clássicas da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A maioria dos casos é de infecção assintomática ou que desenvolvem sintomas moderados ou transitórios como diarreia, tosse seca, adinamia, febrícula, sudorese e discreta hepatoesplenomegalia, que podem evoluir ou não. O quadro clássico consiste de febre persistente, hepatoesplenomegalia, com esplenomegalia volumosa, perda de peso, tosse, diarreia, dor e distensão abdominal. Icterícia e envolvimento renal têm sido descritos e na fase mais tardia da doença os pacientes podem desenvolver edema e ascite (BARBOSA, et al., 2013).

Leishmaniose visceral ativa pode apresentar recidiva (recorrência de 6 a 12 meses após tratamento aparentemente de sucesso) ou reativação tardia (recrudescência) de infecção subclínica ou previamente tratada. A reativação pode ser espontânea, mas é frequentemente provocada por uma baixa da imunidade celular pelo uso de corticosteroide ou terapia citotóxica, em tratamento antirrejeição em receptores de transplantes ou em quadros de AIDS avançada (SILVA, E. et al., 2013).

## 2.4 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE VISCERAL

Enquanto encontramos na literatura uma ampla informação sobre a resposta imune na leishmaniose cutânea, na forma visceral, que difere em diversos aspectos da forma cutânea, ainda é mal compreendida e pouco estudada (GOTO & LINDOSO, 2004).

Estudos vêm demonstrando que pacientes com LV desenvolvem uma resposta imunológica do tipo Th2 com elevada produção de citocinas como a IL-4 e IL-10, o que favorece a multiplicação parasitária e disseminação da doença o que pode constatar com a elevada taxa de mortalidade em caso de não tratamento, diferente do que ocorre na leishmaniose cutânea (LC) (ALEXANDER & BRYSSON, 2005).

Estudos demonstraram que a principal alteração imunológica na LV é a incapacidade dos linfócitos de ativarem os macrófagos para destruir as leishmanias, o que permite a disseminação parasitária e estabelecimento da doença propriamente dita. Sendo o controle da infecção por *Leishmania* dependente da resposta imune celular. Uma citocina importante na resposta imune à *Leishmania* é o IFN- $\gamma$ , produzida principalmente por células T CD4+ do tipo Th1 e por células NK, estimuladas por IL-12. Em camundongos resistentes, células TCD4+ do tipo Th1 produzem IFN- $\gamma$ , o que ativa a óxido nítrico sintetase (iNOS ou NOS2), levando ao estímulo da ação microbicida mediada pelo óxido nítrico (NO). A liberação de NO leva à morte do parasita em macrófagos humanos, que podem também ser estimulados pela ação de quimiocinas como MCP-1 e MCP-1  $\alpha$  (BACELAR & CARVALHO, 2008).

A interleucina-12 (IL-12) tem sido apontada como um dos componentes mais importantes da fase inicial da infecção por *Leishmania*. A IL-12 é produzida primariamente por células apresentadoras de antígenos e sua principal atividade biológica é sobre células T e NK, nas quais estimula a produção de citocinas, principalmente IFN- $\gamma$ . Essa citocina também desempenha um importante papel na diferenciação e expansão de células TCD4+ do tipo Th1 que confere resistência à infecção. Nos indivíduos com LV a IL -12 encontra-se reduzida ou ausente o que, presumivelmente diminui a produção de IFN- $\gamma$  permitindo a expansão de amastigotas (COSTA A. et al., 2012; BACELAR & CARVALHO, 2008).

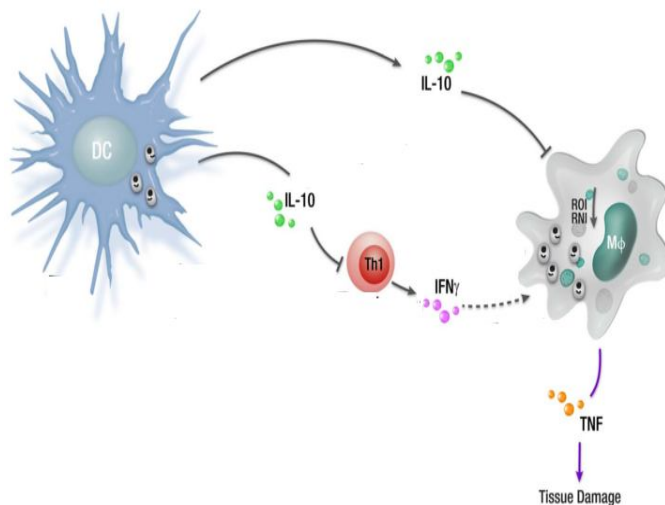
A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina produzida por macrófagos que contribui para a sobrevivência da *Leishmania* nessas células, ela inibe a síntese de citocinas produzidas pelos macrófagos como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , inibindo a função dessas células como apresentadoras de antígeno através da diminuição da expressão de moléculas do MHC classe II. Outro efeito importante da IL-10 nos macrófagos é a inibição dos eventos metabólicos associados com sua ativação, principalmente os associados à sua capacidade de suprimir a produção de IFN- $\gamma$  por células TCD4+ do tipo Th1 (BACELAR O. et al, 2000 ; BACELAR & CARVALHO, 2008).

Em estudo conduzido no Maranhão por Costa A. et al (2012) foram avaliados 80 indivíduos de uma área endêmica para LV em diferentes fases da patologia. Em seus resultados, observou-se um aumento da concentração plasmática de IFN- $\gamma$  e IL-10 além da presença simultânea de IFN- $\gamma$  e IL-10 no grupo com doença ativa, indicando assim, uma falta de contrarregulação por essas citocinas, corroborando com o papel da IL-10 como principal citocina envolvida no estabelecimento e progressão da infecção. (COSTA A. et al., 2012).

Pacientes com LV apresentam níveis séricos altos de TNF- $\alpha$  e de IL-6, que diminuem após a terapêutica com antimonial. Essas citocinas estão

relacionadas com febre e astenia e o TNF- $\alpha$ , também conhecido como caquexina, pode contribuir para a perda de peso acentuada nesses pacientes (KARPLUS et al., 2002). Febre e perda de peso são características marcantes da LV. Estudos apresentaram presença de TNF- $\alpha$  em 100% dos pacientes com LV, tendo essa citocina um importante papel na progressão das doenças infecciosas principalmente pelo seu papel de indução da produção excessiva de óxido nítrico e ativação policlonal das células B (MACHADO et al, 2004; COSTA A. et al., 2012; MCCAL et al., 2013).

Embora vários fatores contribuam para uma ausência da resposta imune celular na LV, existem evidências de ativação de células Th2 e regulatórias do sistema imune que indicam a importância o papel das citocinas com atividade imunomoduladora na patogenia da LV. (FIGURA 1)



Adaptado de FALEIRO, Rebecca J. et al. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. 2014.

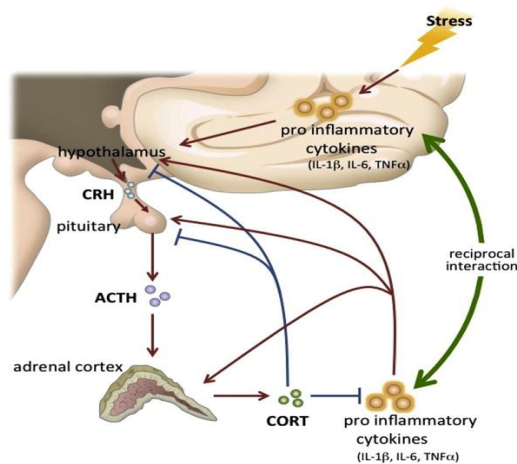
## 2.5 REGULAÇÃO NEUROENDÓCRINA NA LV

### 2.5.1 Regulação neuroendócrina da resposta imune

Durante muitos anos, o sistema nervoso e imunológico foram considerados compartimentos com funções distintas e sem comunicação. Recentemente achados clínicos e experimentais demonstraram que a patogênese de várias doenças, como a esclerose múltipla, sugere o envolvimento de vários fatores como: hormônios e mediadores neurais que interligam o sistema nervoso e o imune (PROCACCINE et al., 2014). Essas evidências apoiam a hipótese da existência de uma comunicação bidirecional entre os sistemas neuroendócrino e imunológico, compondo um mecanismo de manutenção da homeostasia e saúde (STERNBERG et al., 1997; TAUB, 2008; BUTTS et al, 2008).

Linfócitos, monócitos e várias outras células do sistema imune expressam na sua superfície receptores para diferentes neurotransmissores e neuropeptídeos tais como: corticosteroides, insulina, prolactina, hormônio de crescimento (GH), somatostatinas, estrogênios, a testosterona, a leptina, a grelina, opioides, corticosteroides, neuropeptídeo Y e peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (TAUB, 2008). Do mesmo modo, os receptores de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento também foram identificados em células neuronais e no interior de órgãos endócrinos, tanto sob condições fisiológicas normais como em resposta ao *stress* e doença (TAUB, 2008; PROCACCINE et al., 2014).

As redes de regulação neuroendocrinoimunológicas formam um circuito de retroalimentação negativa para manutenção homeostática do organismo. Distúrbios nessa regulação podem levar a uma ativação ou inibição do sistema imune a depender da duração e natureza do estímulo (PROCACCINE et al., 2014). Eixos específicos participam dessa comunicação, a exemplo o eixo HPA (hipotálamo-hipófise-adrenal), HPG (hipófise-gonadal-hipotalâmico), HPT (hipófise-hipotálamo-tireoide). Além desses, o sistema autônomo participa com a liberação de noradrenalina e acetilcolina nos nervos simpático e parassimpático (Figura2). (TAUB et al., 2008).



A ativação do eixo HPA resulta na liberação de glicocorticoides e adrenalina pela glândula adrenal. Os glicocorticoides afetam a resposta imunológica agindo diretamente sobre as células, alterando suas propriedades. Eles podem reduzir a capacidade de proliferação dos linfócitos, reduzir a capacidade fagocítica dos macrófagos, inibir as funções citotóxicas das células NK e alterar a liberação de citocinas, promovendo uma mudança de resposta Th1 para Th2 (HADDAD et al., 2002).

## 2.5.2 Alterações hormonais na leishmaniose

Durante infecções crônicas, ocorrem algumas alterações neuroendócrinas que podem estar relacionadas com as respostas de defesa do hospedeiro. Pacientes com tuberculose apresentam uma profunda redução de testosterona e DHEA (DEL REY et al., 2007) e aumento de cortisol (OPOLOT et al., 2015). Na filariose crônica, também ocorre alteração dos níveis hormonais, com diminuição de testosterona, cortisol, estradiol e LH e aumento de prolactina que se correlaciona com o aumento de citocinas pró-inflamatórias (MAVOUNGOU et al., 2005).

Uma das possíveis causas dessas alterações hormonais seria a ação de algumas citocinas, principalmente IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , diretamente no SNC, resultando na ativação ou inibição de alguns eixos neuroendócrinos, como o eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal) e HPG (hipotálamo-pituitária-gônadas). Isto seria possível visto que a comunicação entre o sistema neuroendócrino e o sistema imunológico é bilateral (MARKETON et al., 2008). Pacientes com leishmaniose também exibem alterações no perfil hormonal. Galindo-Sevilla (2007) mostrou que pacientes com leishmaniose difusa causada por *L. mexicana* apresentam redução nos níveis plasmáticos de cortisol e DHEA quando comparados com pacientes com leishmaniose localizada ou indivíduos não infectados. Em um estudo conduzido, observou-se que pacientes com leishmaniose cutânea localizada apresentam redução nas concentrações plasmáticas de DHEA/S, prolactina e testosterona (BACCAN et al., 2011). Não foram observadas alterações nos níveis de cortisol e estradiol, mas a concentração desses hormônios estava associada com marcadores clínicos e imunológicos. Cortisol e estradiol correlacionaram-se positivamente com o tamanho da lesão e com a dose de Glucantime utilizada no tratamento e cortisol com níveis de IFN- $\gamma$ . Esses resultados indicam que, durante a leishmaniose cutânea localizada, as alterações hormonais parecem ser benéficas ao hospedeiro.

