

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ-UFPI
MESTRADO EM CIÊNCIAS E SAÚDE

SIMONE SOARES LIMA

IFN- γ , IL-6, CXCL8 E IL-10 SÃO MARCADORES PRECOSES DA
EVOLUÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Teresina

2015

SIMONE SOARES LIMA

**IFN- γ , IL-6, CXCL8 E IL-10 SÃO MARCADORES PRECOSES DA
EVOLUÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Métodos diagnósticos e análise das condições de saúde

Linha de Pesquisa: Investigação para diagnóstico em saúde

Orientadora: Prof^a.Dra. Dorcas Lamounier Costa.

Teresina

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

Prof. Dr. Pedro Vilarinho Castelo Branco

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

COORDENADOR DO MESTRADO EM CIÊNCIAS E SAÚDE

Prof.Dr. Benedito Borges da Silva

SIMONE SOARES LIMA

**IFN- γ , IL-6, CXCL8 E IL-10 SÃO MARCADORES PRECOSES DA
EVOLUÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Métodos diagnósticos e análise das condições de saúde

Linha de Pesquisa: Investigação para diagnóstico em Saúde

Orientadora: Prof^a. Dra. Dorcas Lamounier Costa.

Data da defesa: 29/06/2015.

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Dorcas Lamounier Costa (UFPI)

Presidente

Prof^a. Dra. Aldina Maria Prado Barral (FIOCRUZ/BA)

1^o examinadora

Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa (UFPI)

2^o examinador

Dr. Régis Bernardo Brandim Gomes (FIOCRUZ/PI)

Examinador suplente

DEDICATÓRIA

A **Deus** por abençoar a mim e a minha família com saúde e nos manter unidos.

Ao meu esposo, **Evaldo**, e aos meus filhos **Gabriel, Clara e Daniel**, razões da minha vida, meu porto seguro.

A meus pais, **Cecílio e Maria do Amparo**, por acreditarem que o conhecimento é a maior riqueza que um pai dá ao filho e se esforçarem para que eu tivesse uma boa educação.

A minha irmã, **Sílvia**, uma grande amiga e confidente.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, **Dra. Dorcas Lamounier Costa**, por me presentear com seus ensinamentos e amizade. Um modelo de coragem, ética e altruísmo.

Ao **Dr. Carlos Henrique Nery Costa**, por despertar o desejo pelo conhecimento em seus alunos e por sua luta em transformar o Piauí em um polo de excelência em pesquisa.

Aos meus amigos de pesquisa, em especial **Débora Braz e Teresinha Farias**, amigos que contribuíram de forma crucial para a conclusão dessa dissertação.

Ao programa de mestrado em Ciências e Saúde da Universidade Federal de Piauí, pela oportunidade em desenvolver ciência no nosso Estado e pelos ensinamentos. Aos colegas de turma, em especial a **Adriana Cunha**, pela amizade e incentivo.

Aos colegas de trabalho pela amizade, compreensão e apoio.

Um agradecimento especial **aos pacientes e responsáveis**, por acreditarem na importância da pesquisa para a melhoria do conhecimento e participarem de forma voluntária e, pelo esforço para comparecerem a todas as avaliações.

Aos funcionários do **Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela (IDTNP)**, em especial à **Dona Francisca**, à **Dona Goreth**, à **equipe de enfermagem e do setor de prontuários**, que mesmo com tantos afazeres, contribuíram para que este serviço seja um centro permanente de pesquisas.

APRESENTAÇÃO

O interesse pelo estudo da leishmaniose visceral surgiu durante as atividades acadêmicas de iniciação científica, período que participei de estudos epidemiológicos de campo sobre a ecologia do vetor.

Após a conclusão do curso de medicina, o meu interesse esteve voltado à saúde da população pediátrica, conclui residência médica em pediatria e área de atuação em alergologia e imunologia em Brasília-DF. O retorno à minha cidade natal fez ressurgir o interesse em pesquisas científicas, então contactei os meus professores, Carlos Henrique Nery Costa e Dorcas Lamounier Costa, e participei de projetos de pesquisas antes de iniciar o mestrado em Ciências da Saúde.

Eu colaborei com um estudo multicêntrico para a análise dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral e, durante o período de acompanhamento dos voluntários, surgiu o questionamento de quais fatores poderiam influenciar ou servir como marcadores da evolução da doença. Os estudos desenvolvidos no grupo de pesquisas em leishmanioses da Universidade Federal do Piauí indicando a importância da resposta inflamatória como um marcador de prognóstico da leishmaniose visceral despertaram o meu interesse sobre a importância das citocinas e quimiocinas como marcadores de evolução desta patologia. Decisão tomada, iniciada a revisão bibliográfica e o acompanhamento dos voluntários por seis meses.

Este trabalho foi desenvolvido com recursos do Conselho Nacional de Pesquisas e do Ministério da Saúde.

RESUMO

LIMA, S.S. IFN- γ , IL-6, CXCL8 e IL-10 são marcadores precoces da evolução da leishmaniose visceral. 2015.149f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Saúde). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

Introdução: A leishmaniose visceral (LV) é causada por protozoários intracelulares obrigatórios do complexo *Leishmania donovani*. Na fase aguda da LV ocorrem alterações no sistema imune do hospedeiro com intensa resposta inflamatória e comprometimento da imunidade celular antígeno-específica. Hipotetiza-se que as citocinas e quimiocinas regulem a magnitude dessa resposta imune e estejam associadas à evolução clínica e à resolução da LV.

Objetivos: Avaliar a evolução da atividade inflamatória na LV pelo nível de citocinas desde o diagnóstico até o 180º dia de tratamento e correlacionar os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α e CXCL8 com a evolução clínica e laboratorial da doença. **Pacientes e Métodos:** Estudo de coorte prospectivo, composto por 36 pacientes com LV sintomática. Foi realizada avaliação clínica e laboratorial e dosagem, por citometria de fluxo, dos níveis de IL-1 β , IL-6, CXCL8, IL-10, IL-12 e TNF- α pré- tratamento e no 7º, 14º, 21º, 30º e 180º dias de terapia. Os níveis de IFN- γ foram mensurados pré-tratamento e no 7º, 21º, 30º e 180º dias de terapia. Utilizou-se o equipamento BD FACSCanto™ (Becton Dickinson, USA). **Resultados:** IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e CXCL8 foram mais elevados na fase pré-tratamento da LV ($p < 0,05$). Níveis de IFN- γ , IL-6, IL-10 e CXCL8 foram marcadores precoces da resposta terapêutica na LV, enquanto IL-1 β e TNF- α apresentaram queda mais tardia. CXCL8 associou-se à plaquetopenia; IL-6, CXCL8 e IL-10 à neutropenia e IL-6 aos níveis mais baixos de albumina ($p \leq 0,05$). Níveis mais elevados de IFN- γ antes do tratamento associaram-se ao maior tempo para clareamento da febre ($p=0,04$) e elevados níveis de TNF- α associaram-se a persistência da esplenomegalia no 21º de terapia ($p=0,04$). **Conclusões:** O mesmo padrão de citocinas TH1 e TH2 descritos em pacientes graves com LV existe em uma população homogênea sem sinais de gravidade. IFN- γ , IL-6, CXCL8 e IL-10 são bons marcadores da resposta inicial ao tratamento na LV. Esses resultados sugerem que é possível prever e acompanhar a evolução clínica da LV através de citocinas medidas no início do tratamento.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, *Leishmania*, citocinas, quimiocinas, inflamação.

ABSTRACT

LIMA, S.S. IFN- γ , IL-6, CXCL8 and IL-10 are early markers for visceral leishmaniasis evolution. 2015.149p. Dissertation (Masters in Sciences and Health) Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

Introduction: Visceral leishmaniasis (VL) is caused by the obligate intracellular protozoa from the *Leishmania donovani* complex. During VL acute phase, alterations in the host's immune system take place with intense inflammatory response and commitment of antigen-specific cellular immunity. Hypothesis are that cytokines and chemokines regulate the magnitude of this immune response and are associated to the clinic evolution and VL resolution. **Objectives:** To evaluate the evolution of VL inflammatory activity by cytokine levels, from diagnosis to the 180th day of treatment and to correlate IL-1b, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α and CXCL levels with the disease clinical and laboratory evolution. **Patients and methods:** Prospective cohort study, composed by 36 patients with symptomatic VL. Clinical and laboratory evaluation and dosage were conducted by flow cytometry for IL-1b, IL-6, CXCL8, IL-10, IL-12, and TNF- α pre-treatment levels and in the 7th, 14th, 21st, 30th and 180th therapy days. IFN- γ levels were measured pre-treatment and in the 7th, 21st, 30th and 180th therapy days. BD FACSCanto™ (Becton Dickinson, USA) equipment was used. **Results:** IFN- γ , IL-1b, IL-6, IL-10, TNF-a and CXCL8 levels were higher in VL pre-treatment phase ($p < 0.05$). IFN- γ , IL-6, IL-10 and CXCL8 levels were early markers for VL therapy response, while IL-1b and TNF-a levels presented a delayed decrease. CXCL8 was related to thrombocytopenia; IL-6, CXCL8 and IL-10 were related to neutropenia ($p \leq 0.05$) and IL-6 was related to the lower albumin levels ($p \leq 0.05$). Higher IFN- γ levels before treatment was related to faster fever dissipation time ($p = 0.04$) and higher TNF-a was related to splenomegaly persistence at the 21st therapy day ($p = 0.04$). **Conclusions:** The same TH1 and TH2 cytokine patterns described in severe VL patients is present among homogeneous populations with no severity symptoms. IFN- γ , IL-6, CXCL8 and IL-10 are good markers of the initial response to VL treatment. These results suggest the possibility to predict and follow VL clinical evolution through cytokine measurements at the beginning of the treatment.

Key words: Visceral leishmaniasis, *Leishmania*, cytokines, chemokines, inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pag
FIGURA 01	Diagrama representativo da formação da população de pacientes com leishmaniose visceral na coorte do estudo “IFN- γ , IL-6, CXCL8 e IL-10 são marcadores precoces da evolução da leishmaniose visceral. 2015”. Teresina, 2013-2014..... 61
FIGURA 02	Curva de distribuição do peso em relação à idade de pacientes com leishmaniose visceral. Meninas, zero a vinte e quatro meses de idade. Teresina, 2013-2014..... 63
FIGURA 03	Curva de distribuição do peso em relação à idade de pacientes com leishmaniose visceral. Meninos, zero a vinte e quatro meses de idade. Teresina, 2013-2014..... 64
FIGURA 04	Curva de distribuição do peso em relação à idade de pacientes com leishmaniose visceral. Meninas, dois a 10 anos de idade. Teresina, 2013-2014..... 64
FIGURA 05	Curva de distribuição do peso em relação à idade de pacientes com leishmaniose visceral. Meninos, dois a 10 anos de idade. Teresina, 2013-2014..... 65
FIGURA 06	Curva de distribuição do comprimento em relação à idade de pacientes com leishmaniose visceral. Meninas, zero a 24 meses de idade. Teresina, 2013-2014..... 65
FIGURA 07	Curva de distribuição do comprimento em relação à idade de pacientes com leishmaniose visceral. Meninos, zero a 24 meses de idade. Teresina, 2013-2014..... 66
FIGURA 08	Curva de distribuição da estatura em relação à idade de pacientes com leishmaniose visceral. Meninas, dois a 10 anos de idade. Teresina, 2013-2014..... 66
FIGURA 09	Curva de distribuição da estatura em relação à idade de pacientes com leishmaniose visceral. Meninos, dois a 10 anos de idade. Teresina, 2013-2014..... 67
FIGURA 10	Escores z da altura, peso e peso para altura de pacientes com leishmaniose visceral. Teresina, 2013-2014..... 67

FIGURA 11	Escores z para o índice de massa corporal (IMC) de pacientes, de zero a 19 anos de idade, com leishmaniose visceral. Teresina, 2013-2014.....	68
FIGURA 12	Níveis de hemoglobina (g/dL) segundo a idade em anos de pacientes com leishmaniose visceral. Teresina, 2013-2014.....	74
FIGURA 13	Involução dos sintomas em pacientes com leishmaniose visceral entre o dia zero e o sétimo dia da instituição da terapêutica anti- <i>Leishmania</i> . Teresina, 2013-2014.....	77
FIGURA 14	Involução da extensão esplênica (cm) em pacientes com leishmaniose visceral entre os dias zero e o 180° dia da instituição da terapêutica anti- <i>Leishmania</i> . Teresina, 2013-2014.....	78
FIGURA 15	Involução da extensão hepática (cm) em pacientes com leishmaniose visceral entre os dias zero e 180° dia da instituição da terapêutica anti- <i>Leishmania</i> . Teresina, 2013-2014.....	79
FIGURA 16	Ganho médio nos níveis de hemoglobina (g/dL) em pacientes com leishmaniose visceral entre os dias zero e o 60° dia da instituição da terapêutica anti - <i>Leishmania</i> . Teresina, 2013-2014.....	80
FIGURA 17	Ganho médio nos níveis de neutrófilos/mm ³ em pacientes com leishmaniose visceral entre os dias zero e o 7° dia da terapêutica anti- <i>Leishmania</i> . Teresina, 2013-2014.....	81
FIGURA 18	Ganho médio nos níveis de plaquetas/mm ³ em pacientes com leishmaniose visceral entre os dias zero e o dia sete da instituição da terapêutica anti- <i>Leishmania</i> . Teresina, 2013-2014.....	82
FIGURA 19	Eventos adversos em pacientes com leishmaniose visceral entre os dias zero e o dia cento e oitenta da instituição da terapêutica anti- <i>Leishmania</i> . Teresina, 2013-2014.....	83
FIGURA 20	Eventos adversos laboratoriais em pacientes com leishmaniose visceral entre os dias zero e o 180° dia da instituição da terapêutica anti- <i>Leishmania</i> . Teresina, 2013-2014.....	84

LISTA DE TABELAS

TABELA 01	Características demográficas da população de estudo. Teresina, 2013-2014	62
TABELA 02	Sinais e sintomas mensurados na apresentação clínica inicial dos pacientes com leishmaniose visceral incluídos no estudo “IFN- γ , IL-6, CXCL8 e IL-10 são marcadores precoces da evolução da leishmaniose visceral. 2015”. Teresina, 2013-2014.....	69
TABELA 03	Correlação entre a extensão do baço e do fígado em valores não corrigidos e em valores corrigidos pela superfície corporal com o peso, estatura e idade de pacientes com leishmaniose visceral. Teresina, 2013-2014.....	70
TABELA 04	Correlação entre a extensão do baço e do fígado em valores corrigidos pela superfície corporal com os parâmetros clínicos e laboratoriais de pacientes com leishmaniose visceral. Teresina, 2013-2014.....	71
TABELA 05	Correlação de parâmetros hematológicos com a idade, peso, altura e índice massa corporal de pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapêutica anti- <i>Leishmania</i> . Teresina, 2013-2014.....	73
TABELA 06	Parâmetros hematológicos de pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapêutica anti- <i>Leishmania</i> . Teresina, 2013-2014.....	73
TABELA 07	Caracterização laboratorial de pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapêutica anti- <i>Leishmania</i> . Teresina, 2013-2014.....	75
TABELA 08	Correlação entre níveis da Proteína C Reativa (PCR) quantitativa de alta sensibilidade (mg/L) em pacientes com leishmaniose visceral avaliados antes da instituição da terapêutica anti- <i>Leishmania</i> com parâmetros clínicos e laboratoriais admissionais. Teresina, 2013-2014.....	76

TABELA 09	Extensão esplênica em pacientes com leishmaniose visceral avaliados antes da instituição da terapêutica anti- <i>Leishmania</i> até o 180° dia de terapia. Teresina, 2013-2014.....	78
TABELA 10	Extensão hepática em pacientes com leishmaniose visceral avaliados antes da instituição da terapêutica anti- <i>Leishmania</i> até o 180° dia de terapia. Teresina, 2013-2014.....	79
TABELA 11	Ganho médio da hemoglobina, no 60° dia de terapia, em pacientes com leishmaniose visceral em relação aos níveis de hemoglobina prévios à terapêutica anti- <i>Leishmania</i> , correlação com variáveis individuais e com o tratamento instituído. Teresina, 2013-2014.....	80
TABELA 12	Evolução da função hepática em pacientes com leishmaniose visceral durante a terapia anti- <i>Leishmania</i> . Teresina, 2013-2014.....	83
TABELA 13	Níveis de Interferon- γ (pg/mL) em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti- <i>Leishmania</i> até o dia cento e oitenta de terapia. Teresina, 2013-2014.....	85
TABELA 14	Níveis de Interleucina-10 (pg/mL) em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti- <i>Leishmania</i> até o dia cento e oitenta de terapia. Teresina, 2013-2014.....	85
TABELA 15	Níveis de Interleucina-6 (pg/mL) em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti- <i>Leishmania</i> até o dia cento e oitenta de terapia. Teresina, 2013-2014.....	86
TABELA 16	Níveis de CXCL-8 em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti- <i>Leishmania</i> até o dia cento e oitenta de terapia. Teresina, 2013-2014.....	86
TABELA 17	Níveis de Interleucina-1 β (pg/mL) em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti- <i>Leishmania</i> até o dia cento e oitenta de terapia. Teresina, 2013-2014.....	86
TABELA 18	Níveis de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) (pg/mL) em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti- <i>Leishmania</i> até o dia cento e oitenta de terapia. Teresina, 2013-2014.....	87

TABELA 19	Níveis de Interleucina-12 (pg/mL) em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti- <i>Leishmania</i> até o dia cento e oitenta de terapia. Teresina, 2013-2014.....	87
TABELA 20	Correlação entre o logaritmo dos níveis de citocinas em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti- <i>Leishmania</i> .Teresina, 2013-2014.....	88
TABELA 21	Correlação entre o logaritmo dos níveis de citocinas em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti- <i>Leishmania</i> com os parâmetros clínicos.Teresina, 2013-2014.....	89
TABELA 22	Correlação entre o logaritmo dos níveis admissionais de citocinas com a persistência de hepatomegalia durante a terapia anti- <i>Leishmania</i> em pacientes com leishmaniose visceral. Teresina, 2013-2014.....	89
TABELA 23	Correlação entre o logaritmo dos níveis admissionais de citocinas com a persistência de esplenomegalia durante a terapia anti- <i>Leishmania</i> em pacientes com leishmaniose visceral. Teresina, 2013-2014.....	90
TABELA 24	Correlação entre o logaritmo dos níveis de citocinas em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti- <i>Leishmania</i> com os parâmetros hematológicos.Teresina, 2013-2014.....	91
TABELA 25	Correlação entre o logaritmo dos níveis de citocinas em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti- <i>Leishmania</i> com os parâmetros laboratoriais. Teresina, 2013-2014.....	92

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (<i>Acquired Immunodeficiency syndrome</i>)
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BCD	Bordo costal direito
BCE	Bordo costal esquerdo
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CBA	Cytometric Bead Array
CD4 ⁺	Linfócitos T auxiliares CD4 ⁺
CD8 ⁺	Linfócitos T citotóxicos CD8 ⁺
CEP	Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos
CFC-E	Células formadoras de colônia de eritrócitos
CID	Coagulação intravascular disseminada
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CR1	Receptor do complemento 1
CR3	Receptor do complemento 3
CR4	Receptor do complemento 4
CXCL8	Quimiocina - interleucina 8
DC	Células dendríticas
EDTA	Etilenodiaminotetracético
FADD	Domínio de morte associado ao Fas (Fas-Associated protein with Death Domain)
FasL	Ligante do Fas (<i>Fas ligand</i>)
gp63	Glicoproteína de 63 KDa
GPI	glicosilfosfatidilinositol
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDTNP	Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Subclasse 1 da imunoglobulina G

IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina (citocina)
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida
INR	Razão Normalizada Internacional
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose visceral
LV/HIV	Coinfecção leishmaniose visceral e HIV
MAC	Complexo de ataque a membrana (<i>Membrane Attack Complex</i>).
MBL	Lectina ligante de manose (<i>Mannose-Binding Lectin</i>)
mCDs	Células dendríticas mieloides
MS	Ministério da Saúde
NK	Células natural killer
NNN	Novy-MacNeal-Nicolle
pCDs	Células dendríticas plasmocitoides
PE	Phycoerythrin
PKDL	Leishmaniose dérmica pós-calazar (<i>Post-kala-azar dermal leishmaniasis</i>)
PG	Fosfoglicano
PPD	Derivado proteico purificado
PPG	Proteofosfoglicanos
RIM	Reação Intradérmica de Montenegro
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
ROI	Intermediários reativos do oxigênio (<i>Reactive oxygen intermediates</i>)
rpm	rotações por minuto
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação- MS
SMF	Sistema mononuclear fagocítico
TALE	Termo de assentimento livre e esclarecido
TAX	Temperatura axilar
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- β 1	Fator de crescimento transformador beta 1 (<i>Transforming growth factor beta 1</i>)
T _H 0	linfócitos T naives
T _H 1	Linfócitos T Helper 1

T _H 2	Linfócitos T Helper 2
T _H 17	Linfócitos T Helper 17
TLR9	Receptor semelhante a Toll tipo 9 (<i>Toll-like receptors 9</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor necrosis fator alpha</i>)
TRAIL	Ligante de indução de apoptose relacionado com TNF (<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>)
Tregs	Células T regulatórias
TWEAK	TNF-like fraco indutor de apoptose (<i>TNF-like weak inducer of apoptosis</i>)
TS	Top Standard
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UnB	Universidade de Brasília

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
2.	JUSTIFICATIVA	22
3.	REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1.	Urbanização da leishmaniose visceral.....	23
3.2.	Manifestações clínicas da leishmaniose visceral.....	24
3.3.	Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	27
3.4.	Interação <i>Leishmania</i> – hospedeiro e resposta imune.....	28
3.5.	Citocinas na leishmaniose.....	34
3.6.	Fatores que influenciam o prognóstico da leishmaniose.....	41
4.	OBJETIVOS	43
4.1.	Hipótese.....	43
4.2.	Objetivo primário.....	43
4.3.	Objetivos secundários.....	43
5.	PACIENTES E MÉTODOS	44
5.1.	Área geográfica do estudo.....	44
5.2.	Local da pesquisa	44
5.3.	Considerações éticas.....	45
5.4.	Delineamento do estudo.....	47
5.4.1	Tipos de estudo.....	47
5.4.2	População alvo.....	47
5.4.3	População fonte.....	47
5.4.4	População de estudo.....	47
5.4.5	Critérios de inclusão.....	47
5.4.6	Critérios de exclusão.....	48
5.4.7	Definições.....	48
5.4.8	Considerações sobre a amostra.....	50
5.4.9	Mensuração da exposição.....	50
5.4.9.1	Pacientes.....	50
5.4.9.2	Procedimentos.....	51
5.4.9.3	Exames hematológicos, bioquímicos, imunológicos e parasitológicos....	52
5.4.9.4	Exames complementares gerais.....	52

5.4.9.3.2 Exames complementares específicos para diagnóstico de LV.....	53
5.4.9.3.3 Exames complementares específicos para diagnóstico de infecções.....	54
5.4.9.3.4 Triagem do vírus da imunodeficiência adquirida.....	54
5.4.9.3.5 Dosagem de citocinas.....	54
5.4.9.3.5.1 Protocolo para dosagem de citocinas por citometria de fluxo Kit CBA.....	55
5.4.9.3.5.2 Protocolo para dosagem de IFN- γ por citometria de fluxo Kit CBA flex	56
5.5 Produção e análise de dados.....	58
5.6 Cálculo amostral	58
5.7 Poder da amostra.....	58
6. RESULTADOS.....	60
6.1 Estudo clínico geral.....	62
6.1.1 Características demográficas.....	62
6.1.2 Avaliação nutricional.....	63
6.1.3 Apresentação clínica inicial do paciente com leishmaniose visceral.....	68
6.1.4 Alterações laboratoriais.....	72
6.1.5 Evolução clínica-laboratorial da leishmaniose visceral.....	76
6.1.6 Citocinas.....	84
6.1.6.1 Perfil de citocinas na fase aguda da leishmaniose visceral.....	85
6.1.6.2 Correlação entre os níveis das citocinas.....	87
6.1.6.3 Correlação entre os níveis das citocinas e os sintomas clínicos.....	88
7. DISCUSSÃO.....	93
8. CONCLUSÕES.....	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
ANEXOS.....	124
Parecer do Comitê de Ética da UnB-Estudo fonte.....	124
Parecer do Comitê de Ética da UFPI Estudo fonte.....	125
Parecer do Comitê de Ética da UFPI	126
Termos de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.....	130
TCLE para adultos.....	130
TALE para pacientes de 12 a 17 anos de idade.....	134
TCLE para menores de 18 anos.....	138
Questionário estruturado para informações clínicas.....	142

Cronograma de avaliação laboratorial.....	149
--	------------

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral (LV) é uma infecção sistêmica causada por protozoários do gênero *Leishmania*, complexo *Leishmania donovani*: *L. donovani* (sin. *Leishmania archibaldi*) e *Leishmania infantum* (sin. *L. chagasi*) (MAURICIO *et al.*, 2001; LUKES *et al.*, 2007), parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear (SILVA, J.G. *et al.*, 2007), transmitida pela picada da fêmea do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (LAINSON e RANGEL, 2005). O cão (*Canis familiaris*) é considerado a principal fonte de infecção na área urbana e as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) são os reservatórios silvestres (BRASIL, 2003).

A LV ocorre em 98 países, com 350 milhões de pessoas em risco e com 200.000 a 400.000 novos casos por ano. Os sete países mais afetados - Bangladesh, Brasil, Índia, Etiópia, Quênia, Nepal e Sudão - representam mais de 90% dos novos casos (ALVAR *et al.*, 2012; DNDI, 2013). Na América Latina, o maior número de casos tem sido registrado no Brasil (BRASIL, 2003), onde são apontadas ocorrências de LV em 21 das 27 Unidades Federativas, com destaque para a Região Nordeste, que concentra mais da metade dos casos do país (BRASIL, 2013).

Os pacientes infectados por *Leishmania* podem apresentar desde a infecção oligossintomática ou assintomática (BADARÓ *et al.*, 1986) até o quadro clínico clássico caracterizado pela presença de febre associada à hepatoesplenomegalia, perda ponderal e anemia (BADARÓ *et al.*, 1986; CHAPPUIS *et al.*, 2007; HAILU *et al.*, 2004; MADALOSSO *et al.*, 2012; PASTORINO *et al.*, 2002; PEDROSA e ROCHA, 2004; QUEIROZ *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2011).

A leishmaniose ocorre de forma endêmica em nossa região e pode ser fatal se não tratada. O acometimento de crianças menores de cinco anos de idade (BURZA *et al.*, 2014), idosos (LEITE e ARAÚJO, 2013), pacientes com comorbidades (ALVARENGA *et al.*, 2010; LEITE e ARAÚJO, 2013) ou de pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS-*Acquired Immunodeficiency syndrome*) (ARAÚJO *et al.*, 2012; WHO, 2007) tem elevado o número de óbitos por esta patologia.

A letalidade por LV, no Brasil, é de 7,1% (BRASIL, 2013) com tendência a aumento devido à superposição geográfica com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV- *Human Immunodeficiency Virus*), propiciando o surgimento da coinfeção LV/HIV. A

infecção pelo HIV aumenta o risco de LV em 100 a 1000 vezes, em áreas endêmicas, reduz a probabilidade de resposta terapêutica e aumenta consideravelmente a probabilidade de recidiva (WHO, 2007).

O primeiro caso de AIDS, no Brasil, foi reportado em 1983. De 2001 a 2005, foram reportados 16.210 casos de LV neste país, dos quais em 176 pacientes foi identificado a coinfeção HIV/LV, sendo a região Nordeste responsável por 53% dos casos (WHO, 2007). No Piauí, entre os pacientes hospitalizados com AIDS, foi identificado que 8,2% são coinfectados com LV (SOARES *et al.*, 2008) e 16,8% dos casos evoluem para o óbito (LIMA *et al.*, 2013).

A interação *Leishmania* - hospedeiro humano resulta em alterações no sistema imune humano com comprometimento da imunidade celular antígeno-específica (BACELLAR *et al.*, 1996; CALDAS *et al.*, 2005; CARVALHO, E. *et al.*, 1989; KAUSHAL *et al.*, 2014). Destaca-se a importância das citocinas que atuam regulando esta resposta imune inicial (BARRAL-NETTO *et al.*, 1998) e estão associadas a indução de intensa resposta inflamatória na fase aguda da LV humana (COSTA, D *et al.*, 2013). Ocorrem modificações nos níveis destas proteínas de acordo com a forma de apresentação da leishmaniose (COSTA, A. *et al.*, 2012), com a gravidade da doença (GAMA *et al.*, 2013) ou predisposição à susceptibilidade ou resistência à infecção pela *Leishmania* (PITTA *et al.*, 2009). A resposta inflamatória na LV, ao mesmo tempo em que atua para controlar a infecção pela *Leishmania*, pode relacionar-se também às consequências imunopatológicas desta doença e influenciar a sua evolução e desfecho. Hipotetiza-se que as citocinas e quimiocinas regulem a magnitude dessa resposta imune e estejam associadas à evolução clínica e à resolução da LV.

2 JUSTIFICATIVA

A LV constitui um importante problema de saúde pública, principalmente na região Nordeste, por ser uma doença endêmica nesta região e associar-se às más condições de vida, à pobreza e à desnutrição, além de piorar o prognóstico de pacientes infectados com HIV.

Observa-se uma rápida expansão territorial da leishmaniose, com urbanização progressiva, acometendo diferentes grupos etários e, apesar dos esforços de tratamento seguindo protocolos específicos, observa-se um preocupante aumento da letalidade por LV nos últimos 10 anos.

A infecção por *Leishmania* interfere na resposta imune celular das pessoas acometidas. Hipotetiza-se que as citocinas e quimiocinas, ao ativarem células efetoras e influenciarem a ação de outras citocinas, modulem a magnitude da resposta de linfócitos T e correlacionem-se com a evolução clínica da LV. A identificação das alterações ocorridas no sistema imune, associadas à evolução clínica dos pacientes desde o diagnóstico até o 180º dia de terapia, será uma importante ferramenta como marcador de evolução desta doença.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Urbanização da leishmaniose visceral

Descrita inicialmente como uma doença rural, a LV apresenta urbanização progressiva no Brasil. Iniciado em Teresina, Piauí, Brasil, em 1981, com 55 casos, a urbanização progrediu, no ano seguinte, para outras cidades. Observou-se, neste período, transmissão em áreas completamente urbanizadas, uma rápida propagação no Nordeste, Norte, Centro-oeste e Sudeste, uma maior proporção de casos urbanos em relação aos rurais e o surgimento de surtos epidêmicos com grandes epidemias urbanas ocorrendo em ciclos de 10 anos (COSTA, C., 2008).

Em Fortaleza, Ceará, registou-se um significativo aumento de casos de LV nos últimos anos, com um aumento de 121% na incidência em áreas urbanas entre o período de 2004 e 2006, sem variação significativa nas áreas rurais. O crescimento desordenado da população na periferia das cidades, sem condições de saneamento adequados, além do deslocamento dos pacientes para a capital à procura de diagnóstico e tratamento são fatores que podem ter contribuído para a urbanização da LV em Fortaleza (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009).

A análise da epidemia de LV em Teresina, no período de 1993 a 1996, despertou a atenção para a importância das condições socioeconômicas da população como fatores que potencializam a associação entre a infecção canina, vetor e o acometimento humano pela *Leishmania*. Os cães são mais susceptíveis e desenvolvem a doença antes dos humanos, no entanto, a transmissão é potencializada pelas condições precárias de moradia, com aglomerações que facilitam a ação do vetor. Ressalta-se que a estratégia de matar cães para reduzir a incidência de LV humana tem-se mostrado ineficaz, questionando a presença de outros fatores, além do cão, nessa interação flebótomo infectado-LV humana (WERNECK *et al.*, 2006, 2008, 2014).

É descrito que moradias com relato de pelo menos um cão soropositivo para *Leishmania*, recolhido pela equipe de controle de zoonoses, nos últimos doze meses, apresenta correlação positiva com o encontro atual de cães soropositivos. A probabilidade de cão infectado, nestas moradias, aumenta em cinco vezes em relação às habitações onde previamente não havia cães infectados, ressaltando a importância das condições ambientais, sanitárias e socioeconômicas nesta relação (SILVA, J.P. *et al.*, 2012;). Foi demonstrado, também, que o risco de adquirir a doença está associado a condições de residência com esgotamento sanitário inadequado e coleta de lixo irregular (COSTA, C. *et al.*, 2005).

3.2 Manifestações clínicas da leishmaniose visceral

A interação entre a *Leishmania* e a resposta imune do hospedeiro pode resultar em manifestações clínicas diversas, desde a apresentação assintomática até infecção grave com risco de óbito. O quadro clássico caracteriza-se pela presença de febre, caquexia, hepatoesplenomegalia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia com hipoalbuminemia. (HERWALDT, 1999) com resposta de hipersensibilidade tardia (Reação Intradérmica de Montenegro-RIM) negativa e presença de resposta humoral, enquanto a infecção assintomática caracteriza-se pela presença de RIM positiva e ausência de resposta humoral (COSTA, C. *et al.*, 2002; ROSAS FILHO e SILVEIRA, 2007).

A LV acomete principalmente o sexo masculino e crianças menores de 10 anos (BARATA *et al.*, 2013; MADALOSSO *et al.*, 2012;) ou até os 12 anos (NUNES *et al.*, 2010), embora a maioria das pessoas infectadas nunca desenvolva a forma ativa da doença, parecendo haver influência de fatores genéticos (FRADE, 2011; JERONIMO *et al.*, 2007) e nutricionais (ANSTEAD *et al.*, 2001) na susceptibilidade ao desenvolvimento da doença.

Em áreas endêmicas, a infecção assintomática é a principal apresentação clínica da LV (SILVEIRA *et al.*, 2010), que se apresenta com mínima hepatomegalia e, em alguns pacientes, associada a episódios leves de diarreia ou sem determinar alterações ao exame físico (BADARÓ *et al.*, 1986).

Na apresentação subclínica da LV, a hepatomegalia pode persistir por um período prolongado, aproximadamente 3 anos, associada a sintomas constitucionais leves e intermitentes como febre baixa, tosse, mal-estar, diarreia e diminuição da atividade. Poucos pacientes desenvolvem esplenomegalia e, raramente, ocorre anemia, leucopenia, hipergamaglobulinemia ou diminuição importante do ganho ponderal. Na maioria das pessoas infectadas, ocorre resolução da infecção sem a necessidade de terapia específica anti-*Leishmania* (BADARÓ *et al.*, 1986). A presença de febre associada à hepatomegalia, hiperglobulinemia e aumento da velocidade de hemossedimentação são considerados manifestações inespecíficas relacionadas à LV aguda e podem predizer a forma oligossintomática dessa doença, enquanto a presença de esplenomegalia associada à leucopenia ocorre em quase 100% dos pacientes com LV aguda e caracteriza a forma sintomática desta infecção (GAMA *et al.*, 2004).

Na apresentação clínica clássica, após um período de incubação que varia de 10 dias a 2 anos, com média de 2 a 6 meses, iniciam-se as manifestações de inflamação sistêmica, destacando-se como as manifestações clínicas mais frequentemente encontradas a

hepatomegalia, a esplenomegalia, a febre, emagrecimento e a palidez (BADARÓ *et al.*, 1986; CHAPPUIS, 2007; HAILU *et al.*, 2004; MADALOSSO *et al.*, 2012; PASTORINO *et al.*, 2002; PEDROSA e ROCHA, 2004; QUEIROZ *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2011). A febre ocorre tipicamente à noite, associada à taquicardia e sem sinais de toxemia. Diarreia e tosse são frequentes. São descritos também a presença de hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia policlonal - imunoglobulinas G (IgG) e M (IgM) (AWASTHI *et al.*, 2004).

O fígado apresenta-se firme e liso, com aumento difuso de seu volume, estendendo-se em média até 4 a 6 cm do bordo costal direito (BCD) (REY, 2014). Entre as alterações histopatológicas hepáticas descritas em pacientes com LV, destacaram-se a presença de importante hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer, muitas delas repletas de amastigotas. Observou-se, também, espaço-porta alargado e infiltrado inflamatório mononuclear crônico nos espaços periportal e lobular, além de nódulos irregulares esparsamente distribuídos. Destacam-se a presença de degeneração *Ballooning* dos hepatócitos e fibrose pericelular e das vênulas hepáticas terminais que são comumente descritos em pacientes com LV (DUARTE e CORBETT, 1987; El HAG *et al.*, 1994; REY, 2014).

São descritas, também, alterações de marcadores de função hepática. Ocorre aumento das aminotransferases que se elevam em duas a três vezes em relação aos valores de normalidade e elevação dos níveis de bilirrubinas. Observa-se diminuição da atividade da protrombina e aumento dos níveis de globulinas, enquanto os níveis de albumina permanecem normais ou diminuídos, o que determina a inversão da relação albumina /globulina. Essas alterações podem ser leves, como pode haver evolução para o quadro de insuficiência hepática (BADARÓ *et al.*, 1986; BRASIL, 2003; REY, 2014). Ressalta-se que o comprometimento da função hepática, principalmente a presença de icterícia ou a presença de alterações de fatores de coagulação são marcadores relacionados a um pior prognóstico na LV aguda (COSTA, D., 2009; MADALOSSO *et al.*, 2012; WERNECK *et al.*, 2003)

Na forma clínica aguda clássica, o baço é firme, palpável no nível ou abaixo da cicatriz umbilical que corresponde em média a 8 a 10 cm do bordo costal esquerdo (BCE) (REY, 2014). A análise morfológica do baço evidencia redução significativa no tamanho da área de polpa branca, presença de áreas de necrose e fibrose em áreas timo-dependentes e acúmulo de histiócitos contendo parasitos, além de hiperplasia de células plasmáticas. Observou-se depleção linfocitária em áreas timo-dependentes, mesmo em pacientes com número normal de linfócitos no sangue periférico, sugerindo que as anormalidades observadas no baço precedem ou são mais evidentes do que as observadas no sangue (VERESS, B., *et al.*, 1977). O aspecto dos folículos linfóides variou de atrofia a hiperplasia folicular nos pacientes analisados, o que

foi justificado pela hipótese que no início da doença houvesse hiperplasia e com o decorrer da LV evoluísse para atrofia (CARVALHO, E. *et al.*,1985). É descrito que o baço é o maior reservatório de células parasitadas do sistema retículo endotelial e que a esplenectomia deve ser considerada uma opção terapêutica para os casos refratários ao tratamento (DUTRA *et al.*, 2012).

Entre as alterações hematológicas destacam-se a anemia, a plaquetopenia e a leucopenia (AGRAWAL *et al.*,2013; CHAKRABARTI *et al.*, 2013; HAMID e GOBAH, 2009; NAEEM *et al.*, 2014; PREETI *et al.*, 2013). Os achados em relação à morfologia das hemácias divergem entre os estudos, vê-se desde a predominância de hemácias hipocrômicas com microcitose (AL-JURAYYAN *et al.*, 1995) até a anemia normocrômica e normocítica ou hipocrômica com anisocitose (AGRAWAL *et al.*,2013). A diminuição dos leucócitos ocorre precocemente, associada à linfocitose relativa com neutropenia e quase completa ausência de eosinófilos. A plaquetopenia é normalmente justificada pelo sequestro esplênico e a contagem de plaquetas é comumente afetada após longa duração da doença. O diagnóstico diferencial com a anemia aplásica faz-se pela presença de reticulócitos e células brancas jovens que indicam regeneração contínua da medula óssea (VARMA e NASEEM, 2010).

É descrito que a maioria dos pacientes apresenta aumento da celularidade da medula óssea (AL-JURAYYAN *et al.*,1995; CHAKRABARTI *et al.*, 2013), embora seja identificado, também, predomínio de medula óssea normocelular (CASTRO, 2011) ou hipocelular em pacientes com LV (AGRAWAL *et al.*,2013). Ao avaliar a associação entre as alterações morfológicas na medula óssea com a carga parasitária em pacientes com LV, não foi demonstrada associação desta última com a celularidade medular, com a presença de granuloma ou com o risco de óbito. No entanto, a carga parasitária apresentou correlação positiva com a presença de hemofagocitose e com neutropenia grave e correlação negativa com a diseritropoese medular. A presença de granuloma esteve associada ao baixo risco de óbito, o que pode ser justificado por este representar uma resposta imune celular o que contribui para o controle da doença (CASTRO, 2011).