Em relação à LV, Verde e col (2011) detectaram alterações hormonais em pacientes, mas não as correlacionaram com parâmetros imunológicos. Eles encontraram que pacientes apresentavam níveis mais elevados de cortisol que os controles.

## 2.6 RESPOSTA IMUNE DO TECIDO ADIPOSEO

### 2.6.1 Leptina

Durante muitos anos, o tecido adiposo foi considerado o mais importante tecido de armazenamento de energia do organismo humano. Porém, nos últimos 10 anos, vêm sendo acrescidas propriedades distintas, como o papel de órgão multifuncional, produtor e secretor de inúmeros

peptídeos e proteínas bioativas denominadas adipocitocinas (GUIMARÃES et al., 2007).

Dessa forma, o tecido adiposo branco não é mais considerado um tecido inerte dedicado exclusivamente ao armazenamento de energia, mas está emergindo como um participante ativo na regulação dos processos fisiológicos e patológicos, incluindo a imunidade e inflamação (FANTUZZI, 2005). Como órgão secretor, o tecido adiposo apresenta várias particularidades: encontra-se disperso pelo organismo, em depósitos sem ligação física entre si, cuja atividade secretória é regulada por mecanismos humorais e hormonais, não totalmente esclarecidos. Nesses depósitos individuais, encontram-se vários tipos celulares (macrófagos, fibroblastos, pré-adipócitos e adipócitos) com atividade secretória variável. As adipocinas, ou produtos segregados pelo tecido adiposo, são também produzidos por outros tecidos, sendo difícil determinar a contribuição do tecido adiposo para os níveis de adipocinas circulantes (FANTUZZI, 2005; COSTA J., 2006).

Alguns estudos têm mostrado que os níveis de algumas adipocinas estão alterados durante infecções. Keicho et al (2012) observaram que os níveis circulantes de leptina foram menores nos pacientes com tuberculose ativa que nos grupos controles, já a adiponectina tinha valores maiores. Pacientes com tuberculose apresentam redução de leptina (VAN CREVEL et al., 2002; BUYUKOGLAN, et al., 2007).

### 2.6.2 Leptina

A leptina (do grego leptos = magro) é uma proteína de 167 aminoácidos, produto do gene *ob*, que foi inicialmente clonado e sequenciado em camundongos e que se expressa principalmente no tecido adiposo branco. Essa proteína é conhecida atualmente como “hormônio da saciedade” (GUIMARÃES et al., 2007).

A leptina é produzida também por outros tecidos como placenta, medula óssea, estômago, músculo e talvez cérebro. Além disso, é importante observar que algumas citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, aumentam a síntese de RNAm para síntese de leptina (LA CAVA A. & MATARESE G, 2004 ).

Sua produção é regulada pelas alterações induzidas pela insulina no adipócito e os seus níveis correlacionam-se com a massa de tecido adiposo. Sua ligação a receptores hipotalâmicos transmitem informação relativa à massa de tecido adiposo e depósitos energéticos existentes. Desempenha um papel central na fertilidade, influenciando a liberação de GnRH e gonadotrofinas. Tem uma ação reguladora da imunidade e resposta inflamatória (ação pró-inflamatória e moduladora imunológica) (PROCACCINE et al., 2012).

A estrutura da leptina e de seu receptor sugere que a mesma pertence à família das citocinas, podendo possuir efeitos pro inflamatórios (LAGO et al., 2008). No sistema imune, a leptina aumenta a produção de citocinas como a IL-1 e TNF- $\alpha$ , a adesão e a fagocitose em macrófagos, além de estimular a proliferação das células T, levando ao aumento da competência imunológica (MATARESE et al., 2015). O efeito da leptina sobre o sistema imune pode ser direto ou indireto, através da modulação de vias centrais ou periféricas (FANTUZZI G., 2009)

Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma associação entre susceptibilidade a infecções e má nutrição, sendo já bem estabelecido que a deficiência nutricional prejudica a imunidade celular, a função dos fagócitos e a produção de citocinas e anticorpos (FONSECA-ALANIZ,2007).

### 2.6.3 Adiponectina

Em meados de 1990, mais uma proteína expressa exclusivamente pelo tecido adiposo, demonstrando importantes efeitos sobre o metabolismo, foi identificada e denominada adiponectina. É uma proteína plasmática de aproximadamente 30 kDa, relativamente abundante, secretada especificamente pelo tecido adiposo, sendo sua expressão maior no tecido adiposo subcutâneo do que no visceral (PALMER et al., 2008).

Sua função biológica depende não somente dos seus níveis plasmáticos, mas também da especificidade tecidual e de seus receptores *ADP-R1* e *ADP-R2*, além de fatores característicos como idade, sexo e estilo de vida. A adiponectina promove aumento da oxidação muscular dos ácidos graxos, redução da concentração plasmática de glicose através do AMPK (adenosina monofosfato quinase), regulando a homeostasia de lipídios e glicose (SILVEIRA et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2007).

Em contraste a outras adipocinas, sua expressão diminui à medida que o tecido adiposo aumenta, o que é confirmado com estudos que mostram seus valores diminuídos na obesidade. Sendo bem estabelecida uma correlação negativa entre a obesidade, principalmente obesidade central, resistência à insulina, diabetes tipo 2 e adiponectina circulante ( KELESIDIS et al., 2006).

Possui uma ação anti-inflamatória resultante da diminuição da produção e inibição da ação do TNF- $\alpha$ , diminuição da produção da IL-6, com consequente indução da produção da IL-10. Assim pode-se afirmar que os níveis de adiponectina são inversamente correlacionados com os níveis de mediadores inflamatórios como IL-6, TNF- $\alpha$  e a proteína-C reativa (FONSECA-ALANIZ et al., 2007).



Estudos recentes vêm associando baixos níveis de adiponectina com síndrome metabólica e associação com risco de câncer e algumas infecções. Combs et al (2005) demonstrou baixos níveis de adiponectina em camundongos CD-1 infectados com *T. cruzi*. Já Palmer et al., 2008, avaliou níveis séricos de adiponectina em pacientes com hepatite C crônica e encontrou valores diminuídos em indivíduos com HCV crônica e com IMC aumentado, em comparação com indivíduos magros. Não temos conhecimento de estudos que demonstrem alterações de adiponectina ou outra adipocina durante a LV.

Nste trabalho, avaliamos possíveis alterações hormonais e associações com parâmetros clínicos e produção de citocinas, em pacientes com LV. Os resultados foram divididos em dois “shorts communications”, apresentados a seguir.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS:

Investigar níveis dos hormônios: Cortisol, ACTH e DHEA-S e das adipocinas: leptina, adiponectina em pacientes com leishmaniose visceral.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Correlacionar parâmetros clínicos com possíveis alterações hormonais em pacientes com LV.
- Correlacionar parâmetros clínicos com níveis de adipocinas e com perfil de citocinas (IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ ) em pacientes com LV.
- Verificar possíveis alterações nos níveis plasmáticos de citocinas e adipocinas em pacientes com LV.

## CAPITULO I

---

## ATIVACÃO DO EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

TEIXEIRA, D.C.C; SANTANA, C. M.; ...BARRAL, A.; BACCAN, G. C.

### RESUMO

O eixo (HPA) hipotálamo-pituitária-adrenal é ativado em resposta ao estresse. Estudos mostraram que, em algumas infecções os níveis de cortisol, corticosterona e de ACTH estavam aumentados, indicando uma ativação do eixo HPA. Os glicocorticoides são hormônios que afetam o metabolismo e a resposta imunitária de várias formas, incluindo a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias. A leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo um grave problema de saúde em várias partes do mundo, incluindo Brasil. Infecção por *Leishmania* pode levar a um amplo espectro de manifestações clínicas: a leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose disseminada (DL), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose cutânea difusa (DCL) e a leishmaniose visceral (LV). No presente trabalho, investigamos se os pacientes com LV tem mudanças nos níveis de ACTH e cortisol e se essas alterações estão relacionadas a alguns marcadores clínicos e/ ou imunológicos da doença. **MATERIAL E MÉTODOS** Foram avaliados um grupo de pacientes com LV (n = 37) e CTL (n = 34), com idades variando de 2 a 11 anos e índice de massa corporal (IMC) similares. Os Hormônios (ACTH e cortisol) foram quantificados utilizando tecnologia Luminex e citocinas (IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ ) foram determinadas por citometria de fluxo (CBA). **RESULTADOS E DISCUSSÃO** Os indivíduos com LV apresentaram níveis mais altos de cortisol (14,79 ng / mL  $\pm$  11,13) e ACTH (9.040 pg / mL  $\pm$  26,42) que os controles (12,00 ng / mL  $\pm$  1,831, P = 0,0004 e 1,880 pg / mL  $\pm$  48,08, P <0,0001, respectivamente). O cortisol teve correlação positiva com o tempo de doença (r = 0,4105, P = 0,04), frequência respiratória (r = 0,44 P = 0,015) e IL-6 (r = 0,389, P = 0,0405). O ACTH teve correlação positiva com TNF- $\alpha$  (r = 0,3769, P = 0,040) e IL-1 $\beta$  (r = 0,3762, P = 0,0405). **CONCLUSÕES:** Nossos resultados indicam que os pacientes com LV tem uma ativação do eixo HPA e que esta pode ser associada com a progressão da doença. A elevação de algumas citocinas como a IL-6 pode estar envolvida nesta ativação e aumento do cortisol.

**Palavras - chave:** Cortisol, Eixo-HPA, Leishmaniose visceral

## ABSTRACT

### INTRODUCTION

The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis is activated in response to stress. Studies have showed that in some infections there is elevation of cortisol or corticosterone and ACTH, indicating an activation of HPA axis. Glucocorticoids are hormones that affect the metabolism and immune response in several ways, including decreased production of proinflammatory cytokines. Leishmaniasis is a disease caused by protozoans of the genus *Leishmania* that is a serious health problem in several parts of the world including Brazil. *Leishmania* infection can lead to a wide spectrum of clinical manifestations: cutaneous leishmaniasis (CL), disseminated leishmaniasis (DL), mucosal leishmaniasis (ML), diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) and visceral leishmaniasis (VL). In the present work, we investigated whether patients with VL have changes in ACTH and cortisol levels and if these alterations are related to some clinical or immunological markers of disease.

**MATERIAL AND METHODS** We evaluated a group of patients with VL (n=37) and healthy volunteers (n=34) with ages ranging from 2 to 11 years and similar body mass index (BMI). Hormones (ACTH and cortisol) were quantified using multiplex bead-based Luminex technology and cytokines (IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ ) were determined by cytometric beads array (CBA).

**RESULTS AND DISCUSSION** Individuals with VL exhibited higher levels of cortisol (14.79 ng/mL  $\pm$ 11.13) and ACTH (9.040 pg/mL $\pm$ 26.42) than controls (12.00 ng/mL $\pm$ 1.831, P=0.0004 and 1.880 pg/mL $\pm$ 48.08, P<0.0001, respectively). Levels of cortisol positively correlated with time of disease (r=0.4105, P=0.04), respiratory frequency (r=0.44 P=0.015) and IL-6 (r=0.389, P=0.0405). ACTH positively correlated with TNF- $\alpha$  (r=0.3769, P=0.040) and IL-1 $\beta$  (r=0.3762, P=0.0405). **CONCLUSIONS:** These results indicate that patients with VL have an activation of the HPA axis and that this activation could be associated with the outcome of disease. The elevation of some cytokines as IL-6 could be involved in the HPA activation and increase of cortisol.

**Keywords:** Cortisol, HPA axis, visceral leishmaniasis

Apoio financeiro: CNPq (Universal 14/2011)

## INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças parasitárias não contagiosas causadas por diferentes espécies de parasitos do gênero *Leishmania*. Possuem variadas manifestações clínicas em humanos, entre elas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), mucocutânea (LM) e a leishmaniose visceral (LV) (CONCEIÇÃO J. 2014).

A LV é a forma mais grave da doença, com potencial de assumir formas graves e letais principalmente quando associada a quadros de desnutrição e infecções concomitantes. A LV é classificada em segundo lugar na mortalidade e quarto em morbidade entre as doenças tropicais, com 20.000 a 40.000 mortes por ano. (MCCALL et al., 2013; CALDAS et al., 2014, WHO, 2014).

A atividade do eixo HPA vem sido examinada em diversas infecções e sugere que ocorrem alterações nos níveis de glicocorticoides como a hipercortisolemia e desregulação dos níveis basais de ACTH, o que pode ter papel fundamental no desequilíbrio da resposta Th1, Th2 e Th17, favorecendo a progressão da doença (ZAPANTI et al., 2008; KELESTIMUR et al., 2004; ROGGERO et al., 2009).

Em um estudo conduzido por Baccan et al, 2011, observou-se que pacientes com LCL não apresentaram alterações nos níveis de cortisol e estradiol, mas a concentração desses hormônios estava associada com marcadores clínicos e imunológicos.

Neste trabalho foram avaliadas possíveis alterações nas concentrações plasmáticas de cortisol, ACTH e DHEA em pacientes com LV e possíveis associações com marcadores clínicos e imunológicos da doença. Pacientes com LV apresentaram uma ativação do eixo HPA, provavelmente desencadeada pela alta concentração plasmáticas de citocinas e esta ativação pode influenciar parâmetros clínicos da doença.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **População em estudo**

Estudo transversal analítico prospectivo, realizada com população proveniente de área endêmica de LV do estado do Maranhão e Piauí, no Brasil. A amostra foi composta por 71 crianças com idade entre 2 e 11 anos, que foram divididas em 2 grupos: grupo LV, composto por 37 pacientes e o grupo CTL (controles), composto por 34 voluntários saudáveis. Os indivíduos incluídos nos diferentes grupos apresentavam idade similar, com variação máxima de 2 anos.

Para a definição da população incluída no estudo, foram definidos critérios de inclusão e exclusão. Foram considerados indivíduos portadores de LV, indivíduos com quadro clínico compatível (febre por mais de duas semanas, hepatoesplenomegalia, perda de peso e palidez mucocutânea) e teste sorológico (ELISA ou imunofluorescência) e/ou exame parasitológico positivo. E foram considerados CTL, crianças saudáveis residentes na mesma área endêmica, que não apresentavam clínica compatível com LV, sem diagnóstico positivo para outras doenças infecciosas e que os responsáveis legais aceitaram que participassem do presente estudo.

O sangue dos indivíduos incluídos no estudo, foi coletado entre as 8:00 às 10:00h da manhã, processado e armazenado à  $-80^{\circ}\text{C}$  até a realização dos experimentos.

### **Aspectos éticos**

Iniciou-se o trabalho após a aprovação do comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM/Fiocruz) em 22 de fevereiro de 2013, sob o nº 222/2010

### **Dosagem de hormônios e citocinas**

Foram analisadas as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-1, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12 e IFN- $\gamma$  através da técnica CBA (Cytometric Bead Array), com o aparelho BD FACS Array e os kits diagnóstico para IFN- $\gamma$  e Human Inflammatory Cytokine Kit da

BD catálogo nº 551811 dentro das normas do protocolo geral do fabricante para realização de CBA. Os hormônios ACTH, cortisol e DHEA foram quantificados através da técnica Luminex - Luminex® xMAP® Technology.

### **Análise estatística**

Nas análises hormonais e de citocinas, os grupos LV e CTLs foram comparados através do teste de Mann-Whitney. Para as análises de correlações foi utilizado o teste de Spearman. Todos os testes estatísticos foram realizados pelo programa Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## **RESULTADOS**

*Pacientes com LV apresentam ativação do eixo HPA e elevação de citocinas plasmáticas*

Após avaliação dos níveis hormonais verificou-se que as crianças com LV, apresentaram níveis mais elevados de cortisol e ACTH, que os controles (figura 1). Não foram detectadas diferenças nas concentrações de DHEA, nos grupos analisados (figura 1).

Para determinar o perfil de citocinas produzidas pelos pacientes, avaliamos os níveis plasmáticos das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

Os pacientes apresentaram níveis mais elevados de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-10, que os controles (tabela 1).

*Concentrações de ACTH e cortisol apresentam associações com citocinas plasmáticas e parâmetros clínicos:*

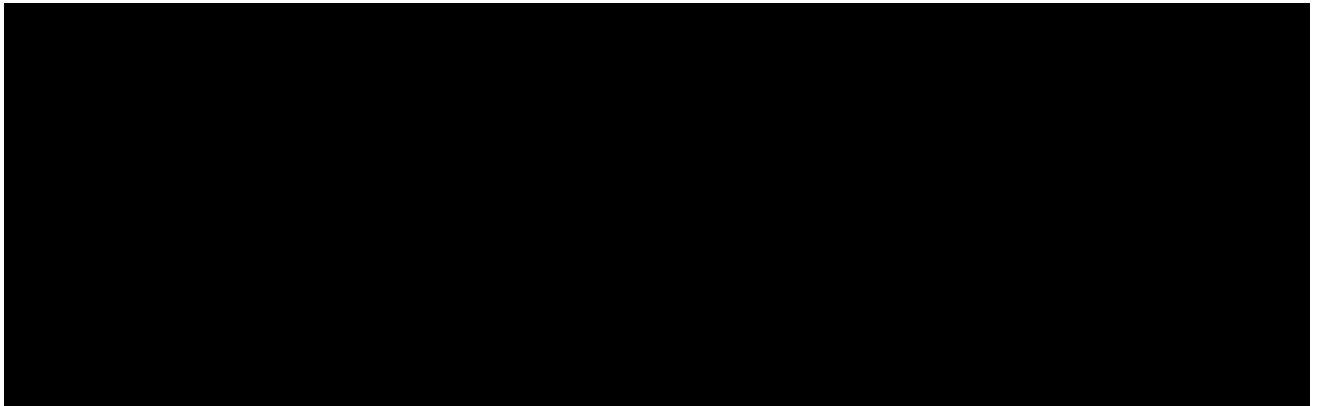
Com a finalidade de avaliar possíveis associações entre concentrações hormonais e marcadores clínicos e imunológicos da LV, nós realizamos análises de correlações entre hormônios, citocinas e os seguintes parâmetros clínicos: Cortisol teve uma correlação positiva com o tempo de doença,



frequência respiratória (FR) e IL-6, e negativa com número de plaquetas (figura 2). Uma associação positiva foi observada entre ACTH e TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (figura 2).

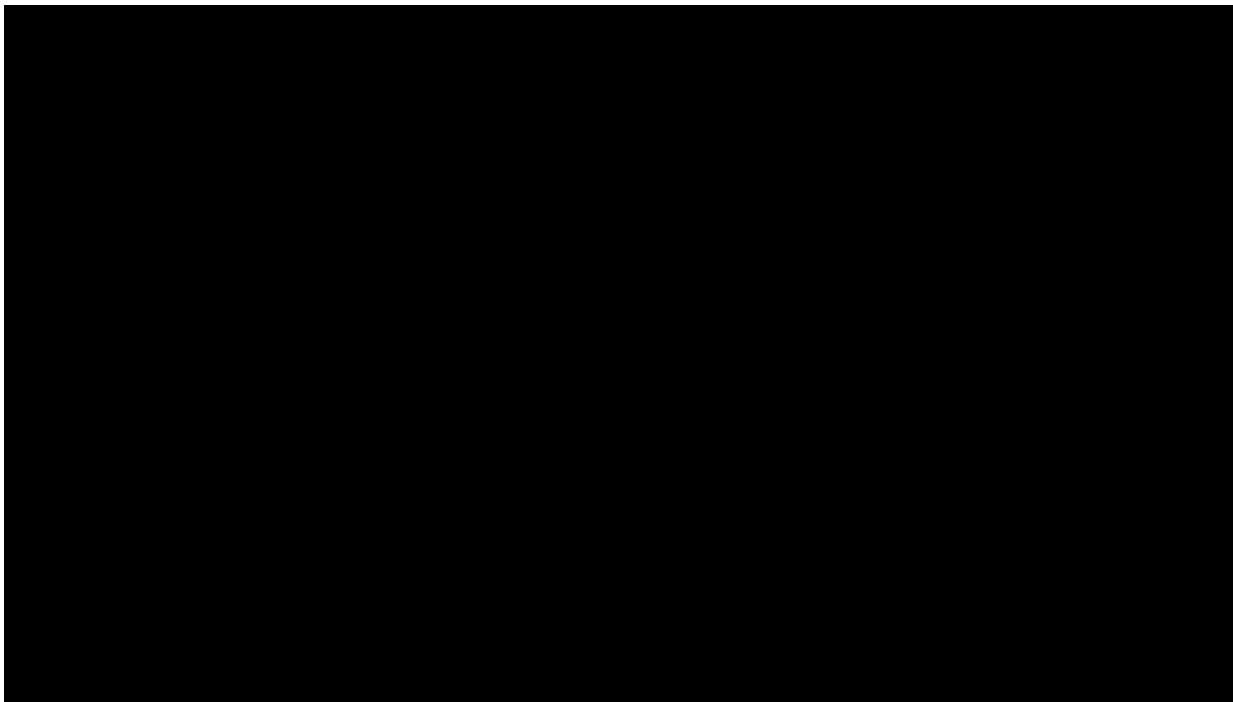
	<b>LV</b>	<b>CTL</b>	<b>P</b>
	<b>(mediana<math>\pm</math>SD)</b>	<b>(mediana<math>\pm</math>SD)</b>	
<b>IL-1<math>\beta</math> (pg/mL)</b>	4,090 $\pm$ 2,895	3,135 $\pm$ 2,414	P=0,0164
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>	6,060 $\pm$ 6,983	6,520 $\pm$ 1,967	P=0,2022
<b>IL-6 (pg/mL)</b>	9,050 $\pm$ 233,9	1,590 $\pm$ 3,515	P<0,0001
<b>IL-8 (pg/mL)</b>	12,44 $\pm$ 79,35	5,50 $\pm$ 3,97	P<0,0001
<b>IL-10 (pg/mL)</b>	17,33 $\pm$ 9,325	2,185 $\pm$ 0,6468	P<0,0001
<b>IL-12 (pg/mL)</b>	5,290 $\pm$ 3,484	5,185 $\pm$ 1,792	P=0,9334
<b>IFN-<math>\gamma</math> (pg/mL)</b>	5,550 $\pm$ 6,343	5,800 $\pm$ 5,562	P=0,2329

**Tabela 1-** Concentrações plasmáticas de citocinas em pacientes (LV) e controles (CTL)



**Figura 1-** Concentrações plasmáticas de cortisol, ACTH e DHEA em pacientes com LV. Os níveis de cortisol, ACTH e DHEA foram determinados no plasma

e pacientes com LV (n=37) e de voluntários normais (n= 34, controles, CTL). Os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. \*p<0,05.



**Figura 2-** Correlações do cortisol e ACTH com parâmetros clínicos e citocinas em pacientes com LV. Os níveis plasmáticos de cortisol tiveram correlação negativa com número de plaquetas ( $r=-0,485$ ,  $p=0,003$ ) e positiva com tempo de doença ( $r=0,4105$ ,  $p=0,041$ ), frequência respiratória (FR,  $r=0,446$ ,  $p=0,015$ ) e IL-6 ( $r=0,484$ ,  $p=0,003$ ). O ACTH teve correlação positiva com IL-1 $\beta$  ( $r=0,468$ ,  $p=0,009$ ) e a TNF- $\alpha$  ( $r=0,417$ ,  $p=0,021$ ).