Sene (2013), em análise de pacientes com LV sintomática em área endêmica, evidenciou que ocorre diminuição significativa na concentração de hemoglobina com o aumento da carga parasitária e que a parasitemia apresenta correlação negativa com o número de neutrófilos no sangue periférico, dados justificados como consequência da resposta inflamatória induzida pelo parasito.

A avaliação da cura na LV obedece principalmente aos critérios clínicos. Espera-se que a defervescência da febre ocorra em até cinco dias do início da medicação anti-*Leishmania*,

enquanto a involução da hepatoesplenomegalia é esperada nas primeiras semanas, com redução de 40% ou mais da extensão do baço ao final do tratamento. A partir da segunda semana, observa-se melhora dos níveis de hemoglobina e números de leucócitos, além da melhora do estado geral e retorno do apetite, que ocorrem de forma progressiva. O seguimento dos pacientes com LV aguda recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil é a realização de consultas ambulatoriais no terceiro, sexto e 12º meses após o início da terapia (BRASIL, 2003).

3.3 Ciclo de vida da *Leishmania*

A *Leishmania*, durante seu ciclo de vida, apresenta duas formas evolutivas distintas: a amastigota, forma ovoide com flagelo não exteriorizado que habita as células do sistema mononuclear fagocítico (SMF) do hospedeiro vertebrado e a promastigota, que se localiza no intestino do inseto vetor e apresenta corpo alongado e flagelo livre (MICHALICK, 2005).

As fêmeas de flebotomíneos, do gênero *Lutzomyia*, durante o repasto sanguíneo, ingerem macrófagos infectados com amastigotas, que sofrem várias alterações morfofuncionais à medida que migram no intestino do vetor visando garantir a sua sobrevivência. A primeira transformação é em formas replicativas com pouca motilidade e flagelo curto - promastigotas procíclicas. Após 48-72 horas, inicia um estágio de replicação lenta e com forte motilidade - promastigotas nectomonadas, que se movem em direção ao intestino anterior e transformam-se em leptomonadas e, por fim, a forma infecciosa promastigota metacíclica que será inoculada no tecido do hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo. Esta se localiza nas porções mais anteriores do tubo digestivo e é altamente adaptada a sobreviver no hospedeiro mamífero (WALTERS *et al.*, 1989; DOSTÁLOVÁ e VOLF, 2012).

Moléculas de superfície das *Leishmanias* modificam sua composição de acordo com a fase de desenvolvimento do parasito e têm participação importante na relação parasito-hospedeiro, estão implicadas em muitos passos no estabelecimento da infecção macrofágica contribuindo para a sobrevivência da *Leishmania*, além de influenciar na virulência, infecciosidade e patogênese (MICHALICK, 2005). Promastigotas são cobertas por glicocálix que é mais espesso nas formas metacíclicas que nas procíclicas e quase completamente ausente nas amastigotas. Este revestimento compreende glicoproteínas e outras espécies glicosiladas, como lipofosfoglicano (LPG), proteofosfoglicanos (PPG) e a metaloproteinase gp63, as quais estão ancoradas à membrana da superfície por meio de âncoras lipídicas glicosilfosfatidilinositol (GPI) (FRANCO *et al.*, 2012; OLIVIER *et al.*, 2005). No inseto vetor, esse denso glicocálix formado por LPG e PPG protege a *Leishmania* contra a ação de enzimas intestinais hidrolíticas,

bloqueia a liberação de proteases do intestino médio do hospedeiro invertebrado, além de contribuir com a fixação das promastigotas na parede do intestino médio, evitando sua excreção com o sangue digerido (FRANCO *et al.*, 2012).

A molécula de superfície dominante é o complexo lipofosfoliglicano, o LPG, que é expresso em altos níveis em todas espécies de *Leishmania* que são patogênicas para o ser humano, apresentando estrutura superior nas formas metacíclicas e praticamente nula nas amastigotas (McCONVILLE *et al.*, 2002). O LPG contribui para a sobrevivência da *Leishmania* no hospedeiro vertebrado ao proteger as formas promastigotas da lise mediada pelo complemento e da hidrólise extracelular, inibir a resposta oxidativa dos macrófagos, evadir da fusão fagossomo-lisossomo e inibir a proteína C quinase (FERGUSON, 1997; McMONVILLE e FERGUSON, 1993; McCONVILLE *et al.*, 2002; WILSON *et al.*, 2005). Destacam-se, também, as glicoinositolfosfolipídeos, moléculas expressas em todos os estágios do ciclo de vida da *Leishmania* e dez vezes mais abundantes que o LPG. Elas auxiliam no mecanismo de escape durante a interação com macrófagos ao exibirem efeito inibitório na produção de óxido nítrico e na indução de citocinas, principalmente interleucina 12 (IL-12) (ASSIS *et al.*, 2012).

Outra importante molécula de superfície é a glicoproteína de 63 KDa (gp63), uma metaloproteinase que atua como ligante para ligação intercelular e favorece a multiplicação de promastigotas (PANDEY *et al.*, 2004), além de degradar imunoglobulinas, inibir proteínas lisossomais, inibir a lise mediada pelo complemento e promover a captura do parasito pela clivagem da proteína do complexo C3b a sua forma inativa iC3b (AWASTHI *et al.*, 2004).

3.4 Interação *Leishmania* – hospedeiro e resposta imune

A resposta imune inicial do hospedeiro humano após a inoculação da *Leishmania* é um dos fatores determinantes para a evolução da doença, visto que este parasita possui várias estratégias para modular a resposta imune e escapar dos mecanismos iniciais de defesa humana (OLIVIER *et al.*, 2005; de ALMEIDA *et al.*, 2003).

Quando a fêmea do flebótomo lacera o tecido do hospedeiro para se alimentar, induz um intenso infiltrado inflamatório na pele. As formas promastigotas inoculadas são capturadas pelos neutrófilos, que são rapidamente recrutados para o local da picada do vetor (PETERS *et al.*, 2008; FALCÃO *et al.*, 2015). No entanto, os neutrófilos não destroem os parasitos, entram em apoptose e são fagocitados pelos macrófagos. Como não ocorre interação direta entre os parasitos intracelulares dos neutrófilos e os receptores de superfície dos

macrófagos, nenhum mecanismo efetor é ativado contra as *Leishmanias*. Os neutrófilos comportam-se, portanto, como “Cavalos de Tróia”, servem como células hospedeiras temporárias da *Leishmania* e entram em apoptose, facilitando sua entrada silenciosa nos macrófagos (ZANDBERGEN *et al.*, 2004). As promastigotas são, então, fagocitadas pelos macrófagos da pele onde se transformam em formas amastigotas e iniciam a multiplicação intracelular (PEARSON *et al.*, 1981).

Componentes da saliva de *Lutzomyia longipalpis* também participam desta resposta imune inicial, potencializando o recrutamento de macrófagos para facilitar a entrada da *Leishmania* nas células do hospedeiro (TEIXEIRA *et al.*, 2005), além de estimularem a apoptose, a produção de prostaglandina e diminuir a geração de intermediários reativos do oxigênio (ROI- *Reactive oxygen intermediates*) de neutrófilos infectados (PRATES *et al.*, 2011).

A entrada das promastigotas nos macrófagos depende de um mecanismo eficaz de evasão da lise mediada pelo complemento. Esse sistema é um importante mecanismo efetor da imunidade inata que tem como principais funções promover a fagocitose e / ou lise de microrganismos nos quais o complemento está ativado, além de estimular a inflamação. O evento inicial para sua ativação é a proteólise do terceiro componente do complemento, a proteína C3, para gerar produtos biologicamente ativos, seguida pela ligação covalente de C3b, um produto de C3, às superfícies das células microbianas ou aos anticorpos ligados aos antígenos. Todas as funções biológicas do complemento são dependentes desta clivagem proteolítica e a fase final efetora dessa cascata, independente da via inicial de ativação, será sempre a mesma e culminará com a formação do complexo de ataque à membrana (MAC - *Membrane Attack Complex*). Este se liga ao agente infectante e induz formação de poros em suas membranas plasmáticas que permitem o livre acesso de água e íons com consequente ruptura osmótica do parasito (ABBAS, 2008c).

Estudos, *in vitro*, demonstram ativação simultânea da via clássica e alternativa do complemento pela *Leishmania*, com rápido início da ligação Promastigota-C3, atingindo o máximo em 2 a 3 minutos pela via clássica (DOMINGUEZ *et al.*, 2002). Promastigotas de *Leishmania amazonensis* inoculadas em camundongos nos quais o complemento foi inativado apresentam significante decréscimo da resposta inflamatória e maior número de parasitos no sétimo dia da infecção, indicando que complemento é importante no controle do parasito na fase inicial da infecção (LAURENTI *et al.*, 2004).

As glicoproteínas de superfície LPG e gp63 são capazes de ativar as etapas iniciais da cascata do complemento sem induzir a formação do MAC. A metaloproteinase gp63 converte

a opsonina C3b a sua forma inativa iC3b prevenindo a formação da C5 convertase, evento iniciador das etapas finais do complemento, evitando a lise do parasito. Estas opsoninas ligam-se à superfície da *Leishmania* e induzem a fagocitose via receptores de complemento tipo 1 (CR1) e tipo 3 (CR3) (SHARMA e SINGH, 2009). Esse processo de opsonização via receptores CR1 e CR3 é considerado um importante mecanismo de entrada silenciosa da *Leishmania* no macrófago, pois não ativa a resposta oxidativa dos macrófagos, nem induz a produção de IL-12. Receptores CR4, receptor manose-frutose, receptor de fibronectina, receptor de produtos finais de glicosilação avançada, receptor de proteína C reativa e receptor Fc também foram identificados neste processo, mas o principal ligante de macrófagos para promastigotas maduros é o receptor CR1 (ALEXANDER *et al.*, 1999).

Outra modificação que facilita o escape do sistema imune é o maior comprimento do LPG nas promastigotas metacíclicas, as quais possuem duas vezes mais unidades de repetição fosfoglicano (PG) que as formas procíclicas, tornando-as resistentes à formação de poros em sua superfície induzido pelo MAC. Ocorre, então, a ativação das etapas iniciais do complemento, sem ocorrer a lise osmótica da *Leishmania* (FRANCO *et al.*, 2012).

Um importante opsonina que interfere na infectividade da *Leishmania* é a lectina ligante de manose (MBL-*Mannose-Binding Lectin*), uma proteína plasmática que reconhece resíduos terminais de manose, que são tipicamente encontrados em glicoproteínas e glicolípídeos da superfície de células microbianas, incluindo a *Leishmania*, atuando como um receptor solúvel de reconhecimento de padrão que se liga às células microbianas (ABBAS, 2008b; GREEN *et al.*, 1994; JACK e TURNER, 2003; EVANS-OSES *et al.*, 2013). É descrito que níveis de MBL são significativamente mais elevados em indivíduos com história de LV que nos assintomáticos e nos saudáveis. Observa-se, ainda, que monócitos infectados por promastigotas de *L. chagasi* opsonizadas com MBL secretam níveis mais elevados de interleucina seis (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α - *Tumor necrosis factor alpha*), sem interferir na produção da interleucina um alfa (IL-1 α), IL-10 ou IL-12, o que sugere que a MBL pode modular o perfil de citocinas secretado pelos monócitos infectados e influenciar no desenvolvimento de LV (SANTOS, I. *et al.*, 2001).

Foi detectado que pacientes com LV apresentam maior frequência de genótipos resultando em elevados níveis de MBL que o constatado em indivíduos assintomáticos ou saudáveis e que este genótipo esteve associado a presença de complicações no curso da infecção por *Leishmania chagasi* (ALONSO *et al.*, 2007). Estudo, no Iran, obteve resultados semelhantes em pacientes com infecção por *L. infantum* que apresentaram maior frequência de genótipos com elevada concentração de MBL que os controles saudáveis, o que infere que a

baixa expressão genotípica MBL pode ser associada à proteção contra a LV (ASGHARZADEH *et al.*, 2007).

A resistência inicial à infecção por *Leishmania* depende da interação dos componentes do sistema imunológico natural humano. As principais células efetoras desta imunidade inata são os neutrófilos, os fagócitos mononucleares (monócitos e macrófagos) e as células natural killer (NK). Estas últimas, além de destruírem as células infectadas diretamente, são uma importante fonte de produção de IFN- γ , que ativa macrófagos para destruir os patógenos fagocitados (ABBAS, 2008b; CRUVINEL *et al.*, 2010). Estudos em ratos infectados com *Leishmania major*, através de análise imuno-histoquímica e exames de imagem intravital, evidenciam que as células NK localizam-se em áreas estratégicas dos linfonodos onde interagem com células dendríticas (DC). A infecção por *L major* induz maior recrutamento de células NK para os linfonodos e as ativam a secretar IFN- γ . Essa interação pode influenciar a resposta imune adaptativa envolvendo células dendríticas e sua interação com linfócitos T (BAJENOFF *et al.*, 2006). Análise de promastigotas de *L. amazonensis* (in vitro) confirmam ativação mútua entre NK e células dendríticas e que esta parece ser dependente do contato intercelular (SANABRIA *et al.*, 2008).

Promastigotas de *Leishmania infantum*, *in vivo*, via receptor semelhante a Toll tipo 9 (TLR9 - *Toll-like receptors*), estimulam células dendríticas plasmocitoides (pCDs) e mieloides (mCDs) a produzirem IL-12. Tanto a depleção de TLR9 como de mCDs abolem a citotoxicidade mediada por NK e a produção de IFN- γ , enquanto a ablação da subpopulação plasmocitoide não modifica a ativação destas. Considerando que as formas mieloides são produtoras mais potentes de IL-12, confirma-se a importância dessa citocina associada às mCDs e à TLR9 para ativação de células NK na LV (SCHLEICHER *et al.*, 2007).

Guillerey e colaboradores (2012) desenvolveram estudo com modelo de camundongo onde as pCDs foram suprimidas. Demonstrou que as pCDs têm um papel crucial na indução da atividade de células NK e na produção de quimiocinas, mediado via TLR9, ratificando a importância das células dendríticas, via TLR9, na indução da resposta imune inata e na inflamação.

Após evadir dos mecanismos imunes supracitados, a promastigota metacíclica é internalizada no fagossomo, onde ocorre a conversão para forma amastigota, forma mais adaptada ao pH ácido do meio (BARROS *et al.*, 2012; CASTELLANO, 2005). A LPG propicia, então, um atraso na maturação do fagossomo e inibe a fusão fagossomo-lisossomo como uma estratégia para adquirir o tempo necessário para essa diferenciação em uma forma mais resistente ao meio lisossomal, protegendo as promastigotas da degradação hidrolítica

(DESJARDINS e DESCOTEAUX, 1997; SWANSON e FERNANDEZ-MOREIRA, 2002). Se o fagolisossomo for formado, a proteção a *Leishmania* dependerá da atuação da protease gp63 que inibirá as enzimas líticas produzidas no fagolisossomo (AWASTHI *et al.*, 2004; BARROS *et al.*, 2012). Os LPGs também inibem a atividade hidrolítica das enzimas lisossomais, além de inibirem a atividade oxidativa dos macrófagos (AWASTHI *et al.*, 2004; BARROS *et al.*, 2012; SHARMA e SINGH, 2009; WILSON *et al.*, 2005).

No interior do fagolisossomo, ocorre a redução do oxigênio em ROI pelo mecanismo denominado explosão respiratória e, através da enzima óxido nítrico sintase induzida (Inos), a produção de intermediários reativos do nitrogênio, como o óxido nítrico. Esses radicais livres são importantes na atividade leishmaniscida dos macrófagos (CRUVINEL *et al.*, 2010; MURRAY e NATHAN, 1999; OLIVIER *et al.*, 2005)

É descrito, em modelo murino, que a expressão da iNOS pelos macrófagos infectados por *Leishmania* induzida pelas células NK, independe do contato entre essas duas células, mas está relacionado à estimulação por IFN- γ e pelo fator de necrose tumoral (TNF- *Tumor necrosis factor*), sugerindo que o principal mecanismo efetor da atividade leishmaniscida dos macrófagos, em murinos, é dependente de produtos solúveis das células NK (PRAJEETH *et al.*, 2011).

Estudo em murinos infectados com *Leishmania chagasi* encontrou elevados níveis de TNF- α no início da infecção, indicando ativação macrofágica concomitante com a diminuição das amastigotas intracelulares seguido por aumento de IL-10. Foi observado também aumento na produção de óxido nítrico, concomitante com a elevação das transaminases hepáticas e da desidrogenase láctica, enquanto a inibição da explosão respiratória e o uso de inibidores da iNOS inibiram os danos nos hepatócitos, o que sugere que os efeitos citotóxicos intracelulares induzidos por macrófagos para a destruição da *Leishmania* podem contribuir para o dano hepático e que o óxido nítrico tem um papel importante neste dano (COSTA, J. *et al.*, 2007).

Entre os mecanismos de escape descritos, destacam-se a presença do LPG, que protege promastigotas de elevação transitória nos níveis de ROI (SPATH *et al.*, 2003) e a existência de promastigotas de *Leishmania chagasi* naturalmente resistentes ao óxido nítrico, descrita em estudo em modelos murinos, os quais potencializam a capacidade deste patógeno em resistir aos mecanismos microbicidas macrofágicos (SANTOS, P. *et al.*, 2012).

As *Leishmanias* possuem, também, uma grande quantidade de proteases, entre elas a catepsina B, que está implicada na clivagem do fator de crescimento transformador beta um (TGF- β 1- *Transforming growth factor beta 1*) em sua forma biologicamente ativa

(SOMANNA *et al.*, 2002). É descrito que concentrações fisiológicas de TGF- β inibem a morte de *L.chagasi* em macrófagos (GANNT *et al.*, 2003) e que esta citocina, *in vitro*, além de inibir o mecanismo de controle macrofágico à infecção por *L.braziliensis*, está relacionada, *in vivo*, a uma menor expressão do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) para IFN- γ e IL-2 e a um aumento na expressão de IL-10 (BARRAL *et al.*, 1993). Esses dados sugerem a importância de TGF- β como moduladora da resposta imune à infecção por *Leishmania* e da catepsina B como um dos mecanismos de escape deste parasita.

O papel dos linfócitos B e imunoglobulinas na resposta imune à *Leishmania* é controverso e pouco compreendido, no entanto esses anticorpos podem servir como marcadores de recidiva ou infecção. Foi observado que camundongos mutantes deficientes de linfócitos B maduros apresentavam maior resistência à infecção por *L. donovani* com maior número de granulomas hepáticos e rápido clearance do parasito, entretanto detectou-se maior resposta inflamatória, associado à presença de grande número de neutrófilos no fígado e baço, e consequente maior dano hepático (SMELT *et al.*, 2000).

Foram detectados níveis mais elevados de anticorpos anti-*Leishmania* IgG subclasses 1, 3 e 4 (IgG1, IgG3 e IgG4, respectivamente), principalmente IgG1 em pacientes com LV, em relação aos controles saudáveis e aos pacientes com infecção subclínica, além disso a resposta imune dos pacientes curados foi semelhante aos controles saudáveis, indicando a necessidade de estudos para comprovar a importância de níveis elevados de IgG1 como marcador de prognóstico da progressão do estado subclínico para forma ativa da doença (HAILU *et al.*, 2001).

Bhattacharyya e colaboradores (2014) evidenciaram níveis elevados de IgG1 anti-*Leishmania* durante a LV ativa e nas recidivas, com queda lenta, sem redução significativa aos 30 dias e com declínio drástico aos 6 meses de tratamento, sugerindo que a persistência de valores elevados de IgG1 anti-*Leishmania* após esse período pode ser um marcador de falha terapêutica ou recaída. Essa tendência de IgG1 foi parcialmente espelhada por IgG3, mas com níveis bem menores, enquanto perfil baixo de IgG2 e ausente de IgG4.

Foi descrito, na fase aguda da LV, a presença de anticorpos anti-*Leishmania* IgG1 e IgG3, modesta produção de IgG4 e nenhum aumento de IgG2, concomitante com elevados níveis de IFN- γ e IL-10 e mínima produção, *in vitro*, de IFN- γ por células mononucleares do sangue periférico estimuladas por antígeno *Leishmania* (CALDAS *et al.*, 2005). A IL-10 atua como um fator que induz os linfócitos B à produção de IgG1 e IgG3 (BRIÈRE *et al.*, 1994), enquanto o IFN- γ está associado à produção de IgG2 por estas células (KAWANO e NOMA, 1996). Os elevados níveis de IgG1 e IgG3 podem indicar a atividade de

IL-10 nesta fase, enquanto a ausência de detecção de IgG2 e a pobre atividade proliferativa de IFN- γ inferem a pobre atividade de IFN- γ na LV antes do tratamento (CALDAS *et al.*, 2005). Esses dados sugerem que a produção de subclasses de IgG podem refletir a atividade das citocinas durante a fase aguda da LV.

O papel dos linfócitos T CD8⁺ no controle da LV também não é claro. A persistência de níveis constantes dessas células nos granulomas hepáticos até a 18^o semana da inoculação de *L.donovani* em camundongos, após o declínio nos níveis de linfócitos T CD4⁺, sugere a participação dos linfócitos T CD8⁺ como efetoras na citotoxicidade contra a *Leishmania* (McELRATH *et al.*, 1988).

Análise de indivíduos assintomáticos e curados de infecção por *L infantum*, na França, sugeriu a participação linfócitos T CD8⁺ no controle da infecção na população assintomática (MARY *et al.*, 1999). Estudo posterior, na Índia, ratificou a importância das células T CD8⁺ na imunidade contra *Leishmania*, ao observar significativa proporção de linfócitos T CD8⁺ ativados no grupo de paciente curados em relação aos pacientes com LV ativa indicando um possível papel de linfócitos T CD8⁺ na resistência à infecção por *Leishmania* (KAUSHAL *et al.*, 2014).

A *Leishmania* induz a uma imunodepressão antígeno-específica (BACELLAR *et al.*, 1996; CALDAS *et al.*, 2005; CARVALHO, E. *et al.*, 1989; GOTO e LINDOSO, 2004; KAUSHAL *et al.*, 2014) evidenciada pela falha de linfócitos em responderem à estimulação, *in vitro*, pelo antígeno *Leishmania* na fase aguda da doença associada à ausência de resposta de hipersensibilidade tardia a este antígeno e à presença de elevados títulos de anticorpos (BADARÓ *et al.*, 1985). Não ocorre, no entanto, alteração na resposta de hipersensibilidade tardia em resposta a injeção intradérmica do derivado proteico purificado (PPD), o que indica que a imunossupressão é específica para o antígeno de *Leishmania* (FLORA *et al.*, 2014).

3.5 Citocinas na leishmaniose

Citocinas são proteínas produzidas por diversos tipos celulares em resposta a microrganismos e outros antígenos. Atuam em concentrações baixíssimas e de forma pleiotrópica e redundante, influenciando a síntese e ação de outras citocinas. Essas características permitem-nas fazer a ligação entre a imunidade inata e adquirida, contribuir para especialização da resposta imune ao ativar diferentes células efetoras, além de regular a magnitude desta resposta. A sua produção ou ação excessiva tem papel significativo na resposta

imune humana, desencadeando ou agravando diversas patologias (ABBAS, 2008a; BILATE, 2007; VARELLA e FORTE, 2001).

As citocinas influenciam também a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ auxiliares em subconjuntos de células efetoras que se diferenciam em linfócitos T helper 1 (T_H1), 2 (T_H2) ou 17 (T_H17) de acordo com o perfil de citocinas que produzem. A resposta T_H1 é essencial para o controle de patógenos intracelulares e caracteriza-se pela produção de grande quantidade de IL-2 e por induzir a proliferação e aumentar a capacidade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺. Tem como citocina de assinatura o IFN- γ , que induz uma retroalimentação positiva induzindo linfócitos T naives (T_H0) a diferenciarem-se no perfil T_H1, além de inibir a via T_H2. Os linfócitos T_H2 produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 e este perfil relaciona-se à resposta a doenças alérgicas e infecções por helmintos. As citocinas IL-4 e IL-5 são quem definem a resposta T_H2. A primeira também induz retroalimentação positiva T_H2 e suprime T_H1, enquanto os linfócitos T_H17 produzem IL-22, IL-26 e citocinas da família IL-17 que são potentes indutoras da inflamação (ABBAS, 2008d; MESQUITA JUNIOR *et al.*, 2010).

É descrito, ainda, uma subpopulação de linfócitos T com importante função na tolerância imunológica, as células T regulatórias (Tregs), que são caracterizadas por expressar a molécula CD25⁺ e o fator nuclear FOXP3. As Tregs naturais são produzidas no timo e expressam o receptor da cadeia α de IL-2 (CD25⁺) sendo denominadas células CD4⁺CD25⁺, enquanto as Tregs adaptativas são geradas na periferia após estimulação antigênica e exercem sua função através da liberação das citocinas inibitórias IL-10 e TGF- β . As Tregs podem bloquear a ativação e função dos linfócitos T efetores (CHAPLIN, 2010; MELO e CARVALHO, 2009; MESQUITA JUNIOR *et al.*, 2010; SAKAGUCHI *et al.*, 2009).

Estudos experimentais, no final do século vinte, evidenciavam que a resistência à LV estava relacionada à produção de citocinas do perfil T_H1, representado principalmente por IFN- γ , enquanto a susceptibilidade à IL-4, citocina marco na diferenciação para o perfil T_H2 (HEINZEL *et al.*, 1989). No entanto, essa teoria não foi confirmada por estudos posteriores que evidenciavam: níveis mais elevados de IL-10 e IFN- γ na fase aguda da LV em relação aos valores após tratamento (KARP *et al.*, 1993); que a ativação de IL-4 não parecia ser suficiente para influenciar o perfil de citocinas T_H1 e modificar a evolução da LV em estudo experimental (MIRALLES *et al.*, 1994). Camundongos deficientes de IL-4 infectados com *L.donovani* não foram mais resistentes à infecção que os controles e, em alguns experimentos, a carga parasitária foi maior nos camundongos deficientes de IL-4, contrariando a teoria do papel prejudicial da resposta T_H2 no controle da infecção por *Leishmania* (ALEXANDER *et al.*, 2000).

É descrito que, na fase aguda da LV, ocorre uma elevada liberação de citocinas, principalmente em crianças, o que ocasiona uma resposta inflamatória exagerada, o que pode estar relacionado ao seu desfecho fatal (COSTA, D. *et al.*, 2013). Identificou-se, também, uma elevação de citocinas proinflamatórias com uma resposta imune mista T_H1/T_H2 , na doença ativa, com aumento das concentrações plasmáticas de IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10. Enquanto na doença assintomática e, após a sua cura, os níveis de citocinas são semelhantes, sugerindo que após a cura da LV, ocorre recuperação do sistema imune aos níveis pré-doença (COSTA, A. *et al.*, 2012). Os níveis IFN- γ , IL-12 e IL-10 de pacientes com LV são significativamente mais elevados que as de seus irmãos que, também, exibem níveis maiores que controles saudáveis de área endêmica, reafirmando a abundante produção de citocinas no curso desta infecção (KHOSHDEL *et al.*, 2009).

Estudo na Índia identificou que os pacientes com LV apresentam níveis mais elevados de IFN- γ , IL-10 e IL-6 antes do tratamento específico anti-*Leishmania* em relação aos controles saudáveis, aos níveis pós-tratamento e, também, em relação à leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL - *Post-kala-azar dermal leishmaniasis*), enquanto os níveis de TNF- α foram mais elevados na PKDL e em controle saudáveis. Observou-se, também, altos níveis de IFN- γ nos pacientes não responsivos ao tratamento, sugerindo que esta citocina pode ser um marcador de atividade da infecção por *Leishmania* (ANSARI *et al.*, 2006). A PKDL é uma complicação tardia da LV, causada pela *L. donovani* e caracterizada por lesões cutâneas que variam de máculas hipocrômicas ao padrão papular ou nodular e parece estar relacionada ao tratamento incompleto da LV (SINGH, R. *et al.*, 2012).

Estudo brasileiro, desenvolvido em área de risco para infecção por *Leishmania*, detectou que o perfil de citocinas dos sujeitos com quadro de LV assintomática era semelhante ao observado nas pessoas não infectadas, enquanto os pacientes apresentando sintomatologia clássica de LV apresentam elevados níveis de CXCL8, IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 em relação aos assintomáticos e aos não infectados. No entanto, não se observou diferença entre os grupos em relação aos níveis de IL-2, IL-4, IL-5 e IL-12. Os níveis de IL-1 β foram indetectáveis neste estudo (PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2006). Elevados níveis de IFN- γ e das quimiocinas induzidas por esta citocina na fase aguda da LV em relação aos pacientes assintomáticos e saudáveis foi confirmado por estudo em área endêmica da Etiópia (HAILU *et al.*, 2004).

O perfil de citocinas, na LV, pode modificar-se também de acordo com a gravidade da doença. É descrito que crianças sem sinais de gravidade (maiores de 6 meses, ausência de comorbidades como icterícia, hemorragia, edema generalizado ou sinais de toxemia) ou com

apenas um sinal de alerta (crianças com 6 meses a 1 ano de idade com diarreia, vômitos, suspeita de infecção bacteriana, febre há mais de 60 dias ou recidiva) apresentam elevados níveis de IFN- γ e IL-10, em contraste com pacientes com mais de dois sinais de gravidade que exibem níveis indetectáveis de IL-2 e IFN- γ e baixos níveis de IL-10 (GAMA *et al.*, 2013).

Especula-se que ocorra uma intensa atividade inflamatória, na LV grave, mediada por citocinas e quimiocinas, e que essa resposta imune exagerada pode ser um dos determinantes do prognóstico na LV. É descrito que os níveis de IL-6, IFN- γ e CXCL8 encontram-se diretamente associadas à morte na LV particularmente entre os jovens. Estas proteínas apresentam elevados níveis nos pacientes com sinais de sangramento ou com marcadores de coagulação intravascular disseminada (CID) (COSTA, D. *et al.*, 2013). A presença de sangramentos ou de distúrbios hemorrágicos são sinais de gravidade e indicativos de internação em pacientes com LV (BRASIL, 2006).

Os níveis das citocinas, na LV, correlacionam-se, também, à suscetibilidade individual a este parasito. As citocinas IL-17 e IL-22, *in vitro*, apresentam níveis superiores em indivíduos soropositivos para *L. donovani* que não desenvolveram a LV em relação aos pacientes com a doença, indicando uma forte relação dessas citocinas com a resistência à leishmaniose (PITTA *et al.*, 2009).

A IL-10 tem um importante papel na imunopatogênese da LV. Ela diminui a resposta proliferativa de células mononucleares obtidas de sangue periférico em pacientes infectados por *Leishmania* (GHALIB *et al.*, 1993) e apresenta correlação positiva com a carga parasitária em pacientes com LV (NYLÉN *et al.*, 2007; VERMA *et al.*, 2010). A inibição desta citocina acelera a formação de granulomas hepáticos e a morte da *Leishmania*, além de potencializar a eficácia do antimoniato de metil-glutamina em estudos experimentais (MURRAY *et al.*, 2002). O bloqueio de IL-10, em aspirados esplênicos de pacientes com LV, promove a morte de *L. donovani* e aumenta a secreção de IFN- γ e TNF- α . (GAUTAM *et al.*, 2011). Esta citocina, ao mesmo tempo que diminui a atividade leishmanicida dos macrófagos, favorecendo a multiplicação da *Leishmania* e o desenvolvimento da doença, reduz os eventos adversos de uma resposta inflamatória exagerada (SINGH, O. *et al.*, 2012; TRINCHIERI, 2007).

Em indivíduos com LV sintomática foi identificada correlação positiva entre os níveis plasmáticos e o número absoluto de leucócitos totais, esinófilos, neutrófilos e linfócitos T CD4⁺ expressando IL-10 e IFN- γ (PERUHYPE-MAGALHAES *et al.*, 2006); observou-se também níveis de IL-10 mais elevados em crianças que adultos antes do tratamento específico anti-*Leishmania* (ANSARI *et al.*, 2006), o que pode estar relacionado ao pior prognóstico em crianças. Enquanto pacientes co-infectados por LV e HIV apresentam níveis significativamente

mais baixos de IL-10 e IFN- γ , sugerindo a importância dos linfócitos T CD4⁺ na secreção destas citocinas (COSTA, D. *et al.*, 2013).

O IFN- γ é produzido principalmente por linfócitos T, linfócitos B e células NK e atua como uma citocina imunomoduladora induzindo a diferenciação dos linfócitos T para o perfil T_H1 (ABBAS, 2008; MESQUITA JUNIOR *et al.*, 2010; SCHRODER *et al.*, 2004; VARELLA e FORTE, 2001), e é descrita como a molécula-chave na ativação de macrófagos, podendo potencializar a resposta antiprotozoária de fagócitos mononucleares humanos, tanto por mecanismos dependentes como independentes de oxigênio (MURRAY *et al.*, 1983). Esta citocina apresenta níveis elevados na fase aguda da LV (ANSARI *et al.*, 2006; CALDAS *et al.*, 2005; COSTA, A. *et al.*, 2012; HAILU *et al.*, 2004; KARP *et al.*, 1993; KHOSHDEL *et al.*, 2009) e postula-se que esteja relacionada ao controle da infecção por *Leishmania* (ANSARI *et al.*, 2006; KIMA e SOONG, 2013). Destacam-se como principais origens de IFN- γ na LV aguda, os neutrófilos, eosinófilos, células NK e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (PERUHYPE-MAGALHAES *et al.*, 2006).

Análise de camundongos com deficiência genética para produção de IFN- γ , infectados com amastigotas de *L. donovani*, evidenciou resistência ao tratamento anti-*Leishmania*, tanto em doses subótimas como convencionais (MURRAY and DELPH-ETIENNE, 2000). Apesar de estudos em animais evidenciarem a importância de IFN- γ no controle da infecção por *Leishmania*, a monoterapia com IFN- γ , em pacientes com LV, não se mostrou eficaz em aumentar a defesa antimicrobiana intracelular e promover a cura; apesar de ter sido relatada melhora dos sintomas em mais da metade dos pacientes, a infecção persistiu em todos. Houve aumento persistente de IL-10, sem alterar a produção de IL-4, o que pode ter influenciado negativamente o desenvolvimento de uma resposta T_H1 dominante e a subsequente cura desses pacientes (KENNEY *et al.*, 1998).

A IL-12 tem sido descrita como citocina chave na modulação da resposta T_H1 e subsequente produção de IFN- γ . Estudo, *in vitro*, evidenciou a que a adição IL-12 em culturas contendo o antígeno *L. chagasi* é capaz de restaurar a resposta citotóxica e a produção de IFN- γ (BACELLAR *et al.*, 1996). Além de otimizar a produção de IFN- γ por células T_H1, a participação de IL-12 na resistência à LV garante que células T_H1 não sejam eliminadas durante leishmaniose (PAKPOUR *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2000).

Não há um consenso sobre os níveis de IL-12 em relação as diversas apresentações da LV humana. Observou-se níveis basais de IL-12 na fase aguda da LV, sem apresentar diferença significativa com os níveis encontrados nos pacientes assintomáticos ou não infectados por *Leishmania* (PERUHYPE-MAGALHAES *et al.*, 2006), foram descritos também como

elevados na fase aguda da LV (CALDAS *et al.*, 2005; HAILU *et al.*, 2004; KHOSHDEL *et al.*, 2009) ou elevados níveis de IL-12 na LV sintomática em relação aos pacientes assintomáticos e curados, mas sem apresentar diferença quando comparados aos encontrados nos indivíduos saudáveis (COSTA, A. *et al.*, 2012). Descreveu-se, também, associação dos níveis de IL-12 com comorbidades relacionadas ao mau prognóstico na LV, observou-se elevados níveis de IL-2 na presença de diarreia, alteração radiológica pulmonar e oligúria, enquanto na presença de esplenomegalia verificou-se diminuição dos níveis de IL-12 e aumento dos níveis de IL-10, essa diminuição foi justificada pela imunossupressão induzida pelo calazar, via IL-10 (SENE, 2013). Evidenciou-se, também, correlação mútua entre os níveis de IL-12 com os níveis de TNF- α em pacientes com LV sintomática (COSTA, D. *et al.*, 2013).

Carswell e colaboradores (1975) identificaram a presença de uma substância induzida pela endotoxina que era seletivamente tóxica para as células malignas, esse fator indutor de necrose tumoral foi denominado, pelo autor, como TNF- α . A síntese desta citocina ocorre principalmente por fagócitos mononucleares ativadas, embora possa ser secretado também por neutrófilos, linfócitos ativados, células endoteliais, mastócitos e células NK.

A principal função do TNF é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local de infecção e ativar essas células, no entanto, quando produzido em grande quantidade, induz resposta inflamatória exagerada podendo ocasionar febre, anorexia, caquexia, induzir a síndrome do choque séptico, trombose vascular, além de distúrbios metabólicos graves. O lipopolissacarídeo é o principal indutor da produção de TNF- α por monócitos, via TLR4 e do receptor polissacarídeo CD14 γ (ABBAS, 2008a; BORISH e ROSENWASSER, 2008; VARELLA e FORTE, 2001).

Em estudos experimentais, TNF- α é crítico para o controle da LV causada por *L. donovani*. Camundongos suprimidos da ação de TNF apresentam maior susceptibilidade à infecção por este parasito e menor produção de iNOS, além do TNF ser essencial para o recrutamento de leucócitos para o fígado (ENGWERDA *et al.*, 2004). Na LV humana, é descrito que os níveis de TNF- α em indivíduos sintomáticos são superiores aos níveis detectados em pessoas com infecção assintomática, subclínica ou pós - tratamento e que ocorre uma redução significativa nos níveis desta citocina após terapêutica anti-*Leishmania* efetiva. Observou-se, no entanto, a persistência de níveis elevados de TNF- α nos sujeitos não responsivos ao tratamento, sugerindo que os níveis de TNF- α podem indicar a atividade da LV (BARRAL-NETTO *et al.*, 1991).

Salomão e colaboradores (1996) encontraram resultados semelhantes aos descritos por Barral-Netto e colaboradores. Foram detectados níveis elevados de TNF- α antes do tratamento específico anti-*Leishmania*, medidos pelo ELISA, que declinaram com a melhora clínica e laboratorial, no entanto essa evolução não foi confirmada em ensaio citotóxico; a discrepância entre as análises foi justificada pela presença de fatores no plasma, como outras citocinas e receptores de TNF circulantes, que podem influenciar a liberação e atividade de TNF- α .

Em análise dos níveis das citocinas TNF- α , IL-4 e IL-10 no baço e fígado de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, observou-se que os níveis médios de TNF- α em extratos hepáticos de cães sintomáticos foram significativamente mais elevados em relação aos cães assintomáticos e que este aumento esteve associado ao aumento da carga parasitária nesse órgão. Os níveis de IL-10 foram mais elevados no fígado de cães assintomáticos e também correlacionados linearmente com a carga parasitária hepática, enquanto os níveis de IL-4, no fígado e baço, não apresentaram correlação com o número de *Leishmanias* nestes órgãos, indicando a importância de TNF- α , com a participação de IL-10, no processo patológico da LV (MICHELIN *et al.*, 2011).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que influencia respostas imune antígeno específicas e reações inflamatórias, identificada como um dos maiores mediadores da fase aguda da inflamação. É sintetizada por fagócitos mononucleares, células do endotélio vascular, fibroblastos e por algumas células T ativadas e tem como principais estímulos a IL-1 e o TNF, enquanto TGF- β a diminui. A IL-6 estimula a produção de proteínas da fase aguda da inflamação nos hepatócitos e o crescimento de linfócitos B que se diferenciam em produtores de anticorpos, além de atuar na quimiotaxia de eosinófilos para o local de inflamação (ABBAS, 2008a; VARELLA e FORTE, 2001).