## DISCUSSÃO

Os mecanismos de interação neuroimunoendócrino durante a LV ainda não foram bem elucidados. Neste estudo, procuramos por alterações hormonais em pacientes diagnosticados com LV e relacionamos concentrações hormonais com marcadores clínicos e imunológicos. Cortisol e ACTH estavam elevados nos indivíduos com LV quando comparados com os voluntários saudáveis (CTL), e seus níveis plasmáticos mostraram estar correlacionados com alguns marcadores clínicos e citocinas.

Em estudo anterior realizado por Baccan et al em 2011, foram observadas alterações hormonais em pacientes com LCL. A concentração de cortisol e estradiol estavam associados com marcadores clínicos e imunológicos. Em 2011, Verde et al. analisou distúrbios hormonais no kalazar onde verificou alteração nos níveis hormonais de ACTH e cortisol, porém não os correlacionou com parâmetros clínicos e/ou imunológicos. Em 2009, Roggero et al., buscou analisar a influência dos níveis de cortisol na ativação de linfócitos T no HIV em ratos e seus dados sugerem que o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) contribui para a regulação da ativação de células T em HIV.

Foram observadas algumas alterações de citocinas, com aumento nas concentrações de IL-10, IL-8 e IL-6, porém não verificamos um aumento na concentração de TNF- $\alpha$ . Nos seres humanos a LV é considerada uma disfunção imune comprometendo tanto a imunidade celular quanto humoral. Pesquisas anteriores demonstram que a susceptibilidade à doença e sintomatologia clínica é atribuída a uma resposta do tipo Th2 com produção de citocinas como: IL-10, IL-4, IL-12 e TNF- $\alpha$  (GOTO & PRIANTI 2009; ANDRADE & COSTA, 2012). Andrade, 2012, avaliou 80 sujeitos no período de 2008 a 2009, divididos em 3 grupos distintos: o de pacientes assintomáticos, o de portadores sintomáticos e o grupo controle, após análise das citocinas presentes no plasma dos indivíduos verificou um aumento nas concentrações de IL-12, IFN- $\alpha$  e IL-10 em pacientes sintomáticos comparados aos assintomáticos e controles. COSTA A. et al em 2013, avaliou as citocinas séricas presentes em pacientes graves com kalazar, eles verificaram um aumento nas concentrações de IL-8, IL-6, IL1- $\beta$ , porém eles estavam associados de forma independente com sintomas de gravidade. Nossos

resultados corroboram com os de estudos anteriores, que vêm demonstrando que pacientes com LV, desenvolvem uma resposta imunológica do tipo Th2, com elevada produção de citocinas como a IL-4, IL-6 e IL-10, o que favorece a multiplicação parasitária e disseminação da doença, resultando em elevada taxa de mortalidade em caso de não tratamento, diferente do que ocorre na leishmaniose cutânea (LC) (BRYSSON & ALEXANDER, 2005).

Em estudo conduzido no Maranhão por Costa et al., 2012, foram avaliados 80 indivíduos de uma área endêmica para LV em diferentes fases da patologia, em seus resultados observou-se um aumento da concentração plasmática de IFN- $\gamma$  e IL-10 além da presença simultânea de IFN- $\gamma$  e IL-10 no grupo com doença ativa, indicando assim, uma falta de contra-regulação por estas citocinas corroborando o papel da IL-10 como principal citocina envolvida no estabelecimento e progressão da infecção, conferindo a mesma um importante papel na regulação da resposta inflamatória (COSTA et al., 2012).

O efeito dos hormônios e neurotransmissores interagindo com a função imune tem sido bastante estudado, porém existem também evidências que as estruturas neuroendócrinas alteram sua atividade em sincronia com a ativação de células imunitárias (BESEDOVSKY et al., 1985). A desordem endócrina observada durante as infecções pode ser o resultado da ativação de vários eixos neuroendócrinos, tais como o eixo HPG e o eixo HPA, ambos ativados através do sistema imune (WEBSTER et al., 2002). Algumas citocinas, principalmente a IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , atuam diretamente no SNC ativando principalmente o eixo HPA (DUNN, 2000; HADADD et al., 2002). Neste estudo, os valores de cortisol e ACTH encontram-se mais elevados nos indivíduos com LV, indicando assim uma ativação do eixo HPA. Os níveis elevados de cortisol consequentes da ativação do eixo HPA, observada nos pacientes com LV, poderiam estar envolvidos em alguns sintomas ou ainda serem utilizados como marcadores de gravidade da doença. Em nosso estudo, observamos uma associação positiva entre cortisol e tempo de doença, frequência respiratória e IL-6.

Em 1998 Libonati avaliou níveis séricos de cortisol e DHEA na malária não complicada e os correlacionou com os níveis de cortisol basal, porém não foram encontrados resultados estatisticamente significativos. Não foram encontrados outros estudos relacionando cortisol-tempo de doença e

parasitoses. Em 2005, Wildmer et al descreveu que pacientes críticos apresentaram concentrações elevadas de cortisol proporcionalmente com a progressão da doença.

A frequência respiratória é um parâmetro clínico que possui relação direta com quadros inflamatórios e/ou liberação adrenérgica por stress. Não existe na literatura estudos que relacionem frequência respiratória com níveis de cortisol. Acreditamos que a progressão do tempo da doença e aumento das concentrações de cortisol eleve a frequência respiratória, porém é necessário mais estudos e embasamento para que se confirme essa hipótese.

Várias citocinas inflamatórias tais como IFN- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 que medeiam a resposta imune inata, têm sido reconhecido como moduladores importantes da função do eixo HPA (CHROUSOS & ZAPANTI, 2014). Nossos pacientes apresentaram elevação dos níveis de IL-6 e cortisol o que corrobora com estudos anteriores. BOONEN et al., 2013, avaliou os níveis de cortisol em 158 pacientes com sepsis grave e encontrou em seus resultados níveis mais elevados tanto no cortisol total quanto no sistêmico nos pacientes do grupo grave e moderado, no entanto os níveis de ACTH foram menores neste mesmo grupo. Em 2011, Verde et al., analisou distúrbios hormonais no Kalazar onde verificou alteração nos níveis hormonais de ACTH e cortisol, porém não os correlacionou com parâmetros clínicos e imunológicos. Em nosso estudo observamos uma associação positiva entre ACTH e TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  o que corrobora com estudos anteriores que relacionaram ativação de eixo HPA com citocinas inflamatórias (DUNN et al., 2000; STEENSBERG et al., 2003; Gill et al., 2008).

Diante dos resultados obtidos podemos afirmar que existem evidências de ativação do eixo HPA durante a LV esperamos que novos estudos sejam realizados com número maior de indivíduos e em diferentes fases clínicas da patologia a fim de maiores esclarecimentos sobre a participação do circuito HPA na resposta imunopatogênica da LV.

## REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J. & BRYSON, K. T helper (h) 1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. **Immunology letters**, 99(1), 17-23. (2005).

ALVAR, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., Dedet, J. P., & Moreno, J. (2008). The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clinical microbiology reviews**, 21(2), 334-359.

BACCAN, G. C., Oliveira, F., Sousa, A. D., Cerqueira, N. A., Costa, J. M. L., Barral-Netto, M., & Barral, A. (2011). Hormone levels are associated with clinical markers and cytokine levels in human localized cutaneous leishmaniasis. **Brain, behavior, and immunity**, 25(3), 548-554.

BACELLAR, Olívia; CARVALHO, Edgar M. Imunopatogênese da leishmaniose visceral. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 74, n. 1, 2008.

BESEDOVSKY, h. O.; del rey, a. E.; sorkin, E. Immune-neuroendocrine interactions. **J. Immunol**, v. 135, p. 750-753, 1985.

BOONEN, E., Vervenne, H., Meersseman, P., Andrew, R., Mortier, L., Declercq, P. E., & Van den Berghe, G. (2013). Reduced cortisol metabolism during critical illness. **New England Journal of Medicine**, 368(16), 1477-1488.

CALDAS, Arlene de Jesus Mendes, et al. Profile of children with visceral leishmaniasis that evolved to death, therapeutic failure and relapse in a hospital. **Revista de Pesquisa em Saúde** v.14 n.2. (2014).

COLLIN, S., Davidson, R., Ritmeijer, K., Keus, K., Melaku, Y., Kipngetich, S., & Davies, C. (2004). Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. **Clinical Infectious Diseases**, 38(5), 612-619.

CONCEIÇÃO, Jacilara Alexandrino O papel dos neutófilos na leishmaniose tegumentar causada por *Leishmania brasilienses*. 2014 97f. Dissertação (mestrado em imunologia) – PPGIM – Universidade Federal da Bahia-salvador-bahia.

COSTA, A. S. A., Costa, G. C., Aquino, D. M. C. D., Mendonça, V. R. R. D., Barral, A., Barral-Netto, M., & Caldas, A. D. J. M. (2012). Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 107(6), 735-739.

DEL REY, A., Mahuad, C. V., Bozza, V. V., Bogue, C., Farroni, M. A., Bay, M. L., & Besedovsky, H. O. (2007). Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. **Brain, behavior, and immunity**, 21(2), 171-179.

DUNN, Adrian J. Cytokine activation of the HPA axis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 917, n. 1, p. 608-617. (2000).

GILL, Jessica; VYTHILINGAM, Meena; PAGE, Gayle G. Low cortisol, high DHEA, and high levels of stimulated TNF- $\alpha$ , and IL-6 in women with PTSD. **Journal of traumatic stress**, v. 21, n. 6, p. 530-539, 2008.

GOTO, h. & PRIANTI, G. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 51(5), 241-246. (2009)

HADDAD, John J.; SAADÉ, Nayef E.; SAFIEH-GARABEDIAN, Bared. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. **Journal of neuroimmunology**, v. 133, n. 1, p. 1-19, 2002.

HOLADAY, Bettie J. Role of CD8+ T cells in endogenous interleukin-10 secretion associated with visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 2, p. 217-220, 2000.

KELESTIMUR, F. The endocrinology of adrenal tuberculosis: the effects of tuberculosis on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and adrenocortical function. **Journal of endocrinological investigation**. v.27 n.4, p. 380-386 (2004).

LIBONATI, Rosana Maria Feio. Evaluation of both cortisol and dehydroepiandrosterone levels in patients with non-complicated malaria due to Plasmodium falciparum. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**., v. 31, n. 2, 1998.

MCCALL, Laura-Isobel, WEN-Wei Zhang, and GREG Matlashewski. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. Ed. Chetan E. Chitnis. **PLoS Pathogens**, v.9. n.1. (2013): e1003053. *PMC*. Web. 18 June 2015.

MICHALICK, Marilene Suzan M. e GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. **Parasitologia humana**, v. 11, p. 67-84, 2005.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V., Martins-Filho, O. A., Prata, A., Silva, L. D. A., Rabello, A., Teixeira-Carvalho, A., & Correa-Oliveira, R. (2006). Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon- $\gamma$  and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor- $\alpha$ + monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to Leishmania chagasi infection. **Clinical & Experimental Immunology**, 146(1), 124-132.



ROGGERO, E., Pérez, A. R., Bottasso, O. A., Besedovsky, H. O., & Del Rey, A. (2009). Neuroendocrine-immunology of Experimental Chagas' Disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1153(1), 264-271.

SILVA, A. R. D., Tauil, P. L., Cavalcante, M. N. S., Medeiros, M. N., Pires, B. N., & Gonçalves, E. D. G. Epidemiological Situation Of Visceral Leishmaniasis On The Island Of São Luis, State Of Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41 n4, p.358-364. 2008.