Tem-se descrito o encontro de elevados níveis de IL-6 na fase aguda da LV em estudos do final do século XX, na África, confirmados por estudos mais recentes da Índia e Brasil (VAN DER POLL *et al.*, 1995; ANSARI *et al.*, 2006; PERUHYPE-MAGALHAES *et al.*, 2006). Análise de pacientes com LV sintomática em área endêmica do Nordeste ressaltou a importância de IL-6 como marcador de prognóstico desta patologia. Demonstrou que os níveis de IL-6 e de CXCL8 apresentavam associação entre si e com sinais de gravidade desta doença, como sangramentos, edema, anemia, dano hepático e plaquetopenia (COSTA, D. *et al* 2013).

A interleucina 1 beta (IL-1 β) é considerada a principal mediadora da inflamação e o principal pirógeno endógeno. É um fator crucial no desenvolvimento de febre e anorexia durante inflamação local e parece controlar a expressão de IL-6. Associada a esta citocina ou

de forma isolada, a IL-1 β contribui para a resposta inflamatória aguda, para a perda ponderal, indução de proteínas na fase aguda e produção de febre (ZHENG *et al.*, 1995). Monócitos e macrófagos são a principal fonte de IL-1, produzindo principalmente IL-1 β , que são induzidos por produtos bacterianos ou por outras citocinas, como TNF (VARELLA e FORTE, 2001).

Foi identificado que, na apresentação aguda da LV, os níveis de IL-1 β encontravam-se associados aos níveis de TNF- α e com alguns sinais de gravidade ou complicações relacionadas a esta patologia; observou-se níveis mais elevados de IL-1 β na presença de sangramentos, diarreia, oligúria e sepse (SENE, 2013) e nos pacientes desnutridos ou que referiam emagrecimento após o início da doença, que apresentavam menores números de neutrófilos e plaquetas e mais baixos níveis de hemoglobina (COSTA, D., 2009).

CXCL8 é uma quimiocina produzida principalmente por monócitos e macrófagos e que tem como principais estímulos as citocinas inflamatórias, TNF- α e IL-1. Destaca-se por induzir grande estímulo migratório para as células do sistema imune, principalmente neutrófilos, além de determinar um aumento da expressão de moléculas de adesão por células endoteliais. Elevados níveis de CXCL8 foram identificados no plasma de pacientes com infecção sintomática por *L. chagasi* (PERUHYPE-MAGALHAES *et al.*, 2006), com valores superiores nas crianças menores de 2 anos e nos pacientes que evoluíram para o óbito (COSTA, D., 2009, 2013).

Na fase aguda da LV, foi descrita associação entre os níveis de CXCL8 e os níveis das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-1. Foi detectada, também, maiores níveis de CXCL8 nos pacientes que apresentavam hemorragias, edema, alterações das enzimas hepáticas, menores concentrações de hemoglobina e menor número de linfócitos e de plaquetas, o que sugeriu uma importante participação de CXCL8 na atividade inflamatória da LV aguda (COSTA, D. *et al.*, 2013).

3.6 Fatores que influenciam o prognóstico da leishmaniose

A leishmaniose é uma zoonose com envolvimento sistêmico que apresenta grande relevância na saúde pública no Brasil tanto pelas elevadas taxas de incidência e letalidade, como pela progressiva expansão das áreas de transmissão

A emergência recente da LV em áreas onde só havia casos importados, associada à falta de conhecimento da população e à pouca intimidade dos profissionais de saúde com os sintomas típicos desta patologia são fatores que contribuem para o diagnóstico tardio

(MADALOSSO *et al.*,2012). O retardo no tratamento além de influenciar o desfecho da infecção aguda aumenta a chance de recidiva (KAJAIA *et al.*, 2011; LEITE e ARAÚJO, 2013).

A identificação dos fatores que possam contribuir para uma evolução desfavorável na LV tem despertado o interesse de vários estudiosos no assunto. Entre os fatores de risco associados á gravidade na LV, destacaram-se a presença de anemia intensa, sangramentos, duração da doença, extremos de idade, diarreia, vômitos, desnutrição, icterícia, presença de infecções bacterianas e sangramentos (COLLIN *et al.*, 2004; COSTA, C. *et al.*, 2010; OLIVEIRA, J. *et al.*, 2010; SAMPAIO *et al.*, 2010; WERNECK *et al.*, 2003)

Araújo e colaboradores (2012) avaliaram as manifestações clínicas associadas ao óbito na LV, em Belo Horizonte, Brasil, através de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação- MS (SINAN), do período de 2002 a 2009, e desenvolveram um sistema de escore clínico que atribuía valor de escore 1 para cada uma das três variáveis (idade maior ou igual a 60 anos, sangramento ou outras infecções associadas) e escore 2 para icterícia. Os pacientes com escore entre 1 e 5 deveriam ter atenção especial durante o tratamento devido o maior risco de óbito. Não foram incluídas variáveis laboratoriais neste escore.

Em crianças e adolescentes, detectou-se que a pacientes com neutropenia ou plaquetopenia graves, com sangramentos de mucosas, icterícia, dispneia e ou suspeita de infecção bacteriana apresentavam maior risco de morte na LV. Essas variáveis foram alocadas em um sistema de escore para avaliar o prognóstico da LV com elevada sensibilidade, especificidade, mas com baixo índice preditivo positivo (SAMPAIO *et al.*, 2010).

Costa, D (2009) selecionou 825 pacientes de uma coorte prospectiva envolvendo 883 pacientes com LV, em Teresina- Piauí, para a construção de um modelo de variáveis clínicas e laboratoriais relacionadas ao óbito em pacientes com esta patologia. Este foi o escore padrão adotado pelo ministério da saúde para identificação dos pacientes com risco aumentado de evoluir para o óbito e teve como principais variáveis analisadas a idade, a quantidade de sítios de sangramentos, a presença de edema, vômitos, icterícia, dispneia, infecção bacteriana e a presença de leucopenia, plaquetopenia, comprometimento da função hepática e renal, além da associação com AIDS (BRASIL, 2011b).

O sistema de escore é uma importante ferramenta na avaliação do prognóstico da LV. No entanto, apenas conhecer as variáveis associadas ao óbito não é suficiente para o sucesso terapêutico, é crucial a compreensão da resposta inflamatória sistêmica induzida pela *Leishmania* e a identificação das moléculas que influenciem nesse prognóstico, visto que na leishmaniose ocorre uma modulação do sistema imune para favorecer a infectividade do parasito e que os tratamentos atuais ainda apresentam toxicidade importante.

4 OBJETIVOS:

4.1 Hipótese

É possível prever a evolução clínica da leishmaniose visceral através da análise de citocinas medidas no início do tratamento.

4.2 Objetivo primário

Avaliar a evolução da atividade inflamatória na leishmaniose visceral pelo nível de citocinas desde o diagnóstico até o centesimo octogésimo dia pós-tratamento.

4.3 Objetivos secundários

- 1- Descrever a evolução clínica dos pacientes com leishmaniose visceral;
- 2- Correlacionar os níveis pré-tratamento das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-12 e da quimiocina CXCL8 com a evolução clínica, idade, resposta terapêutica e com as alterações laboratoriais na leishmaniose visceral;
- 3-Correlacionar a evolução clínica com a resposta inflamatória medida por citocinas e quimiocinas.

5 PACIENTES E MÉTODOS

5.1 Área geográfica do estudo

O estudo foi conduzido em Teresina, capital do Estado do Piauí, localizada em uma faixa de transição entre o semiárido nordestino e a região Amazônica, a 350 km do litoral, denominada região meio-norte do Piauí. Encontra-se numa situação privilegiada por localizar-se num importante entroncamento rodoviário do Nordeste, que interliga seus estados à região Norte, e facilita a comunicação com os principais centros urbanos das regiões sudeste e centro-oeste, além de ter sido construída às margens do rio Parnaíba, que a comunica com a cidade Timon- MA, a quarta cidade maranhense em população (TERESINA, 2010).

O clima é tropical, quente e úmido. Apresenta temperaturas elevadas durante todo o ano, variando entre os extremos de 22,0°C a 40,0°C, com umidade relativa média do ar de 69%. As chuvas ocorrem de dezembro a maio e a vegetação predominante é o Cerrado, caracterizado por uma cobertura vegetal de médio porte e densa com uma participação significativa da vegetação de matas e de coqueirais (Palmeira do Babaçu). (TERESINA, 2010).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Teresina possui uma população estimada de 840.600 habitantes (BRASIL, 2014) e destaca-se como um relevante polo regional de prestação de serviços em saúde. É descrito que de cada 100 pacientes que recebem atendimento médico em seus hospitais, aproximadamente 40 são oriundos de outras cidades do Piauí, do Maranhão, Tocantins, Pará e do oeste do Ceará e de Pernambuco (TERESINA, 2010). Teresina foi o local de ocorrência da primeira grande epidemia de LV em meio urbano (COSTA, C.*et al*, 2008) e representa uma parcela significativa dos casos desta infecção no Brasil, onde a doença ocorre de forma endêmica e epidêmica desde 1980 e são registrados, aproximadamente, 200 casos por ano no Piauí (BRASIL,2013).

5.2 Local da pesquisa

A pesquisa foi realizada no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella (IDTNP), hospital geral da Secretaria Estadual da Saúde do Piauí conveniado com a Universidade Federal do Piauí (UFPI). O IDTNP é referência em doenças infecciosas e parasitárias para o Piauí e para estados vizinhos, admite aproximadamente 400 pacientes com LV ao ano, o que representa

95% dos casos notificados no Estado. Todos os médicos assistentes possuem experiência em diagnosticar e tratar pacientes com LV.

5.3 Considerações éticas

O presente trabalho é um subprojeto do “Estudo multicêntrico de eficácia e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil”, estudo multicêntrico, aberto e randomizado desenvolvido nos centros de referência em leishmanioses em Campo Grande – MS, Palmas – TO, Teresina – PI, Montes Claros – MG, Aracaju – SE e Belo Horizonte – MG, no período de fevereiro de 2011 a abril de 2014. O cenário desse projeto, em Teresina – PI, foi o IDTNP, deste foi retirada toda a amostra para o projeto atual.

O projeto fonte foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos (CEP) da Universidade de Brasília-UnB em 29 de outubro de 2008 com o registro de projeto: CEP-FM 056/2008 (ANEXO A) e pelo CEP da UFPI, em 06 de agosto de 2009, com CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) 0101.0.045.000-09 (ANEXO B). O presente estudo também foi submetido à apreciação pelo CEP da UFPI e aprovado sem recomendações sob CAAE 38389714.3.0000.5214 (ANEXO C).

O soro foi preservado a 20 ° C negativos e todos os pacientes incluídos no estudo, ou seus responsáveis, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, o qual continha uma cláusula sobre armazenamento de amostras biológicas e possível uso em pesquisas futuras (ANEXO D). O consentimento por escrito obtido para cada voluntário detalhava sobre os possíveis riscos do estudo e que a sua participação era voluntária e poderia ser interrompida a qualquer momento. No caso de pacientes entre 12 e 17 anos, tornou-se necessário obter, além do consentimento do pai/mãe ou responsável legal, o termo de assentimento do menor.

Além da sintomatologia clínica sugestiva de LV, o projeto mãe exigia confirmação diagnóstica com um dos seguintes resultados positivos: pesquisa direta de amastigotas ou cultura de promastigotas a partir do aspirado de medula óssea, amplificação da região conservada do k-DNA de *Leishmania* aspirado da medula óssea ou sangue periférico ou teste imunocromatográfico rápido baseado no antígeno rK39. Todos esses exames eram realizados durante a triagem para o estudo, após a assinatura do termo de consentimento.

Os voluntários deste estudo multicêntrico foram submetidos à anamnese e exame físico completos para identificar sinais e sintomas de LV. Foram submetidos também à coleta de amostras para a realização de exames complementares pertinentes tais como hemograma completo, plaquetas, glicemia de jejum, creatinina, atividade de protrombina, bilirrubinas,

transaminases, proteínas totais, albumina e globulina, exame de urina, sorologia ou teste rápido para HIV, teste de Gravidez, exame parasitológico de fezes, dosagem sérica de sódio, potássio e magnésio, hemocultura e urocultura, radiografia de tórax e ECG, além dos exames para procedimento diagnóstico acima especificados. Reavaliações clínicas e laboratoriais foram realizadas nos dias três, sete, catorze, vinte e um, trinta, sessenta, noventa e cento e oitenta do início da terapia.

Uma vez que as intervenções necessárias para o diagnóstico, triagem e acompanhamento clínico da população de estudo já faziam parte da rotina do IDTNP e do protocolo do projeto fonte para acompanhamento dos pacientes com LV, uma amostra adicional de 2 ml de sangue periférico colhida no mesmo momento do projeto, na triagem inicial e no sétimo, 14º, 21º, 30º e 180º dias de terapia foi suficiente para esta pesquisa. Como não foram necessárias novas punções, não adicionou riscos adicionais aos voluntários.

As principais complicações das coletas de sangue são os sangramentos nos locais de punção e os hematomas. No entanto, todos os procedimentos foram realizados em ambiente hospitalar com estrutura adequada para realização de primeiros socorros e reanimação, além da equipe responsável pelo projeto ser capacitada para intervenção imediata em caso de sangramentos ou quaisquer outras intercorrências.

O estudo foi conduzido em conformidade com os preceitos fundamentais da Resolução do Conselho Nacional de Saúde-CNS 466/12, que trata das Diretrizes e Normas de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (BRASIL, 2012), e da Resolução do Conselho Nacional de Saúde-CNS Nº 441, de 12 de maio de 2011, que trata da análise ética de projetos de pesquisa que envolva armazenamento de materiais ou uso de materiais armazenados em pesquisas anteriores (BRASIL, 2011a).

Os soros coletados foram armazenados em freezers, a menos 20°C, no laboratório de leishmanioses do Dr. Carlos Henrique Nery Costa, localizado na Av. Governador Arthur de Vasconcelos, 151/s. Todo material biológico foi identificado por código, preservando a identidade do paciente e o acesso era restrito aos pesquisadores do grupo de estudo de leishmanioses.

O investigador não interferiu nas tomadas de decisão referentes ao diagnóstico, ao tratamento e ao acompanhamento do paciente. Avaliações posteriores à alta hospitalar foram realizadas em regime ambulatorial e as despesas com o transporte para estas reavaliações clínicas e laboratoriais foram custeadas pelo estudo multicêntrico.

Não houve intervenções terapêuticas e os sujeitos do estudo não receberam benefícios diretos pela sua participação nesta pesquisa. O benefício indireto justificou-se pelas

reavaliações clínicas frequentes que, indiretamente, contribuíram para a detecção precoce de complicações.

5.4 Delineamento do estudo

5.4.1 Tipo de estudo

Estudo de coorte, prospectivo, não pareado.

5.4.2 População alvo:

Pacientes com leishmaniose visceral causada *L. infantum* de área endêmica do Piauí.

5.4.3 População fonte:

Pacientes com idade entre seis meses e 50 anos internados no IDTNP com hipótese de LV no período de abril de 2013 a fevereiro de 2014.

5.4.4 População de estudo:

Paciente com idade entre seis meses e 50 anos, com sintomatologia sugestiva de LV e que tenha diagnóstico confirmado por um ou mais dos seguintes exames laboratoriais com resultado positivo: pesquisa direta de amastigotas ou cultura de promastigotas a partir do aspirado de medula óssea, amplificação da região conservada do k-DNA de *Leishmania* de aspirado da medula óssea ou sangue periférico ou teste imunocromatográfico rápido baseado no antígeno rK39.

5.4.5 Critérios de inclusão:

Pacientes com leishmaniose visceral que cumpram a definição de caso confirmado;
Concordância para participar de forma voluntária e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

No caso de pacientes entre 12 e 17 anos, além do consentimento do pai/mãe ou responsável legal, fez-se, também, necessário o termo de assentimento do menor.

5.4.6 Critérios de exclusão:

Infecção pelo HIV;

Recidiva de LV;

Desnutrição grave;

Portadores de doenças crônicas ou agudas que possam interferir no resultado: diabetes mellitus, nefropatias, hepatopatias, cardiopatias, esquistossomose mansônica, malária ou tuberculose;

Qualquer condição que impeça a realização do acompanhamento com a periodicidade preconizada pelo estudo.

5.4.7 Definições

Considerou-se como caso sintomático de LV o paciente com o relato de febre com duração igual ou superior a uma semana associada a presença de hepatomegalia ou esplenomegalia.

Definiu-se febre a temperatura axilar (TAX) maior ou igual a 37,8°C, enquanto a temperatura máxima correspondeu ao pico febril mais elevado durante o período de internação hospitalar. A hepatomegalia foi definida pelo aumento da extensão hepática a 2 cm ou mais do BCD, enquanto a esplenomegalia foi definida pelo aumento do baço que ultrapassasse o BCE ou a presença de espaço de Traube ocupado à percussão.

O tempo de sintomatologia foi definido como o período compreendido entre o início dos sintomas e a data de admissão ao estudo. O tempo de desaparecimento da febre após o início da terapia correspondeu ao intervalo de tempo compreendido entre a data da primeira dose do tratamento específico anti-*Leishmania* e o último pico febril durante a internação hospitalar.

O tempo de internação durante o estudo não foi mensurado em virtude de a amostra ser proveniente de um projeto em que o tempo de internação era influenciado pelo tratamento ao qual o paciente foi randomizado. No entanto, a internação em um serviço diferente do local da pesquisa e antes do início da terapêutica anti-*Leishmania* foi avaliado como uma variável que pudesse influenciar o prognóstico da LV.

A presença de palidez cutânea e de mucosas era avaliado durante o exame físico admissional ao estudo, enquanto a perda ponderal referida à admissão foi considerada apenas pelo relato dos pacientes adultos ou dos responsáveis pelas crianças.

Anemia foi definida como hemoglobina abaixo de 11,0 g/dL em crianças com menos de cinco anos de idade; abaixo de 11,5 g/dL, em crianças entre cinco e onze anos de idade; abaixo de 12,0 g/dL, em crianças entre doze e catorze anos de idade e mulheres adultas não grávidas e abaixo de 13,0 g/dL em homens com idade maior ou igual a 15 anos (WHO,2011). O ganho médio de hemoglobina foi definido como a diferença entre os níveis de hemoglobina (g/dL) aferidos no 60º dia de terapia e os níveis de hemoglobina (g/dL) admissionais mensurados antes do início da terapêutica específica anti-*Leishmania*.

Considerou-se leucopenia quando a contagem leucócitos era inferior a 4.500/mm³, enquanto a presença de neutropenia foi definida pelo número de neutrófilos inferior a 1500/mm³ (LEITE e COUTINHO, 1998). Caracterizou-se como neutropenia moderada os valores de neutrófilos compreendidos no intervalo 500 a 1000 neutrófilos / mm³ e grave quando a contagem de neutrófilos era inferior a 500 / mm³ (BOXER, 2009). O ganho médio nos níveis de neutrófilos/mm³ foi calculado pela diferença entre os níveis de neutrófilos/mm³ aferidos após uma semana de terapia e os níveis de neutrófilos/mm³ aferidos no dia zero de terapêutica específica anti- *Leishmania*.

A presença de plaquetopenia foi definida pela contagem de plaquetas inferior a 150.000/mm³ (BEHRMAN *et al.*, 2009) e o ganho médio nos níveis de plaquetas/mm³ correspondeu à diferença entre os níveis de plaquetas/mm³ aferidos no sétimo dia de terapia e no dia zero de terapêutica específica anti-*Leishmania*.

Foram considerados valores normais de referência para as enzimas hepáticas e pancreáticas, bilirrubinas, creatinina, proteínas totais, albumina, potássio e INR (Índice Internacional Normalizado) os valores de referência definidos pelo laboratório que analisou todas as amostras, como especificado a seguir: 15 a 79 U/L sexo masculino e 14 a 36 U/L sexo feminino para AST; 21 a 72 U/L sexo masculino e 9 a 52 U/L sexo feminino para ALT; amilase 30 a 110 U/L; lipase 23 a 300 U/L; bilirrubina total até 1,4 mg/dL; creatinina 0,66 a 1,25 mg/dL sexo masculino e 0,52 a 1,04 para o sexo feminino; proteínas totais 6,3 a 8,2 g/dL e albumina 3,5 a 5,5 g/dL; potássio 3,5 a 5,1 mmol/L; INR menor ou igual a 1,2 e proteína C reativa quantitativa de alta sensibilidade até 10mg/dL.

O aumento dos níveis de albumina no 30º dia de terapia correspondeu à diferença entre os níveis de albumina aferidos após 30 dias de terapia e os níveis admissionais. Da mesma forma, o aumento dos níveis de albumina no 180º dia de terapia foi calculado pela diferença

entre os níveis de albumina aferidos aos 6 meses de tratamento em relação aos níveis mensurados no dia zero da terapêutica específica anti - *Leishmania*.

As infecções de vias aéreas incluíram as infecções de vias aéreas superiores (rinofaringite aguda, sinusite aguda, faringoamigdalite aguda estreptocócica e laringite viral aguda) e inferiores (pneumonia). Definiu-se como quadro sugestivo de pneumonia a presença de tosse, febre associada ou não à dispneia, além da ausculta respiratória com presença de estertores crepitantes confirmada pela imagem radiológica evidenciando opacidades alveolares ou intersticiais.

As infecções dermatológicas compreenderam as piодermites e dermatofitoses, enquanto as dermatites relacionaram-se às dermatites alérgicas ou irritativas da pele.

Foi considerado involução significativa da esplenomegalia e da hepatomegalia quando a involução da extensão esplênica e hepática, respectivamente, atingiram de forma significativa a metade de sua extensão à admissão.

5.4.8 Considerações sobre a amostra

Os pacientes deste estudo foram recrutados de uma coorte aberta, randomizada, denominada “Estudo multicêntrico de eficácia e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil”, realizada em Teresina, Piauí, no período de fevereiro de 2011 a abril de 2014. Realizou-se entrada sistemática e não probabilística

5.4.9 Mensuração da exposição

5.4.9.1. Pacientes

Os médicos envolvidos na pesquisa realizaram anamnese e exame físico em cada paciente antes da randomização para o tratamento específico anti-*Leishmania*, de acordo com questionário estruturado (ANEXO E).

Avaliou-se as variáveis demográficas (gênero, idade e procedência), nutricionais (peso, estatura, índice de massa corporal (IMC) e valores de escore z), sinais vitais (pressão arterial, pulso, frequência respiratória e temperatura) e as variáveis clínicas: anorexia, fraqueza, adinamia, palidez cutânea e de mucosas, icterícia, sangramentos, edema, náuseas, vômitos, dor abdominal, presença de diarreia ou constipação, alterações respiratórias como presença de

taquipneia e/ou dispneia, ruídos adventícios pulmonares e tiragens ou retrações torácicas, além de aferição do tamanho do baço e fígado.

A evolução médica diária foi realizada durante todo o período de internação e após a alta hospitalar. O paciente retornou em consultas ambulatoriais no 14º, 21º, 30º, 60º, 90º e 180º dia após o início da terapia. O tempo mínimo de internação foi sete dias e, em cada consulta ambulatorial, o paciente era submetido a questionário clínico, exame físico e realização de exames laboratoriais (ANEXO E).

A aferição das medidas antropométricas – peso e estatura – seguiu a padronização do ministério da Saúde (BRASIL, 2004; SBP, 2009). A estatura era aferida à admissão e no 180º dia de terapia, enquanto o peso foi avaliado à admissão ao estudo e no sétimo, 14ª, 21º, 30ª, 60º, 90º e 180º dia de terapia. Para mensuração do peso utilizou-se balança pediátrica para crianças com peso estimado inferior a 16 Kg e balança-plataforma para crianças mais pesadas e adultos. Na faixa etária de zero a 23 meses, a aferição do comprimento foi realizada com o lactente em decúbito dorsal sobre superfície plana e com o auxílio de régua antropométrica. As crianças com mais de dois anos de idade e adultos tiveram sua estatura aferida em balança plataforma com antropômetro. O paciente deveria permanecer descalço, posicionado no centro do equipamento, sem adereços na cabeça, de pé, ereto, com os braços estendidos ao longo do corpo, a cabeça erguida, olhando na altura dos olhos para um ponto fixo.

A extensão esplênica foi delimitada em sua maior extensão a partir do BCE na linha mamilar esquerda, em direção à ponta esplênica. O tamanho hepático foi delimitado pela palpação da borda inferior do fígado a partir do BCD na linha hemiclavicular direita no sentido craniocaudal, criando uma linha imaginária entre esses dois pontos. A estimativa em centímetros dessa linha traçada entre os pontos determinou a hepatimetria clínica do fígado. Visto que a amostra era constituída por crianças e adultos, com diferentes pesos e estaturas e que a extensão de um órgão normal é proporcional ao tamanho do corpo (SILVA e SIQUEIRA, 2009; DAEHNERT, 1996), procedeu-se à correção da extensão hepática e esplênica pela superfície corpórea do paciente, como definido por Costa em sua tese de doutorado (COSTA, D., 2009).

O baço corrigido foi calculado dividindo o tamanho esplênico (cm) pela superfície corporal (m^2) e fígado corrigido correspondeu à extensão do fígado (cm) dividido pela superfície corporal (m^2) (COSTA, D., 2009). A superfície corporal foi calculada pela fórmula de Dubois & Dubois, onde: $\text{Superfície corporal} = [(\text{peso} \times 4) + 7] / (\text{peso} + 90)$.

5.4.9.2 Procedimentos

A amostra é proveniente de uma coorte prospectiva onde os exames para investigação diagnóstica e avaliação hematológica, bioquímica, análise de função hepática, renal e investigação de infecções associadas era realizado para admissão ao estudo antes da instituição terapêutica.

As amostras de sangue foram colhidas por punção de veia periférica em frascos estéreis contendo anticoagulante ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA). O soro foi obtido após a centrifugação a 3000 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos. Todo o material foi armazenado em tubos *ependorfs* de 1,5 mL a -20°C até à sua utilização.

Todos os pacientes recrutados para este estudo já haviam realizado punção aspirativa da medula óssea para pesquisa direta e cultura de *Leishmania*. A punção de crista ilíaca superior posterior era o método recomendado para crianças de qualquer idade e a punção esternal para adultos.

O projeto fonte seguiu o seguinte procedimento para punção de crista ilíaca superior posterior: Realizou-se assepsia do local de punção com álcool ou agente degermante (realizando a limpeza do centro para a periferia), a seguir o paciente foi posicionado em posição fetal, pernas fletidas sobre o abdômen, em decúbito lateral, expondo a crista ilíaca ou em decúbito ventral. Com o polegar posicionado abaixo da crista ilíaca e o indicador acima da crista ilíaca para firmarem a pele, penetrou-se a epiderme com a agulha, e posicionando a mesma a 90°, procedeu-se à introdução em osso, com firmeza. O mandril foi removido e conectou-se uma seringa estéril para aspiração do material. Após a coleta, o local de punção foi pressionado com gaze para evitar sangramento.

Para punção esternal, após assepsia, posicionou-se o dedo mínimo na fúrcula e o polegar e indicador nos espaços intercostais. Utilizou-se agulha com proteção de profundidade para penetrar a epiderme, em seguida, esta foi posicionada a 90° e introduzida no osso, com firmeza. O mandril foi removido e o material aspirado com uma seringa estéril. Após o procedimento, comprimiu-se o local de punção com gaze estéril.

5.4.9.3. Exames hematológicos, bioquímicos, imunológicos e parasitológicos

5.4.9.3.1. Exames complementares gerais

Os seguintes exames laboratoriais foram solicitados e realizados segundo o protocolo proposto no estudo multicêntrico de onde foi retirada a amostra para este estudo: hemograma

(Utilizou sangue total com EDTA e procedeu-se à contagem automática através de citometria de fluxo com revisão dos esfregaços corados), proteína C reativa quantitativa de alta sensibilidade (utilizou soro e realizou automação com anticorpos monoclonais), dosagem de proteínas totais (material: soro e tratamento de cobre por química seca) e albumina (utilizou soro e método colorimétrico verde de bromocresol por química seca), amilase (dosada no soro pelo método colorimétrico amilopectina com corante por química seca), lipase (utilizou soro e método peroxidase por química seca), dosagem de aminotransferases (material: soro e método piridoxal-5-fosfato por química seca), bilirrubinas (utilizou soro e método colorimétrico), creatinina (material: soro e método: amidinohidrolase por química seca), tempo de Protrombina (utilizou plasma e método coagulométrico automatizado CA1500), potássio (dosado no soro pelo método potenciométrico por química seca) e exame sumário de urina (Uri-test 11 e revisão óptica).

5.4.9.3.2. Exames complementares específicos para diagnóstico de LV

O exame parasitológico direto de medula óssea seguiu as especificações do estudo fonte. A leitura das lâminas foi realizada por profissional experiente e qualificado para esse exame e utilizou-se um tempo mínimo de avaliação de 30 minutos caso nenhuma forma amastigota fosse detectada previamente (SILVA, M. *et al.*, 2005). Realizava-se, ainda, uma revisão da lâmina para os pacientes com pesquisa direta negativa e quadro clínico e epidemiológico sugestivo de LV.

O aspirado medular foi semeado em meio de cultura constituído por uma base sólida, NNN (*Novy-MacNeal-Nicolle*) e outra parte em base líquida com *Schneider's Insect Medium* (Sigma, St. Louis, EUA) incubado a 26° C em estuda BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio). A detecção de formas promastigotas foi realizada no sobrenadante do meio de cultura no segundo, terceiro, sétimo, 14°, 21° e 28° dias da semeadura. As culturas foram declaradas negativas se formas promastigotas não fossem identificadas após este período.

Utilizou-se o produto comercial Kalazar Detect Rapid Test da InBios como método imunocromatográfico rápido baseado na detecção de anticorpos anti-rK39 seguindo as instruções de uso do produto comercial especificadas na bula. Utilizou-se 20 µL de soro na esponja encontrada na extremidade da fita e adicionou-se 2 a 3 gotas da solução tamponante. A migração ocorre por capilaridade e a leitura do resultado não deve exceder a 10 minutos. Considerou-se como positivo o teste que evidenciava a presença de duas bandas vermelhas na fita, enquanto a presença de uma linha rubra na banda de controle caracterizava o resultado

como negativo. A ausência da banda vermelha no controle negativo invalidava o teste pela má qualidade técnica. (SILVA, J.N., 2004)

5.4.9.3.3. Exames complementares específicos para diagnóstico de infecções

Realizou-se em todos os pacientes, antes da introdução da terapêutica específica anti-*Leishmania*, a pesquisa de infecções associadas à LV através da análise de hemocultura (Hemocult, Laborclin Ltda), urocultura (Cromoclin S Urina, LaborclinLtda) e radiografia simples de tórax.

5.4.9.3.4. Triagem do vírus da imunodeficiência adquirida

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana-HIV era critério de exclusão para este estudo, tornando necessária a triagem para esta infecção em todos os pacientes após orientação pré-teste e obtenção do consentimento verbal e seguiu as diretrizes propostas pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 1999).

5.4.9.3.5. Dosagem de citocinas no soro

A dosagem de citocinas, no soro, por citometria de fluxo - CBA (Cytometric Bead Array) foi realizada em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). Utilizou-se o kit “Human inflammatory cytokine CBA kit” da BD Biosciences que incluía beads específicas para dosagem das seguintes citocinas humanas: CXCL8, IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12p70. Para a avaliação de IFN- γ utilizou o Kit denominado “Human IFN- γ Flex Set” da BD Biosciences.

As dosagens dos níveis das citocinas IL-1 β , IL-6, CXCL8, IL-10, IL-12 e TNF- α foram realizadas na admissão ao estudo, antes da instituição da terapia anti-*Leishmania* e nos dias sete, catorze, trinta e cento e oitenta de tratamento, enquanto os níveis de IFN- γ foram mensurados no dia zero, no sétimo, 30° e 180° dia de terapia específica anti-*Leishmania*.

5.4.9.3.5.1 Protocolo para dosagem de citocinas por citometria de fluxo Kit CBA

Os seguintes passos foram seguidos para análise de citocinas por citometria de fluxo:

Preparo do *top standart* (pool de citocinas): Os frascos das citocinas liofilizadas foram vertidos em um tubo de 15 mL, identificado como Top Standard (TS), e a este tubo foi adicionado 2 mL de *Assay Diluent*. Após 15 minutos, homogeneizou-se apenas com a pipeta.

Preparo da curva de calibração: Foram numerados 8 tubos com as seguintes diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256. A cada tubo foi adicionado 300µL de *Assay Diluent*. Em seguida, transferiu-se 300µL do TS para o primeiro tubo da curva (1:2) e homogeneizou-se, de maneira suave, com a pipeta. Diluições seriadas foram realizadas transferindo 300µL do tudo 1:2 para o tubo 1:4 e assim sucessivamente até o tubo 1:256, que permaneceu com 600 µL. Homogeneizou-se, de maneira delicada, utilizando apenas a pipeta.

Para preparar o pool de beads: Em um único tubo adicionou-se o volume determinado de cada bead de acordo com as fórmulas:

Volume final no tubo “pool de beads” = n° de amostras x 25 (volume de cada amostra em µL).

Volume de cada bead = Volume final do tubo “pool de beads” / n° de beads (informa o volume de cada bead que deve ser adicionado ao tubo pool de beads).

Antes de retirar o volume de cada bead, procedeu-se a homogeneização vigorosa, por aproximadamente cinco segundos, com agitador de tubos vortex. Em seguida, adicionou-se o volume de cada bead, conforme definido pela fórmula acima, ao tubo “pool de beads”, logo em seguida a mistura de beads foi homogeneizada delicadamente no vortex.

Tratamento do pool de beads com *Serum enhancement buffer*: Fez-se necessário ressuspender as beads de captura em *Serum enhancement buffer* antes de distribuí-las entre os tubos de amostras. Para isso centrifugou-se o pool de beads de captura a 200g por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante utilizando uma ponteira. Em seguida, adicionou-se *Serum enhancement buffer* em volume igual ao do sobrenadante que foi descartado. Realizou-se homogeneização delicada no vortex. Incubou-se o pool de beads por 30 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz.

Preparo das amostras: Tubos de citometria foram identificados com os números de identificação de cada paciente. Depositou-se, em cada um destes, 25µL de soro do paciente a ser analisado.

Preparo do Ensaio para Kit citocinas inflamatórias – CBA: Dez tubos foram identificados de 1 a 10. Alíquotas dos tubos preparados no passo curva de calibração foram transferidas conforme o esquema abaixo:

- Tubo 1: adicionou-se 25 µL do Assay Diluent.
- Tubo 2: adicionou-se 25 µL do tubo da curva 1:256
- Tubo 3: adicionou-se 25 µL do tubo da curva 1:128
- Tubo 4: adicionou-se 25 µL do tubo da curva 1:64
- Tubo 5: adicionou-se 25 µL do tubo da curva 1:32
- Tubo 6: adicionou-se 25 µL do tubo da curva 1:16
- Tubo 7: adicionou-se 25 µL do tubo da curva 1:8
- Tubo 8: adicionou-se 25 µL do tubo da curva 1:4
- Tubo 9: adicionou-se 25 µL do tubo da curva 1:2
- Tubo 10: adicionou-se 25 µL do top standart.

Foram adicionados 25 µL do *pool de beads* aos 10 tubos acima descritos e a cada amostra. Em seguida, adicionou-se a todos os tubos 25 µL do reagente de detecção contendo o fluorocromo *phycoerythrin* (PE), deixando-os em repouso por 3 horas, em câmara escura, a temperatura ambiente. Após incubação, adicionou-se um mL de *Wash Buffer* em cada tubo de ensaio e centrifugou-se a 200g por 5 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se aos tubos 300 µL de *Wash Buffer*. Procedeu-se com a leitura no citômetro de fluxo.

5.4.9.3.5.2 Protocolo para dosagem de IFN- γ por citometria de fluxo Kit CBA flex:

Preparo do Top standart do Kit CBA flex: O frasco contendo a citocina IFN- γ liofilizada foi vertido em um tubo de 15 mL e dissolvido em 4 mL de *Assay Diluente*. Após 15 minutos, procedeu-se a homogeneização delicada utilizando pipeta.

Preparo da curva de calibração: Foram numerados 8 tubos com as seguintes diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256. A cada tubo foi adicionado 500µL de *Assay Diluent*. Em seguida, transferiu-se 500µL do TS para o primeiro tubo da curva (1:2) e homogeneizou-se, de maneira suave, com a pipeta. Diluições seriadas foram realizadas transferindo 500µL do tudo 1:2 para o tubo 1:4 e assim sucessivamente até o tubo 1: 256, que permaneceu com 1000 µL. Homogeneizou-se, de maneira delicada, utilizando apenas a pipeta.

Preparo da bead de capturado Kit CBA flex: O kit “*Human IFN- γ Flex Set*” contém um frasco com bead de captura específica para IFN- γ concentrada em 50 vezes que deve ser diluída

em diluente próprio e homogeneizada em vortex antes do uso. O experimento requer 50 µL das beads diluídas para análise de cada amostra. O volume do diluente da bead foi determinado de acordo com as fórmulas a seguir:

$$\text{Volume total da bead diluída} = \text{número de testes} \times 50.$$

$$\text{Volume do diluente de bead} = \text{volume total das beads diluídas} - \text{volume de cada bead concentrada}.$$

Preparo do reagente de detecção PE kit CBA flex: O reagente de detecção encontrava-se concentrado em 50 vezes, procedeu-se, então, a diluição e foram utilizados 50 microlitros do reagente de detecção em cada tubo.

Preparo das amostras: Tubos de citometria foram identificados com os números de identificação de cada paciente. Depositou-se, em cada um destes, 50 µL de soro do paciente a ser analisado.

Ensaio do kit CBA flex: Identificou-se 10 tubos de 1 a 10. Alíquotas dos tubos preparados no passo curva de calibração foram transferidas conforme o esquema abaixo:

Tubo 1: adicionou-se 50 µL do *Assay Diluent*.

Tubo 2: adicionou-se 50 µL do tubo da curva 1:256

Tubo 3: adicionou-se 50 µL do tubo da curva 1:128

Tubo 4: adicionou-se 50 µL do tubo da curva 1:64

Tubo 5: adicionou-se 50 µL do tubo da curva 1:32

Tubo 6: adicionou-se 50 µL do tubo da curva 1:16

Tubo 7: adicionou-se 50 µL do tubo da curva 1:8

Tubo 8: adicionou-se 50 µL do tubo da curva 1:4

Tubo 9: adicionou-se 50 µL do tubo da curva 1:2

Tubo 10: adicionou-se 50 µL do top standart

Adicionou-se 50 µL da bead diluída a todos os tubos do experimento e procedeu-se a incubação por 1 hora, a temperatura ambiente e em câmara escura. Ao término do período de incubação, adicionou-se 50 µL do reagente de detecção PE a todos os tubos, seguiu-se a incubação em câmara escura, por 2 horas, a temperatura ambiente. Adicionou-se, a seguir, um mL de *Wash Buffer* em cada tubo de ensaio e centrifugou-se a 200g por 5 minutos. O sobrenadante foi

desprezado e o experimento foi finalizado com a adição 300 μ L de *Wash Buffer* aos tubos para análise no citômetro de fluxo.

5.5 Produção e análise dos dados

Os dados foram coletados em formulário impresso e transcritos para planilha eletrônica do programa Microsoft Windows Excell2013®. A avaliação nutricional foi realizada pelo programa estatístico Epi Info® Versão 3.5.1 (*Division of Integrated Surveillance Systems and Services- DISSS, National Center for Public Health Informatics-NCPHI, Centers for Diseases Control and Prevention-CDC*) que utiliza os padrões do *National Center for Health Statistics (NCHS)*. As demais análises foram realizadas pelo programa Stata/SE® 10.0 for Windows (*CollegeStation, Texas, USA*).

Utilizou-se o teste qui-quadrado (X^2) para analisar as diferenças entre variáveis dicotômicas e a análise de correlação de Spearman para detectar concordância entre variáveis contínuas com dados esparsos. As diferenças entre médias de variáveis contínuas de amostras independentes com distribuição normal foram comparadas pelo teste t de Student.

O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para comparar diferenças entre médias de variáveis com distribuições não-paramétricas. Em todas as análises foram considerados os testes bi-caudais e um nível de significância estatística α de 0,05.

Os dados foram apresentados em percentuais, proporções, médias e medianas. Foram determinados os intervalos de confiança (95%), o desvio-padrão e os valores mínimos e máximos. As variáveis com distribuição exponencial sofreram transformação logarítmica e a normalidade foi conferida.