STEENBERG, A., Fischer, C. P., Keller, C., Møller, K., & Pedersen, B. K. (2003). IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, 285(2), E433-E437.

STERNBERG, Esther M. Neural-immune interactions in health and disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 11, p. 2641, 1997.

TAUB, Dennis D. Neuroendocrine interactions in the immune system. **Cellular immunology**, v. 252, n. 1-2, p. 1, 2008.

TEAGUE, T. K., Schaefer, B. C., Hildeman, D., Bender, J., Mitchell, T., Kappler, J. W., & Marrack, P. (2000). Activation-induced inhibition of interleukin 6-mediated T cell survival and signal transducer and activator of transcription 1 signaling. **The Journal of experimental medicine**, 191(6), 915-926.

VERDE, Frederico Araujo Lima et al. Hormonal disturbances in visceral leishmaniasis (kala-azar). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. vol. 84 , no. 5 , 668-673. (2011).

XIONG, Fuxia, and Lubo Zhang. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease. **Frontiers in neuroendocrinology** v.34 n1, p. 27-46. (2013).

ZAPANTI, Evangelia; TERZIDIS, Konstantinos; CHROUSOS, George. Dysfunction of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in HIV infection and disease. **Hormones (Athens)**, v. 7, n. 3, p. 205-16, 2008.

## CAPITULO II

---

## **ADIPOCINAS E LEISHMANIOSE VISCERAL: ASSOCIAÇÕES ENTRE ADIPONECTINA E MARCADORES HEMATOLÓGICOS**

Teixeira, D. C. C.; Santos, A. F.; Sousa, A. D.; Barral, A.; Baccan, G. C.

### **RESUMO**

**INTRODUÇÃO** A leishmaniose é causada pelo protozoário do gênero *Leishmania* e é um grave problema de saúde em várias partes do mundo, inclusive no Brasil. Infecção por *Leishmania* leva a um amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose disseminada (LD), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose visceral (LV). LV é a forma mais grave. Caracterizada por febre alta, perda de peso substancial, hepatoesplenomegalia e anemia. Adipocinas são hormônios produzidos pelo tecido adiposo que influenciam o metabolismo energético e função imunológica. Alterações nos níveis plasmáticos de adipocinas têm sido descritos em muitas infecções. **MATERIAL E MÉTODOS.** No presente trabalho, avaliamos pacientes com LV para determinar possíveis mudanças nos níveis das adipocinas leptina e adiponectina e correlacionamos com marcadores clínicos da doença. Os pacientes (n = 37) e CTL (n = 34) tinham idade de 2 a 11 anos e IMC similares. As Adipocinas foram quantificadas por ELISA. **RESULTADOS E DISCUSSÃO** Os pacientes com LV e CTL saudáveis tiveram níveis similares de leptina (8.444ng / mL  $\pm$  4,411, 8.478ng / mL  $\pm$  0,4568, P = 0,995) e adiponectina (23.24 $\mu$ g / mL  $\pm$  5,469, 23.20 $\mu$ g / mL  $\pm$  5,354, P = 0,9625). Os níveis de adiponectina correlacionados positivamente com o hematócrito (r = 0,3503, P = 0,0362) e negativamente com a taxa de sedimentação de eritrócitos( Vhs) 1 e 2 (R = -0,6593 P = 0,004 e r = -0,700, P = 0,0017, respectivamente). **CONCLUSÕES** Os nossos resultados indicam que a adiponectina pode ser um importante marcador de gravidade da doença uma vez que seus níveis plasmáticos estão associados com os parâmetros clínicos importantes.

Palavra chave: Adipocinas, leishmaniose visceral, adiponectina

CNPq (Universal 14/2011)

## ABSTRACT

**INTRODUCTION** Leishmaniasis is caused by protozoan of the genus *Leishmania* and is a serious health problem in several parts of the world including in Brazil. *Leishmania* infection leads to a wide spectrum of clinical manifestations ,including cutaneous leishmaniasis (CL), disseminated leishmaniasis (DL), mucosal leishmaniasis (ML), diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) and visceral leishmaniasis (VL). VL is a systemic disease with a very complex host-parasite. It is characterized by high fever, substantial weight loss, swelling of the spleen and liver, and anaemia. Adipokines are hormones produced by adipose tissue that influence the energetic metabolism and immune function. Alterations in adipokine plasma levels have been described in many infections. **MATERIAL AND METHODS** In the present work, we evaluated a group of patients with VL to determine changes in plasma adipokine levels (leptin and adiponectin) and their association with clinical markers of disease. Patients (n=37) and healthy volunteers (n=34) had 2 to 11 years and similar body mass index (BMI). Adipokines were quantified by ELISA. **RESULTS AND DISCUSSION** Patients with LV and healthy volunteers shown similar levels of leptin (8.444ng/mL±4.411, 8.478ng/mL±0.4568, P=0.995) and adiponectin (23.24µg/mL±5.469, 23.20µg/mL±5.354, P=0.9625). Adiponectin levels positively correlated with hematocrit (r=0.3503, P=0.0362) and negatively with erythrocyte sedimentation rate 1 and 2 (r= -0.6593 P=0.004 and r= -0.700, P=0.0017, respectively). **CONCLUSIONS** Our results indicate that adiponectin may be an important marker of severity of disease since its plasma levels are associated with important clinical parameters.

Keyword: adipokine, visceral leishmaniasis, adiponectin

Patrocínio: CNPq (Universal 14/2011)

## INTRODUÇÃO

O tecido adiposo, além de funções como a termogênese e armazenamento energético, possui uma importante função endócrina (GUIMARÃES et al., 2007). Uma variedade de proteínas podem ser sintetizadas e liberadas pelos adipócitos, denominadas adipocinas, as quais possuem diferentes funções, entre elas as de regulação de apetite e balanço energético, controle da sensibilidade à insulina, angiogênese e imunorregulação. Dentre as adipocinas mais conhecidas, estão: leptina, adiponectina e resistina (DUARTE et al., 2005; SILVEIRA et al., 2009, GEIGER, K., et al., 2011).

A primeira adipocina descrita foi a leptina. Esta atua principalmente como modulador hipotalâmico da ingestão de alimentos, peso corporal e reserva energética (GEIGER, K., et al., 2011) A estrutura da leptina e do seu receptor sugere que a mesma pertence à família das citocinas, podendo apresentar efeitos pro- inflamatórios. No sistema imune, a leptina exerce papel no desenvolvimento, proliferação, maturação e ativação das células T promovendo a adesão e a fagocitose em macrófagos e aumentando a produção de citocinas como a IL-1 e TNF- $\alpha$  (MATARESE et al., 2012; LAGO et al., 2008; MATARESE, G. et al., 2015). Em 2005, Wieland et al observou que os níveis de leptina encontravam-se aumentados localmente durante a infecção *M. tuberculosis* em camundongos infectados. O papel da leptina em infecções como a Hanseníase, câncer e esquistossomose também tem sido investigado (ATASEVEN et al., 2006; POTTER et al., 2003; DE SOUZA, 2003.).

A adiponectina possui uma ação anti-inflamatória resultante da diminuição e inibição da produção de TNF- $\alpha$ , diminuição da produção da IL-6. Assim, pode-se afirmar que os níveis de adiponectina são inversamente correlacionados com os níveis de mediadores inflamatórios como IL-6, TNF- $\alpha$  e a proteína-c reativa (FONSECA-ALANIZ et al., 2007). Alguns autores estudaram o papel da adiponectina na regulação linfocitária e seu papel na resposta inflamatória e verificaram que seus níveis séricos estavam diminuídos em diversas infecções crônicas como câncer, hepatite, HIV ( KELESIDIS et al., 2006; PALMER et al., 2008; COMBS et al., 2005; PEPPING ,2014).

Considerando que ainda não existem estudos enfocando na participação das adipocinas na imunopatogênese da LV, este estudo visou avaliar a concentração dos níveis plasmáticos de leptina e adiponectina em crianças com LV e buscar associações entre aspectos clínicos e imunológicos da doença.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **População em estudo**

Os participantes foram divididos em dois grupos: pacientes (LV, n=37) e controles (CTL=34). Eles foram recrutados nos estados do Maranhão e Piauí, que são áreas endêmicas, onde ocorre cerca de 90% dos casos de LV no Brasil. (MICHALSKI & GENARO 2005, MAIA-ELKHOURY et al., 2008, MS/SVS 2009, WHO 2009). Os critérios de inclusão no grupo LV foram: indivíduos com quadro clínico compatível (febre por mais de 2 semanas, hepatoesplenomegalia, perda de peso e palidez muco cutânea), teste sorológico (ELISA ou imunofluorescência) e/ou exame parasitológico positivo. E foram considerados CTL crianças saudáveis, residentes na mesma área endêmica, que não apresentavam clínica compatível com LV, sem diagnóstico positivo para outras doenças infecciosas e que os responsáveis legais autorizaram a participação no estudo.

Os dados clínicos e amostras de sangue dos participantes foram coletados na área endêmica. Essas amostras foram processadas no local e o plasma armazenado a 80°C, antes de efetuadas as análises.

### **Aspectos éticos**

Iniciou-se o trabalho após a aprovação do comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM/Fiocruz) em 22 de fevereiro de 2013, sob o nº 222/2010.

**Dosagem de citocinas e adipocinas**

Foram analisadas as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-1, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12 e IFN- $\gamma$  através da técnica CBA (Cytometric Bead Array), com o aparelho BD FACS Array e os kits diagnóstico para IFN- $\gamma$  e Human Inflammatory Cytokine Kit da BD catálogo nº 551811 dentro das normas do protocolo geral do fabricante para realização de CBA. Para detecção da adiponectina foi realizada ELISA direta, utilizando o kit da invitrogen (Carlsbad, CA, USA) com sensibilidade de 100 pg/ml. A determinação da leptina foi feita através de ELISA sanduíche, utilizando kit da invitrogen (Carlsbad, CA, USA) com sensibilidade de 1000 ng/ml.

**Análise estatística**

Os dados obtidos foram comparados através do teste de Mann-Whitney. As correlações entre os níveis de adipocinas, citocinas e parâmetros clínicos foram analisadas através do teste de Spearman. Todos os testes estatísticos foram realizados com o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## RESULTADOS

Neste estudo foram incluídos 37 pacientes diagnosticados com LV e 34 indivíduos saudáveis, destes 75,67% de pacientes eram do sexo masculino e 23% de crianças com idade entre 2 e 4 anos de idade.

### *Níveis plasmáticos de adipocinas e de citocinas em pacientes com LV:*

Para determinar o perfil de citocinas e adipocinas produzidas durante a LV avaliamos os níveis plasmáticos das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e das adipocinas leptina e adiponectina em pacientes e controles. Foram observadas diferenças entre as amostras do grupo CTL e do grupo LV. As citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-10 encontravam-se aumentadas no grupo com LV. Não foram encontradas diferenças significantes nos níveis de adipocinas (fig. 1).