5.6 Cálculo amostral

No planejamento do estudo foi estimado que uma amostra constituída por 43 pacientes seria necessária para avaliar associação entre os níveis de citocinas e a resposta clínica com um nível de significância alfa de 0,05 e um poder de 0,90.

5.7 Poder da amostra

Em 75% dos pacientes, os níveis de citocinas eram significativamente menores no 30º dia de tratamento em relação aos níveis admissionais. Baseado nestes dados, a amostra de 36 pacientes estudados teria sido capaz de detectar essa diferença com nível de significância alfa de 0,05 e um poder de 0,88.

6 RESULTADOS

A população de estudo foi recrutada de uma coorte aberta denominada “Estudo multicêntrico de eficácia e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil”, realizada em Teresina, Piauí, no período de fevereiro de 2011 a abril de 2014, onde os pacientes elegíveis eram randomizados para receberem um tratamento específico para LV.

Todos os pacientes eram maiores de seis meses de idade e menores de 50 anos, preenchiam os critérios de caso sintomático de leishmaniose visceral e tinham o diagnóstico confirmado por pesquisa direta de amastigotas ou cultura de promastigotas a partir do aspirado de medula óssea ou teste imunocromatográfico rápido baseado no antígeno rK39.

Durante o período do estudo, 260 pacientes cumpriram a definição de caso sintomático de LV e concordaram participar da pesquisa. Destes, foram excluídos 224 pacientes, como especificado na figura 01. A amostra foi selecionada por conveniência, sendo recrutados os pacientes que possuíam amostras de soro estocadas em quantidade e condições técnicas adequadas para a análise de citocinas por citometria de fluxo. O primeiro paciente foi admitido no estudo em abril de 2013 e o último fevereiro de 2014 e todos foram acompanhados por 180 dias.

Foram incluídos 36 pacientes, destes 14 pacientes (38,9%) apresentaram resultado positivo para os três testes diagnósticos, 14 (38,9%) associavam resultados positivos do rk39 com a pesquisa direta de medula óssea e três (8,3%) do rK39 com a mielocultura. O aspirado de medula óssea foi positivo de forma isolada em três pacientes (8,3%) e o rk39 em dois (5,6%) (FIGURA 01).

O rk39 foi positivo em 91,7 % dos pacientes, a pesquisa direta de *Leishmania* em medula óssea em 86.1% e a mielocultura para *Leishmania* em 50% dos acometidos.

A formação da população de estudo está representada na figura 01.

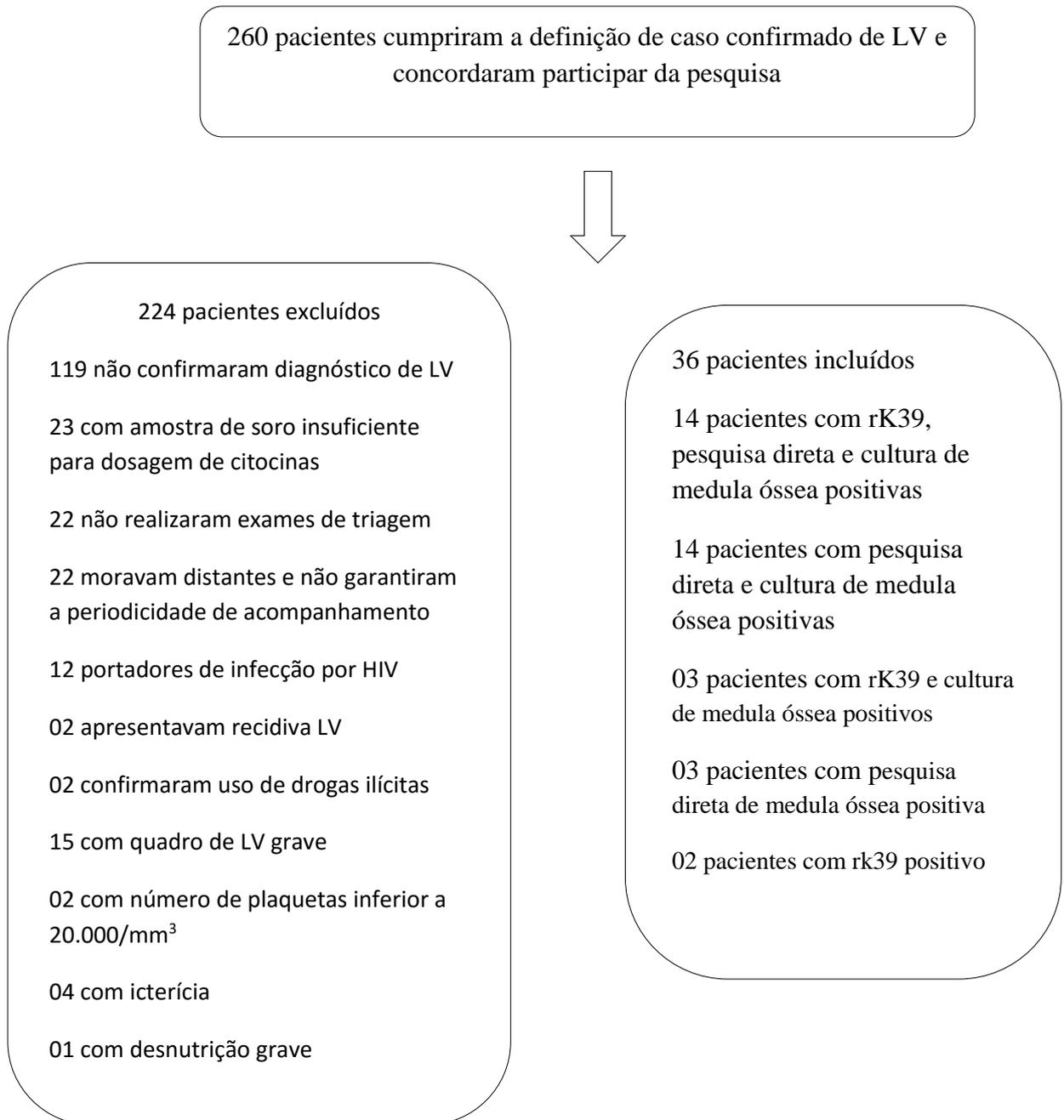


FIGURA 01 Diagrama representativo da formação da população de pacientes com leishmaniose visceral na coorte do estudo “IFN- γ , IL-6, CXCL8 e IL-10 são marcadores precoces da evolução da leishmaniose visceral. 2015”. Teresina, 2013-2014.

6.1 Estudo Clínico Geral

6.1.1 Características demográficas

A maioria dos pacientes incluídos nessa coorte era criança (32/36). A mediana de idade da amostra foi de 48,4 meses (95% CI 38,5- 69,5) com idade variando de 11 a 488 meses. Crianças menores de quatro anos de idade representaram metade dos pacientes e apenas quatro pacientes eram maiores de 18 anos de idade. Durante a infância, não houve diferença da incidência da doença entre os sexos, mas três dos quatro adultos acometidos eram do sexo masculino (TABELA 01).

O estado do Maranhão contribuiu com 80,6% dos casos e apenas 19,4% dos pacientes eram procedentes do Piauí. A distância entre o centro de pesquisa e cidade de infecção foi inferior ou 150 km em 80,6% dos pacientes e a maioria originava-se de cidades de pequeno porte com população estimada em até 50.000 habitantes (TABELA 01).

TABELA 01. Características demográficas da população de estudo. Teresina 2013-2014.

Características	Número de pacientes	%
Idade		
0 a 24 meses	07	19,4
25 a 48 meses	11	30,6
49 a 120 meses	13	36,1
121 a 215 meses	01	2,8
Adultos	04	11,1
Gênero		
Feminino	18	50,0
Masculino	18	50,0
Unidade Federativa de procedência		
Maranhão	29	80,6
Piauí	07	19,4
População estimada cidade onde ocorreu a infecção		
< 20.000 habitantes	08	22,2
20.000 a 50.000 habitantes	18	50,0
> 100.000 habitantes	10	27,8
Distância do município onde ocorreu a infecção		
< 50 km	09	25,0
50 a 150 Km	20	55,6
151 a 299 Km	07	19,4

6.1.2 Avaliação nutricional

A maioria das meninas menores de dois anos de idade encontrava-se, no momento de inclusão no estudo, com peso inferior ao percentil 5 % do índice nutricional peso para idade (FIGURA 02), enquanto os pesos dos meninos do mesmo grupo etário distribuía-se predominantemente entre os percentuais 5 % e 10% (FIGURA 03). Nenhuma menina, entre os dois e dez anos de idade, apresentava-se com peso acima do percentil 50% do índice antropométrico peso para idade e metade desta amostra possuía peso inferior ao percentual 10% para este índice (FIGURA 04). Os pesos dos meninos, da mesma faixa de idade, distribuía-se, em sua maioria, abaixo do percentual 25%, enquanto 50% classificava-se com peso menor ao igual ao percentual 10% de peso para idade (FIGURA 05).

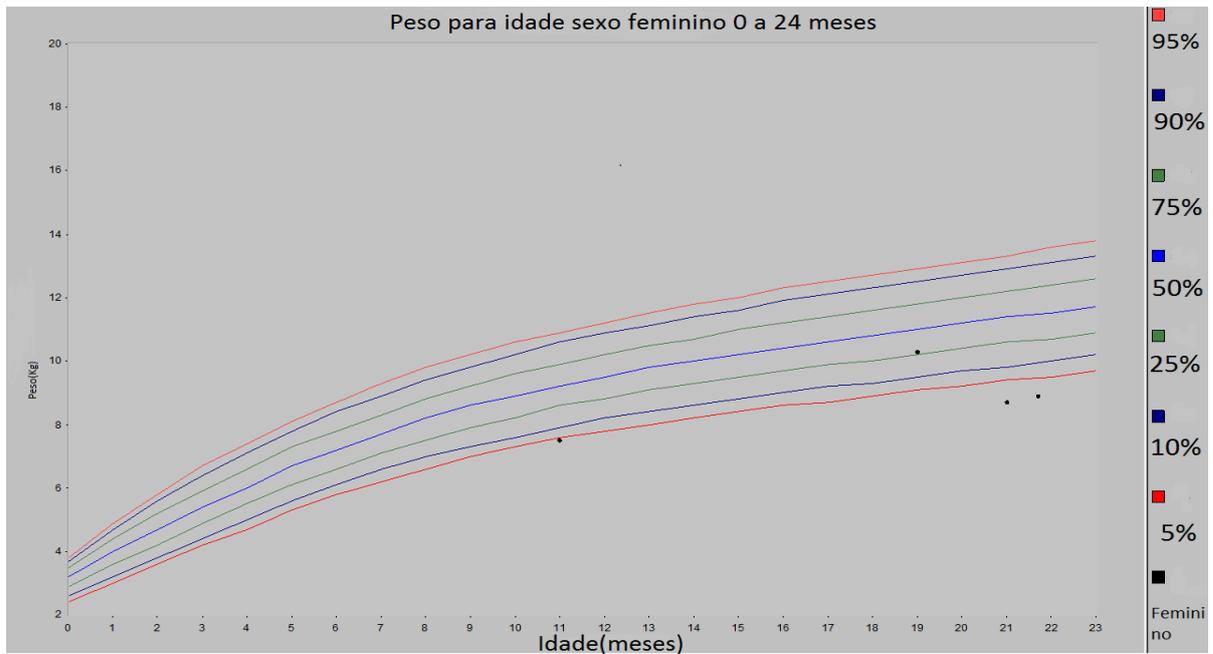


FIGURA 02 Curva de distribuição do peso em relação à idade de pacientes com leishmaniose visceral. Meninas, zero a vinte e quatro meses de idade. Teresina, 2013-2014.

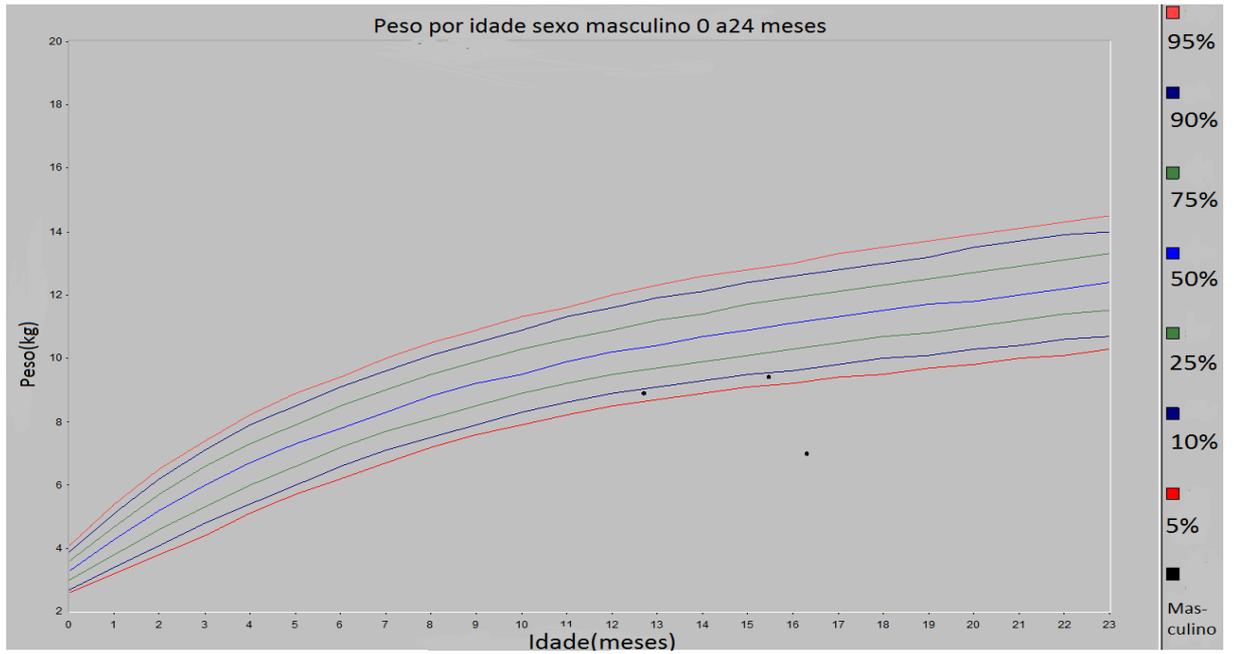


FIGURA 03 Curva de distribuição do peso em relação à idade de pacientes com leishmaniose visceral. Meninos, zero a vinte e quatro meses de idade. Teresina, 2013-2014.

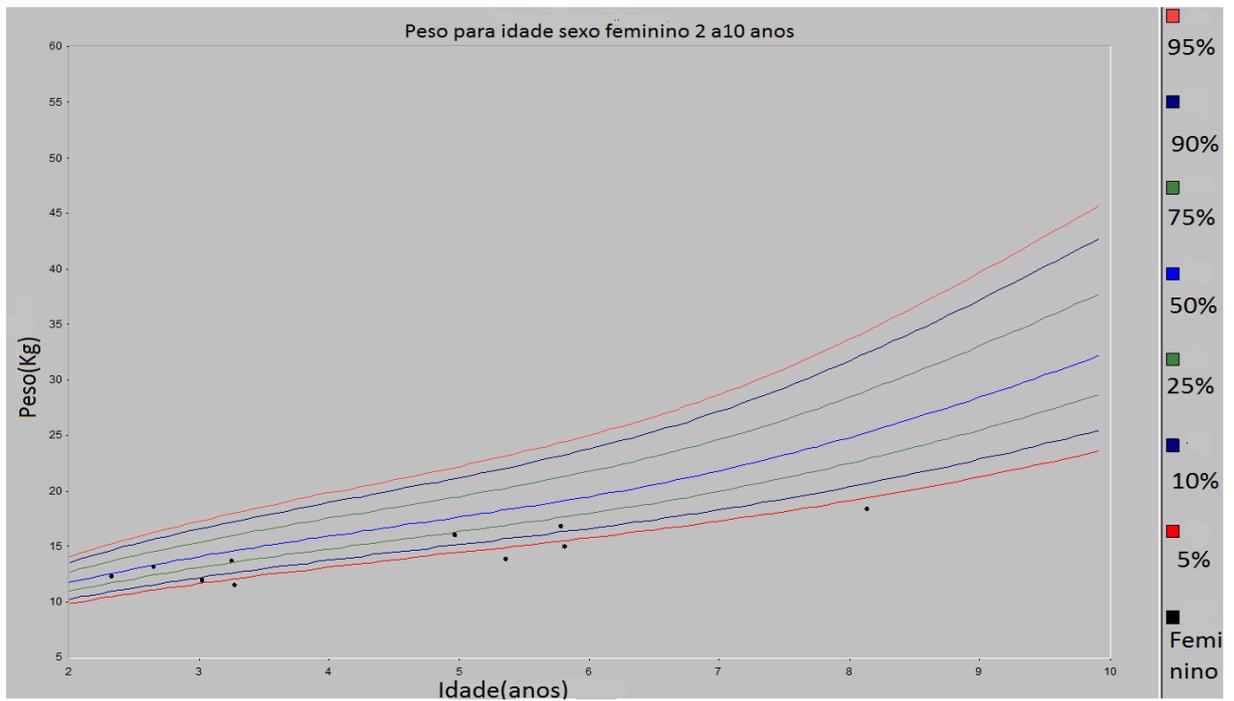


FIGURA 04 Curva de distribuição do peso em relação à idade de pacientes com leishmaniose visceral. Meninas, dois a 10 anos de idade. Teresina, 2013-2014.

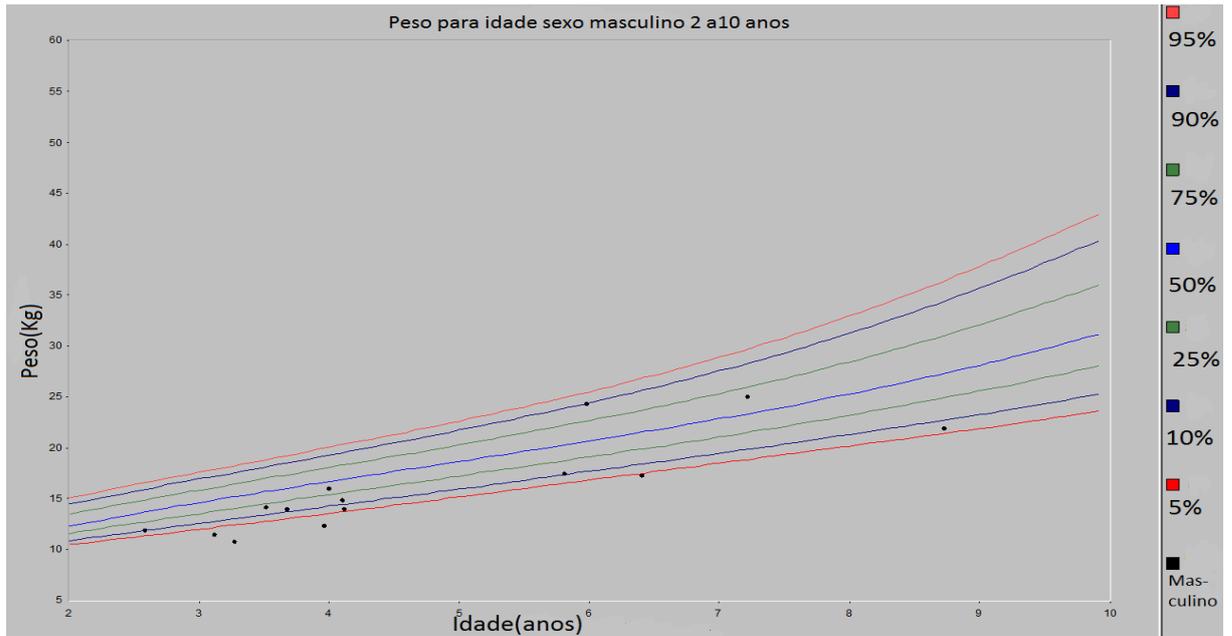


FIGURA 05 Curva de distribuição do peso em relação à idade de pacientes com leishmaniose visceral. Meninos, dois a 10 anos de idade. Teresina, 2013-2014

A maior parte dos lactentes foi classificada com comprimento inferior ao percentil 5% do índice antropométrico comprimento para idade (FIGURAS 06 e 07). Metade das crianças maiores de 2 anos e menores de 10 anos de idade, do sexo feminino, apresentava estatura distribuída abaixo do percentual 10% de estatura para idade (FIGURA 08) e aproximadamente 43% dos meninos, deste grupo etário, recebeu igual classificação antropométrica (FIGURA 09).

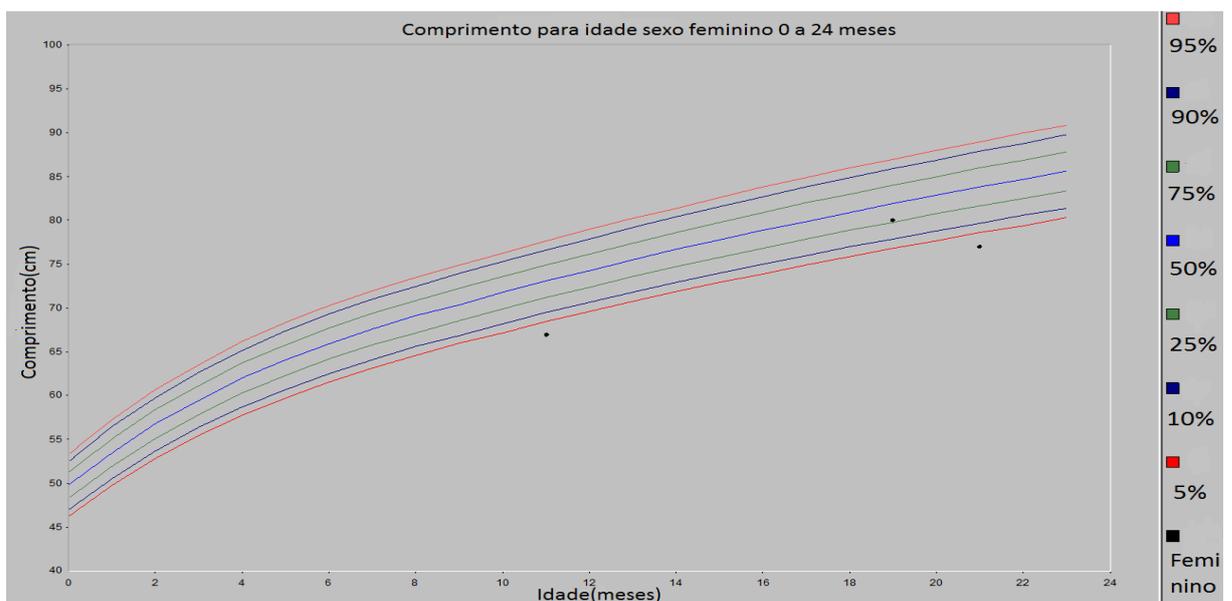


FIGURA 06 Curva de distribuição do comprimento em relação à idade de pacientes com leishmaniose visceral. Meninas, zero a 24 meses de idade. Teresina, 2013-2014.

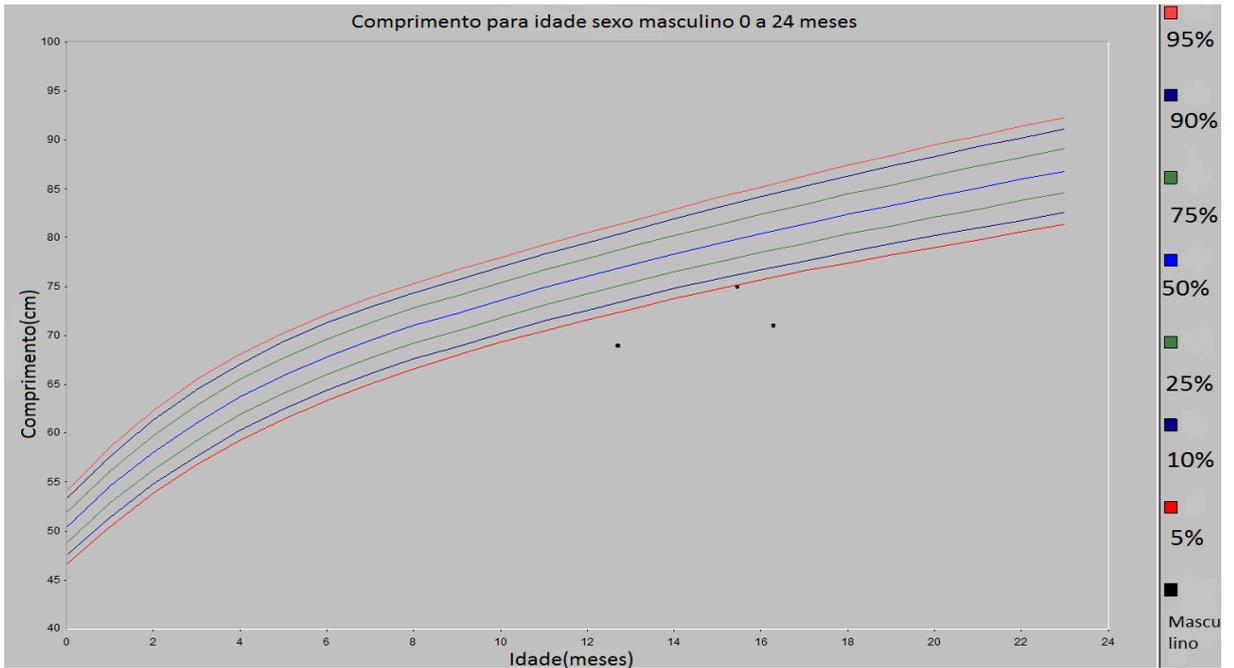


FIGURA 07 Curva de distribuição do comprimento em relação à idade de pacientes com leishmaniose visceral. Meninos, zero a 24 meses de idade. Teresina, 2013-2014.

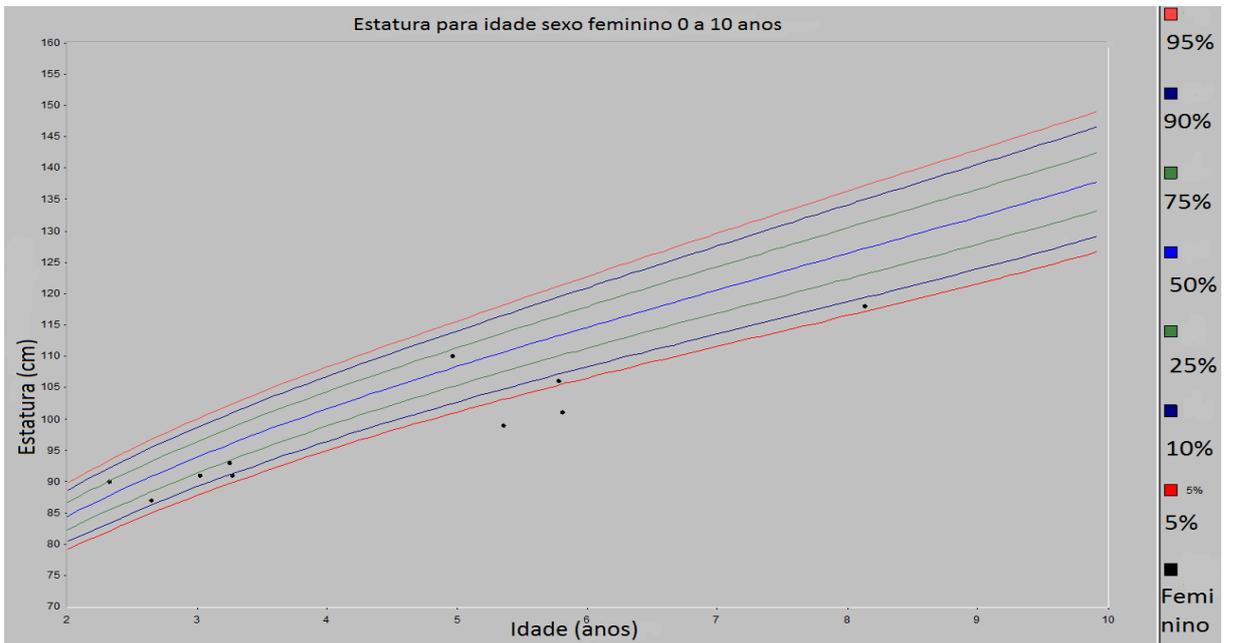


FIGURA 08 Curva de distribuição da estatura em relação à idade de pacientes com leishmaniose visceral. Meninas, dois a 10 anos de idade. Teresina, 2013-2014

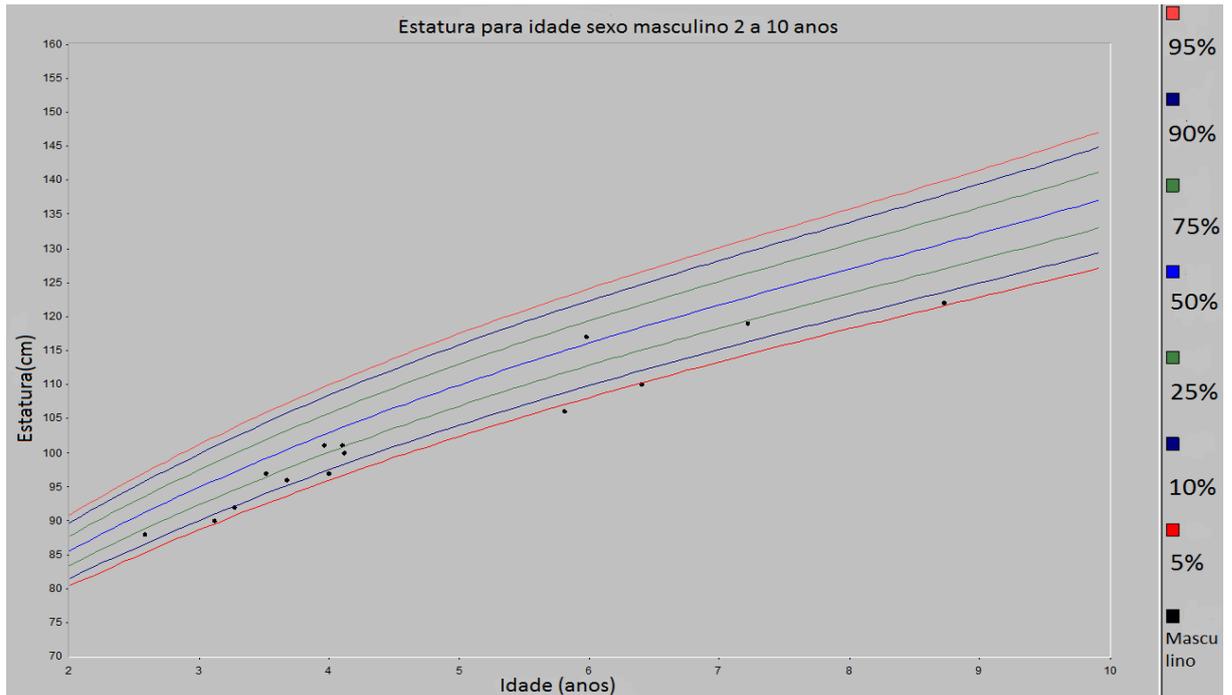


FIGURA 09 Curva de distribuição da estatura em relação à idade de pacientes com leishmaniose visceral. Meninos, dois a 10 anos de idade. Teresina, 2013-2014.

A avaliação nutricional por escore-z das crianças e adolescentes menores de 15 anos para os índices peso para idade, altura em relação à idade e peso em relação à altura evidenciou que a maioria se concentrava entre os escores z -2 e +2 (FIGURA 10).

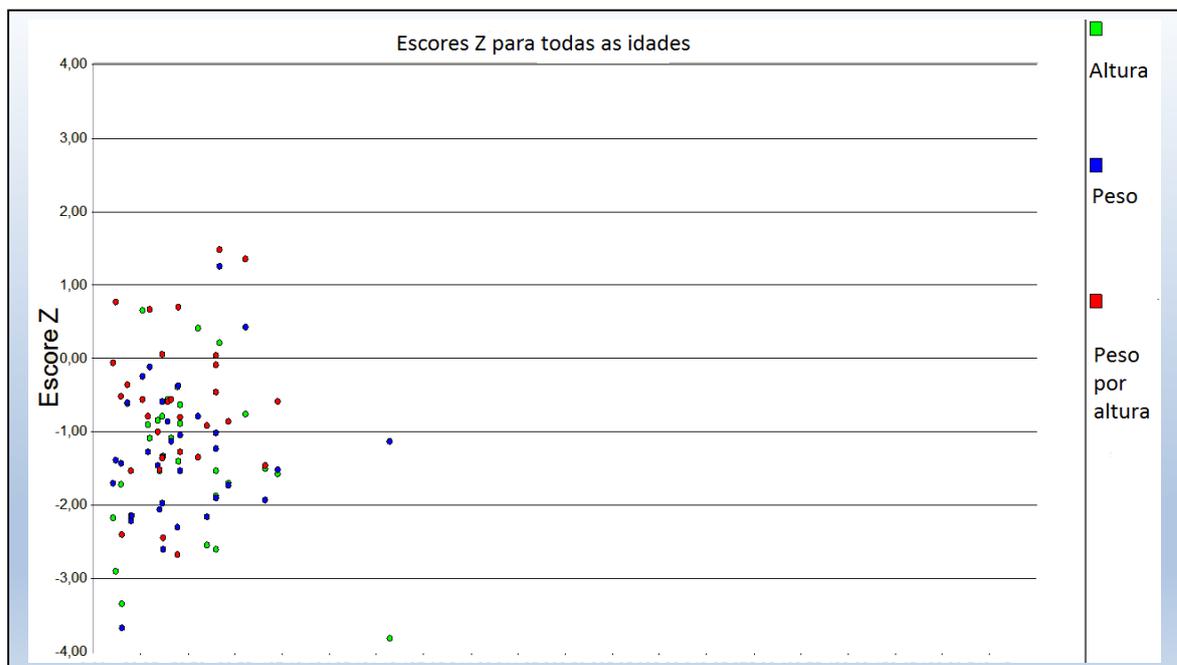


FIGURA 10 Escores-z da altura, peso e peso para altura de pacientes com leishmaniose visceral. Teresina, 2013-2014.

O IMC dos pacientes menores de 19 anos de idade, mensurado durante a admissão no estudo, teve seus valores distribuídos, em 57,6% dos pacientes, no intervalo que inclui valores acima ou iguais ao escore-z menos um e abaixo ou iguais ao escore-z mais um, apenas nove por cento dos pacientes apresentou IMC abaixo do escore- z menos dois (FIGURA 11).

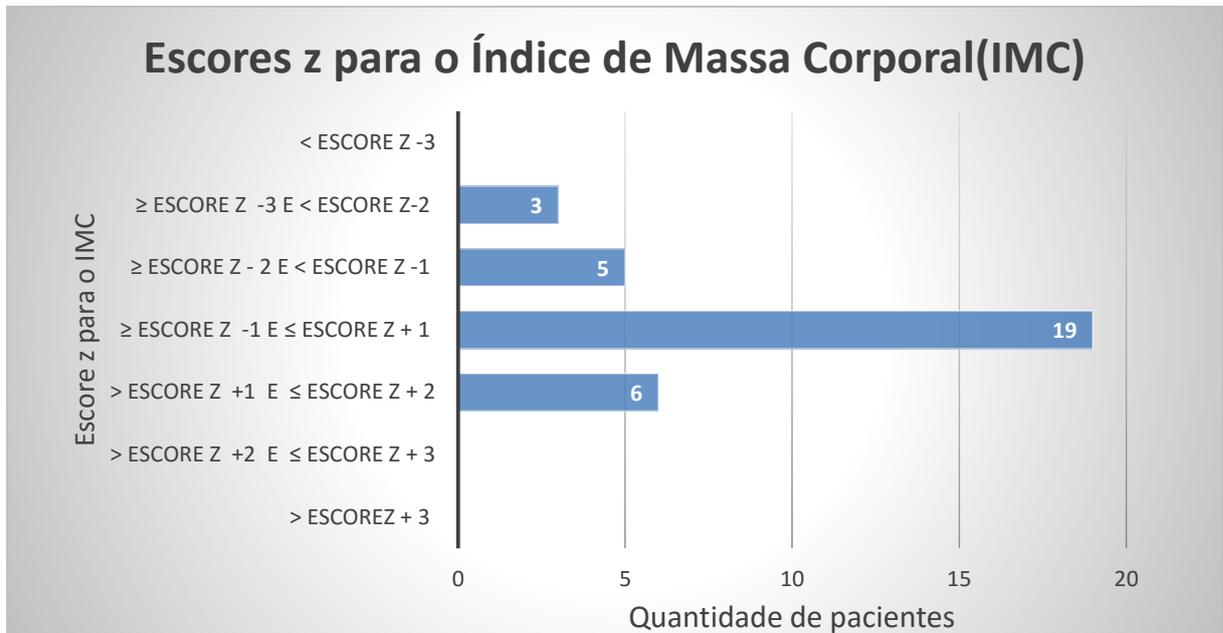


FIGURA 11 Escores- z para o índice de massa corporal (IMC) de pacientes, de zero a 19 anos de idade, com leishmaniose visceral. Teresina, 2013-2014.

Não foi mensurado a porcentagem de peso perdido desde o início da infecção por *Leishmania*, mas a queixa de perda ponderal após o adoecimento foi relatada por 63,3% dos pacientes ou responsáveis. Esta queixa apresentou correlação positiva com a idade ($r=0,33$; $p=0,05$) e com a queixa de fraqueza ($r=0,37$; $p=0,03$), no entanto não esteve correlacionada com o tempo de sintomatologia, com anorexia, adinamia ou necessidade de internação.

6.1.3 Apresentações clínica inicial da leishmaniose visceral

A LV manifestou-se, na maioria dos pacientes estudados, com a presença de palidez cutânea e de mucosas, fraqueza, adinamia, relato de perda ponderal, linfonomegalia e anorexia, além da febre e da hepatoesplenomegalia que estavam presentes em todos os pacientes (TABELA 02).

TABELA 02. Sinais e sintomas mensurados na apresentação clínica inicial dos pacientes com leishmaniose visceral incluídos no estudo “ IFN- γ , IL-6, CXCL8 e IL-10 são marcadores precoces da evolução da leishmaniose visceral”. Teresina 2013-2014.

Sintomas	Número de pacientes	%
Febre $\geq 37,8^{\circ}\text{C}$ e duração ≥ 1 semana	36	100
Esplenomegalia	36	100
Hepatomegalia	36	100
Palidez cutânea	34	94,4
Palidez de mucosas	33	91,7
Fraqueza	31	86,1
Adinamia	26	72,2
Relato de perda ponderal	23	63,9
Linfoadenomegalia	19	52,8
Anorexia	18	50,0
Dor abdominal	15	41,7
Tosse	12	33,3
Vômitos	08	22,2
Cefaleia	04	11,1
Queixas urinárias	04	11,1
Náuseas	03	8,3
Diarreia	03	8,3
Epistaxe	03	8,3
Edema palpebral e de tornozelos	01	2,8

Foi detectada linfoadenomegalia em mais da metade dos pacientes, predominando o acometimento de duas ou mais cadeias ganglionares (19/36). Os linfonodos caracterizavam-se pela consistência elástica, boa mobilidade e ausência de sinais flogísticos.

A presença de febre com duração igual ou superior a uma semana era critério de inclusão neste estudo e estava presente em toda a amostra. A temperatura máxima durante a internação variou entre 38°C a $40,5^{\circ}\text{C}$ com valor médio de $39,3^{\circ}\text{C}$ (95%CI 39,1 -39,5).

Os níveis máximos de temperatura não apresentaram correlação com o tempo de duração dos sintomas até a internação hospitalar, com o peso, com a altura, com o sexo, com o tempo de defervescência da febre após início da terapia anti-*Leishmania*, com a presença de infecções associadas à LV, com a necessidade de uso de antibioticoterapia e nem com o relato de perda ponderal. No entanto, observou-se correlação negativa entre a temperatura máxima e o IMC avaliado a admissão ao estudo ($r=-0,35$; $p=0,03$).

A extensão hepática, antes de se instituir o tratamento específico da LV, variou de 2 a 10 cm. A maioria dos pacientes (24/36) apresentou fígado maior ou igual a 5cm do BCD e o tamanho médio do fígado à admissão ao estudo foi estimado em 5,6 cm (95%CI 4,9-6,2). Não houve correlação da extensão hepática com a idade, com estatura ou com o peso. Realizou-se, então, a correção da extensão hepática pela superfície corpórea e obteve-se, como resultado, a presença de correlação negativa entre o tamanho deste órgão com os três parâmetros previamente citados ($p \leq 0,001$) (TABELA 03).

O baço aferido, antes de iniciar o tratamento anti-*Leishmania*, apresentou extensão variando de 2 a 14 cm do BCE com valor médio de 7,8 cm (95%CI 6,9 -8,8), onde apenas 19,4% dos pacientes apresentava tamanho esplênico menor que 6 cm do BCE. Não houve correlação entre o tamanho esplênico, aferido antes do tratamento, com a idade, estatura ou peso admissionais (TABELA 03).

TABELA 03 Correlação entre a extensão do baço e do fígado em valores não corrigidos e em valores corrigidos pela superfície corporal³ com o peso, estatura e idade de pacientes com leishmaniose visceral. Teresina, 2013-2014.

Caracteres	Extensão do Baço		¹ Baço/ superfície corporal		Extensão do Fígado		² Fígado/ superfície corporal	
	Coefficiente de Correlação	Valor de p	Coefficiente de Correlação	Valor de p	Coefficiente de Correlação	Valor de p	Coefficiente de Correlação	Valor de p
Idade	0,04	0,80	- 0.56	< 0,001	-0,09	0,61	-0.64	<0,001
Estatura	0,08	0,63	-0,52	0,001	-0,11	0,51	-0.64	<0,001
Peso	0,12	0,49	-0,56	< 0,001	-0.08	0,63	-0,67	<0,001

¹Correção da extensão do baço= Extensão do baço (cm) / superfície corporal (m²). ²Correção da extensão do fígado= Extensão do fígado (cm) /superfície corporal (m²). ³Superfície corporal = [(peso*4) +7] / (peso+90).

O tamanho do fígado, ao ser corrigido pela superfície corpórea, não esteve correlacionado às alterações dos marcadores laboratoriais da função hepática, com o tempo de sintomas referidos até a inclusão no estudo, com a temperatura máxima aferida, com o grau de anemia, leucopenia ou neutropenia, mas apresentou significativa correlação negativa com o número de plaquetas à admissão ($r= - 0,46$; $p<0,01$) e com a melhora da anemia no 60° dia de terapia ($r= -0,43$; $p=0,01$). O número de plaquetas inferior ou igual a 50.000/mm³ correlacionou-se positivamente à extensão hepática corrigida ($r=0,33$; $p=0,05$) (TABELA 04).

Houve correlação positiva entre as extensões hepática e esplênica corrigidas pela superfície corpórea ($r=0,75$; $p<0,001$). A análise de regressão logística evidenciou que a extensão do fígado e não a extensão do baço está relacionada a plaquetopenia grave.

Ao realizar a correção da extensão esplênica pela superfície corpórea, observou-se correlação negativa desta com a idade, estatura e peso aferidos à admissão ao estudo ($p<0,01$) (TABELA 03). Observou-se, também, correlação negativa da extensão do baço corrigida pela superfície corporal com um aumento significativo nos níveis de hemoglobina no 60º dia de tratamento anti *Leishmania* ($r= -0,36$; $p=0,04$) (TABELA 04).

TABELA 04 Correlação entre a extensão do baço e do fígado em valores corrigidos pela superfície corporal³ com os parâmetros clínicos e laboratoriais de pacientes com leishmaniose visceral. Teresina, 2013-2014.

Parâmetros clínicos e laboratoriais	¹ Fígado/ Superfície corporal		² Baço/Superfície corporal	
	Coefficiente de correlação	Valor de p	Coefficiente de correlação	Valor de p
⁴ Tempo de sintomatologia	0,06	0,74	0,19	0,27
Temperatura máxima (°C)	0,30	0,07	0,15	0,39
*Hemoglobina (g/dl)	0,15	0,38	0,17	0,32
*Hemoglobina < 7g/dL	-0,10	0,57	-0,08	0,65
*Número de leucócitos/mm ³	0,17	0,33	0,19	0,26
*Número de linfócitos/mm ³	0,28	0,09	0,31	0,06
*Número de neutrófilos/mm ³	-0,06	0,72	-0,03	0,84
*Neutropenia grave	0,10	0,55	0,05	0,77
*Número de plaquetas/mm ³	-0,46	< 0,01	- 0,23	0,14
*Plaquetas < 50.000/mm ³	0,33	0,05	0,22	0,19
* AST (U/L)	0,28	0,10	-0,02	0,90
*ALT (U/L)	0,09	0,59	-0,21	0,22
*Albumina (g/dL)	-0,13	0,45	0,008	0,96
* Bilirrubina total (mg/dL)	0,18	0,28	0,19	0,25
Ganho de plaquetas no 7º dia de terapia	-0,05	0,75	-0,04	0,90
Ganho de neutrófilos no 7º dia de terapia	-0,21	0,20	-0,10	0,56
Ganho de hemoglobina no 60º dia de terapia	-0,43	0,01	-0,36	0,04
Aumento níveis de albumina (30º dia de terapia)	0,01	0,94	-0,06	0,70
Aumento níveis de albumina (180º dia de terapia)	0,11	0,54	-0,02	0,91

¹ Correção da extensão do fígado= Extensão do fígado (cm) /superfície corporal (m²). ²Correção da extensão do baço = Extensão do baço (cm) / superfície corporal (m²). ³Superfície corporal = [(peso*4) +7] / (peso+90). ⁴Tempo entre início sintomas e a admissão no estudo. *Parâmetros clínicos e laboratoriais mensurados à admissão ao estudo.

O tempo médio decorrido entre o início dos sintomas e a admissão hospitalar foi 44,6 dias (95% CI 26,8-60,5), com tempo mínimo de sete e máximo de 270 dias. Houve necessidade de internação prévia, na doença atual, em 33,3% dos pacientes, com duração mínima de um dia

e máxima de 30 dias, média de 1,97 dias (95% CI 0,08 - 3,9). A idade não se mostrou correlacionada ao tempo de sintomatologia ($r=0,06$; $p=0,71$) ou com a necessidade de internação prévia a este estudo ($r= - 0.15$; $p=0,37$). O tempo de internação durante o estudo não foi mensurado em virtude da amostra ser proveniente de um projeto em que o tempo de internação era influenciado pelo tratamento ao qual o paciente foi randomizado.

Não houve icterícia, acometimento renal, sangramentos ou sinais de maior gravidade ou toxemia nestes pacientes.

O tratamento da LV foi randomizado e distribuído de forma homogênea na amostra, em que 30,6% dos pacientes recebeu antimoniato de N-metilglucamina (antimoniato pentavalente) 20mg Sb+5/Kg/dia, por via endovenosa ou intramuscular, dose única diária por 20 dias, com limite máximo de três ampolas por dia; um segundo grupo, 33,3% dos casos, anfotericina B lipossomal na dose de 3mg/kg/dia, por via endovenosa, durante sete dias consecutivos e um terceiro grupo (36,1%) recebeu um tratamento combinado que consistia na administração de dose única inicial de anfotericina B lipossomal, na dose de 10mg/Kg, por via endovenosa, seguida por 10 dias de tratamento com antimoniato pentavalente, 20mg Sb+5/Kg/dia, por via endovenosa ou intramuscular com limite superior de 3ampolas por dia. O desoxicolato de anfotericina B não foi utilizado por nenhum dos pacientes deste estudo.

6.1.4 Alterações laboratoriais

A avaliação laboratorial, realizada à admissão ao estudo, identificou, entre as alterações hematológicas, anemia, leucopenia, neutropenia e plaquetopenia, presentes na maior parte da amostra. O número de leucócitos e linfócitos correlacionou-se negativamente com a idade, peso e altura, enquanto o número de plaquetas apresentou correlação positiva com esses parâmetros (TABELA 05).

TABELA 05 Correlação de parâmetros hematológicos com a idade, peso, altura e índice massa corporal de pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapêutica anti-*Leishmania*. Teresina, 2013-2014.

Parâmetros Laboratoriais	Idade		Peso		Altura		IMC	
	Coefficiente de correlação	Valor de <i>p</i>						
Hemoglobina (g/dl)	- 0,12	0,48	- 0,12	0,48	-0,06	0,73	- 0,03	0,86
Leucócitos/mm ³	-0,48	< 0,01	-0,45	< 0,01	- 0,50	< 0,01	0,07	0,69
Neutrófilos/mm ³	-0,13	0,43	-0,13	0,46	-0,16	0,36	0,12	0,48
Neutrófilos <500	-0,10	0,55	- 0,13	0,46	-0,10	0,54	-0,25	0,13
Linfócitos/mm ³	-0,62	< 0,001	-0,61	< 0,001	-0,66	< 0,001	-0,08	0,65
Plaquetas/mm ³	0,38	0,02	0,38	0,02	0,37	0,02	0,25	0,14

A leucometria encontrava-se abaixo dos limites de normalidade em 72,2% dos pacientes com valor médio de 3.572 leucócitos /mm³ (TABELA 06). Foi detectada neutropenia em 69,4% dos pacientes, destes 56% apresentavam-se com neutropenia moderada e 16% com neutrófilos abaixo de 500 neutrófilos /mm³ caracterizando o quadro de neutropenia grave.

Foi detectada plaquetopenia em 88,9% dos pacientes com valor médio de 97.611 plaquetas/mm³ (TABELA 06). Metade dos pacientes com plaquetas abaixo de 101.000/mm³ e 19,4% deles com valores de 50.000 plaquetas/mm³ ou menos.

TABELA 06 Parâmetros hematológicos de pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapêutica anti-*Leishmania*. Teresina, 2013-2014.

Parâmetros Laboratoriais	Média ± Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Intervalo de confiança (95%)
Hemoglobina (g/dl)	8,6 ± 1,82	4,8	13,9	7,9-9,2
Leucócitos/mm ³	3572,2 ± 2060,0	1130	9860	2875,2 - 4269,2
Neutrófilos/mm ³	1388,2 ± 1223,1	367	6802	974,3 - 1802,1
Linfócitos/mm ³	1972,5 ± 1122,3	431	4536	1592,8- 2352,2
Plaquetas/mm ³	97611,1 ± 48048,9	20.000	243.000	81.353,7 - 113.868,5

Anemia esteve presente em 91,7% dos pacientes, com valor médio de hemoglobina, à admissão, de 8,6 g/dl (TABELA 06). Metade dos pacientes apresentava hemoglobina menor ou igual a 8,1g/dl, anemia grave com hemoglobina menor ou igual a 7g/dl esteve presente em 19,4% e apenas dois (5,5%) pacientes apresentavam-se com hemoglobina maior que 12g/dl (FIGURA 12). Não houve correlação entre o grau de anemia e o fato de ter recebido transfusão

prévia ($r = -0,13$; $p = 0,44$), com o tempo decorrido entre o início dos sintomas e a internação ($r = 0,15$; $p = 0,39$) ou com a idade ($r = -0,12$; $p = 0,48$) ou sexo ($r = 0,18$; $p = 0,29$).

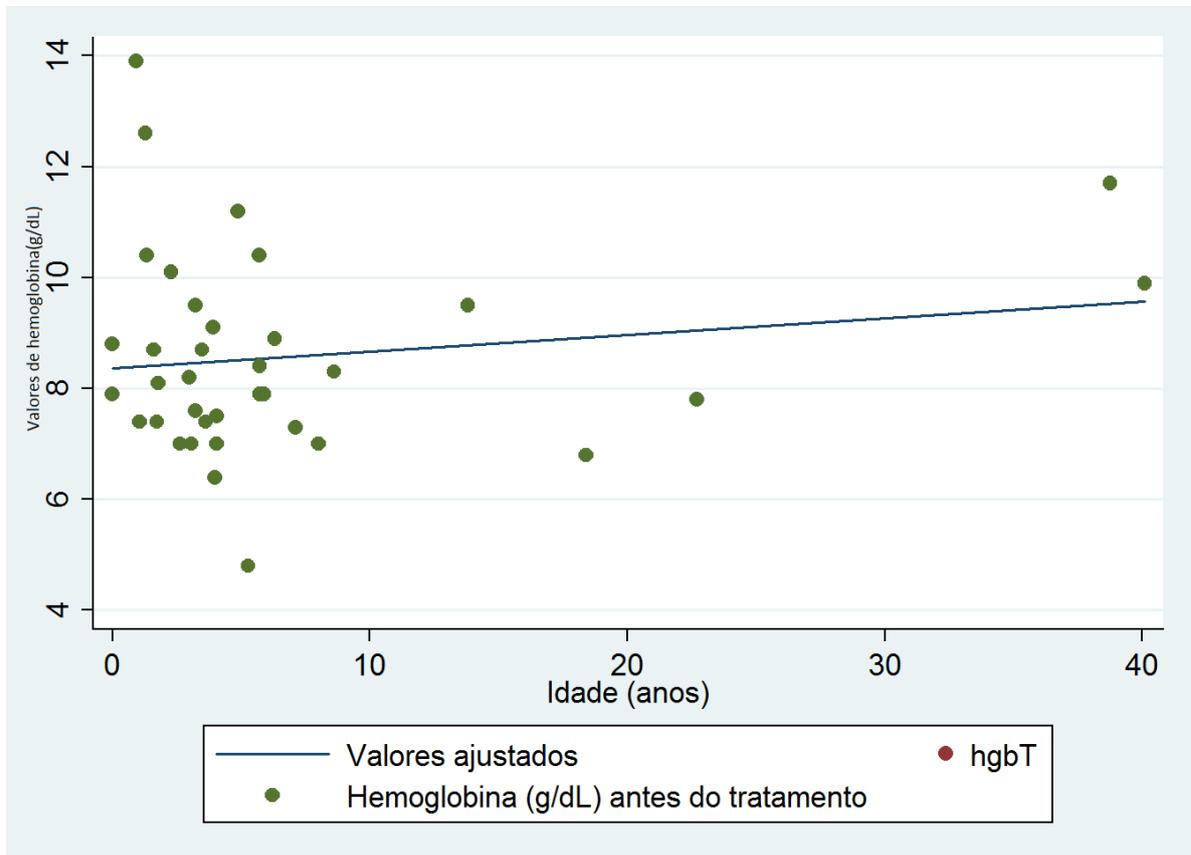


FIGURA 12 Níveis de hemoglobina (g/dL) segundo a idade, em anos, de pacientes com leishmaniose visceral. Teresina, 2013-2014.

O acometimento hepático foi evidenciado pelos níveis elevados das aminotransferases, por níveis de globulina acima dos valores de referência, pelo prolongamento do INR e pelos baixos níveis de albumina, sem alteração nos níveis de bilirrubinas.

A enzima hepática AST apresentou níveis elevados aos valores de referência em 30 dos 36 pacientes (83,3%) com valor médio de 139,3 U/L, enquanto a ALT foi detectada acima dos valores máximos de referência de normalidade em 15 dos 36 pacientes (41,7%) com valor médio de 78,0 U/L. Hipoalbuminemia esteve presente em 31 dos 36 pacientes (86,1%), com valor médio de 2,9 g/dL (TABELA 07). Não foi observada correlação entre a extensão hepática corrigida pela superfície corpórea com os níveis de AST, ALT e albumina à admissão neste estudo (TABELA 04).

TABELA 07 Caracterização laboratorial de pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapêutica anti- *Leishmania*. Teresina, 2013-2014.

Parâmetros Laboratoriais	Média ± Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Intervalo de confiança (95%)
AST (U/L)	139,3 ± 151,6	22	757	88,0 - 190,6
ALT (U/L)	78,0 ± 79,6	10	318	51,1- 105,0
Proteínas totais g/dl	7,4± 0,98	5,4	9,3	7,1- 7,8
Albumina (g/dL)	2,9 ± 0,53	1,8	4	2,7- 3,1
Globulina (g/dL)	4,5 ± 0,87	2,9	6,1	4,2 - 4,8
Bilirrubina total (mg/dL)	0,54 ± 0,24	0,1	1,2	0,45- 0,62
INR	1,25 ± 0,18	1	1,75	1,18 - 1,31
Creatinina (mg/dL)	0,51± 0,23	0,2	1,5	0,43 - 0,59
Amilase U/L	44,0 ± 16,3	20	90	38,4-49,5
Lipase U/L	60,5± 45,8	10	194	45,0 - 76,0
Proteína C reativa quantitativa de alta sensibilidade (mg/L)	57,79± 80,69	0,47	300	30,08 - 85,51

Apenas um paciente apresentou níveis de creatinina elevados. A radiografia de tórax foi normal em todos acometidos. Em um paciente foi detectada hemocultura positiva e três apresentaram urocultura positiva.

Parasitose intestinal foi detectada em 13,9% dos pacientes, dos quais 4 dos 36 (11,1%) sofriam infestação parasitária por *Entamoeba histolytica* e um (2,8%) por *Giardia lamblia*. A infestação parasitária não esteve associada aos níveis iniciais de hemoglobina, à idade ou aos sintomas clínicos gerais como anorexia, adinamia, fraqueza ou aos sintomas gastrointestinais como a presença de dor abdominal, náuseas, vômitos ou diarreia. A identificação de parasitos nas fezes apresentou correlação negativa com IMC aferido antes do tratamento específico anti-*Leishmania* ($r = -0,47$; $p < 0,01$), mas não esteve associada ao relato de perda ponderal.

A proteína C reativa apresentou níveis elevados em 77,8% dos pacientes (28/36). Foram detectados maiores níveis de proteína C reativa nos pacientes com idades mais elevadas e com maiores prolongamentos de INR, enquanto níveis mais baixos desta proteína foram encontrados nos pacientes com maiores concentrações de hemoglobina, com aminotransferases mais elevadas e com maiores extensões hepáticas e esplênicas corrigidas pela superfície corpórea. Não houve correlação com a anemia grave, o tempo de sintomatologia até a admissão, o IMC, a temperatura máxima, o tempo de clareamento da febre após início da terapia específica anti-

Leishmania, os níveis de leucócitos, neutrófilos, plaquetas, proteínas plasmáticas e bilirrubinas ou com a melhora hematológica (TABELA 08).

TABELA 08 Correlação entre níveis da Proteína C Reativa (PCR) quantitativa de alta sensibilidade (mg/L) em pacientes com leishmaniose visceral avaliados antes da instituição da terapêutica anti- *Leishmania* com os parâmetros clínicos e laboratoriais admissionais. Teresina, 2013-2014.

	Proteína C reativa (mg/L)	
	Coefficiente de correlação	Valor de <i>p</i>
Idade	0,36	0,03
IMC	0,10	0,57
Extensão esplênica corrigida pela SC	-0,33	0,05
Extensão hepática corrigida pela SC	-0,52	< 0,01
Tempo de sintomatologia	0,19	0,27
Temperatura máxima (°C)	-0,17	0,33
Tempo de clareamento da febre	- 0,06	0,74
Hemoglobina (g/dl)	-0,42	0,01
Hemoglobina < 7g/dL	0,31	0,07
Número de leucócitos/mm ³	-0,17	0,32
Número de neutrófilos/mm ³	-0,10	0,56
Neutropenia grave	0,10	0,58
Número de plaquetas/mm ³	0,15	0,39
Plaquetas < 50.000/mm ³	-0,02	0,90
AST (U/L)	-0,43	0,01
ALT (U/L)	-0,43	< 0,01
Albumina (g/dL)	0,22	0,19
Globulina (g/dL)	-0,04	0,82
Bilirrubina total (mg/dL)	-0,13	0,46
INR	0,37	0,03
Ganho de neutrófilos (7° dia de terapia)	0,32	0,06
Ganho de plaquetas (7° dia de terapia)	0,04	0,83
Ganho de hemoglobina (60° dia de terapia)	0,28	0,12
Aumento níveis de albumina (30° dia de terapia)	0,10	0,58
Aumento níveis de albumina (180° dia de terapia)	-0,41	0,02

6.1.5 Evolução clínica-laboratorial da leishmaniose visceral

Em todos os pacientes, a duração da febre foi maior ou igual uma semana, como determinado nos critérios de inclusão, com defervescência em até sete dias após o início da terapia. Destes, 27 pacientes (75%) apresentaram o último pico febril antes do terceiro dia de tratamento. O tempo médio de desaparecimento da febre, após terapia instituída, foi de 1,75

dias (95%CI 1,12- 2,4) sem diferença significativa entre os grupos de tratamento ($r= 0,03$; $p= 0,85$).

Os sintomas clássicos da LV involuíram consideravelmente após uma semana de terapia específica para *Leishmania*. Houve redução significativa na frequência da palidez de mucosas, da fraqueza, anorexia, vômito e dor abdominal em relação à admissão, sem correlação com o medicamento anti - *Leishmania*. Nenhum paciente evoluiu com epistaxe, edema ou sangramentos (FIGURA 13).

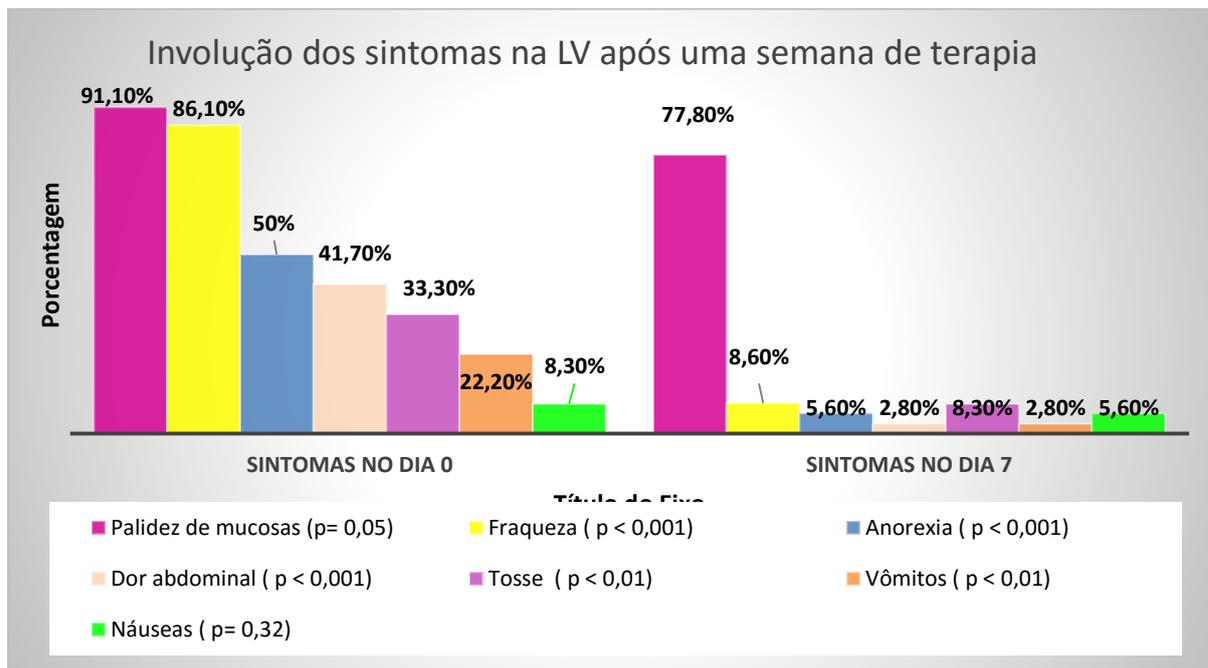


FIGURA 13 Involução dos sintomas em pacientes com leishmaniose visceral entre o dia zero e o 7º dia da instituição da terapêutica anti-*Leishmania*. Teresina, 2013-2014.

Observou-se um significativo aumento do índice de massa corporal aferido aos seis meses de tratamento em relação aos valores antes do tratamento ($p=0,04$), com valor ganho médio de 0,74 (95%CI 0,02-1,46).

A involução da esplenomegalia, definida por sua redução a 50% ou menos da extensão pré-tratamento, ocorreu no 14º dia após a terapia, em que a média da extensão esplênica não apresentou diferença significativa com a metade do seu tamanho inicial ($p=0,81$). Mais da metade dos sujeitos alcançou essa meta no 14º dia (FIGURA 14; TABELA 09). Observou-se significativa associação entre a involução da esplenomegalia corrigida pela superfície corpórea, no 14º dia de terapia, com o tratamento com anfotericina B lipossomal ($p=0,01$).

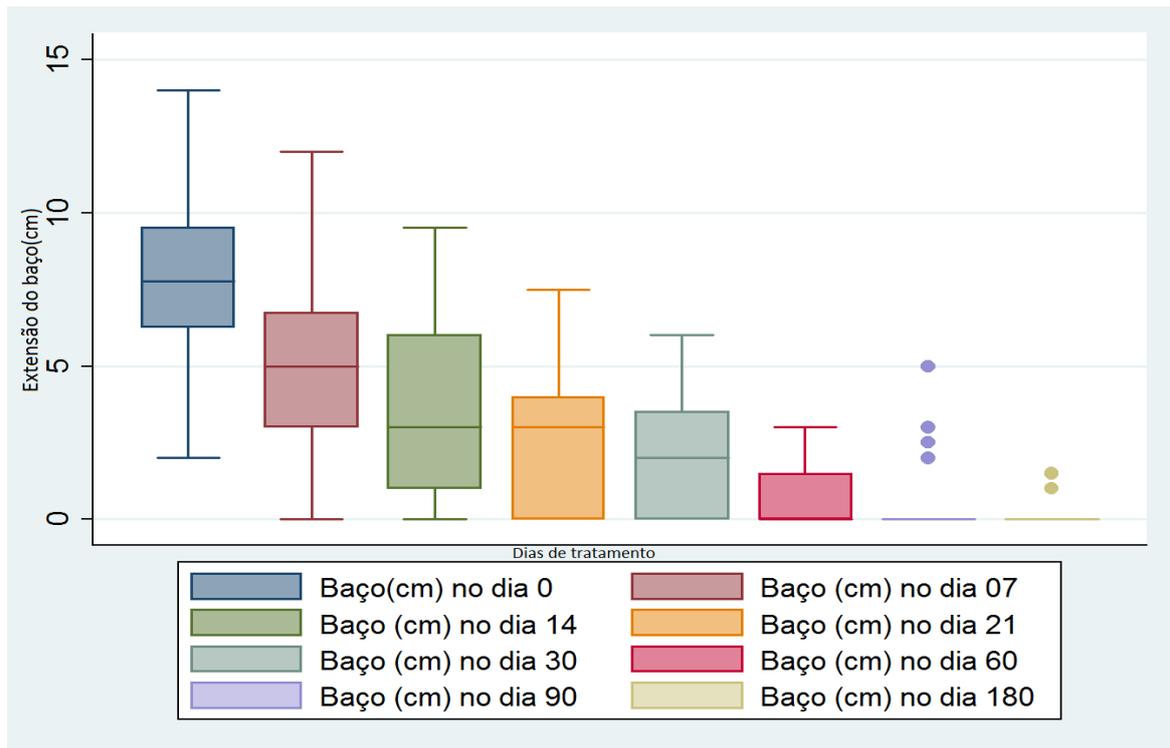


FIGURA 14 Involução da extensão esplênica (cm) em pacientes com leishmaniose visceral entre os dias zero e o 180° dia da terapêutica anti- *Leishmania*. Teresina, 2013-2014.

TABELA 09 Extensão esplênica em pacientes com leishmaniose visceral avaliados antes da instituição da terapêutica anti- *Leishmania* até o 180° dia de terapia. Teresina, 2013-2014

Extensão esplênica	Média ± Desvio padrão	Valor mínimo (cm)	Valor máximo (cm)	Extensão do baço inferior ou igual a metade da extensão no dia zero N° de pacientes (%)
Dia 0	7,8 ± 2,7	2	14	-
Dia 7	5,2 ± 2,9	0	12	14/36 (38,9)
Dia 14	3,4 ± 2,8	0	9,5	22/36 (61,1)
Dia 21	2,5 ± 2,0	0	7,5	31/36 (86,1)
Dia 30	1,9 ± 1,8	0	6	32/36 (88,9)
Dia 60	0,7 ± 1,0	0	3	34/36 (94,4)
Dia 90	0,5 ± 1,4	0	5	32/34 (88,9)
Dia 180	0,7 ± 0,3	0	1,5	36/36 (100,0)

A redução da extensão hepática também ocorreu de forma progressiva (FIGURA 15; TABELA 10). O tamanho médio hepático, aferido antes da terapia, foi reduzido a menos da metade no 21° dia da terapia e, aos seis meses, o comprimento médio hepático era inferior a um

centímetro (TABELA 10). A regressão hepática corrigida pela superfície corpórea, no 21º dia de terapia, não esteve associada ao tratamento instituído ($p=0,10$).

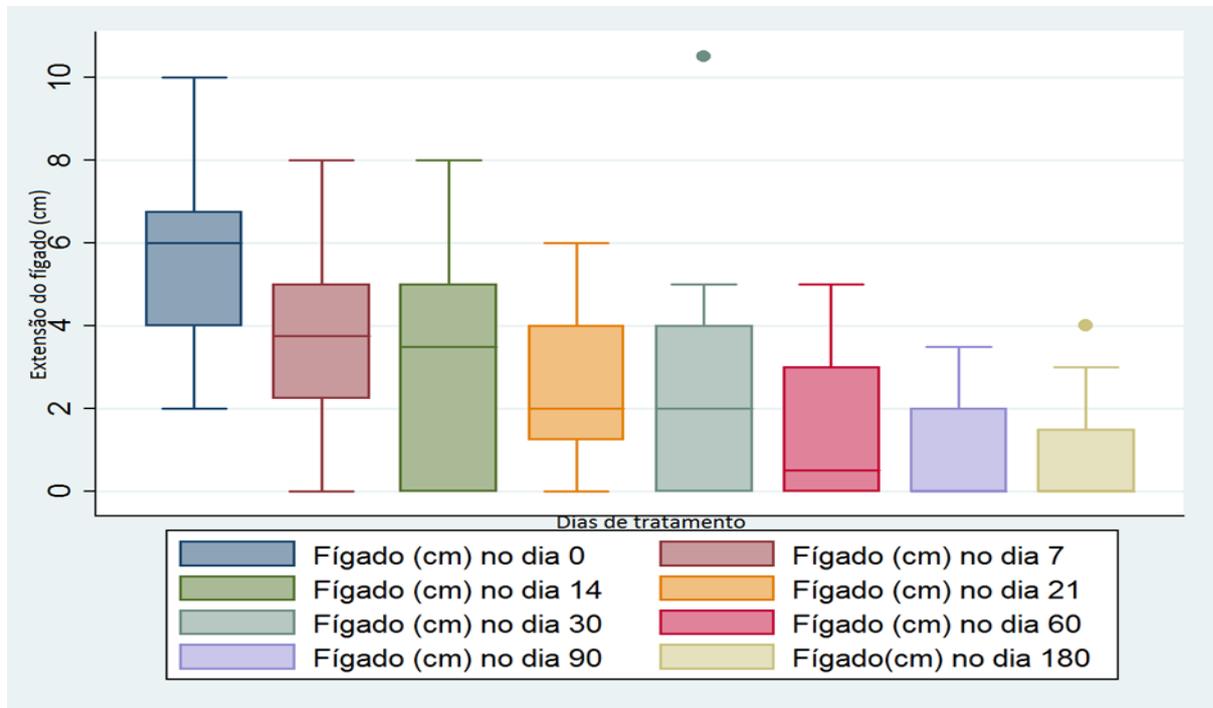


FIGURA 15 Involução da extensão hepática (cm) em pacientes com leishmaniose visceral entre os dias zero e 180º dia da instituição da terapêutica anti- *Leishmania*. Teresina, 2013-2014.

TABELA 10 Extensão hepática em pacientes com leishmaniose visceral avaliados antes da instituição da terapêutica anti- *Leishmania* até o 180º dia de terapia. Teresina, 2013-2014.

Extensão hepática	Média \pm Desvio padrão	Valor mínimo (cm)	Valor máximo (cm)	Extensão hepática inferior ou igual a metade da extensão no dia zero Nº de pacientes (%)
Dia 0	5,6 \pm 1,9	2	10	-
Dia 7	3,6 \pm 1,9	0	8	10/36 (27,8)
Dia 14	3,1 \pm 2,3	0	8	15/36 (41,7)
Dia 21	2,4 \pm 1,7	0	6	22/36 (61,1)
Dia 30	2,2 \pm 1,7	0	5	18 /36(50,0)
Dia 60	1,5 \pm 1,8	0	5	25/36 (69,4)
Dia 90	0,8 \pm 1,2	0	3,5	29/36 (80,6)
Dia 180	0,7 \pm 1,2	0	4	31/36 (86,1)

O ganho médio de hemoglobina, no 60º dia de terapia, em relação a admissão no estudo, foi de 3,1g/dl (95% CI 2,43- 3,74) (FIGURA 16). Não se observou correlação entre este dado e o fato de ter recebido transfusão prévia, o sexo, o índice de massa corporal mensurado à

admissão ao estudo ou o tratamento com antimoniato pentavalente. No entanto, correlacionou-se positivamente com a idade e o tratamento com anfotericina B lipossomal e negativamente com o tratamento combinado (TABELA 11). Neste período, 24 das 29 crianças menores de 18 anos (82,7%) atingiram valores normais de hemoglobina de acordo com a idade e sexo, ocorrendo o mesmo em 3/4 (75%) dos adultos. A proporção de resolução da anemia entre os dias zero e 60° de tratamento em crianças ($p<0,001$) e em adultos ($p=0,01$) foi significativa.

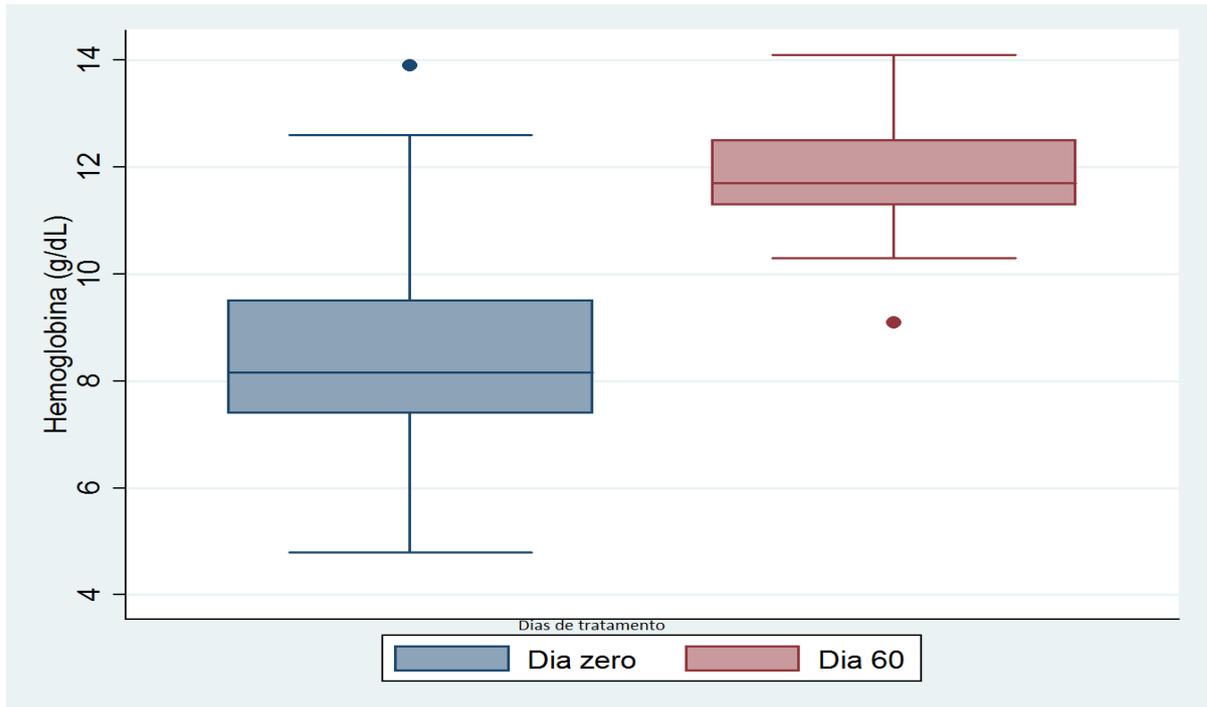


FIGURA 16 Ganho médio nos níveis de hemoglobina (g/dL) em pacientes com leishmaniose visceral entre os dias zero e o 60° dia da instituição da terapêutica anti - *Leishmania*. Teresina, 2013-2014.

TABELA 11 Ganho médio da hemoglobina, no 60° dia de terapia, em pacientes com leishmaniose visceral em relação aos níveis de hemoglobina prévios à terapêutica anti-*Leishmania*, correlação com variáveis individuais e com o tratamento instituído. Teresina, 2013-2014.

Variáveis	Coefficiente de correlação	Valor de p
Idade	0,47	< 0,01
Sexo	-0,13	0,48
IMC no dia 0 de terapia	0,27	0,12
*Hemotransfusão prévia	-0,03	0,86
Tratamento com antimoniato pentavalente	0,007	0,97
Tratamento combinado	-0,40	0,02
Tratamento com anfotericina B lipossomal	0,40	0,02

*Hemotransfusão antes do início da terapia anti -*Leishmania*.

Com uma semana de evolução após o início da terapia, houve melhora significativa da neutropenia ($p < 0,01$) e nenhum dos pacientes apresentava neutropenia grave (FIGURA 17). O ganho de neutrófilos no 7º dia de tratamento esteve correlacionado positivamente com o tratamento com anfotericina B lipossomal ($r = 0,39$; $p = 0,02$) e negativamente com o tratamento combinado ($r = -0,49$; $p < 0,01$), mas não mostrou correlação com o uso de antimoniato pentavalente ($r = 0,12$; $p = 0,49$), com a idade ($r = 0,24$; $p = 0,16$) ou com o sexo ($r = -0,14$; $p = 0,42$).



FIGURA 17 Ganho médio nos níveis de neutrófilos/mm³ em pacientes com leishmaniose visceral entre os dias zero e o 7º dia da terapêutica anti- *Leishmania*. Teresina, 2013-2014

Observou-se, também, no sétimo dia de terapia, incremento significativo no valor médio das plaquetas ($p < 0,01$) (FIGURA 18). Não houve correlação entre a melhora da plaquetopenia com o tratamento instituído ($r = -0,22$; $p = 0,20$), com a idade ($r = 0,08$; $p = 0,64$) ou com o sexo ($r = 0,16$; $p = 0,36$).