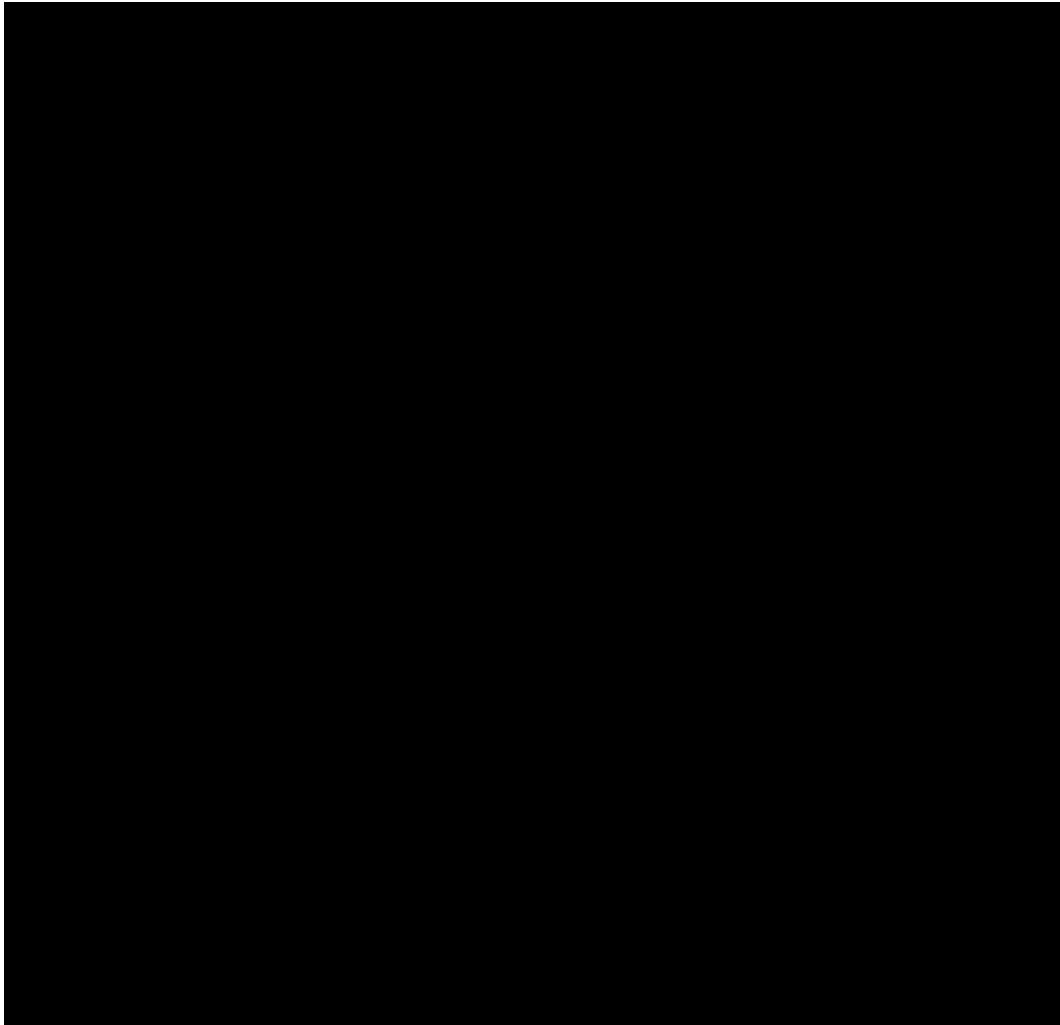
### *Associações entre adipocinas e parâmetros clínicos:*

Foram avaliadas possíveis associações entre adipocinas, citocinas e os seguintes parâmetros clínicos: tempo de doença, hematócrito, frequência respiratória, Vhs (velocidade de hemossedimentação) 1, Vhs2.

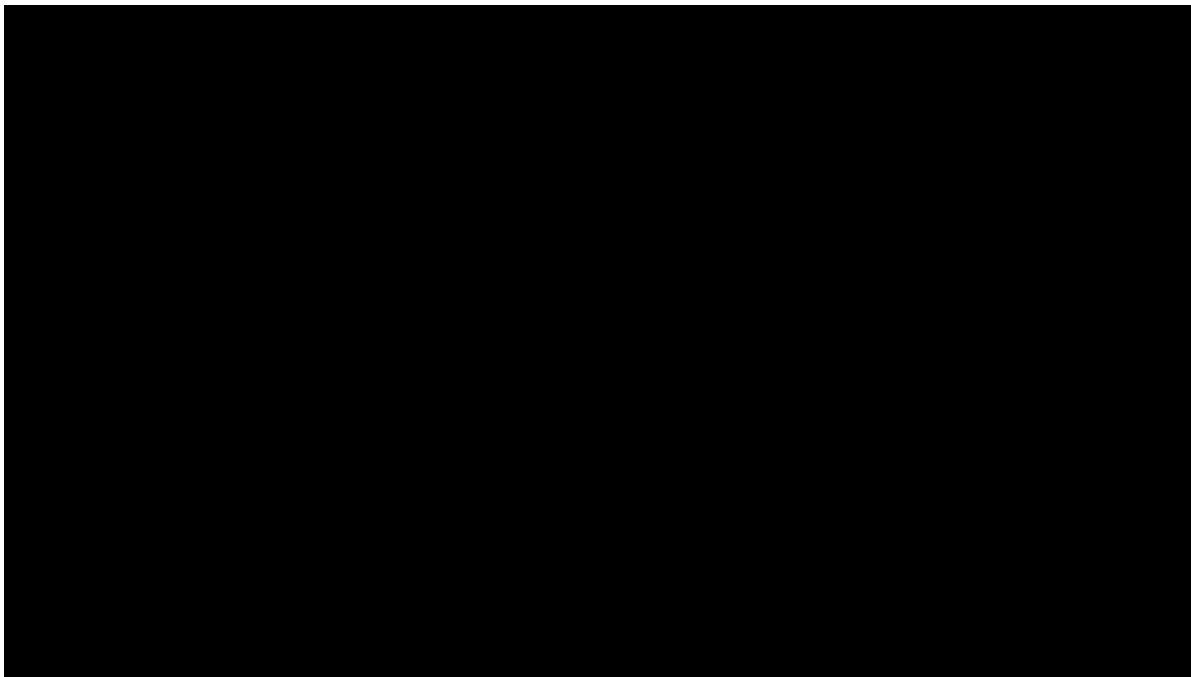
Os níveis plasmáticos de adiponectina mostraram correlação negativa com Vhs 1 e 2 e correlação positiva com hematócrito, Hemoglobina, frequência respiratória e cortisol (fig.2).

Não foram detectadas associações entre leptina, citocinas e parâmetros clínicos.





**Figura 1A** - Concentrações plasmáticas de adipocinas e citocinas em pacientes com LV. Os níveis de adipocinas e citocinas foram determinados no plasma de pacientes com LV (n=37) e de voluntários normais (n= 34, controles, CTL). Os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. \*P<0,05.



**Figura 2A-** Correlações entre adiponectina plasmática e parâmetros clínicos em pacientes com LV. Adiponectina teve uma correlação negativa com velocidade de hemossedimentação 1 (vhs1,  $r=-0,6593$ ,  $P=0,004$ ) e 2 (vhs2,  $r=-0,700$ ,  $P=0,001$ ) e correlação positiva com hematócrito ( $r=0,3503$ ,  $P=0,036$ ), Hemoglobina ( $r=0,372$ ,  $P=0,025$ ), frequência respiratória (FR,  $r=0,478$ ,  $P=0,008$ ) e cortisol ( $r=0,354$ ,  $P=0,036$ ).

## DISCUSSÃO

Adipocinas são importantes reguladores da homeostase energética, do metabolismo e da resposta imune. Seus níveis podem estar alterados durante infecções. Foi avaliado um grupo de 37 pacientes com LV onde foi observada associações entre os níveis plasmáticos de adiponectina e importantes marcadores clínicos e hematológicos da doença como: tempo de doença, hematócrito, plaquetas, linfócitos, bastonetes, segmentados, Vhs1 e 2, frequência respiratória. Não foram detectadas alterações nos níveis de leptina e adiponectina nos pacientes avaliados. Foram observadas algumas alterações de citocinas, com aumento nas concentrações de IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10.

Nos seres humanos a LV é considerada uma disfunção imune comprometendo tanto a imunidade celular quanto humoral (CARVALHO et al, 2005). Pesquisas anteriores demonstram que a susceptibilidade à doença e sintomatologia clínica é atribuída a uma resposta do tipo Th2 com produção de citocinas como: IL-10, IL-4, IL-12 e TNF- $\alpha$  (GOTO & PRIANTI 2009; ANDRADE & COSTA, 2012). Em estudo conduzido no Maranhão por Costa et al (2012) foram avaliados 80 indivíduos de uma área endêmica para LV em diferentes fases da patologia. Em seus resultados, observou-se um aumento da concentração plasmática de IFN- $\gamma$  e IL-10 além da presença simultânea de IFN- $\gamma$  e IL-10 no grupo com doença ativa, corroborando com o papel da IL-10 como principal citocina envolvida no estabelecimento e progressão da infecção, conferindo-lhe um importante papel na regulação da resposta inflamatória. No ano de 2013, foram avaliadas as citocinas séricas presentes em pacientes graves com kalazar, eles verificaram um aumento nas concentrações de IL-8, IL-6, IL-1- $\beta$ , porém estavam associados de forma independente com sintomas de gravidade (COSTA et al., 2013). Dentre as citocinas estudadas, encontramos alterações nas concentrações plasmáticas, com aumento nas concentrações de IL-10, IL-8 e IL-6, porém não verificamos um aumento na concentração de TNF- $\alpha$ .

Embora o papel das adipocinas já tenha sido descrito em muitas infecções, ainda não foram publicados estudos sobre possíveis alterações em pacientes com leishmaniose (BARBOSA et al., 2015; FALASCA et al., 2011; TOUSSIROT et al., 2013). Nós procuramos por alterações de duas importantes adipocinas; leptina e adiponectina, e não encontramos alterações nos níveis plasmáticos dessas adipocinas nos grupos estudados

A leptina é um hormônio proteico, que atua no hipotálamo suprimindo a ingestão de alimentos e aumentando o gasto calórico, e parece ainda ter papéis importantes na reprodução, angiogênese, formação óssea e sinalização neuroendócrina (LAM, Q. L., & LU, L, 2007). Vários trabalhos têm buscado compreender o papel da leptina na fisiopatologia da resposta imune, descrevendo sua participação em doenças autoimunes, doença de Alzheimer, e doenças infecciosas. (HUERTAS et al., 2012; SOUZA BARBOSA et al., 2015; TSCHÖ et al., 2015). Segundo hipótese de A. Dayakar et al. (2010) a patogênese da LV humana e a redução dos níveis de leptina estão associados com o aumento da resposta imunológica do tipo Th2, caracterizada por secreção de citocinas tais como IL-4, IL-6 e IL-10. Considerando que a resposta imune protetora durante a LV está associada a uma resposta imune eficaz do tipo Th1 caracterizada pela secreção de IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-12 e que provavelmente a secreção de leptina induz uma polarização das células Th1 e secreção de citocinas pró-inflamatórias. Espera-se que pacientes sintomáticos de LV tenham diminuição dos níveis circulantes de leptina. Os pacientes incluídos neste estudo não apresentavam alterações nos níveis de leptina

Estudos recentes vêm associando baixos níveis de adiponectina com síndrome metabólica e associação com risco de câncer e algumas infecções (SONG et al., 2015; VANSAUN, M., 2013; FREITAS et al., 2014). COMBS et al., 2005, demonstrou baixos níveis de adiponectina em camundongos CD-1 infectados com *T. cruzi*. Já KEICHO et al., 2012, avaliou níveis séricos de adiponectina e leptina em pacientes com tuberculose e encontrou valores diminuídos de leptina e aumentados de adiponectina em indivíduos com gravidade da doença. Não existem estudos que demonstrem alterações de adipocinas na LV.

O diagnóstico da LV é realizado primeiramente baseado em dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, sendo as suas manifestações clínicas um reflexo da interação entre o parasita e hospedeiro e marcadores da evolução da doença. Os pacientes apresentam anemia variável, hepatoesplenomegalia, leucopenia e aumento do Vhs1 e 2 (GOMES, C., 2012). Embora não tenham sido detectadas alterações nos níveis plasmáticos de leptina e adiponectina nos grupos estudados, foram encontradas associações entre adiponectina e os parâmetros clínicos: Vhs1 e 2, hematócrito, hemoglobina, frequência respiratória e cortisol. Dionísio et al., 2011 acompanhou o perfil de crianças com LV em um hospital de área endêmica entre o período de 1990 e 2009 e encontrou que a velocidade de sedimentação na primeira hora estava aumentada em 91% dos casos. A adiponectina apresentou correlação negativa com Vhs1 e 2.

Verde e col (2011) detectaram alterações hormonais em pacientes com leishmaniose visceral, mas não as correlacionaram com parâmetros imunológicos. Em relação ao cortisol, eles encontraram que os pacientes apresentavam níveis mais elevados que os controles. Nossos resultados corroboram com estudos anteriores onde foi verificado um aumento da quantidade de cortisol em pacientes com LV, porém não existem publicações que relacionem níveis de adipocinas e cortisol em leishmaniose.

Embora os resultados não tenham sido significativos, percebemos uma tendência de aumento dos níveis de leptina no grupo com LV e associação da adiponectina com parâmetros clínicos importantes para diagnóstico de gravidade da patologia como a frequência respiratória e hematócrito, porém não foram encontradas evidências científicas na base literária que corroborem com nosso estudo. Nesse sentido, novos estudos com um número maior de pacientes e em diferentes fases da patologia devem ser realizados a fim de avaliar o papel das adipocinas na imunopatogênese da LV.

## REFERÊNCIAS

- ATASEVEN, H., Bahcecioglu, I. H., Kuzu, N., Yalniz, M., Celebi, S., Erensoy, A., & Ustundag, B. (2006). The levels of ghrelin, leptin, TNF- $\alpha$ , and IL-6 in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma due to HBV and HDV infection. **Mediators of inflammation**, 2006.
- CARLTON, Elizabeth D.; DEMAS, Gregory E.; FRENCH, Susannah S. Leptin, a neuroendocrine mediator of immune responses, inflammation, and sickness behaviors. **Hormones and behavior**, v. 62, n. 3, p. 272-279, 2012.
- DAYAKAR, A., Chandrasekaran, S., Veronica, J., & Maurya, R..Role of leptin in human visceral leishmaniasis?. **Medical hypotheses**, 77(3), 416-418,2011.
- DE SOUZA BARBOSA, Vitalina, Paulo Luiz Francescantônio, and Nílzio Antônio da Silva. Leptina e adiponectina no lúpus eritematoso sistêmico: correlações clínicas e laboratoriais. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.55 n.2, pag. 140-145, 2015.
- FALASCA, K., Ucciferri, C., Mancino, P., Di Iorio, A., Vignale, F., Pizzigallo, E., & Vecchiet, J. (2010). Cystatin C, adipokines and cardiovascular risk in HIV infected patients. **Current HIV research**, 8(5), 405-410, 2010.
- FONSECA-ALANIZ, M. H., Takada, J., Alonso-Vale, M. I. C., & Lima, F. B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria**, 83(5), S192-S203,2007..
- FREITAS, P., Carvalho, D., Santos, A. C., Madureira, A. J., Martinez, E., Pereira, J., & Medina, J. L. (2014). Adipokines, hormones related to body composition, and insulin resistance in HIV fat redistribution syndrome. **BMC infectious diseases**, 14(1), 347.
- GOMES, Carlos Eduardo Maia. Fatores genéticos e étnicos relacionados à evolução da infecção por *Leishmania infantum*. 2012. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal,(2012).
- HUERTAS, A., Tu, L., Gambaryan, N., Girerd, B., Perros, F., Montani, D., & Humbert, M.. Leptin and regulatory T-lymphocytes in idiopathic pulmonary arterial hypertension. **European Respiratory Journal**, 40(4), 895-904,2012.
- LAGO, R., Gómez, R., Lago, F., Gómez-Reino, J., & Gualillo, O. Leptin beyond body weight regulation—current concepts concerning its role in immune function and inflammation. **Cellular immunology**, 252(1), 139-145,2008.
- LAM, Q. L.; LU, Liwei. Role of leptin in immunity. **Cell Mol Immunol**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2007.
- LEE, Mi-Jeong; FRIED, Susan K. The glucocorticoid receptor, not the mineralocorticoid receptor, plays the dominant role in adipogenesis and adipokine production in human adipocytes. **International Journal of Obesity**. v. 38, n. 9, p. 1228-1233,2014.

MATARESE, G., Procaccini, C., Pucino, V., & Mantzoros, C. Leptin, Immune Function, and Inflammation. In *Leptin* (pp. 131-143). **Springer International Publishing**, pp. 131-143, 2015.

MISIAK, Blazej; LESZEK, Jerzy and KIEJNA, Andrzej. Metabolic syndrome, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease—the emerging role of systemic low-grade inflammation and adiposity. **Brain research bulletin**. V. 89 n.3, p144-149, 2012.

PALMER, Clovis S., et al. Increased glucose metabolic activity is associated with CD4+ T-cell activation and depletion during chronic HIV infection. **AIDS (London, England)** v.28n.3, pag. 297, 2014.

PEPPING, J. K., Otvos Jr, L., Surmacz, E., Gupta, S., Keller, J. N., & Bruce-Keller, A. J. Designer adiponectin receptor agonist stabilizes metabolic function and prevents brain injury caused by HIV protease inhibitors. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, 9(3), 388-398, 2014.

PROCACCINI, Claudio; JIRILLO, Emilio, and MATARESE, Giuseppe. Leptin as an immunomodulator. **Molecular aspects of medicine**. v.33 n.1, p 35-45., 2012.

SONG, M., Gong, J., Giovannucci, E. L., Berndt, S. I., Brenner, H., Chang-Claude, J. & Chan, A. T. Genetic variants of adiponectin and risk of colorectal cancer. **International Journal of Cancer**, 137(1), 154-164, 2015.

TSCHÖP, J., Nogueiras, R., Haas-Lockie, S., Kasten, K. R., Castañeda, T. R., Huber, N. & Tschöp, M. H. CNS leptin action modulates immune response and survival in sepsis. **The Journal of Neuroscience**, 30(17), 6036-6047, 2010.

VANSAUN, Michael N. Molecular pathways: adiponectin and leptin signaling in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 8, p. 1926-1932, 2013.

WIELAND, Catharina W. et al. Pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection in leptin-deficient ob/ob mice. **International immunology**, v. 17, n. 11, p. 1399-1408, 2005.

## REFERÊNCIAS

---



ABRANCHES, P.; CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G. M. Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis. **Acta médica portuguesa**, v. 11, n. 10, p. 871-5, 1998.

ALEXANDER, J. & BRYSON, K. T helper (h) 1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. **Immunology letters**, 99(1), 17-23 (2005).

ALVAR, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., & den Boer, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v.7n.5, 2012.

BACELLAR, Olívia et al. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 12, n. 8, p. 1228-1231, 2000.

BACELLAR, Olívia; CARVALHO, Edgar M. Imunopatogênese da leishmaniose visceral. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 74, n. 1, 2008.

BADARÓ, R., Carvalho, E. M., Orge, M. G. O., Teixeira, R. S., & Rocha, H.. Imunidade humoral e celular em indivíduos curados de leishmaniose visceral. **Rev Soc Bras Med Trop**, 18(2), 77-83, 1985.

BARBOSA, Isabelle Ribeiro; COSTA, Íris do Céu Clara. Clinical and epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in children up to 15 years of age in Rio Grande do Norte state, Brazil [Abstract in English]. **Scientia Medica**, v. 23, n. 1, p. 5-11, 2013.

BESEDOVSKY, Hugo O.; DEL REY, Adriana. Processing of cytokine signals at CNS levels: relevance for immune-HPA axis interactions. **NeuroImmune Biology**, v. 7, p. 227-240 (2007).

BOMFIM, G., Andrade, B. B., Santos, S., Clarêncio, J., Barral-Netto, M., & Barral, A. Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.77n.5, 854-859, 2007.

BORGHETTI, P., Saleri, R., Mocchegiani, E., Corradi, A., & Martelli, P. Infection, immunity and the neuroendocrine response. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.130n.3, 141-162,2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e controle de leishmaniose visceral, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral : recomendações clínicas para redução da letalidade / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

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

BUTTS, Cherie L.; STERNBERG, Esther M. Neuroendocrine factors alter host defense by modulating immune function. **Cellular immunology**, v. 252, n. 1, p. 7-15, 2008.

BUYUKOGLAN, H., Gulmez, I., Kelestimur, F., Kart, L., Oymak, F. S., Demir, R., & Ozesmi, M. Leptin levels in various manifestations of pulmonary tuberculosis. **Mediators of inflammation**, 2007.

CALDAS, A. D. J. M., Costa, J. M. L., Silva, A. A. M. D., Vinhas, V., & Barral, A. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene**, 96(1), 21-28, 2002.

CALDAS, A. D. J. M., Lisbôa, L. L. C., da Fonseca Silva, P., Coutinho, N. P. S., & Silva, T. C. Profile of children with visceral leishmaniasis that evolved to death, therapeutic failure and relapse in a hospital. **Revista de Pesquisa em Saúde**, v. 14n.2, 2014.

CARLTON, Elizabeth D.; DEMAS, Gregory E.; FRENCH, Susannah S. Leptin, a neuroendocrine mediator of immune responses, inflammation, and sickness behaviors. **Hormones and behavior**, v. 62, n. 3, p. 272-279, 2012.

CARVALHO, E. M., Bacellar, O., Brownell, C., Regis, T., Coffman, R. L., & Reed, S. G. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 152n.12, 5949-5956, 1994.

CONTROL OF THE LEISHMANIASES: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of leishmaniasis. **World Health Organization**, Geneva (2010)

COSTA, A. S. A., Costa, G. C., Aquino, D. M. C. D., Mendonça, V. R. R. D., Barral, A., Barral-Netto, M., & Caldas, A. D. J. M. Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107n.6, 735-739, 2012.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista Saúde Pública, São Paulo**, v. 24n5, 361-72, 1990

COSTA, D. L., Rocha, R. L., Carvalho, R. M., Lima-Neto, A. S., Harhay, M. O., Costa, C. H. N., ... & Barral, A. P. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. **Pathogens and global health**, v. 107n.2, 78-87, 2013.

COSTA, Joana V.; DUARTE, João S. Tecido adiposo e adipocinas. **Acta Med Port**, v. 19, n. 3, p. 251-256, 2006.

COUNTRIES. 6. Annual reports. I. **World Health Organization**. 2014.

DA SILVA, A. R., Tauil, P. L., Cacalcante, S. M. N., Medeiros, M. N., Pires, B. N., & Gonçalves, E. D. R. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral, na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, 41, 358-364, 2008.

DA SILVEIRA, M. R., Frollini, A. B., Verlengia, R., & Cavaglieri, C. R. Correlação entre obesidade, adipocinas e sistema imunológico. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, v. 11v.4, 466-472, 2009.

DAYAKAR, A., Chandrasekaran, S., Veronica, J., & Maurya, R. Role of leptin in human visceral leishmaniasis?. **Medical hypotheses**, 77(3), 416-418, 2011.

DEL REY, A., Mahuad, C. V., Bozza, V. V., Bogue, C., Farroni, M. A., Bay, M. L., & Besedovsky, H. O. Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. **Brain, behavior, and immunity**, 21(2), 171-179, 2007.

DUNN, Adrian J. Cytokine activation of the HPA axis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 917, n. 1, p. 608-617, 2000.

EJGHAL, R., Hamdi, S., Idrissi, M., Hida, M., El Hessni, A., & Lemrani, M. Polymorphisms in tumor necrosis factor genes and susceptibility to visceral leishmaniasis in Moroccan children. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5n.5, 380-384, 2015.

FAGGIONI, Raffaella; FEINGOLD, Kenneth R.; GRUNFELD, Carl. Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 14, p. 2565-2571, 2001.

FANTUZZI, Giamila. Adipose tissue, adipokines and inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 5, p. 911-919, 2005.

FANTUZZI, Giamila. Three questions about leptin and immunity. **Brain, behavior, and immunity**, v. 23, n. 4, p. 405-410, 2009.