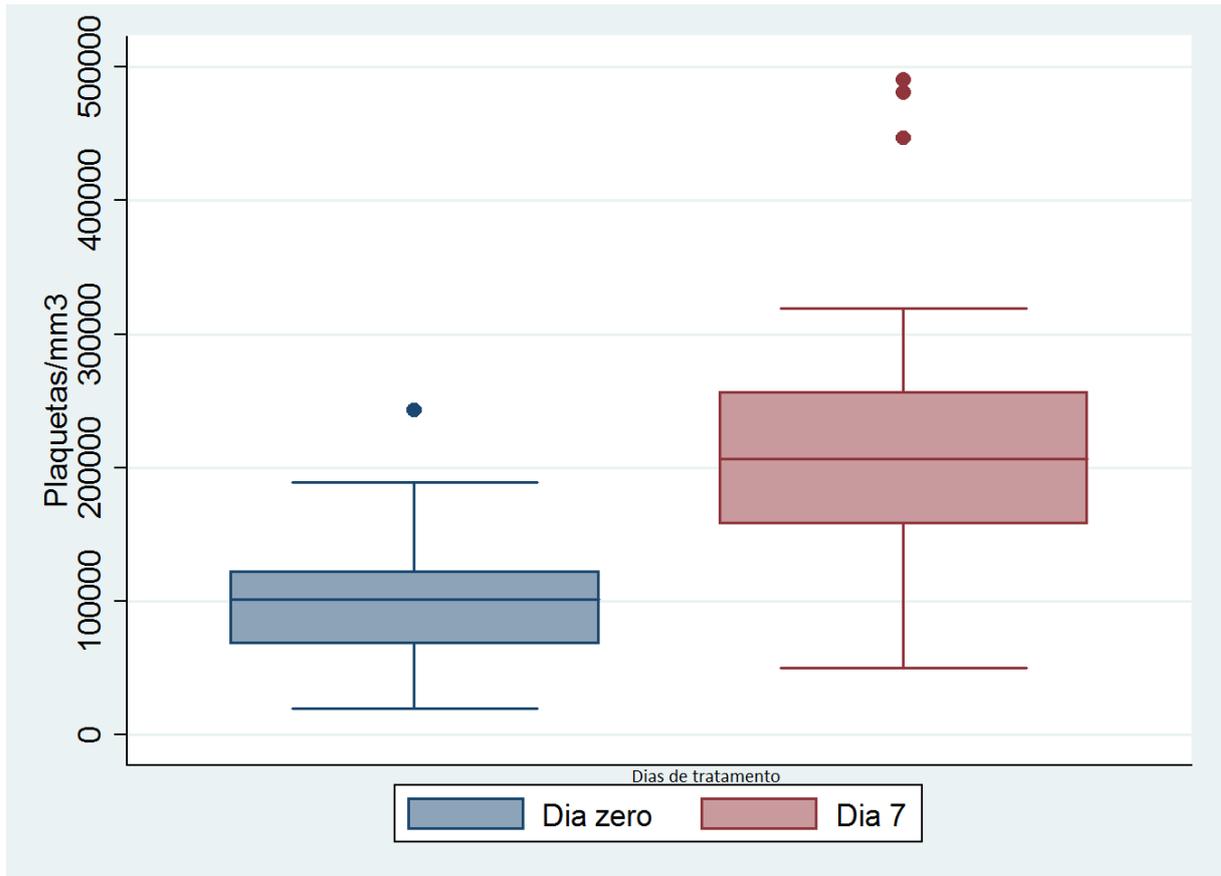


FIGURA 18 Ganho médio nos níveis de plaquetas/mm³ em pacientes com leishmaniose visceral entre os dias zero e o dia sete da instituição da terapêutica anti- *Leishmania*. Teresina, 2013-2014.

Houve melhora progressiva da função hepática caracterizada por diminuição significativa do índice INR no sétimo dia de terapia anti-*Leishmania*, dos níveis médios da aminotransferase AST no 14º dia e dos níveis de ALT no 21º dia de terapêutica (TABELA 12). O tratamento instituído não apresentou correlação com os marcadores de função hepática.

A proteína albumina teve seus níveis dosados à admissão e no 30º e 180º dia de terapia e apresentou incremento significativo de sua média entre o dia zero e o 30º dia ($p < 0,001$) e entre o dia zero e o 180º dia ($p < 0,001$), sem apresentar diferença significativa entre as médias dos níveis de albumina aferidos no 30º e 180º dia ($p = 0,90$) ou modificação com o tratamento proposto ($p = 0,62$) (TABELA 12).

TABELA 12 Evolução da função hepática em pacientes com leishmaniose visceral durante a terapia anti- *Leishmania*. Teresina, 2013-2014.

Marcadores de função hepática	Média ± Desvio padrão	Valor de <i>p</i>	Valor mínimo	Valor máximo	Intervalo de confiança (95%)
AST (U/L) no dia zero	139,3 ± 151,6	-	22	757	88,0-190,6
AST (U/L) no 14° dia	80,5 ± 78,1	0,02	25	349	53,7- 107,3
ALT (U/L) no dia zero	78,0 ± 79,6	-	10	318	51,1- 105,0
ALT (U/L) no 21° dia	40,0 ± 33,6	<0,01	6	182	28,6 -51,4
Albumina (g/dL) no dia zero	2,9 ± 0,53	-	1,8	4	2,7- 3,1
Albumina (g/dL) no 30° dia	4,3 ± 0,45	< 0,001	3,4	5,2	4,1-4,4
Albumina (g/dL) 180 ° dia	4,4 ± 0,4	<0,001	3,5	5,2	4,2 - 4,5
INR no dia zero	1,25 ± 0,18	-	1	1,75	1,18 - 1,31
INR no 7° dia	1,15 ± 0,10	< 0,01	1	1,38	1,12-1,18

Entre os eventos adversos ocorridos nos seis meses de observação destacam-se as infecções de vias aéreas, as infecções cutâneas, as dermatites e a diarreia (FIGURA 19). Ocorreram infecções de vias aéreas em 28 dos 36 pacientes com LV, destas 78,5% limitavam-se ao trato respiratório superior e 14,3% foram caracterizados como pneumonia. Foi introduzido antibioticoterapia para 28,6% dos pacientes com infecção respiratória. Entre as infecções cutâneas, destacam-se, em frequência, as piодermites, que representaram 45,4% das infecções de pele, seguidas pela infecção por *Larva migrans* (18,18%).



FIGURA 19 Eventos adversos em pacientes com leishmaniose visceral entre os dias zero e o dia cento e oitenta da instituição da terapêutica anti- *Leishmania*. Teresina, 2013-2014

Os principais eventos adversos laboratoriais foram elevação das enzimas hepáticas ALT e AST e das enzimas pancreáticas amilase e lipase (FIGURA 20). O tratamento combinado apresentou correlação positiva com a elevação da aminotransferase ALT ($r=0,58$; $p<0,01$) e das enzimas pancreáticas amilase ($r=0,43$; $p=0,02$) e lipase ($r=0,39$; $p=0,03$). Nenhum paciente apresentou sinal de gravidade que necessitasse cuidados intensivos ou a mudança da terapêutica anti-*Leishmania* inicial.

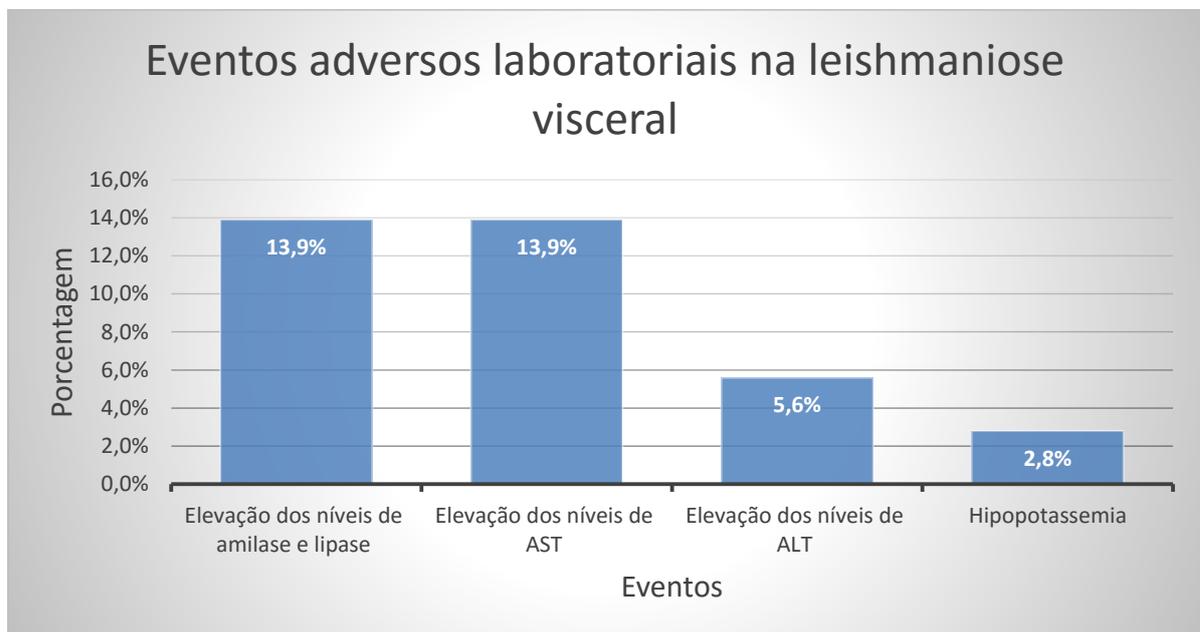


FIGURA 20 Eventos adversos laboratoriais em pacientes com leishmaniose visceral entre os dias zero e o 180º dia da instituição da terapêutica anti- *Leishmania*. Teresina, 2013-2014.

6.1.6 Citocinas

Foram analisadas 128 amostras das citocinas IL-12, IL-10, CXCL8, IL-6, IL-1 β e TNF- α dos 36 pacientes em diferentes tempos de coleta divididas da seguinte forma: 26 amostras no dia zero, 24 no dia sete, 25 no 14º dia, 23 no 30º dia e 30 amostras no 180º dia de tratamento específico anti-*Leishmania*. Enquanto para análise dos níveis de IFN- γ coletou-se, da mesma população de estudo, 92 amostras divididas da seguinte forma: 26 amostras no dia zero, 23 no dia sete, zero no 14º dia, 23 no 30º dia e 20 amostras no 180º dia de terapia específico anti-*Leishmania*.

No início do estudo, antes da instituição terapêutica, foram detectados níveis de TNF- α em 19 de 26 pacientes; IFN- γ e IL-12 em 24 dos 26 pacientes; IL-1 β em 25 de 26 pacientes e IL-10, CXCL8 e IL-6 em todos os pacientes. A maioria das citocinas mensuradas apresentou níveis elevados antes da instituição da terapia com queda progressiva entre o sétimo e trigésimo dia de tratamento.

6.1.6.1 Perfil de citocinas na fase aguda da leishmaniose visceral

O IFN- γ apresentou níveis significativamente superiores na fase aguda da LV antes da instituição do tratamento, em relação ao sétimo dia de terapia (TABELA 13). Observou-se, então, a partir desta data normalização progressiva sem diferença significativa dos níveis encontrados no sétimo dia em relação ao 30° ($p=0,62$) e ao 180° ($p=0,69$) dia após tratamento.

TABELA 13 Níveis de Interferon- γ (pg/mL) em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti- *Leishmania* até o dia cento e oitenta de terapia. Teresina, 2013-2014.

IFN- γ (pg/mL)	Mediana	Média \pm Desvio padrão	Mínimo-máximo	Valor de p
Dia 0	1,1	5,7 \pm 11,7	0-55,8	-
Dia 7	0	0,18 \pm 0,34	0-1,5	< 0,01
Dia 30	0,14	0,28 \pm 0,42	0-1,8	< 0,001
Dia 180	0	0,26 \pm 0,64	0-2,8	0,001

O mesmo padrão observado com os níveis de IFN- γ ocorreu com os níveis de IL-10 que se apresentaram elevados no dia zero com queda progressiva após a primeira semana de terapia (TABELA 14). No entanto, houve diferença significativa nos níveis de IL-10 aferidos no sétimo dia em relação ao 30° dia ($p=0,01$), mas não entre o 30° e 180° ($p=0,48$) dias de terapia.

TABELA 14 Níveis de Interleucina-10 (pg/mL) em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti- *Leishmania* até o dia cento e oitenta de terapia. Teresina, 2013-2014.

IL-10 (pg/mL)	Mediana	Média \pm Desvio padrão	Mínimo-máximo	Valor de p
Dia 0	32,34	40,7 \pm 33,19	4,90- 153,75	-
Dia 7	1,37	3,26 \pm 5,46	0,41- 24,00	< 0,001
Dia 14	1,43	1,8 \pm 1,5	0,44-7,14	< 0,001
Dia 30	0,81	1,44 \pm 1,78	0,01 - 7,09	< 0,001
Dia 180	0,77	1,05 \pm 0,85	0,12 - 4,06	< 0,001

Observou-se elevação significativa dos níveis IL-6 e da quimiocina CXCL8 no dia zero em relação ao 7º, 14º, 30º e 180º dia de terapia (TABELAS 15 e 16 respectivamente). Houve queda progressiva a partir do sétimo dia de evolução após instituição terapêutica sem alteração significativa dos valores de IL-6 ($p=0,17$) e CXCL8 ($p=0,31$) entre os dias sete e cento e oitenta após o início da terapia anti-*Leishmania*.

TABELA 15 Níveis de Interleucina-6 (pg/mL) em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti- *Leishmania* até o dia cento e oitenta de terapia. Teresina, 2013-2014.

IL-6	Mediana	Média ± Desvio padrão	Mínimo-máximo	Valor de p
Dia 0	17,34	85,58 ± 289,89	2,4 - 1498,43	-
Dia 7	1,03	1,95 ± 2,14	0,4 - 9,53	< 0,001
Dia 14	1,24	1,62 ± 1,78	0,2 - 8,92	< 0,001
Dia 30	0,65	0,87 ± 0,79	0,16 - 3,34	< 0,001
Dia 180	1,01	1,32 ± 1,01	0,44 - 5,00	< 0,001

TABELA 16 Níveis de CXCL-8 (pg/mL) em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti- *Leishmania* até o dia cento e oitenta de terapia. Teresina, 2013-2014.

CXCL8	Mediana	Média ± Desvio padrão	Mínimo-máximo	Valor de p
Dia 0	14,93	39,56 ± 68,30	1,12 - 274,94	-
Dia 7	1,78	3,25 ± 3,97	0 - 16,15	< 0,001
Dia 14	1,86	2,22 ± 1,72	0 - 7,16	< 0,001
Dia 30	1,48	1,83 ± 2,12	0,29 - 11,28	< 0,001
Dia 180	1,72	2,14 ± 1,59	0,19 - 7,03	< 0,001

Não se observou diferença significativa entre os níveis de IL-1 β e TNF- α mensurados no dia zero em relação ao sétimo e ao 14º dia de tratamento. No entanto, mostraram-se significativamente elevados, à admissão ao estudo, em relação aos valores encontrados no 30º e 180º dias de terapia (TABELAS 17 e 18).

TABELA 17 Níveis de Interleucina-1 β (pg/mL) em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti- *Leishmania* até o dia cento e oitenta de terapia. Teresina, 2013-2014.

IL1- β	Mediana	Média ± Desvio padrão	Mínimo-máximo	Valor de p
Dia 0	1,23	3,27 ± 4,64	0 - 19,62	-
Dia 7	1,16	2,77 ± 4,01	0 - 17,24	0,12
Dia 14	0,79	2,46 ± 3,92	0 - 6,48	0,11
Dia 30	0,35	0,61 ± 0,80	0 - 3,39	< 0,001
Dia 180	0,97	1,04 ± 0,74	0 - 3,97	< 0,01

TABELA 18 Níveis de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) (pg/mL) em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti- *Leishmania* até o dia cento e oitenta de terapia. Teresina, 2013-2014.

TNF- α	Mediana	Média \pm Desvio padrão	Mínimo-máximo	Valor de <i>p</i>
Dia 0	0,25	0,99 \pm 1,53	0-5,2	-
Dia 7	0,37	1,32 \pm 2,47	0 - 11,42	0,43
Dia 14	0,15	1,18 \pm 2,81	0 - 11,74	0,36
Dia 30	0	0,14 \pm 0,36	0 - 1,72	0,03
Dia 180	0,1	0,19 \pm 0,28	0 - 1,38	< 0,001

Não houve diferença significativa nos níveis de IL-12 em pacientes com LV até o 180° dia de terapia anti-*Leishmania* (TABELA 19).

TABELA 19 Níveis de Interleucina-12 (pg/mL) em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti- *Leishmania* até o dia cento e oitenta de terapia. Teresina, 2013-2014.

IL-12	Mediana	Média \pm Desvio padrão	Mínimo-máximo	Valor de <i>p</i>)
Dia 0	0,43	0,42 \pm 0,23	0 - 0,76	-
Dia 7	0,43	0,46 \pm 0,32	0 - 1,17	0,33
Dia 14	0,49	0,49 \pm 0,27	0 - 1,03	0,84
Dia 30	0,49	0,40 \pm 0,23	0-0,89	0,36
Dia 180	0,66	0,69 \pm 0,30	0,23-1,94	1,00

6.1.6.2 Correlação entre as citocinas

O logaritmo dos níveis de IFN- γ no dia zero de tratamento, antes de qualquer intervenção terapêutica específica para *Leishmania*, correlacionou-se positivamente com os níveis de IL-6 ($r= 0,56$; $p < 0,01$) e negativamente com os de TNF- α ($r= -0,49$; $p=0,05$), mas não apresentou correlação com os níveis de IL-12, IL-10, CXCL8 e IL-1 β . Enquanto os níveis de IL-12 não apresentaram correlação com nenhuma das citocinas mensuradas (TABELA 20).

A IL-10 teve seus níveis iniciais, antes da instituição da terapêutica anti-*Leishmania*, correlacionados positivamente com IL-6 ($r= 0,61$; $p < 0,001$) e CXCL8 ($r= 0,50$; $p < 0,01$), mas não apresentou correlação com os níveis das citocinas IFN- γ , IL-12, IL-1 β e TNF- α . (TABELA 20).

Os níveis de IL-6 e CXCL8 apresentaram correlação positiva entre si ($r= 0,52$; $p < 0,01$) e ambas correlacionaram- se positivamente com IL-10 como descrito acima, mas somente a citocina IL-6 correlacionou-se a IFN- γ e somente CXCL8 com IL-1 β . Nenhuma das duas

apresentou correlação com IL-12 e TNF- α . Observou-se, também, correlação positiva entre as citocinas IL-1 β e TNF- α (TABELA 20).

TABELA 20 Correlação entre o logaritmo dos níveis de citocinas em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti- *Leishmania*. Teresina, 2013-2014.

Ln	IFN- γ	IL-12	IL-10	CXCL8	IL-6	IL-1 β	TNF- α
(Níveis de citocinas no dia zero)	Coefficiente de Correlação						
IFN- γ	-	-0,005	0,22	0,34	0,56**	0,08	-0,49***
IL-12	-0,005	-	-0,17	-0,16	-0,34	-0,27	-0,46
IL-10	0,22	-0,17	-	0,50**	0,61*	0,35	0,14
CXCL8	0,34	-0,16	0,50**	-	0,52**	0,42***	0,38
IL-6	0,56**	-0,34	0,61*	0,52**	-	0,23	-0,003
IL-1 β	0,08	-0,27	0,35	0,42***	0,23	-	0,69**
TNF- α	-0,49***	-0,46	0,14	0,38	-0,003	0,69**	-

* $p < 0,001$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,05$

6.1.6.2 Correlação entre as citocinas e os sintomas clínicos

Não houve associação entre os níveis iniciais das citocinas com a idade, com estado nutricional, com as extensões hepática e esplênicas corrigidas pela superfície corporal, com a temperatura máxima aferida durante o período de internação hospitalar ou com a duração dos sintomas até a admissão ao estudo. Observou-se, no entanto, mais baixos níveis de IL-1 β , à admissão ao estudo, nos pacientes com relato de perda ponderal ($r = -0,40$; $p = 0,05$) (TABELA 21).

Foram detectados níveis admissionais de IFN- γ significativamente mais elevados nos pacientes que apresentaram maior tempo para o clareamento da febre após a instituição terapêutica anti-*Leishmania* ($r = 0,43$; $p = 0,04$) (TABELA 21).

TABELA 21 Correlação entre o logaritmo dos níveis de citocinas em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti-*Leishmania* com os parâmetros clínicos. Teresina, 2013-2014.

Parâmetros clínicos	Ln (níveis de citocinas) no dia zero						
	Coeficiente de correlação						
	IFN- γ	IL-12	IL-10	CXCL8	IL-6	IL-1 β	TNF- α
Idade	0,07	-0,01	-0,27	-0,25	-0,07	-0,28	-0,24
IMC	-0,01	0,21	-0,24	0,03	-0,12	-0,08	-0,11
Ganho IMC após 180° dia de terapia	-0,01	0,05	0,03	-0,31	0,003	-0,18	-0,24
Tempo de sintomatologia	-0,26	0,18	0,37	0,17	0,03	-0,17	0,28
Relato de perda ponderal	0,05	-0,05	0,10	0,13	0,07	-0,40***	-0,16
Temperatura máxima (°C)	0,24	0,15	0,04	-0,16	0,23	0,06	-0,18
Tempo de clareamento da febre	0,43***	-0,08	0,23	0,009	0,28	0,32	-0,08
Extensão esplênica ¹	-0,09	0,02	0,13	0,07	0,10	0,006	0,26
Extensão hepática ¹	0,08	0,05	0,29	0,25	0,22	0,18	0,04

* $p \leq 0,001$

** $p \leq 0,01$

*** $p \leq 0,05$

¹Corrigido pela superfície corpórea.

A citocina inflamatória TNF- α também apresentou níveis admissionais significativamente mais elevados nos pacientes que persistiam com hepatomegalia no sétimo dia de terapia específica anti-*Leishmania* ou com esplenomegalia no 21° dia de terapia (TABELAS 22 e 23 respectivamente)

TABELA 22 Correlação entre o logaritmo dos níveis admissionais de citocinas com a persistência de hepatomegalia durante a terapia anti-*Leishmania* em pacientes com leishmaniose visceral. Teresina, 2013-2014.

Presença de Hepatomegalia	Ln (níveis de citocinas) no dia zero						
	Coeficiente de correlação						
	IFN- γ	IL-12	IL-10	CXCL8	IL-6	IL-1 β	TNF- α
Dia 0	-	-	-	-	-	-	-
Dia 7	0,04	-0,30	0,14	0,25	0,06	0,34	0,47*
Dia 14	-0,17	-0,16	0,09	0,25	0,04	0,18	0,10
Dia 21	-0,18	-0,31	0,08	0,10	-0,08	0,14	0,42
Dia 30	-0,20	-0,11	0,16	-0,05	-0,11	0,01	0,10
Dia 180	-0,22	0,05	0,02	0,03	-0,12	0,40	0,38

* $p=0,04$

TABELA 23 Correlação entre o logaritmo dos níveis admissionais de citocinas com a persistência de esplenomegalia durante a terapia anti-*Leishmania* em pacientes com leishmaniose visceral. Teresina, 2013-2014.

Presença de Esplenomegalia	Ln (níveis de citocinas) no dia zero						
	Coeficiente de correlação						
	IFN- γ	IL-12	IL-10	CXCL8	IL-6	IL-1 β	TNF- α
Dia 0	-	-	-	-	-	-	-
Dia 7	-0,19	0,04	0,28	-0,17	0,08	0,03	0,17
Dia 14	-0,21	-0,33	0,10	0,14	0,02	0,12	0,45
Dia 21	-0,30	-0,34	0,15	-0,23	-0,13	0,29	0,47*
Dia 30	-0,16	0,01	0,05	-0,35	-0,12	-0,02	0,10
Dia 180	-0,27	0,10	-0,19	-0,35	-0,37	0,15	0,20

* $p=0,04$

Menores concentrações de hemoglobina foram observadas nos pacientes que apresentavam níveis mais elevados de IFN- γ , no dia zero de terapia. No entanto, a melhora da anemia no 60º dia de terapia, não esteve associada aos níveis iniciais das citocinas mensuradas (TABELA 24).

O número de leucócitos apresentou correlação positiva com os níveis admissionais de IL-12 ($r=0,44$; $p=0,03$) e correlação negativa com os níveis de IL-6 ($r=-0,52$; $p<0,01$). (TABELA 24).

Menor número de neutrófilos, à admissão ao estudo, apresentou correlação com elevados níveis de IL-6 ($r=-0,43$; $p=0,03$) e IL-10 ($r=-0,42$; $p=0,03$), mensurados na admissão ao estudo, enquanto a neutropenia grave esteve associada a níveis iniciais elevados de IL-10 ($r=0,48$; $p=0,01$) e CXCL8 ($r=0,38$; $p=0,05$). Não houve correlação entre o ganho de neutrófilos no 7º dia de terapia e os níveis iniciais das citocinas mensuradas (TABELA 24).

O número de plaquetas, antes da terapêutica anti-*Leishmania*, correlacionou-se negativamente com os níveis de CXCL8 ($r=-0,63$; $p<0,001$), enquanto o ganho de plaquetas com uma semana de terapia não se correlacionou aos níveis de citocinas mensurados à admissão (TABELA 24).

TABELA 24 Correlação entre o logaritmo dos níveis de citocinas em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti-*Leishmania* com os parâmetros hematológicos. Teresina, 2013-2014.

Parâmetros hematológicos	Ln (níveis de citocinas) no dia zero						
	Coeficiente de correlação						
	IFN- γ	IL-12	IL-10	CXCL8	IL-6	IL-1 β	TNF- α
Hemoglobina (g/dl)	-0,43***	0,01	-0,05	0,18	-0,15	0,09	0,10
Hemoglobina < 7g/dL	0,34	0,02	0,17	0,01	0,18	0,04	-0,01
Leucócitos/mm ³	-0,07	0,44***	-0,34	-0,27	-0,52**	0,09	-0,06
Neutrófilos/mm ³	0,05	0,31	-0,42***	-0,36	-0,43***	0,06	-0,22
Neutropenia grave	0,08	-0,12	0,48**	0,38***	0,26	0,08	0,24
Plaquetas/mm ³	-0,37	0,02	-0,36	-0,63*	-0,31	-0,34	-0,15
Ganho de neutrófilos (7° dia de terapia)	0,18	-0,21	-0,10	-0,16	0,35	-0,05	0,04
Ganho de plaquetas (7° dia de terapia)	0,22	-0,001	-0,17	-0,32	0,26	-0,12	-0,20
Ganho de hemoglobina (60° dia de terapia)	0,25	0,13	-0,08	-0,25	0,11	-0,30	-0,34

* $p \leq 0,001$

** $p \leq 0,01$

*** $p \leq 0,05$

Os níveis iniciais de TNF- α correlacionaram-se positivamente com os níveis de proteína C reativa quantitativa de alta sensibilidade e negativamente com os níveis admissionais de AST e ALT. Enquanto o prolongamento do INR correlacionou-se de forma positiva os níveis de IL-12 (TABELA 25).

Os níveis de albumina, à admissão ao estudo, correlacionaram-se negativamente aos níveis iniciais de IL-6 ($r=-0,49$; $p=0,01$) e CXCL8 ($r=-0,48$; $p=0,01$), enquanto o ganho médio nos níveis de albumina 30° dia de terapia correlacionou-se positivamente com CXCL8 ($r=0,49$; $p=0,01$) e IL-6 ($r=0,44$; $p=0,03$). Os níveis de globulina apresentaram correlação negativa com os níveis admissionais de IFN- γ ($r=-0,58$; $p<0,01$) (TABELA 25).

TABELA 25 Correlação entre o logaritmo dos níveis de citocinas em pacientes com leishmaniose visceral antes da instituição da terapia anti-*Leishmania* com os parâmetros laboratoriais. Teresina, 2013-2014.

Parâmetros laboratoriais	Ln (níveis de citocinas) no dia zero						
	IFN- γ	IL-12	IL-10	CXCL8	IL-6	IL-1 β	TNF- α
Proteína C reativa quantitativa de alta sensibilidade(mg/L)	0,10	-0,34	< 0,001	-0,11	-0,03	-0,03	0,53***
AST (U/L)	0,32	0,20	0,09	0,13	0,01	0,14	-0,48***
ALT (U/L)	0,15	0,34	-0,11	-0,01	-0,13	-0,03	-0,68*
Albumina (g/dL)	0,16	0,25	-0,20	-0,48**	-0,49**	-0,26	-0,18
Globulina (g/dL)	-0,58**	0,04	-0,24	-0,27	-0,33	0,05	0,10
Bilirrubina total (mg/dL)	0,04	-0,01	0,42***	0,44***	0,14	0,15	0,09
INR	0,29	-0,68*	0,21	0,24	0,37	0,30	0,23
Aumento de albumina (30º dia de terapia)	0,12	-0,29	0,30	0,49**	0,44***	0,38	0,47***
Aumento de albumina (180º dia de terapia)	0,08	-0,14	-0,03	0,40***	0,26	0,11	-0,06

* $p \leq 0,001$

** $p \leq 0,01$

*** $p \leq 0,05$

¹Corrigido pela superfície corpórea.

7 DISCUSSÃO

A população de estudo foi constituída por pacientes com idades entre 6 meses e 50 anos, como definido nos critérios de inclusão do estudo fonte. A maioria era representada pela população pediátrica e metade da amostra eram crianças com menos de 4 anos de idade, dados em consonância com estudos prévios que evidenciavam a predominância da LV em crianças (COSTA, C. *et al.*, 1990; COSTA, D., 2009; DANTAS-TORRES, 2006; GUERRA *et al.*, 2004; KAJAIA *et al.*, 2011; MADALOSSO *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2010; OLIVEIRA, A. *et al.*, 2006).

Acredita-se que a maior incidência de LV na população pediátrica esteja relacionada à maior susceptibilidade deste grupo à infecção por *Leishmania*, visto que as crianças pequenas só sofrem maior exposição quando os vetores e as fontes de infecção aumentam e penetram em seu restrito ambiente (COSTA, C. *et al.*, 1990). Uma possível explicação para o maior acometimento em crianças está relacionada a particularidades do metabolismo pediátrico, como demonstrado em estudo experimental, em modelos murinos, que evidenciou maior expressão de arginase pelos macrófagos infectados por *L. major* nos animais de menor idade em relação aos espécimes mais velhos (MULLER *et al.*, 2008). Esta enzima, ao ser induzida por citocinas do perfil Th2, promove a degradação do aminoácido essencial arginina a poliaminas que são importantes nutrientes para o crescimento da *Leishmania* (WANASEN e SOONG, 2008). Sugere-se, portanto, que crianças ao expressarem maior quantidade de arginase favoreçam o meio propício ao crescimento da *Leishmania* contribuindo para a maior incidência e gravidade da leishmaniose na população pediátrica (MULLER *et al.*, 2008).

Apesar da desnutrição ser descrita como um importante fator relacionado à presença da infecção sintomática por *Leishmania* na população pediátrica (ANSTEAD *et al.*, 2001; DYE e WILLIAMS, 1993; CERF *et al.*, 1987), os sujeitos desta pesquisa não apresentaram grande comprometimento do estado nutricional.

Os índices antropométricos peso para idade e estatura para idade em crianças menores de 10 anos de idade predominou nos percentuais menores ou iguais a 10%. Apesar de esses índices estarem na referência de normalidade, ressalta-se que estas crianças encontram -se em uma faixa importante de vigilância de baixo peso ou baixa estatura, pois indicam que as mesmas apresentam peso, comprimento ou estatura menores que os de 90% das crianças de sua idade.

Os escores-z dos parâmetros peso para idade, altura para idade, peso para a altura e IMC das crianças e adolescentes predominaram nos intervalos de normalidade. Dados em contradição com alguns autores que associam os defeitos imunológicos causados pela desnutrição ao desenvolvimento da infecção pela *Leishmania* (ANSTEAD *et al.*, 2001; CERF *et al.*, 1987; CUERVO-ESCOBAR *et al.*, 2014; DYE e WILLIAMS, 1993). Como a desnutrição grave, assim como outros sinais de comprometimento do estado geral, tal qual toxemia, sangramentos, falência de órgãos ou infecções graves eram critérios de exclusão do estudo fonte, os pacientes incluídos nesta análise não apresentavam grave comprometimento do estado nutricional ou outras características associadas a gravidade da doença.

A perda ponderal foi uma queixa referida pela maioria dos pacientes e responsáveis no momento da admissão ao estudo e apresentou correlação positiva com a queixa de fraqueza. Como esta perda não foi mensurada, especula-se que a diminuição do vigor físico possa induzir a falsa percepção de perda ponderal ou que pacientes debilitados a identifiquem com maior frequência. O relato de perda ponderal esteve correlacionado positivamente com a idade e apresentou correlação negativa com os níveis admissionais de IL-1 β , o que vai de encontro às funções biológicas desta citocina que interage com o sistema nervoso central induzindo anorexia (BORISH e ROSENWASSER, 2008) e que juntamente com TNF- α tem capacidade de iniciar a caquexia (KOWATA *et al.*, 2009).

Estudos prévios de pacientes com LV, na mesma área geográfica deste estudo, evidenciaram níveis mais elevados de IL-1 β , TNF- α e IL-12 nos sujeitos que referiram emagrecimento, independente da avaliação nutricional (COSTA, D. 2009), e que a maior perda ponderal esteve correlacionada positivamente à carga parasitária (SILVA, J.M. *et al.*, 2014). É possível que os pacientes mais longilíneos tiveram uma menor percepção da perda ponderal que os brevilíneos e que esta perda não esteja relacionada ao estado nutricional.

A temperatura máxima aferida durante o período de internação hospitalar apresentou correlação negativa com o IMC, no entanto não se associou com o relato de perda ponderal, com a idade, com o tempo de duração dos sintomas até a internação hospitalar ou com a presença de infecções associadas. Como a população estudada não apresentava déficit nutricional, especula-se que esta correlação deva-se a fatores externos não aferidos, como uma maior atenção médica aos pacientes com estado nutricional limítrofes.

O tempo de clareamento da febre após a instituição terapêutica anti-*Leishmania* correlacionou-se positivamente com os níveis admissionais de IFN- γ . Na Índia, foram detectadas maiores concentrações de IFN- γ , pré-tratamento, em pacientes com LV não

responsivos à terapia anti-*Leishmania*, sugerindo que elevados níveis desta citocina podem refletir a ausência de resolução e que a dosagem de IFN- γ poderia ser utilizada como um marcador da extensão da doença (ANSARI *et al.*, 2006). Esta proteína é a molécula-chave para o controle de patógenos intracelulares e o encontro de elevados níveis de IFN- γ , na fase aguda da LV (ANSARI *et al.*, 2006; CALDAS *et al.*, 2005; COSTA, A. *et al.*, 2012; HAILU *et al.*, 2004; KARP *et al.*, 1993; KHOSHDEL *et al.*, 2009) pode refletir a ativação da infecção pela *Leishmania*.

A distribuição entre os sexos ocorreu de forma homogênea, no entanto a população adulta foi representada em sua maioria pelo sexo masculino. É descrita uma maior incidência de LV na população masculina (ALVARENGA *et al.*, 2010; MADALOSSO *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2010; PASTORINO *et al.*, 2002; PEDROSA e ROCHA, 2004; SILVA, E. *et al.*, 2001) e postula-se que a maior área corporal exposta à picada dos vetores nos homens seja um dos determinantes para este acometimento, principalmente no Nordeste do Brasil, onde trabalhadores e crianças do sexo masculino não costumam usar camisa para atividades diárias ou para o trabalho na lavoura devido às altas temperaturas desta região (COSTA, C. *et al.*, 1990). Outra hipótese é que os níveis de testosterona podem aumentar a susceptibilidade da população masculina como evidenciado em estudos com animais (MOCK e NACY, 1988). Travi e colaboradores (2002) evidenciaram, através da análise de hamsters infectados com *Leishmania (Viannia) panamensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*, que o espécime do sexo masculino apresentava doença mais grave associada à maior expressão lesional de IL-4, IL-10 e TGF- β , indicando que ocorre no sexo masculino a indução de uma resposta imune mais permissiva à infecção por *Leishmania*.

A apresentação inicial da LV, na população estudada, foi semelhante às publicações anteriores que evidenciam como principais manifestações clínicas a presença de hepatoesplenomegalia associada à febre e à palidez cutânea e de mucosas (ALVARENGA *et al.*, 2010; MADALOSSO *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2010; PASTORINO *et al.*, 2002; PEDROSA e ROCHA, 2004; SILVA, E. *et al.*, 2001). A anemia esteve presente em quase todos os pacientes estudados e os níveis de hemoglobina correlacionaram-se negativamente com os níveis de IFN- γ .

O IFN- γ é uma citocina pleiotrópica, secretada pela subpopulação de linfócitos TCD4 T_H1 e por células NK, que exerce efeitos inibitórios no crescimento de células hematopoiéticas normais e malignas. Dai e colaboradores (1998) demonstraram que a adição de IFN- γ aumenta a porcentagem de células expressando Fas na superfície de células formadoras de colônia de eritrócitos (CFC-E), bem como a intensidade da expressão de Fas. O sistema Fas/ligante do Fas

(FasL) é um importante via celular responsável pela iniciação do apoptose. Fas é uma glicoproteína pertencente à família de receptores do TNF que contém um domínio de interação proteína-proteína conhecida como domínio de morte. Uma proteína adaptadora contendo domínio de morte chamado FADD (domínio de morte associado ao Fas - *Fas-Associated protein with Death Domain*) liga o Fas a outra caspase iniciadora, pró-caspase-8, na face interna da membrana plasmática. A ligação do Fas por FasL leva a ativação da caspase-8 e, conseqüente indução de apoptose (ABBAS, 2008e).

O aumento da expressão de Fas correlaciona-se com o efeito inibitório de IFN- γ na proliferação de CFC-E. É possível que a interação Fas-FasL e CFC-E produza o efeito inibitório eritróide e a apoptose iniciados pelo IFN- γ (DAI *et al.*, 1998).

Estudo posterior evidenciou que a ação inibitória no crescimento, diferenciação e viabilidade de imaturos precursores eritróides exercida por IFN- γ necessita do envolvimento simultâneo de mais dois membros da superfamília TNF, além do FasL, o TNF-like fraco indutor de apoptose (TWEAK- *TNF-like weak inducer of apoptosis*) e o ligante de indução de apoptose relacionado com TNF (TRAIL- *TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Felli e colaboradores (2005), ao tratar eritrócitos purificados humanos com IFN- γ e analisar a sua atividade após uso de antagonistas dos receptores da família TNF constatou que a atividade anti-proliferativa de IFN- γ sobre os precursores eritróides humanos, só é restaurada após a neutralização combinada do TWEAK, do TRAIL e do FasL. O envolvimento do TRAIL, um indutor negativo da eritropoiese induzido por IFN- γ , na inibição da eritropoiese foi confirmado em estudo de hamsters infectados com *L. donovani* que evidenciou que a infecção por este parasito induz em macrófagos a expressão do TRAIL. Este interage com os receptores de eritroblastos imaturos induzindo-os a apoptose (LAFUSE *et al.*, 2013).

A anemia durante a infecção por *Leishmania* é foco de atenção de pesquisadores e acredita-se que muitos fatores contribuam para sua patogenia. Sofre influência da carga parasitária, como descrito em análise de pacientes de área endêmica no Piauí, que evidenciou correlação negativa entre a carga parasitária e os níveis de hemoglobina, justificado como consequência da importante resposta inflamatória induzida pelo grande número de *Leishmanias* na medula óssea (SENE, 2013). Foi observado que os níveis de hemoglobina correlacionaram-se negativamente com a extensão hepática e esplênica e com as proteínas IL-1 β , CXCL8, IL-10, IFN- γ e TNF- α , reforçando a importância da resposta inflamatória na anemia da LV (COSTA, D 2009). É possível também que a captação esplênica dos glóbulos vermelhos pelo baço seja associada à anemia encontrada em pacientes com calazar.

Discordando de estudos iniciais que rejeitavam a hipótese da deficiência de ferro como causa da anemia na LV (MARTINS *et al.*, 1965), hoje se acredita que infecção por *Leishmania* regula a homeostasia do ferro ao induzir os macrófagos a produzir hepcidina. Trata-se de um hormônio peptídico circulante, sintetizado no fígado, que induz a internalização e degradação lisossômica da ferroportina, proteína exportadora de ferro dos macrófagos e enterócitos que apresenta papel essencial na homeostasia do ferro. Ocorre, então, inibição da expressão de ferroportina induzida pelos altos níveis de hepcidina com consequente diminuição do transporte do ferro dos macrófagos e enterócitos para a circulação e consequente acúmulo do íon intracelular (BEN-OTHMAN *et al.*, 2014).

O ferro é um substrato importante para a sobrevivência e crescimento da *Leishmania* em meio intracelular, como demonstrado em murinos infectados por *L. chagasi* que evidenciou menor parasitismo esplênico e hepático nos animais tratados com quelante de ferro, desferrioxamina, em relação aos que não receberam tratamento (MALAFAIA *et al.*, 2011). Contudo, na LV, não existe insuficiência sistêmica de ferro, este íon está aumentado no intracelular e baixo na circulação. Os altos níveis de hepcidina no calazar podem contribuir para a morbidade na LV por duas vias: ao induzir o acúmulo de ferro intracelular e favorecer a multiplicação da *Leishmania* e ao induzir a hipoferremia com consequente diminuição na síntese da heme que resulta em menor aporte de oxigênio aos tecidos.

A intensidade da anemia não esteve correlacionada à idade, sexo ou com à extensão esplênica, divergindo de estudo prévio que indicava a presença de anemia mais intensa nas crianças menores de 10 anos de idade, no sexo feminino e em pacientes com grande extensão esplênica (MARTINS *et al.*, 1965). A presença de parasitose intestinal não apresentou correlação com os níveis de hemoglobina, contrariando a hipótese da infestação parasitária como um dos fatores que contribuiriam para a presença de anemia nesta população. A imprecisão quanto à data de início dos sintomas da LV pode ser um dos fatores que justifique a ausência de correlação entre o grau de anemia e a duração dos sintomas nesta amostra.

Todos os pacientes apresentavam esplenomegalia à admissão ao estudo e a extensão do baço corrigida pela superfície corpórea correlacionou-se negativamente com a idade, peso, estatura, sem correlação com os níveis admissionais de citocinas, dados semelhantes aos descritos em coorte envolvendo 883 pacientes com infecção sintomática por *Leishmania* em área endêmica do Nordeste do Brasil (COSTA, D., 2009).

A extensão esplênica corrigida pela superfície corpórea não apresentou correlação com a concentração de hemoglobina mensurada à admissão ao estudo, no entanto se correlacionou negativamente com a melhora nos níveis de hemoglobina no 60º dia de terapia anti-*Leishmania*.

Especula-se que a correlação entre a extensão esplênica e anemia possa ser justificada por outro fator não investigado neste estudo, como por exemplo, a carga parasitária. Foi descrito que o maior número de *Leishmanias* na medula óssea está associado à maior extensão esplênica corrigida pela superfície corpórea e que a concentração de hemoglobina diminui significativamente com o aumento da carga parasitária (SENE, 2013). Acredita-se, ainda, que a captação esplênica seja um dos fatores que contribua para a pancitopenia na LV (AL-HAMASH, 2012; AL-JURAYYAN *et al.*, 1995; HAMID e GOBAH, 2009; VARMA e NASEEM, 2010).

Níveis mais elevados de TNF- α , mensurados antes do início da terapia anti-*Leishmania*, mostraram-se associados à persistência da esplenomegalia no 21º dia de terapia, dados em concordância com estudo prévio, em Natal-RN, que demonstrou que os níveis de TNF- α correlacionavam-se negativamente com a melhora clínica (SALOMÃO *et al.*, 1996) e com os resultados observados por Barral-Netto e colaboradores (1991) que identificaram elevados níveis de TNF- α nos pacientes com LV sintomática em relação aos assintomáticos e queda significativa nos níveis de TNF- α após o tratamento nos pacientes responsivos à terapia, além de elevação dos níveis desta citocina durante as recidivas, o que sugere que a mensuração dos níveis de TNF- α poderia ser usada para avaliar a atividade da LV.

O TNF- α é o principal mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias gram-negativas e pode ser um preditor do prognóstico de infecções graves por estes microrganismos. Níveis elevados desta citocina associam-se a complicações sistêmicas graves, como distúrbios metabólicos incompatíveis com a vida e à síndrome do choque séptico (ABBAS, 2008a). Apresenta correlação positiva com as citocinas inflamatórias IL-6 e IL-1 β em pacientes com LV (SENE, 2013) e pode estar envolvida na gravidade da LV (COSTA, D. *et al.*, 2013).

A hepatomegalia esteve presente em todos os pacientes. A extensão hepática corrigida pela superfície corpórea apresentou correlação negativa com o número de plaquetas e correlação positiva com a extensão esplênica corrigida. A análise de regressão logística evidenciou que a extensão do fígado e não a extensão do baço relacionava-se a plaquetopenia grave. Observou-se, também, correlação negativa entre o número de plaquetas e os níveis admissionais de CXCL8. Esses dados estão em concordância aos encontrados em coorte envolvendo de pacientes com LV sintomática desenvolvida em área endêmica do Nordeste do Brasil (COSTA, D. 2009; COSTA, D. *et al.*, 2013; SENE, 2013).

Níveis de TNF- α no fígado de cães sintomáticos infectados por *L. (L.) chagasi* correlacionaram-se linearmente com a carga parasitária hepática e encontravam-se elevados nos

cães sintomáticos, em relação aos infectados assintomáticos (MICHELIN *et al.*, 2011). É possível que níveis mais elevados de TNF- α , no curso da infecção por *Leishmania*, induza, direta ou indiretamente, maior dano hepático e consequente involução mais lenta da hepatomegalia.

O tempo médio decorrido entre o início dos sintomas e a admissão hospitalar foi aproximadamente 45 dias, resultado semelhante ao descrito por Leite e Araújo (2013) na região Nordeste do Brasil. Estudos prévios de pacientes com sintomatologia clássica de LV, realizados no Brasil, evidenciaram que o tempo médio decorrido entre o início da sintomatologia e a confirmação diagnóstica ou a instituição terapêutica esteve compreendido no intervalo entre um e dois meses (ALVARENGA *et al.*, 2010; COSTA, D. 2009; LEITE e ARAÚJO, 2013; MADALOSSO *et al.*, 2012; SAMPAIO *et al.*, 2010).

Pancitopenia associada à neutropenia esteve presente na maior parte da população estudada. Não houve correlação entre os índices hematológicos e o IMC. No entanto, idade, peso e altura correlacionaram-se negativamente com o número de leucócitos e linfócitos aferidos no momento da admissão ao estudo, resultados justificados pelas modificações fisiológicas no número de leucócitos e linfócitos com o progredir da idade.

A contagem global e diferencial de leucócitos modifica-se com a idade. O número de leucócitos no recém-nascido sadio encontra-se acima do esperado em qualquer faixa etária, então se observa redução progressiva para atingir valores semelhantes ao do adulto por volta dos seis anos de idade (BRAGA *et al.*, 2014). Da mesma forma, o número de linfócitos T maduros e de suas subpopulações aumenta gradativamente após a 19^o semana de gestação, esse aumento continua após o nascimento, com pico por volta dos seis a nove meses, declinando aos valores encontrados no adulto por volta dos seis ou sete anos de idade (GRUMACH e DUARTE, 2006).

O número inicial de leucócitos apresentou correlação positiva com os níveis admissionais de IL-12, enquanto baixa contagem de leucócitos e neutrófilos esteve associada a elevados níveis de IL-6.

A IL-12 é fundamental para a iniciação e manutenção da resposta Th1 e subsequente produção de IFN- γ . A sua participação na resposta imune a infecção por *Leishmania* é descrita em estudos experimentais que sugerem a contribuição desta citocina para o controle da doença (PAKPOUR *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2000, 2002; PINHEIRO e ROSSI-BERGMANN, 2007; SCHLEICHER *et al.*, 2007). Especula-se que a atuação da IL-12 no combate a este parasito contribua para a diminuição da esplenomegalia e consequente a melhora da leucopenia. Não houve diferença significativa nos níveis de IL-12 em pacientes com LV durante os seis meses

de avaliação o que sugere que a melhora da leucopenia esteja relacionada a melhora da infecção pela *Leishmania*.

A IL-6 tem sido apontada por contribuir para a intensa atividade inflamatória que ocorre na fase aguda da LV e tem sido implicada como a principal citocina relacionada ao óbito ou a complicações graves no curso desta doença (COSTA, D. 2009; COSTA, D. *et al.*,2013; SENE, 2013). Sugere-se, então, que a associação entre elevados níveis de IL-6 e a menor contagem de leucócitos e, conseqüentemente, de neutrófilos ocorra em virtude da patogenicidade da *Leishmania* induzindo maior inflamação e menor resposta imune efetiva para controle da LV.

O menor número de neutrófilos e a neutropenia grave, antes da instituição terapêutica anti-*Leishmania*, estiveram associadas a elevados níveis admissionais de IL-10. É descrito que elevados níveis de IL-10 estão associados à maior carga parasitária (NYLÉN *et al.*, 2007; VERMA *et al.*, 2010), que é um dos fatores que contribui para o aumento da extensão do baço (SENE,2013). Diante destes dados, especula-se que a relação entre os níveis de IL-10 e o número de neutrófilos deva-se a captação esplênica.

A maior parte das pessoas avaliadas neste estudo apresentou alteração em no mínimo um marcador de inflamação hepática, como elevados níveis de enzimas hepáticas, baixos níveis de albumina e/ou prolongamento do INR. É descrito, em estudo em murinos infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* o que os efeitos citotóxicos intracelulares induzidos por macrófagos para a destruição da *Leishmania* estão diretamente relacionados ao dano hepático e que o óxido nítrico tem um papel importante neste dano (COSTA, J.D. *et al.*, 2007).

Elevados níveis de IL-6 e CXCL8 correlacionaram-se a baixos níveis de albumina, enquanto elevados níveis de globulina correlacionaram-se com baixos níveis de IFN- γ . As aminotransferases AST e ALT apresentaram correlação negativa com os níveis admissionais de TNF- α , enquanto o prolongamento do INR esteve correlacionado positivamente com IL-12.

IL-6 é a principal indutora da produção de proteínas da fase aguda por hepatócitos (BORISH e ROSENWASSER, 2008) e correlaciona-se positivamente com CXCL8 como demonstrado neste estudo e em estudos prévios no Piauí (COSTA, 2009; COSTA, D *et al.*, 2013). As proteínas IL-6, CXCL8 e TNF- α podem contribuir diretamente ou de forma indireta para o dano hepático ao estimularem a produção de proteínas da fase aguda da inflamação nos hepatócitos (ABBAS,2008a; VARELLA e FORTE, 2001) ou a produção de outras citocinas, mediado por TRAIL, estimular apoptose dos hepatócitos (DAY,2006). Ressalta-se, ainda, que elevados níveis de IL-6 estão associados a baixos níveis de albumina (OLIVEIRA, C. 2010).

A IL-12 é um importante indutora da produção de IFN- γ e, por conseguinte, fundamental na resposta inicial a infecção por *Leishmania*, enquanto o prolongamento do INR relaciona-se indiretamente ao comprometimento hepático. Especula-se que o acometimento hepático é um reflexo da interação *Leishmania*- resposta imune do hospedeiro e, por conseguinte, a indução da inflamação.

A proteína C reativa é produzida no fígado e atua regulando a extensão e a intensidade da reação inflamatória. É descrita como um importante biomarcador de atividade inflamatória, pois pode refletir a extensão do processo inflamatório ou da atividade clínica, principalmente em infecções bacterianas, reações de hipersensibilidade, doenças reumatológicas, isquemia e necrose tecidual podendo servir como preditor de prognóstico (HART, 1989; PROCTOR *et al.* 2015; ROSA NETO e CARVALHO, 2009; WORTHMANN *et al.* 2015). Este estudo identificou elevados níveis de proteína C reativa na maioria dos pacientes acompanhados. Observou-se correlação positiva da proteína C reativa com a idade, INR e com os níveis admissionais de TNF- α e correlação negativa com os níveis de hemoglobina, aminotransferases e extensões hepáticas e esplênicas. Os pacientes mais inflamados apresentaram -se mais anêmicos e com prolongamento de INR, alterações que podem contribuir com uma evolução clínica desfavorável no curso da LV.

Estudo de pacientes com LV, realizado no final do século XX, já alertava para a análise as proteínas de fase aguda, com destaque para proteína C reativa, como marcadoras da atividade da doença. Foi descrito que pacientes com LV apresentavam níveis de proteína C reativa mais elevados que os controles saudáveis e que a redução da carga parasitária ocorria de forma mais rápida nos pacientes com menores concentrações desta proteína (WASUNNA *et al.*,1995).

Os níveis das citocinas IFN- γ , IL-6, CXCL8, IL-10, IL-1 β e TNF- α foram significativamente superiores antes da instituição terapêutica anti-*Leishmania*. Observou-se, portanto, a ativação simultânea de citocinas/quimiocinas dos perfis Th1 e Th2 na resposta inicial à infecção por *Leishmania* como demonstrado em estudos prévios (ANSARI *et al.*, 2006; COSTA, A. *et al.*, 2012; PERUHYPE-MAGALHAES *et al.*,2006).

Os altos níveis de IFN- γ justificam-se pela ativação da resposta imune do hospedeiro. Esta citocina caracteriza-se por ativar macrófagos e potencializar a resposta antiprotzoária de fagócitos mononucleares humanos (MURRAY *et al.*,1983) e tem sido descrita com uma importante mediadora da resposta imune à infecção por *Leishmania* (KENNEY *et al.*, 1998; MURRAY e DELPH-ETIENNE, 2000; PINHEIRO e ROSSI-BERGMANN, 2007). Os neutrófilos, eosinófilos, células NK e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foram identificados como principais origens celulares de IFN- γ em indivíduos com LV sintomática, demonstrando a

participação de células da resposta imune inata e adaptativa na sua produção (PERUHYPE-MAGALHAES *et al.*, 2006).

Estudo prévio, brasileiro, identificou correlação positiva entre os níveis plasmáticos e o número absoluto de leucócitos totais, esinófilos, neutrófilos e linfócitos T CD4⁺expressando IL-10 e IFN- γ (PERUHYPE-MAGALHAES *et al.*, 2006). A IL-10 apresenta ações contraditórias durante a infecção por *Leishmania*, pois, ao mesmo tempo em que diminui a atividade leishmaniscida dos macrófagos e favorece a multiplicação do parasito e o desenvolvimento da doença, apresenta ação imunoreguladora atenuando os eventos adversos de uma resposta inflamatória exagerada (SINGH *et al.*, 2012; TRINCHIERI, 2007). Em indivíduos assintomáticos para a infecção por *Leishmania*, observa-se uma resposta imune mista com padrão de citocinas Th1 e Th2 e ressalta-se a importância ação da IL-10 que abrande os mecanismos de defesa do hospedeiro para preservar a homeostasia imune após efetivo clearance do parasito (PERUHYPE-MAGALHAES *et al.*, 2005). Especula-se, portanto, que os elevados níveis de IL-10 sejam justificados por um mecanismo de defesa do hospedeiro para contrabalancear aos efeitos deletérios da resposta imune exagerada.

As citocinas e quimiocinas apresentam papel de destaque na resposta imune à infecção por *Leishmania* e podem correlacionar-se aos fatores de mau prognóstico ou ao óbito (COSTA, 2009; COSTA, D *et al.*, 2013; SENE, 2013). O sucesso da imunidade depende do recrutamento apropriado de células imune efectoras para o local da infecção e, portanto, da ação das quimiocinas (OGHUMU *et al.*, 2010). As proteínas CXCL8, IL-6, IL-1 β e TNF- α são mediadores inflamatórios e caracterizam-se por estimular o recrutamento de células para o sítio da inflamação e induzir os principais sintomas clínicos evidenciados na LV sintomática como febre, anorexia, adinamia, perda ponderal. Os elevados níveis destas proteínas refletem a resposta imune inicial a defesa do hospedeiro e estão de acordo com os sinais e sintomas clínicos evidenciados nesta população de estudo.

Observou-se correlação positiva entre CXCL8, IL-6 e IL-10 (COSTA, D. 2009), entre IL-6 e IFN- γ (COSTA, D. 2009; COSTA, D *et al.*, 2013), CXCL8 e IL-1 β (COSTA, D. 2009; COSTA, D *et al.*, 2013). Enquanto TNF- α correlacionou-se negativamente com IFN- γ e positivamente com IL-1 β (COSTA, D. 2009; COSTA, D *et al.*, 2013; SENE, 2013). Resultados semelhantes aos descritos em estudos prévios no Piauí, exceto a correlação entre os níveis de TNF- α e IFN- γ que foi descrita como positiva (COSTA, D. 2009). As diferenças entre as populações estudadas, como o menor número de participantes e ausência de sinais de gravidade na população estudada, podem justificar a discrepância entre os resultados encontrados.

A evolução clínica dos pacientes estudados seguiu o curso descrito pelo Ministério da Saúde do Brasil para definição de melhora clínica e critérios de cura na LV. É descrito defervescência precoce da febre que ocorre por volta do quinto dia de medicação, melhora dos parâmetros hematológicos a partir da segunda semana e redução da hepatoesplenomegalia nas primeiras semanas. Ao final do tratamento, espera-se redução da extensão esplênica de 40% ou mais, em relação à medida inicial (BRASIL, 2003).

Ocorreu defervescência da febre antes do terceiro dia de terapia na maioria dos pacientes avaliados. Enquanto, no sétimo dia de terapia, observou-se grande redução da sintomatologia clínica, aumento significativo do número de neutrófilos e plaquetas e melhora da função hepática. Essa melhora ocorreu concomitante com a redução significativa nos níveis de IFN- γ , IL-10, IL-6 e CXCL8.

Tem-se descrito a importância dos níveis de IFN- γ como um marcador da extensão da LV. Estudo na Índia, evidenciou elevados níveis de IFN- γ , pré-tratamento, em pacientes com LV sintomática com redução significativa ao final da terapia específica anti-*Leishmania*. Os pacientes que não responderam a terapêutica apresentavam os maiores níveis iniciais de IFN- γ , sugerindo que elevados níveis desta citocina podem refletir a ausência de resolução da doença (ANSARI *et al.*, 2006). Foram observados, também, níveis mais elevados das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-6 e da quimiocina CXCL8 em pacientes com menores números de neutrófilos e plaquetas e somente IL-10, IL-6 e CXCL8 associaram-se a elevação das aminotransferases (COSTA, D. 2009). Sene (2013), evidenciou a presença de correlação negativa entre o número de plaquetas e os níveis de IL-10, IL-6 e CXCL8 em pacientes com LV sintomática. Os níveis de IFN- γ não foram mensurados (SENE, 2013). Estes dados reforçam a hipótese que as citocinas e quimiocinas, de forma direta ou indiretamente, associam-se a magnitude da sintomatologia na LV.

A involução significativa da esplenomegalia e da hepatomegalia, definida por redução do órgão a cinquenta por cento ou menos da extensão pré-tratamento, ocorreu no 14º dia de terapia para o baço e no 21º dia para o fígado. O parasitismo hepático e esplênico ocorre de forma diferenciada, observa-se rápida multiplicação hepática nas primeiras semanas, enquanto o crescimento do baço é lento nesse período. Este aumenta à medida que os folículos linfóides esplênicos são substituídos por células mononucleares parasitadas (WILSON *et al.*, 2005). A persistência da hepatoesplenomegalia nessa população de estudo foi associada a elevados níveis de TNF- α mensurados antes da instituição da terapia anti-*Leishmania*.

A redução dos níveis de IL-1 β e TNF- α ocorreu de forma mais lenta com significativa regressão no 30º dia de terapêutica específica anti-*Leishmania*. Estas citocinas apresentaram

correlação positiva entre si e contribuem para a manutenção da atividade inflamatória. Elevados níveis deTNF- α associaram-se a maiores níveis de proteína C reativa e à persistência da hepatoesplenomegalia. Especula-se, então, que a resposta inflamatória da LV persista mesmo após o término do tratamento o que justifica a involução mais lenta da hepatoesplenomegalia, bem como uma significativa melhora nos níveis admissionais de hemoglobina só observada no 60° dia de terapia.

O IMC só foi mensurado a admissão e aos 6 meses de terapia, no entanto no 30° dia de terapêutica observou-se aumento significativo nos níveis de albumina. Especula-se que a queda significativa nos níveis das citocinas caracterizadas por induzir anorexia e caquexia possam ter contribuído para a melhora do apetite e consequente maior aporte nutricional e melhoria proteica.

O tratamento com anfotericina B lipossomal esteve significativamente associado à involução da esplenomegalia corrigida pela superfície corpórea, no 14° dia de terapia, à melhora da anemia e da neutropenia. A anfotericina B é a droga leishmaniscida mais potente disponível comercialmente, atuando nas formas promastigotas e amastigotas do parasita, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (BRASIL,2003). Estudo, na Índia, descreve esta medicação como extremamente efetiva na primeira linha de tratamento da LV e com maior aumento na contagem de plaquetas, leucócitos e hemoglobina, além de maior taxa de cura em relação ao tratamento com antimoniato (MISHRA *et al.*, 1994). A eficácia e segurança desta droga para cura da LV é descrita em áreas endêmicas do Sul da Ásia, mas a dose ideal para eficácia no leste da África ainda precisa ser determinada (BALASEGARAM *et al.*,2012; WHO, 2010).

O tratamento combinado – anfotericina B lipossomal associada ao antimoniato – esteve negativamente correlacionado à melhora da anemia e correlacionado de forma positiva com a elevação da aminotransferase ALT e das enzimas pancreáticas amilase e lipase. Entre os efeitos colaterais do uso de antimoniato de N- metil glucamina são descritos elevação das enzimas hepáticas e pancreáticas (BRASIL, 2003; SALDANHA *et al.*, 2000; TOBIAS, 2009) sem repercussões clínicas e que, normalmente, não contraindicam a progressão da terapia. Neste estudo não houve associação entre os eventos descritos e o uso isolado do antimoniato. Hipotetiza-se, portanto, que a sobreposição dos efeitos tóxicos destas duas medicações – anfotericina B lipossomal e antimoniato – pode ter acentuado a toxicidade de cada droga isolada.

A incidência de eventos adversos nos pacientes avaliados foi superior à descrita em estudo prévio, no Piauí, que detectou infecções bacterianas em 16,6% dos pacientes com LV sintomática, infecções de pele e tecido celular subcutâneo em 22,4% e pneumonia 14,5%

(COSTA, D., 2009). Análise de crianças menores de 12 anos de idade internadas para tratamento de LV, em Minas Gerais, também apresentaram menores taxas de infecção respiratórias e cutâneas aos descritos neste estudo (XAVIER-GOMES *et al.*,2009). O longo período de observação e a maior representatividade da população pediátrica nesta amostra justificam estes resultados, visto que crianças menores de cinco anos de idade apresentam de quatro a catorze episódios de infecções de vias aéreas superiores ao ano (BEREZIN, 2014) e são alvos frequentes de infecções cutâneas e gastrointestinais.

8 CONCLUSÕES

O mesmo padrão de citocinas TH1 e TH2 descritos em pacientes graves com LV existe em uma população homogênea sem sinais de gravidade. Ocorre uma resposta inflamatória exacerbada com elevados níveis de citocinas, quimiocinas e proteína C reativa na fase aguda da LV antes do tratamento que se atenua com a melhora clínica e laboratorial. A atividade inflamatória e a sintomatologia clínica clássica, bem como as alterações laboratoriais apresentam relação temporal entre si e melhoram significativamente a partir da primeira semana de terapia. IFN- γ , IL-6, CXCL8 e IL-10 são bons marcadores da resposta inicial ao tratamento na LV. Esses resultados sugerem que é possível prever e acompanhar a evolução clínica da LV através de citocinas medidas no início do tratamento.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K., *et al.* Cytokines. In: (Ed.). **Imunologia Celular e Molecular**. 6^oed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008a, p. 268-301.

_____. Imunidade natural. In: (Ed.). **Imunologia Celular e Molecular**. 6^oed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008b, p. 19-46.

_____. Mecanismos efetores da imunidade humoral. In: (Ed.). **Imunologia Celular e Molecular**. 6^oed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008c, p. 321-348.

_____. Mecanismos efetores da imunidade mediada por células. In: (Ed.). **Imunologia Celular e Molecular**. 6^oed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008d, p. 303-320.

_____. Tolerância imunológica. In: (Ed.). **Imunologia Celular e Molecular**. 6^oed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008e, p. 243-263.

AGRAWAL, Y. *et al.* Hematological profile in visceral leishmaniasis. **Int J Infect Microbiol.** v.2, n.2, p. 39-44, 2013.

ALBUQUERQUE, P.L.M.M. *et al.* Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Rev Panam Salud Publica**, Washington, v. 26, n. 4, Oct. 2009.

ALEXANDER, J. *et al.* Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, p.2935–2943, 2000.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSELL D.G. *Leishmania* species: Models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 2993-3002, 1999.

AL-HAMASH, F.I.C.M.S. Study of visceral leishmaniasis (kala-azar) in children of Iraq. **Mustansiriya Medical Journal**, v. 11, n. 2, dec. 2012.

AL-JURAYYAN, N.A., *et al.* The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. **J Trop Pediatr**, v.41, n.3, p.143-8, June.1995.

ALONSO, D.P. *et al.* Genotypes of the Mannan-Binding Lectin Gene and Susceptibility to Visceral Leishmaniasis and Clinical Complications. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n.8, p.1212-1217, Apr. 2007.

ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n.5, May. 2012.

ALVARENGA, D.G. *et al.* Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados a letalidade. **Rev Soc. Bras Med Trop.**, v. 43, p. 194-197, 2010.

ANSARI, N.A. *et al.* Elevated levels of interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. **Clin Immunol.**, v.119, n.3, Jun, p.339-45. 2006

ANSTEAD, G. M. *et al.* Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. **Infection and Immunity**, v.69, n.8, p. 4709-4718, Aug. 2001.

ARAÚJO, V.E.M *et al.* Early Clinical Manifestations Associated with Death from Visceral Leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis.**, v.6, n.2, 2012.

ASGHARZADEH, M. *et al.* Mannose-binding lectin gene and promoter polymorphism in visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.10, n.11, p.1850-1854, June. 2007.

ASSIS, R.R. *et al.* Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: Modulation of Innate Immune System and Variations in Carbohydrate Structure. **PLoS Negl Trop Dis.**, v.6, n.2, p.1-11, Feb.2012.

AWASTHI, A., *et al.* Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J Med Res**, v.119, n.6, p.238-258, June.2004.

BACELLAR, O. *et al.* Interleukin-12 restores Interferon- γ production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. **J Infect Dis.**, v.173, n.6, p.1515-1518, June.1996.

BADARÓ, R., *et al.* New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v.154, n.6, p.1003-11, Dec.1986.

_____. Imunidade humoral e celular em indivíduos curados de leishmaniose visceral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.18, n.2, abr-maio,1985.

BAJÉNOFF, M., B. *et al.* Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, p. 619–63. Mar. 2006.

BALASEGARAM, M. *et al.* Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert Opin. Emerging Drugs**, v.17, n. 4, p. 493-510, 2012.

BARATA, R.A. *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. **BioMed Research International**, 2013.

BARRAL, A. *et al.* Transforming growth factor β as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p. 3442-3446, Apr.1993.

BARRAL-NETTO, M. *et al.* Human-Leishmaniasis@cytokines.bahia.br. **Braz J Med Biol Res.**, v. 31, n. 1, 1998.

BARRAL-NETTO, M.; BADARÓ, R; BARRAL, A. Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v.163, p. 853-857, Apr.1991.

BARROS.M.P. *et al.* Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários intracelulares: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium* spp. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 13, n. 20, p.01-20, 2012.

BEHRMAN, R. E.; KLIEGMAN, R.; JENSON, H. B. Plaquetas e distúrbios dos vasos sanguíneos. In: (Ed.). **Nelson: Tratado de Pediatria**. 18. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 2087-2095.

BEN-OTHTMAN, R. *et al.* Leishmania-Mediated Inhibition of Iron Export Promotes Parasite Replication in Macrophages. **PLoS Pathog.**, v. 10, n.1, 2014.

BEREZIN, E.N. Infecções de vias aéreas superiores. IN: CAMPOS JÚNIOR, D; BURNS, D.A.R. **Tratado de Pediatria: Sociedade Brasileira de Pediatria**. Barueri, SP: Manole, 2014, p. 1477-1481.

BHATTACHARYYA, T. *et al.* IgG1 as a potential biomarker of post-chemotherapeutic relapse in visceral leishmaniasis, and adaptation to a rapid diagnostic test. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 8, n.10, Oct. 2014.

BILATE, A.M.B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. Curso Básico Atualizado de Imunologia para o Reumatologista. **Temas de reumatologia clínica**, v.8, n.2, jun.2007.

BORISH, L; ROSENWASSER, L.J. Cytokines in allergic inflammation. In: ADKINSON Jr, N.F. *et al.* **Middleton's Allergy: Principles and Practice**. 7ed. St Louis: Mosby, 2008. p. 165-179.

BOXER, L.A. Leucopenia. In: BEHRMAN, R. E.; KLIEGMAN, R.; JENSON, H. B. **Nelson: Tratado de Pediatria**. 18. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p.909-915.

BRAGA *et al.* Interpretação do hemograma e de provas de coagulação. IN: CAMPOS JÚNIOR, D; BURNS, D.A.R. **Tratado de Pediatria: Sociedade Brasileira de Pediatria**. Barueri, SP: Manole, 2014, p. 2297-2304.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução CNS N° 441, de 12 de maio de 2011: **Diretrizes para análise ética de projetos de pesquisa que envolva armazenamento de materiais ou uso de materiais armazenados em pesquisas anteriores**. DOU n° 136 de 18/07/2011. Disponível em: <http://www.ung.br/arquivo/pesquisa/comite_etica/resolucao_441_2011.pdf>. Acesso em: 26 jan. 2015.

_____. Conselho Nacional de Saúde. Resolução CNS N° 466, de 12 de dezembro de 2012: **Diretrizes e Normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos**: Brasília, 2012. DOU n° 12 de 13/06/2013. Disponível em: <<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>> Acesso em: 10 jan.2014.

_____. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estimativa da população residente em Teresina** com data de referência 1° de julho de 2014. Disponível em: <<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=221100>> Acesso em: 20 jan. 2015.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Coordenação Nacional de DST e Aids. **Diretrizes dos Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA)**: Brasília, 1999. 32 p.1999.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. 2006.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 82 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 122 p. 2003.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2013**. Sinan Net, 2013. [on line] Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf>> Acesso em: 19 abr. 2015.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Letalidade de leishmaniose visceral. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2013**. [on line] Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Letalidade.pdf> > Acesso em: 19 abr. 2015.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância alimentar e nutricional- SISVAN**. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. Disponível em:<http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/sms/usu_doc/album_seriado_de_antropometria.pdf> Acesso em: 28 fev. 2012.

BRIÈRE, F. *et al.* Human Interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D + (sIgD +) B Cells to Secrete IgG1 and IgG3. **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 757-762, Feb. 1994.

BURZA, S. *et al.* Risk Factors for visceral leishmaniasis relapse in immunocompetent patients following treatment with 20 mg/kg liposomal amphotericin b (ambisome) in Bihar, India. **PLoS Negl Trop Dis.**, v.8, n.1, p.1-7, 2014.

CALDAS, A. *et al.* Balance of IL-10 and Interferon- γ plasma levels in human visceral leishmaniasis: Implications in the pathogenesis. **BMC Infectious Diseases**, v.5, n.113, 2005.

CARSWELL, E.A. *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.72, n.9, p.3666-3670, 1975.

CARVALHO, E.M. *et al.* Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. **J. Clin. Invest.** v.83, p..860-864, Marc.1989.

_____. Imunopatologia do baço na leishmaniose visceral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.18, n.2, p.109-112, abr-jun, 1985.

CASTELLANO, L.R.C. Resposta imune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão. **VITAE Academia Biomédica Digital**, n.25, Oct., dec, 2005.

CASTRO, A.J.M. **Leishmaniose Visceral- Avaliação Citomorfológica da Medula Óssea e Correlação com a Gravidade da Doença**. 69 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) 2011. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2011.

CERF, B.J., *et al.* Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. **J Infect Dis.**, v.156, n.6, p.1030-3, Dec.1987.

CHAKRABARTI, S. *et al.* Clinico-hematological profile of visceral leishmaniasis among immunocompetent patients. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v.44, n.2, Mar. 2013.

CHAPLIN, D.D. Overview of the Immune Response. **J Allergy Clin Immunol**, v 125, n.2, suppl.2, Feb. 2010.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature reviews microbiology**, v. 5, nov.2007.

COLLIN, S. *et al.* Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in Southern Sudan. **Clin Infect Dis.**, v.38, n.5, p.612-9. 2004.

COSTA, A.S.A., *et al.* Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 707, n. 6, p. 735-739, 2012.

COSTA, C.H.N., *et al.* Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg**, v.66, n.4, p.334-337, Apr. 2002.

_____. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n.12, p.:2959-2963, 2008.

_____. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil (1980-1986). **Rev Saude Publica**, v.24, p.361-372. 1990.

_____. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 99, n.3, p. 229-236, Apr. 2005.

_____. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? – A case control study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n.4, p.386-392, jul -ago.2010.

COSTA, D.L **Fatores de prognóstico na leishmaniose visceral: alterações clínicas e laboratoriais associadas à resposta imune aos distúrbios da coagulação e à morte**.2009.194f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,2009.

_____. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. **Pathogens and Global Health**, v.107, p.78-87, 2013.

COSTA, J.D. *et al.* *Leishmania chagasi*: Cytotoxic effect of infected macrophages on parenchymal liver cells. **Experimental Parasitology**, v. 117, n.4, p. 390–398, 2007.

CRUVINEL, W. de M. *et al.* Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n.4, p.434-461, 2010.

CUERVO-ESCOBAR, S. *et al.* T-Cell populations and cytokine expression are impaired in thymus and spleen of protein malnourished balb/c mice infected with *Leishmania infantum*. **PLoS ONE**, v.9, n.12, Dec. 2014.

DAEHNERT, W. Differential diagnosis of hepatic, biliary, pancreatic and splenic disorders. IN: DAEHNERT, W. **Radiology review manual**, 3rd ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1996, p.485-540.

DAI, C. H., J. O. *et al.* Fas ligand is present in human erythroid colony-forming cells and interacts with Fas induced by interferon γ to produce erythroid cell apoptosis. **Blood**, v. 91, n.4, p.1235–1242, Fev,1998.

DANTAS-TORRES, Filipe. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 3, June. 2006.

DAY, C.P. *et al.* From Fat to Inflammation. **Gastroenterology**, v. 130, n.1, p. 207 - 210, 2006.

De ALMEIDA *et al.*, Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.98.n.7, p.861-870, Oct. 2003.

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. **J Exp Med**, v.185, p. 2061-2068, June.1997.

DIBLEY, M.J. *et al.* Interpretation of Z-score anthropometric indicators derived from the international growth reference. **Am J Clin Nutr**, v.46, n.5, p.749-62, Nov.1987.

DNDI. Drugs for Neglected Diseases Initiative. Disponível em: < <http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas/leishmanioses> > Acesso em: 26 jun.2013.

DOMINGUEZ, M. *et al.* Complement Interaction with Trypanosomatid Promastigotes in Normal Human Serum. **J Exp Méd.** v. 195, n.4, p. 451-459, 2002.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v.5, n. 276, 2012.

DYE, C. e WILLIAMS, B. Malnutrition, age and the risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revisited. **Proced. R. Soc.Lond.B.**, v.254, p.33-39. 1993.

DUARTE, M.I.S e CORBETT, C.E.P. Histopathological patterns of the liver involvement in visceral leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.29, n.3, May-Jun, p.131-6. 1987.

DUTRA, R.A. *et al.* Splenectomy in a patient with treatment-resistant visceral leishmaniasis: a case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n.1, p.130-131, jan-fev, 2012

EL HAG, I.A., *et al.* Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). **J. Clin Pathol**, v.47, n.6, Jun, p.547-51. 1994.

ENGWERDA, C.R. *et al.* Distinct Roles for Lymphotoxin- α and TumorNecrosis Factor in the Control of Leishmaniadonovani Infection. **American Journal of Pathology**, v.165, n. 6, Dec. 2004.

EVANS- OSSES, I.; MESSIAS-REASON, I.; RAMIREZ, M.I. The emerging role of complement lectin pathway in trypanosomatids: molecular bases in activation, genetic deficiencies, susceptibility to infection, and complement system-based therapeutics. Review article. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

FALCÃO, S. A. C. *et al.* Exposure to *Leishmania braziliensis* triggers neutrophil activation and apoptosis. **PLoS Negl Trop Dis.**, v.9, n.3, 2015.

FELLI, N.*et al.* Multiple Members of the TNF Superfamily Contribute to IFN- γ -mediated inhibition of erythropoiesis. **J immunol**, v.175, p. 1464-1472, 2005.

FERGUSON, M.A.J. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 352, n. 1359, p. 1295-1302, 1997.

FLORA, R *et al.* Immunosuppression during *Leishmania donovani* infection: a potential target for the development of therapy. **Annals of Parasitology**, v.60, n.4, p 239–245, 2014.

FRADE, A.F. Leishmaniose visceral e susceptibilidade genética. **Revista da Biologia**, 2011, v.6b, p. 22-25.

FRANCO, L.H; BEVERLEY, S.M; ZAMBONI, D.S. Innate Immune Activation and Subversion of Mammalian Functions by *Leishmania* Lipophosphoglycan. **Journal of Parasitology Research**, 2012.

GAMA, M.E.A. *et al.* Severe visceral leishmaniasis in children: the relationship between cytokine patterns and clinical features. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 46, n.6, Dec. 2013.

_____. Subclinical Form of the American Visceral Leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.99, n.8, p. 889-893, Dec.2004.

GANTT, K. R. *et al.* Activation of TGF- β by *Leishmania chagasi*: Importance for Parasite Survival in Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 170, p. 2613-2620, 2003.

GAUTAM, S. *et al.* IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. **JID**. v. 204, n.7, p.134-137, Oct. 2011.

GHALIB, H.W *et al.* Interleukin-10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J Clin Invest**, v. 92, p. 324-329, July.1993.

GREEN, P.J. *et al.* Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan -binding protein. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.66, p.319-328, 1994.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p. 615-623, 2004.

GRUMACH, A.S; DUARTE, A.J.S. Desenvolvimento da resposta imune na criança. IN: ROXO JÚNIOR, P. **Alergia e imunodeficiências em pediatria**. Abordagem prática. Ribeirão Preto-SP: Tecmedd, 2006, p.225-236.

GUERRA, J.A., *et al.* [Visceral leishmaniasis among Indians of the State of Roraima, Brazil: clinical and epidemiologic aspects of the cases observed from 1989 to 1993]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.37, n.4, July-Aug, p.305-11. 2004.

GUILLEREY, C. *et al.* Pivotal role of plasmacytoid dendritic cells in inflammation and NK - cell responses after TLR9 triggering in mice. **Blood Journal**, v.120, n.1, p.90-99, 2012.

HAILU, A. *et al.* Distinct immunity in patients with visceral leishmaniasis from that in subclinically infected and drug-cured people: implications for the mechanism underlying drug cure. **J Infect Dis**, v.184, p.112-115, 2001.

_____. Elevated plasma levels of interferon (IFN)- γ , IFN- γ inducing cytokines, and IFN- γ inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.71, n.5, 2004, p. 561–567, 2004.

HEINZEL, F.P., *et al.* Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **J Exp Med**, v.169, n.1, p.59-72, Jan. 1989.

HAMID, G. A; GOBAH, G.A. Clinical and hematological manifestations of visceral leishmaniasis in Yemeni children. **Turk J Hematol**, v.26, p. 25-28, 2009.

HART, W. R. C-reactive protein: the best laboratory indicator available for monitoring disease activity. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v.56, n.2, p.126-130, 1989.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. *Lancet*, v.354, Oct 2, p.1191–1199, 1999.

JACK, D.L. and TURNER, M.W. Anti-microbial activities of mannose-binding lectin. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. 4, p. 753-757, 2003.

JERONIMO, S.M., *et al.* Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. **Genes Immun**, v.8, n.7, p.539-51, Oct. 2007.

KAJAIA, M. *et al* Risk factors for relapse of visceral leishmaniasis in Georgia. **Trop Med Int Health**, v.16, n.2, p.186–192, Feb, 2011.

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

KAUSHAL, H. *et al.* Role of CD8+ T cells in protection against *Leishmania donovani* infection in healed visceral leishmaniasis individuals. **BMC Infectious Diseases**, v.14, 2014.

KAWANO, Y; NOMA, T. Role of interleukin-2 and interferon- γ in inducing production of IgG subclasses in lymphocytes of human newborns. *Immunology*, v.88, p.40-48, 1996.

KENNEY, R. T. *et al.* Splenic Cytokine Responses in Indian Kala-Azar before and after Treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, v.177, p.815–819, 1998.

KHOSHDEL, A. *et al.* Increased levels of IL-10, IL-12, and IFN- γ in patients with visceral leishmaniasis. *Braz J Infect Dis*, Salvador, v. 13, n. 1, Feb. 2009.

KIMA, P.E.; SOONG, L. Interferon gamma in leishmaniasis. *Frontiers in immunology*, v. 4, n. 156, June. 2013.

KOWATA, C. H. *et al.* Fisiopatologia da caquexia no câncer: uma revisão. *Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR*, Umuarama, v. 13, n. 3, p. 267-272, set/dez. 2009.