FELIPE, I. M. A., Aquino, D. M. C. D., Kuppinger, O., Santos, M. D. C., Rangel, M. E. S., Barbosa, D. S., & Caldas, A. D. J. M. Leishmania infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106 n.2, p.207-211. 2011.

FONSECA-ALANIZ, M. H., Takada, J., Alonso-Vale, M. I. C., & Lima, F. B. Adipose Tissue As An Endocrine Organ: From Theory To Practice. **Jornal de Pediatria**, v. 83n.5, p.192-203. 2007.

GADEK-MICHALSKA, A., Tadeusz, J., Rachwalska, P., & Bugajski, J. Cytokines, Prostaglandins And Nitric Oxide In The Regulation Of Stress-Response Systems. **Pharmacological Reports**, v.65n.6, p.1655-1662. 2013.

GOMES, R., Teixeira, C., Teixeira, M. J., Oliveira, F., Menezes, M. J., Silva, C., & Brodskyn, C. I. Immunity To A Salivary Protein Of A Sand Fly Vector Protects Against The Fatal Outcome Of Visceral Leishmaniasis In A Hamster Model. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105n.22, p.7845-7850. 2008.

GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev bras epidemiol**, v. 7, n. 3, p. 338-49, 2004.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 37, n. 4, p. 615-623, 2004.

GUERRA, J. A. O., Barros, M. L. B., Fé, N. F., Guerra, M. V. E., Castellon, E., Paes, M. G., & Sherlock, A. Leishmaniose Visceral Entre Índios No Estado De Roraima, Brasil. Aspectos Clínico e epidemiológicos De Casos Observados No Período De 1989 A 1993. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 37n.4, 305-11. 2004.

GUIMARÃES, D. E. D., Sardinha, F. L. D. C., Mizurini, D. D. M., & Carmo, M. D. G. T. D. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. **Rev. nutr**, v.2 n.5, p.549-559. 2007.

HADDAD, John J.; SAADÉ, Nayef E.; SAFIEH-GARABEDIAN, Bared. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. **Journal of neuroimmunology**, v. 133, n. 1, p. 1-19, 2002.

KARPLUS, T. M., Jeronimo, S. M., Chang, H., Helms, B. K., Burns, T. L., Murray, J. C., & Wilson, M. E. Association Between The Tumor Necrosis Factor Locus And The Clinical Outcome Of Leishmania Chagasi Infection. **Infection and immunity**, v.70n.12,p. 6919-6925. 2002.

KAYE, P. M., Svensson, M., Ato, M., Maroof, A., Polley, R., Stager, S., & Engwerda, C. R. The Immunopathology Of Experimental Visceral Leishmaniasis. **Immunological reviews**,v. 20 n.1, 239-253. 2004.

KEICHO, N., Matsushita, I., Tanaka, T., Shimbo, T., Hang, N. T., Sakurada, S., & Lien, L. T. Circulating Levels Of Adiponectin, Leptin, Fetuin-A And Retinol-Binding Protein In Patients With Tuberculosis: Markers Of Metabolism And Inflammation. **PLoS One**, v.7 n.6. 2012.

KELESIDIS, I.; KELESIDIS, T.; MANTZOROS, C. S. Adiponectin and cancer: a systematic review. **British journal of cancer**, v. 94, n. 9, p. 1221-1225, 2006.

LA CAVA, Antonio; MATARESE, Giuseppe. The weight of leptin in immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 5, p. 371-379, 2004.

LAGO, R., Gómez, R., Lago, F., Gómez-Reino, J., & Gualillo, O. Leptin Beyond Body Weight Regulation—Current Concepts Concerning Its Role In Immune Function And Inflammation. **Cellular immunology**, v.25 n.1, p.139-145. 2008.

LIHN, A. S., Richelsen, B., Pedersen, S. B., Haugaard, S. B., Rathje, G. S., Madsbad, S., & Andersen, O. Increased Expression Of TNF-A, IL-6, And IL-8 In HALS: Implications For Reduced Adiponectin Expression And Plasma Levels. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v.285 n.5, p.1072-1080. 2003.

MACHADO, P. R., Araújo, M. I. A., Carvalho, L., & Carvalho, E. M. Immune Response Mechanisms To Infections. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.79n.6,p. 647-662. 2004.

MACHADO, P. R., Araújo, M. I. A., Carvalho, L., & Carvalho, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções Immune Response Mechanisms To Infections. **An Bras Dermatol**, v.79 n.6, 647-664. 2004.

MARKETON, Jeanette I. Webster; GLASER, Ronald. Stress hormones and immune function. **Cellular immunology**, v. 252, n. 1, p. 16-26, 2008.

MATARESE, G., La Cava, A., Sanna, V., Lord, G. M., Lechler, R. I., Fontana, S., & Zappacosta, S. Balancing Susceptibility To Infection And Autoimmunity: A Role For Leptin?. **Trends in immunology**, v.23 n4, p.182-187. 2002.

MATARESE, Giuseppe; MOSCHOS, Stergios; MANTZOROS, Christos S. Leptin in immunology. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3137-3142, 2005.

MAVOUNGOU, D., Poaty-Mavoungou, V., Ongali, B., Akoume, M. Y., Maka, G., & Mavoungou, E. Hypothalamic-Pituitary Gonadal Axis And Immune Response Imbalance During Chronic Filarial Infections. **Tropical Medicine & International Health**, v.10n.11, p.1180-1186. 2005.

MCCALL, Laura-Isobel; ZHANG, Wen-Wei; MATLASHEWSKI, Greg. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 1, p. e1003053, 2013.

MELO, Maria Norma. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. sup 1, p. 41-45, 2004.

MIYOSHI, Y., Funahashi, T., Kihara, S., Taguchi, T., Tamaki, Y., Matsuzawa, Y., & Noguchi, S. Association Of Serum Adiponectin Levels With Breast Cancer Risk. **Clinical Cancer Research**, v.9n15,p. 5699-5704. 2003.

MONTEIRO, E. M., Silva, J. C. F. D., Costa, R. T. D., Costa, D. C., Barata, R. A., Paula, E. V. D., & Dias, E. S. Leishmaniose Visceral: Estudo De Flebotomíneos E Infecção Canina Em Montes Claros, Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.38 n2, p.147-52. 2005.

NAPOLITANO, L. A., Schmidt, D., Gotway, M. B., Ameli, N., Filbert, E. L., Ng, M. M., & McCune, J. M. Growth Hormone Enhances Thymic Function In HIV-1–Infected Adults. **The Journal of clinical investigation**, v.118 n3, p.1085. 2008.

NYLÉN, Susanne; SACKS, David. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in immunology**, v. 28, n. 9, p. 378-384, 2007.

O'CONNOR, J. C., McCusker, R. H., Strle, K., Johnson, R. W., Dantzer, R., & Kelley, K. W. Regulation Of IGF-I Function By Proinflammatory Cytokines: At The Interface Of Immunology And Endocrinology. **Cellular immunology**, v.252 n1,p. 91-110. 2008.

OPOLOT, J. O., Theron, A. J., Anderson, R., & Feldman, C. Acute Phase Proteins And Stress Hormone Responses In Patients With Newly Diagnosed Active Pulmonary Tuberculosis. **Lung**, v.193 n1,p13-18. 2015.



PALMER, C., Hampartzoumian, T., Lloyd, A., & Zekry, A. A Novel Role For Adiponectin In Regulating The Immune Responses In Chronic Hepatitis C Virus Infection. **Hepatology**, v.48 n 2,p.374-384. 2008.

PASTORINO, A. C., Jacob, C. M., Oselka, G. W., & Carneiro-Sampaio, M. M. Leishmaniose Visceral: Aspectos Clínicos E Laboratoriais. **J Pediatr**,v.78 n.2, 120-7. 2002.

PEDROSA, Célia Maria Silva; ROCHA, Eliana Maria Mauricio da. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos procedentes de Alagoas, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 37, n. 4, p. 300-4, 2004.

PROCACCINI, C., Pucino, V., De Rosa, V., Marone, G., & Matarese, G. Neuro-Endocrine Networks Controlling Immune System In Health And Disease.**Frontiers in immunology**,v. 5. 2014.

PROCACCINI, Claudio; JIRILLO, Emilio; MATARESE, Giuseppe. Leptin as an immunomodulator. **Molecular aspects of medicine**, v. 33, n. 1, p. 35-45, 2012.

QUEIROZ, Márcia JA; ALVES, João GB; CORREIA, Jailson B. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. **J Pediatr**, v. 80, n. 2, p. 141-6, 2004.

ROSAS FILHO, Mário de Souza; SILVEIRA, Fernando Tobias. Epidemiologia, clínica e imunologia da infecção humana por Leishmania (Leishmania) infantum chagasi em área endêmica de leishmaniose visceral no Pará. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, n. 3, p. 7-18, 2007.

SEGATTO, M., Ribeiro, L. S., Costa, D. L., Costa, C. H. N., Oliveira, M. R. D., Carvalho, S. F. G., & Lemos, E. M. Genetic Diversity Of Leishmania Infantum Field Populations From Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107 n1, p.39-47. 2012.

SILVA, A. R. D., Tauil, P. L., Cavalcante, M. N. S., Medeiros, M. N., Pires, B. N., & Gonçalves, E. D. G. D. R. Epidemiological Situation Of Visceral Leishmaniasis On The Island Of São Luis, State Of Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41 n4, p.358-364. 2008.

SILVA, E. D. D., Andrade, L. D. D., Araujo, P. S. R. D., Silveira, V. M., Padilha, C. E., Silva, M. A. L. D., & Medeiros, Z. M. D. Case Study Of A Patient With HIV-AIDS And Visceral Leishmaniasis Co-Infection In Multiple Episodes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.55 n.6, p.425-428. 2013.

SOUSA-GOMES, M. L. D., Maia-Elkhoury, A. N. S., Pelissari, D. M., Lima Junior, F. E. F. D., Sena, J. M. D., & Cechinel, M. P. Coinfecção Leishmania-HIV No Brasil: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos E Laboratoriais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.20 n.4, p.519-526. 2011.

STERNBERG, Esther M. Neural-Immune Interactions In Health And Disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 11, p. 2641, 1997.

TAUB, Dennis D. Neuroendocrine interactions in the immune system. **Cellular immunology**, v. 252, n. 1-2, p. 1, 2008.

TEIXEIRA, M. J., Teixeira, C. R., Andrade, B. B., Barral-Netto, M., & Barral, A. Chemokines In Host-Parasiteinteractions In Leishmaniasis. **Trends in parasitology**, v.22 n.1, p.32-40. 2006.

TONG, Q., Sankalé, J. L., Hadigan, C. M., Tan, G., Rosenberg, E. S., Kanki, P. J., & Hotamisligil, G. S. Regulation Of Adiponectin In Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients: Relationship To Body Composition And Metabolic Indices. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.88 n.4, p.1559-1564. 2003.

VAILLANT, George E.; MUKAMAL, Kenneth. Successful A; in 3. **Stress and the Brain: The Science of Mental Health**, p. 205, 2013.

VAN CREVEL, R., Karyadi, E., Netea, M. G., Verhoef, H., Nelwan, R. H., West, C. E., & van der Meer, J. W. Decreased Plasma Leptin

Concentrations In Tuberculosis Patients Are Associated With Wasting And Inflammation. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.87 n.2, p.758-763. 2002.

VERDE, F. A. L., Verde, F. A. A. L., Neto, A. S., Almeida, P. C., & Verde, E. M. L. Hormonal Disturbances In Visceral Leishmaniasis (Kala-Azar). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.84 n.5, p.668-673. 2011.

**WHO** Library Cataloguing-in-Publication Data Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases, 2013.

**WHO** Library Cataloguing-in-Publication Data: Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee On The Control Of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010.

## ANEXOS

---