KUCZMARSKI, R.J; OGDEN, C.L.; GUO, S.S. *et al.* 2000. CDC growth charts for the United States: Methods and development. National Center for Health Statistics. Vital Health Stat v.11, n.246, May. 2002. Disponível em: < http://www.cdc.gov/nchs/data/series/sr_11/sr11_246.pdf > Acesso em: 05 mar. 2015.

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

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

LAURENTI, M.D *et al.* The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.37, n.3, p.427-434, 2004.

LEITE, A.I. e ARAÚJO, L.B. Leishmaniose visceral: aspectos epidemiológicos relacionados aos óbitos em Mossoró-RN.Rev. *Patol. Trop.*, v. 42, n.3, p. 301-308, jul-set.2013.

LEITE, F; COUTINHO, J. Neutropenia.Acta Médica Portuguesa, v.11, p.989-996,1998.

LIMA, I.P. *et al.* Human immunodeficiency virus/*Leishmania infantum* in the first foci of urban American visceral leishmaniasis: clinical presentation from 1994 to 2010.*Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 46, n. 2, Apr. 2013.

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

MADALOSSO, G. *et al.* American visceral leishmaniasis: Factors associated with lethality in the state of São Paulo, Brazil. *Hindawi Publishing Corporation. Journal of Tropical Medicine*, 2012.

MALAFAIA, G. *et al.* *Leishmania chagasi*: Effect of the iron deficiency on the infection in BALB/c mice. *Experimental Parasitology*, v.127, n.3, p. 719–723, 2011.

MARTINS, J.M., *et al.* The anemia of kala-azar. **Rev.Inst. Med. Trop.** São Paulo, v.7, n.1, p.47-64, 1965.

MARY, C. *et al.* Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8 (+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4 (+) antigen-specific T cells. **Infect Immun.**, v.67, n.11, p.5559-66, nov.1999.

MAURICIO, I.L., *et al.* Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. **Parasitology**, v.122, n. Pt 4, Apr, p.393-403. 2001.

McCONVILLE, M.J. *et al.* Secretory pathway of trypanosomatid parasites. **Microbiology and molecular Biology Reviews**, v.66, n.1, p.122-154, Mar.2002.

McCONVILLE, M.J.; FERGUSON, M.A. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. **Biochem J.**, v. 294(Pt2), p.305–324, Sep. 1993.

McELRATH, MJ. *et al.* The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, v.167, p.1927-1937, June.1988.

MELO, K.M; CARVALHO, B.T.C. Células T regulatórias; mecanismos de ação e função nas doenças humanas. **Rev. bras, alerg. imunopal**, v.32, n.5, p.184-188, 2009.

MESQUITA JUNIOR, D. *et al.* Sistema imunitário- parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev. Bras. Reumatol**, São Paulo, v.50, n.5, Out. 2010.

MICHALICK, M.S.M. Gênero *Leishmania* In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2005, p.41-46.

MICHELIN, A de F. *et al.* Evaluation of TNF-a, IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 105, n. 5, p. 373–383, 2011.

MIRALLES, D.G. Th1 and Th2 Cell-Associated Cytokines in Experimental Visceral Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v.62, n.3, p. 1058-1063, Mar.1994.

MISHRA, M. *et al.* Amphotericin versus sodium stibogluconate in first-line treatment of India kala-azar. **Lancet**, v.344, p.1599-1600, Dec.1994.

MOCK, B.A. e NACY, C.A. Hormonal modulation of sex differences in resistance to *Leishmania major* systemic infections. **Infect Immun**, v.56, n.12, Dec, p.3316-9. 1988.

MULLER, I., *et al.* Age-related alteration of arginase activity impacts on severity of leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v.2, n.5, p.e 235. 2008.

MURRAY, H.W. *et al.* Interleukin-10 (IL-10) in Experimental Visceral Leishmaniasis and IL-10 Receptor Blockade as Immunotherapy. **Infection and Immunity**, p. 6284–6293, Nov.2002.

MURRAY, H.W.; DELPH-ETIENNE, S. Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 68, n.1, p. 288–293, Jan. 2000.

MURRAY, H.W.; NATHAN, C.F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral Leishmaniadonovani. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n.4, p. 741–746, 1999.

MURRAY, H.W.; RUBIN, B. Y.; ROTHERMEL, C.D. Killing of intracellular *L. donovani* by lymphokine stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon gamma is the activating lymphokine. **J Clin Invest**, v.72, n.4, p.1506-1510, Oct.1983.

NAEEM, A. Z. *et al.* Clinical Features and Laboratory Findings of Visceral Leishmaniasis in Children Referred to Children Medical Center Hospital, Tehran, Iran during 2004-2011. **Iranian J. Parasitol.** v. 9, n. 1, p.1-5, Jan- mar, 2014.

NUNES *et al.* Epidemiological profile of leishmaniasis at a reference service in the state of Alagoas, Brazil, from January 2000 to September 2008. **Braz. J Infect Dis**, v.14, n.4, p. 342-345, 2010.

NYLÉN, S. *et al.* Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n.4, April, p. 805-817. 2007.

OGHUMU, S.O. *et al.* Role of Chemokines in Regulation of Immunity against Leishmaniasis. **Exp Parasitol.** v. 126, n.3, p. 389–396. 2010 Nov.2010.

OLIVEIRA, A.L.L., *et al.* [Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.39, n.5, Sep-Oct, p.446-50. 2006.

OLIVEIRA, C.M.C. **Marcadores nutricionais e inflamatórios e sua associação com a morbimortalidade em hemodiálise.**2010.130f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

OLIVEIRA, J.M. *et al.* Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n.2, p.188-193, mar-abr.2010.

OLIVIER, M., *et al.* Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.2, p.293- 305, Apr. 2005

PAKPOUR, N.; ZAPH, C.; SCOTT, P. The central memory CD4₊ T Cell population generated during *Leishmania major* infection requires IL-12 to produce IFN- γ . **The Journal of Immunology**, v.180, p. 8299-8305, 2008.

PANDEY, S. *et al.* Involvement of *Leishmania donovani* major surface glycoprotein gp63 in promastigote multiplication. **J. Biosci.**, v. 29, n. 1, p.15–22, Mar.2004.

PARK, A. Y.; HONOWICZ, B.; KOPF, M; SCOTT, P. The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*. **J. Immunol.**, v. 168, p. 5771–5777, 2002.

PARK, A. Y.; HONDOWICZ, B.D; SCOTT, P. IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. **J. Immunol.**, v.165, p. 896–902, 2000.

PASTORINO, A.C., *et al.* Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. **Jornal de Pediatria**. Rio de Janeiro, v.78, n.2, p.120-127, Mar-Apr.2002.

PEARSON, R. D. *et al.* Interaction of *Leishmania donovani* promastigotes with Human Monocyte-Derived Macrophages: Parasite entry, intracellular survival, and multiplication. **Infection and Immunity**, v.32, n.3, p. 1249-1253. June.1981.

PEDROSA, C.M.S.; ROCHA, E. M. M. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos procedentes de Alagoas, Brasil. **Rev. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n.4, p.300-304, jul/ago. 2004.

PERUHYPE-MAGALHAES, V., *et al.* Immune Response in Human Visceral Leishmaniasis: Analysis of the Correlation Between Innate Immunity Cytokine Profile and Disease Outcome. **Scandinavian Journal of Immunology**. v.62, n.5, p.487-495, Nov.2005

_____. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha+ monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. **Clin Exp Immunol**, v.146, n.1, p.124-32, Oct. 2006.

PETERS, N.C. *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted sand flies. **Science**, v.15, n.321, p.970-974, Aug. 2008.

PINHEIRO, R. O.; ROSSI-BERGMANN, B. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57BL/6 mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.102, n.1, p.79–82. Feb.2007.

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

PRAJEETH, C.K. *et al.* *Leishmania*-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 7, p. 2699–2708, July.2011.

PRATES, D.B. *et al.* *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, Sep. 2011.

PREETI, B.; SHRIRAM, G.; PUNEET, K. Haematological parameters in visceral leishmaniasis. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, v. 2, n. 8, Aug, p.6-8, 2013.

PROCTOR, M.J. Systemic Inflammation predicts all-cause mortality: a Glasgow inflammation outcome study. **PLoS ONE**, v.10, n.3, 2015.

QUEIROZ, M.J., *et al.* Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. **J Pediatr**, Rio de Janeiro, v.80, n.2, p.141-146, Mar-Apr.2004.

REY, L.C. Grandes endemias-Leishmaniose visceral (calazar). In: CAMPOS JÚNIOR, D e BURNS, D.A.R. (Org.) **Tratado de pediatria- Sociedade Brasileira de Pediatria**. Barueri, SP: Manole, 2014, p.1545-1554.

ROCHA, N.A. *et al.* Visceral leishmaniasis in children: a cohort of 120 patients in a metropolitan city of Brazil. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v.53, p.154-160, 2011.

ROSA NETO, N.S; CARVALHO; J.F. de. O uso de provas de atividade inflamatória em reumatologia. **Rev Bras Reumatol**, v. 49, n.4, p.413-430, 2009.

ROSAS FILHO, M.S; SILVEIRA, F.T. Epidemiologia, Clínica e Imunologia da Infecção Humana por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em Área Endêmica de Leishmaniose Visceral no Pará. **Revista Paranaense de Medicina**, v.21, n.3, p.7-15, July-set. 2007.

SAKAGUCHI, S. *et al.* Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? **International Immunology**, v. 21, n.10, p. 1105–1111, 2009.

SALDANHA, A.C.R, *et al.* Estudo comparativo entre estibogluconato de sódio BP 88® e antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea II. Toxicidade bioquímica e cardíaca. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.4, p.:383-388, julho, 2000.

SALOMÃO, R. *et al.* Plasma levels of tumor necrosis factor- α in patients with visceral leishmaniasis (Kala-Azar). Association with activity of the disease and clinical remission following antimonial therapy. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.38, n.2, p. 113-118, mar/abr.1996.

SAMPAIO, M.J.A.Q. *et al.* Risk Factors for Death in Children with Visceral Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.4, n.11, 2010.

SANABRIA, M.X.H. *et al.* Role of Natural Killer Cells in Modulating Dendritic Cell Responses to *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v.76, n.11, p. 5100–5109, Nov. 2008.

SANTOS, I.K.F.M. *et al.* Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v.69, n.8, p.5212-5215. Aug.2001.

SANTOS, P.L. *et al.* *Leishmania chagasi* naturally resistant to nitric oxide isolated from humans and dogs with visceral leishmaniasis in Brazil. **Nitric Oxide**, v.27, p. 67–71, 2012.

SBP. Sociedade Brasileira de Pediatria. **Avaliação nutricional da criança e do adolescente – Manual de Orientação / Sociedade Brasileira de Pediatria. Departamento de Nutrologia**. – São Paulo: Sociedade Brasileira de Pediatria. Departamento de Nutrologia, 2009.116 p.

SCHLEICHER, U *et al.* NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. **The Journal of Experimental Medicine**, v.204, n.4, p. 893–906, April. 2007.

SCHRODER, K. *et al.* Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 2, p. 163-189, feb.2004.

SENE, I.S. **Avaliação de fatores clínicos de pacientes com leishmaniose visceral e sua relação com a quantidade de parasitos e citocinas.** 2013. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Saúde). Universidade Federal do Piauí, Teresina. 2013.

SHARMA, U.; SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian Journal of Experimental biology**, v.47, n.6, p. 412-423, June. 2009.

SILVA, E.S., *et al.* Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.96, n.3, Apr. p.285-91. 2001.

SILVA, J.G.D. *et al.* Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Teresina, Piauí, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 7, p.1715-1720, 2007.

SILVA, J.M. *et al.* Bone Marrow Parasite Burden among Patients with New World Kala-Azar Is Associated with Disease Severity. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.90, n. 4, p. 621–626, 2014.

SILVA, J.N. **Estudo do teste rápido imunoenzimático através do antígeno recombinante rK39 para diagnóstico de leishmaniose visceral americana: correlação clínico-terapêutica.** 2004.112f. Dissertação (Mestrado em Patologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2004,

SILVA, J.P. *et al.* Factors associated with *Leishmania chagasi* infection in domestic dogs from Teresina, State of Piauí, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n.4, p.480-484, jul/ago.2012.

SILVA, M.R., *et al.* Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v.72, n.6, p.811-4. June,2005.

SILVA, R.M; SIQUEIRA, M.V. Hepatimetria: correlação entre o método clínico e ultrasonográfico. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 38, n. 2, 2009.

SILVEIRA, F. T. *et al.* Further evidences on a new diagnostic approach for monitoring human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in Amazonian Brazil. **Parasitol Res.**, v. 106, p.377-386, 2010.

SINGH, O. P. *et al.* Reassessment of immune correlates in human visceral leishmaniasis as defined by cytokine release in whole blood. **Clin. Vaccine Immunol**, v.19, n.6, p. 961-966. June.2012.

SINGH, R.P. Post-kala-azar dermal leishmaniasis in visceral leishmaniasis-endemic communities in Bihar, India. **Tropical Medicine and International Health**, v.17, n.11, p. 1345–1348, nov. 2012.

SMELT, S.C. *et al.* B cell deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. **Journal of Immunology**, v.164, n.7, p. 3681-3688, Apr, 2000.

SOARES, V.Y.R. *et al.* Clinical and epidemiological analysis of patients with HIV/AIDS admitted to a reference hospital in the northeast region of Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 50, n. 6, Dec. 2008.

SOMANNA, A et al. Functional analysis of cathepsin b-like cysteine proteases from *leishmania donovani* complex: Evidence for the activation of latent transforming growth factor β . **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 28, p. 25305–25312, July 12. 2002.

SPATH, G.F. *et al.* The role (s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 100, n. 16, p. 9536-9541, Aug. 2003.

SWANSON, M. S.; FERNANDEZ-MOREIA, E A Microbial Strategy to Multiply in Macrophages: The Pregnant Pause. **Traffic**, v.3, p.170-177, 2002.

TEIXEIRA, C.R. *et al.* Saliva from *Lutzomyia longipalpis* Induces CC Chemokine Ligand 2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression and Macrophage Recruitment. **The Journal of Immunology**, v.175, n.12, p.8346-8353. Dec. 2005.

TERESINA. Secretaria Municipal de Desenvolvimento Econômico e Turismo –SEMDEC. **Perfil de Teresina: Econômico, Social, Físico e Demográfico**. Raimundo Leôncio Ferraz Fortes, coord, 2010, 112p. Disponível em: <<http://www.teresina.pi.gov.br/portalmpt/orgao/SEMDEC/doc/20100709-336-1461-D.pdf>> Acesso em: 20 jan.2015.

TOBIAS, C.A.S. **Alterações laboratoriais e efeitos adversos no tratamento da leishmaniose visceral: Hospital de Doenças Tropicais – Araguaína – TO**. 2009. 74 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica) Universidade Católica de Goiás, Universidade Estadual de Goiás e Centro Universitário de Anápolis, Araguaína.

TRAVI, B.L., *et al.* Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. **Infect Immun.**, v.70, n.5, p.2288-96, May, 2002.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self-control. **JEM**, v. 204, n. 2, p. 239–243, Feb. 2007.

VAN DER POLL, T., *et al.* Interleukin 6 during active visceral leishmaniasis and after treatment. **Clin Immunol Immunopathol**, v.77, n.1, p.111-114, Oct, 1995.

VARELLA, P, P.V.; FORTE, W.C.N. Cytokines: review. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol**, v.24, n.4, p.146-154,2001.

VARMA, N.; NASEEM, S. Hematologic Changes in Visceral Leishmaniasis/Kala Azar: A review. **Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion**, v.26, n.3, p. 78–82. July-Sept. 2010.

VERESS, B., *et al.* Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. **Immunology**, v.33, n.5, Nov, p.605-10. 1977.

VERMA, S. et al. Quantification of Parasite Load in Clinical Samples of Leishmaniasis Patients: IL-10 Level Correlates with Parasite Load in Visceral Leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 5, n.4, 2010.

WALTERS, L. L. et al. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.41, n.3.p.295-317, 1989.

WANASEN, N. e SOONG, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunol Res*, v.41, n.1, p.15-25. 2008.

WASUNNA, K.M., et al. Acute phase protein concentrations predict parasite clearance rate during therapy for visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.89, n.6, p.678-81. Nov-Dec, 1995.

WERNECK, G.L., et al. Avaliação da efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral na cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil: resultados do inquérito inicial – 2004. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, n.17, v.2, p. 87-96, abr-jun., 2008.

_____. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiol. Infect*, n.135, p.195–201, 2006.

_____. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Infection*, v.31, n.3, June, p.174-7, 2003.

_____. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. *Rev. Saúde Pública*, v. 48, n.5, p.851-855, 2014.

WHO. World Health Organization. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**, Geneva, 22-26 Mar. 2010.

_____. World Health Organization. **Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and Mineral Nutrition Information System**. Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO/NMH/NHD/MNM/11.1) Disponível em: < <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf> > Acesso em: 28 fev.2015.

_____. World Health Organization. **Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection**. WHO: Addis Ababa, Ethiopia, 2007: n.32 [on line]. Disponível em: < http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/ > Acesso em: 01 jul.2014.

WILSON, M.E., et al. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microbial Pathogenesis*, v.38, n.4, p.147-60, Apr. 2005.

WORTHMANN, H. et al. Lipopolysaccharide binding protein, interleukin-10, interleukin-6 and C-reactive protein blood levels in acute ischemic stroke patients with post-stroke infection. *Journal of neuroinflammation*, v.12, n.13, 2015.

XAVIER-GOMES, L.M. et al. Características clínicas e epidemiológicas da leishmaniose visceral em crianças internadas em um hospital universitário de referência no norte de Minas Gerais, Brasil. *Rev. Bras. Epidemiol.* v.12, n.4, p. 549-555, 2009.

ZANDBERGE, G.V. et al. Cutting Edge: Neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 173, p.6521-6525, 2004.

ZHENG, H. et al. Resistance to Fever Induction and Impaired Acute-Phase Response in interleukin-1 P-Deficient Mice. **Immunity**, v.3, p. 9-19, July.1995.

ANEXOS

ANEXO A- Aprovação do projeto fonte “Estudo Multicêntrico de análise e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Piauí” pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Universidade de Brasília-UnB.



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-9000 – Brasília, DF - Tel.: (061) 3307-2520 / 3273-4069

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de projeto: CEP-FM 056/2008
 Título: “Estudo multicêntrico de eficácia e segurança dos fármacos recomendados para tratamento da Leishmaniose visceral no Brasil”.
 Pesquisador responsável: Gustavo Adolfo Sierra Romero
 Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo(s) de pesquisador(es).
 Data de entrada: 26/08/2008

Proposição do(a) relator(a)

- () Aprovação
 () Não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB: 23/09/2008
 Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB: 29/10/2008

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS Nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR**, na reunião ordinária de 29/10/2008, conforme parecer do (a) relator (a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

- 1 – Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
- 2 – O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 30 de outubro de 2008.

Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina-UnB

ANEXO B- Aprovação do projeto fonte “Estudo Multicêntrico de análise e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Piauí” pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal do Piauí-UFPI.

 <p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFPI REGISTRO CONEP: 045</p> 
---	--

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

Título: Estudo multicêntrico de eficácia dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0101.0.045.000-09

Pesquisador Responsável: Dorcas Lamounier Costa

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

Setembro/2010 **Relatório parcial**
Setembro/2011 **Relatório final**

Os membros do CEP-UFPI não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA APROVAÇÃO: 6/8/2009

Teresina, 06 de agosto de 2009.


Prof. Dr. Carlos Ernando da Silva
Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI
COORDENADOR

ANEXO C- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal do Piauí-UFPI do projeto “ IFN- γ , IL-6, CXCL8 e IL-10 são marcadores precoces da evolução da leishmaniose visceral”, previamente intitulado Biomarcadores de prognóstico na leishmaniose visceral.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: BIOMARCADORES DE PROGNÓSTICO NA LEISHMANIOSE VISCERAL

Pesquisador: SIMONE SOARES LIMA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 38389714.3.0000.5214

Instituição Proponente: Universidade Federal do Piauí - UFPI

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 985.337

Data da Relatoria: 05/02/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa intitulado BIOMARCADORES DE PROGNÓSTICO NA LEISHMANIOSE VISCERAL, que tem como pesquisador responsável SIMONE SOARES LIMA, como pesquisador assistente a profa. Dra. DORCAS LAMOUNIER COSTA e como integrantes da equipe de pesquisa o prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa.

A pesquisadora informa que "A Leishmaniose visceral (LV) é uma infecção sistêmica causada pelo protozoário *Leishmania chagasi* e transmitida pela picada da fêmea do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. É uma doença endêmica em nossa região que, se não tratada na fase inicial, leva o paciente ao óbito. Provoca uma imunossupressão importante nas pessoas acometidas e seu desfecho pode estar relacionado a atuação das citocinas pró inflamatórias. A identificação das alterações ocorridas no sistema imune associadas a evolução clínica dos pacientes desde a o diagnóstico da doença até a sua cura ou desfecho fatal será uma importante ferramenta como marcador de prognóstico desta doença."

Descreve ainda "Estudo de coorte, prospectivo, não pareado. A população fonte será constituída pelos pacientes internados no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela(DTNP) com hipótese de LV no período de janeiro a março de 2015 e amostra pelos pacientes com sintomatologia sugestiva de LV e que tenha diagnóstico de LV confirmado por um ou mais dos seguintes exames

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PIAUÍ - UFPI



Continuação do Parecer: 985.337

laboratoriais com resultado positivo: pesquisa direta de amastigotas no esfregaço de medula óssea; ou cultura de promastigotas a partir do aspirado de medula óssea; ou amplificação da região conservada do k-DNA de Leishmania de aspirado da medula óssea ou sangue periférico; ou teste imunocromatográfico rápido baseado no antígeno rK39. Serão incluídos pacientes com leishmaniose visceral que cumpram a definição de caso confirmado, que concordem em participar de forma voluntária e assinem o termo de consentimento livre e esclarecido. Serão excluídos os pacientes com infecção pelo HIV, com recidiva de LV, portadores de doenças crônicas ou agudas que possam interferir no resultado: diabetes mellitus, nefropatias, hepatopatias, cardiopatias, esquistossomose mansônica, malária, tuberculose ou com qualquer condição que impeça a realização do acompanhamento com a periodicidade preconizada pelo estudo. O estudo será realizado no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella (IDTNP), hospital geral da Secretaria Estadual da Saúde do Piauí conveniado com a Universidade Federal do Piauí (UFPI). O IDTNP é referência em doenças infecciosas e parasitárias para o Piauí e para estados vizinhos, admite aproximadamente 400 pacientes com LV ao ano, o que representa 95% dos casos notificados no Estado. Espera-se que uma amostra constituída por 43 pacientes será suficiente para detectar uma diferença de 50% entre os níveis de citocinas dos pacientes com leishmaniose visceral nos diversos momentos do tratamento com um nível de significância α de 5% e um poder de 90%. Serão realizadas avaliações clínicas e laboratoriais nos dias 0,7,14,21,30 e 180 de tratamento. Os casos sintomáticos de LV farão avaliação clínica-questionário de sintomas e exame físico completo- nas datas referidas acima e serão colhidas amostras para posterior análise de citocinas por citometria de fluxo. "

Serão realizados coletas de sangue assim descritas pela pesquisadora "A maior parte dos exames laboratoriais que serão solicitados neste projeto de pesquisa fazem parte da rotina do IDTNP para investigação de todos os casos com clínica sugestiva de leishmaniose visceral. Os exames adicionais serão realizados em alíquotas de sangue armazenadas por ocasião da coleta de sangue na rotina, desta forma não havendo procedimentos invasivos adicionais e considerando que a amostra necessária para os exames adicionais é pequena, o risco decorrente da participação deste estudo será pequena. As coletas de sangue podem ocasionar dor local, sangramentos nos locais de punção e hematomas, mas as coletas serão realizadas em ambiente hospitalar com estrutura para primeiros socorros e reanimação e a equipe do projeto está capacitada para intervenção imediata em caso de sangramento ou qualquer outra intercorrência."

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PIAUÍ - UFPI



Continuação do Parecer: 985.337

Objetivo da Pesquisa:

"Objetivo Primário:

Avaliar o prognóstico da leishmaniose visceral através de biomarcadores.

Objetivo Secundário:

1-Correlacionar as citocinas IL-1B, IL-6, IL-8, IL-10, IL 12, IFN-y e TNF- a evolução clínica e os fatores de risco associados à morte na leishmaniose visceral, especificamente as infecções bacterianas, as discrasias sanguíneas, o comprometimento renal e hepático, as alterações hematológicas e nutricionais. 2-Descrever a evolução clínica dos pacientes com leishmaniose visceral."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"Riscos:

A maior parte dos exames laboratoriais que serão solicitados neste projeto de pesquisa fazem parte da rotina do IDTNP para investigação de todos os casos com clínica sugestiva de leishmaniose visceral. Os exames adicionais serão realizados em alíquotas de sangue armazenadas por ocasião da coleta de sangue na rotina, desta forma não havendo procedimentos invasivos adicionais e considerando que a amostra necessária para os exames adicionais é pequena, o risco decorrente da participação deste estudo será pequena. As coletas de sangue podem causar dor local e complicar com sangramentos nos locais de punção ou hematomas, mas as coletas serão realizadas em ambiente hospitalar com toda estrutura de primeiros socorros e reanimação. A equipe responsável pelo projeto está capacitada para intervenção imediata em caso de sangramentos ou quaisquer outras intercorrências. O investigador não interferirá nas tomadas de decisão referentes ao diagnóstico, ao tratamento e ao acompanhamento do paciente. Avaliações posteriores à alta hospitalar serão realizadas em regime ambulatorial. Este projeto custeará as despesas com o transporte para estas reavaliações clínicas-laboratoriais.

Benefícios:

Os sujeitos do estudo não receberão benefícios diretos pela sua participação nesta pesquisa. O benefício indireto justifica-se pelas reavaliações clínicas frequentes que podem agilizar os diagnósticos e a detecção de complicações."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Realizada a análise documental a partir da qual foi procedida a uma apreciação ética da pesquisa, restou evidenciada a sua pertinência e valor científico.

A metodologia escolhida para o desenvolvimento da pesquisa, tendo em vista as várias correntes

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga CEP: 64.049-550
UF: PI Município: TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 Fax: (86)3237-2332 E-mail: cep.ufpi@ufpi.edu.br



Continuação do Parecer: 985.337

metodológicas existentes, encontra-se em conformidade com os fins objetivados, ao tempo em que evidencia o respeito aos preceitos éticos orientadores de uma pesquisa envolvendo seres humanos. Na elaboração do projeto de pesquisa ora em apreço, percebe-se a atenção do pesquisador no que concerne à situação de vulnerabilidade inerente à condição de participante que, respeitado em sua individualidade, tem protegidas as suas dimensões física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural e espiritual.

Por fim, a equipe de pesquisa é composta por profissionais experientes, como evidenciado pelo currículo anexado, sendo tal circunstância mais um instrumento de segurança conferida ao participante que estará devidamente amparado durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados todos os documentos obrigatórios.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sanadas as pendências sou pela aprovação do projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

TERESINA, 13 de Março de 2015

Assinado por:
Adrianna de Alencar Setubal Santos
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa			
Bairro: Ininga	CEP: 64.049-550		
UF: PI	Município: TERESINA		
Telefone: (86)3237-2332	Fax: (86)3237-2332	E-mail: cep.ufpi@ufpi.edu.br	

ANEXO D: Termo de consentimento e assentimento livre e esclarecido do projeto fonte “Estudo Multicêntrico de análise e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Piauí”

TCLE – versão 3.0 - Estudo multicêntrico de eficácia e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: *Estudo multicêntrico de eficácia e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil*

Pesquisadores responsáveis: Carlos Henrique Nery Costa e Dorcas Lamounier Costa
 Telefone e Fax: (86) 3221 2424
 e-mail: secretariaidtnp@gmail.com

Informações ao voluntário ou ao seu representante legal

Estamos convidando você para participar como voluntário de um projeto de pesquisa desenvolvido por pesquisadores desta e de outras instituições brasileiras. A pesquisa tem como objetivo comparar os efeitos de cura e os efeitos indesejados dos principais medicamentos disponíveis para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil.

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é uma doença causada por um micróbio chamado leishmania que infecta o ser humano por meio da picada de um inseto chamado flebótomo (também conhecido como mosquito palha). O doente apresenta febre, palidez, emagrecimento, cansaço e crescimento do abdome. O diagnóstico é feito pelo exame do material da medula óssea, que é a parte interior de um dos ossos do corpo, geralmente da bacia ou do tórax. O diagnóstico pode também ser feito por exame de sangue.

A doença tem cura, mas pode ser grave e pode matar se não for tratada. No Brasil, o tratamento é fornecido pelo Ministério da Saúde, sem custo para o paciente. O medicamento mais usado é o antimoniato de meglumina (o nome comercial é Glucantime). Existem outros dois medicamentos chamados Anfotericina B desoxicolato e Anfotericina B lipossomal e a escolha de qual deles será usado depende do estado de saúde geral de cada paciente porque todos os medicamentos até hoje desenvolvidos para o tratamento da leishmaniose visceral têm algum efeito indesejado ou não podem ser usados se o paciente tem determinados problemas de saúde.

No Brasil, faltam pesquisas completas que comparem as vantagens e as desvantagens destes medicamentos. É preciso comparar para saber quais os que curam melhor e causam menos problemas ao paciente ou se todos têm o mesmo efeito. É por isto que o Ministério da Saúde chamou pesquisadores de várias instituições de pesquisa e ensino do Brasil e está financiando este estudo.

Descrição do estudo

Serão convidados para participar desta pesquisa homens, mulheres e crianças com mais de seis meses e menos de 50 anos, com diagnóstico de leishmaniose visceral atendidos nos Centros de Referência para leishmanioses que participam do estudo. Não poderão participar da pesquisa, pacientes menores de seis meses de idade ou maiores do que 50 anos. Também não poderão participar mulheres que estejam amamentando ou gestantes e pacientes que tenham alguma condição clínica que não permita o uso de um dos medicamentos que serão estudados.

É importante para a pesquisa que os grupos de pacientes que vão receber cada um dos três tipos de medicamentos sejam compostos por pacientes com características parecidas, como idade, tempo de doença e outras. Para que isto aconteça, foi preparada uma lista por sorteio. Somente no momento de receitar é que o médico e o paciente ficam sabendo qual o medicamento que o paciente vai receber.

Data da modificação 24-05-2010

I


 Prof. Dr. Carlos Fernando da Silva
 Comitê de Ética em Pesquisa - UFPI
 COORDENADOR

TCLE – versão 3.0 - Estudo multicêntrico de eficácia e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil.

Assim, você poderá receber um dos três tratamentos, todos eles administrados pela veia: 1) Glucantime, que é o medicamento mais para pacientes com leishmaniose visceral e que é administrado por 30 dias; 2) desoxicolato de anfotericina, por 14 dias, em dias alternados ou 3) anfotericina B lipossomal, por sete dias seguidos. O tratamento será completamente supervisionado no hospital, hospital dia ou por equipes de atendimento domiciliar devidamente capacitadas.

O paciente será acompanhado através de exame clínico e de exames laboratoriais até seis meses após o tratamento, nos dias 3, 7, 14, 21, 30, 60, 90 e 180. É muito importante que você considere se aceita participar do estudo em todas estas datas, até o final.

Riscos possíveis

Os possíveis riscos da participação no estudo estão principalmente relacionados às reações adversas que podem acontecer com cada um dos medicamentos.

No caso da anfotericina B, no momento da aplicação do medicamento, podem ocorrer elevações da temperatura, calafrios, falta de apetite, náuseas e irritação na veia em que está sendo aplicado o medicamento. Estas reações podem ser evitadas ou tratadas com outros medicamentos. Outros efeitos colaterais podem aparecer durante o tratamento: anemia, alterações do rim, baixa de potássio e alterações no coração. O paciente será acompanhado antes e durante todo o tratamento com a realização de provas de função renal, hemograma e eletrocardiograma. Para realizar os exames de sangue haverá necessidade de extrair sangue da veia como se faz rotineiramente durante o acompanhamento dos pacientes com leishmaniose visceral independentemente de que estejam ou não participando de um projeto de pesquisa. Portanto, a quantidade de sangue extraída não será maior pelo fato do paciente participar do projeto.

Os eventos adversos mais freqüentes com o tratamento com antimoniato de meglumina (Glucantime) são dores nas articulações e dores musculares, falta de apetite, náuseas, vômitos, dor abdominal e dor no local da aplicação. Outras reações são menos freqüentes, como febre e alterações do coração, rins, fígado e pâncreas. Os pacientes serão acompanhados por meio de exames clínicos e laboratoriais e receberão o tratamento adequado se surgirem reações causadas pelo medicamento.

Armazenamento de amostras biológicas para uso em pesquisas futuras

As amostras de sangue, soro e medula dos ossos que serão utilizadas para confirmar o diagnóstico da leishmaniose visceral serão guardadas nos laboratórios dos centros de referência para que possam ser utilizados em novas pesquisas que precisem de amostras de pacientes com diagnóstico confirmado de leishmaniose, principalmente para desenvolver novos métodos de diagnóstico que permitam facilitar o cuidado aos pacientes que sofrem de leishmaniose visceral no Brasil e em outras partes do mundo.

Esclarecimentos sobre garantias aos pacientes que aceitarem participar do estudo.

1. Você pode pedir esclarecimento aos profissionais de saúde, em qualquer momento, se tiver alguma dúvida em relação à participação na pesquisa, ou sobre riscos, benefícios e resultados.
2. Sua participação nesta pesquisa é totalmente voluntária. Se você não quiser mais participar da pesquisa você pode retirar seu consentimento a qualquer momento. Isto não vai trazer nenhum prejuízo ao atendimento rotineiro, a que tem direito na unidade de saúde aonde vem sendo tratado. Os responsáveis pelo estudo poderão interromper a participação dos pacientes voluntários neste

Data da modificação 24-05-2010

2


Prof. Dr. Carlos Ernando da Silva
Comitê de Ética em Pesquisa - UFPI
COORDENADOR

TCLE – versão 3.0 - Estudo multicêntrico de eficácia e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil.

estudo se eles acharem que esta seja a melhor conduta para você, nesse caso o médico responsável pelo seu tratamento informará a você oportunamente sobre essa decisão e sobre as alternativas que serão oferecidas para continuar o seu tratamento. Este estudo também pode ser interrompido pelo Ministério da Saúde, nesse caso você também será informado oportunamente sobre essa decisão e continuará recebendo tratamento na unidade de saúde onde vem sendo tratado. O centro de atendimento onde você será tratado assume a responsabilidade pelo seu tratamento e pelo tratamento das eventuais complicações que possam se apresentar durante o mesmo.

3. Todas as informações da pesquisa serão sigilosas. Ninguém divulgará o nome dos participantes e os resultados dos exames identificados com o nome dos participantes, a não ser para os pais ou responsáveis, no caso dos menores de idade. Se for solicitado por lei, somente o grupo de estudo, o Ministério da Saúde (Brasil) e os Comitês de Ética terão acesso às informações confidenciais que identificam o paciente pelo nome. Você não será identificado em qualquer relatório ou publicação que resulte deste estudo.

4. Em caso de emergência, se você tiver qualquer dúvida com relação ao tratamento ou se achar que está ocorrendo algum problema relacionado ao tratamento, você deverá avisar ao médico imediatamente.

5. Durante o acompanhamento você terá direito ao ressarcimento das despesas com transporte para as visitas à unidade de saúde relacionadas com a pesquisa.

6. O uso das amostras de sangue e outras que serão guardadas nos laboratórios dos centros de referência só serão utilizadas para novos estudos após a aprovação dos respectivos comitês de ética em pesquisa e o sigilo sobre as informações particulares de cada pessoa que participou da pesquisa será mantido. Em cada centro serão mantidas as informações de contato de cada um dos pacientes dos quais foram obtidas as amostras caso haja necessidade de informá-lo sobre novos resultados de exames realizados após a finalização do estudo que possam ser de benefício no cuidado da sua saúde.

Observações complementares

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato:

Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI - Campus Universitário Ministro Petrônio Portella -
Bairro Ininga. Centro de Convivência L09 e 10. CEP: 64.049-550. Teresina-PI.

Tel.: (86) 3215.5734. email: cep.ufpi@ufpi.br. web: www.ufpi.br/cep

Dados de identificação do voluntário e do responsável

Nome do paciente: _____ Sexo : M F

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade _____ Estado: _____

CEP _____ Telefone: () _____

Responsável Legal _____ Sexo: M F

Grau de parentesco _____

Data da modificação 24-05-2010

3


Prof. Dr. Carlos Ernando da Silva
Comitê de Ética em Pesquisa - UFPI
COORDENADOR

TCLE – versão 3.0 - Estudo multicêntrico de eficácia e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, antes de dar o consentimento assinando este documento, afirmo que fui suficientemente informado(a) de todo o estudo e dos medicamentos que serão utilizados, os inconvenientes, os perigos e os eventos adversos que podem acontecer. Eu conversei diretamente com profissional de saúde envolvido no estudo que respondeu todas as minhas perguntas satisfatoriamente em relação ao estudo e voluntariamente aceito a participação. Eu autorizo os pesquisadores a utilizarem as anotações médicas desta pesquisa para obterem a informação necessária para avaliar a eficácia e os efeitos adversos do medicamento que está sendo estudado. Autorizo ainda o armazenamento de amostras biológicas obtidas durante este estudo para a realização de pesquisas a serem realizadas após a finalização do presente estudo. Tenho conhecimento que a minha cooperação com os compromissos marcados (consultas, exames) é essencial para o êxito do projeto.

Nome do voluntário

Assinatura ou impressão digital do voluntário ou representante legal

____/____/____ às ____ horas
Data Hora

Declaração da testemunha:

Eu presenciei a explicação acima descrita, posso confirmar a oportunidade concedida ao voluntário de fazer perguntas e a assinatura do mesmo.

Nome da testemunha

Assinatura ou impressão digital da testemunha

____/____/____ às ____ horas
Data Hora

Declaração do investigador:

Eu expliquei o objetivo deste estudo ao voluntário. No melhor do meu conhecimento, ele entendeu o objetivo, procedimentos, riscos e benefícios deste estudo. Declaro também que o paciente recebeu uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Nome do investigador

Assinatura do investigador

____/____/____ às ____ horas
Data Hora

Data da modificação 24-05-2010

4


Prof. Dr. Carlos Ernando da Silva
Comitê de Ética em Pesquisa - UFPI
COORDENADOR

TCLÉ – versão 1.0 - Estudo multicêntrico de eficácia e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil,

**TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(DESTINADO AOS PACIENTES DE 12 a 17 ANOS DE IDADE)**

Título da pesquisa: *Estudo multicêntrico de eficácia e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil*

Pesquisadores responsáveis: Carlos Henrique Nery Costa e Dorcas Lamounier Costa
Telefone e Fax: (86) 3221 2424
e-mail: secretariaidtnp@gmail.com

INFORMAÇÕES AO VOLUNTÁRIO PARTICIPANTE DA PESQUISA

Estamos convidando você para participar como voluntário de um projeto de pesquisa desenvolvido por pesquisadores desta e de outras instituições brasileiras. Nós discutimos esta pesquisa com seus pais ou responsáveis e eles sabem que também estamos pedindo seu acordo.

Você pode discutir qualquer coisa deste formulário com seus pais, amigos ou qualquer um com quem você se sentir à vontade de conversar. Pode haver algumas palavras que não entenda ou coisas que você quer que seja explicado mais detalhadamente, porque você ficou mais interessado ou preocupado. Quando tiver qualquer dúvida interrompa a leitura e peça explicação.

A pesquisa tem como objetivo comparar os efeitos de cura e os efeitos indesejados dos principais remédios usados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil.

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é uma doença causada por um micróbio chamado *Leishmania* que infecta o ser humano por meio da picada de um inseto chamado flebótomo (também conhecido como mosquito palha). A pessoa com essa doença tem febre, palidez, emagrecimento, cansaço e aumento da barriga. A confirmação da doença é feita pelo exame do material da medula óssea, que é a parte interior de um dos ossos do corpo, geralmente da bacia ou do tórax. A confirmação da doença pode também ser feita por exame de sangue.

A doença tem cura, mas pode ser grave e pode matar se não for tratada. No Brasil, o tratamento é fornecido pelo Ministério da Saúde, sem custo para o paciente. O remédio mais usado é o antimoniato de meglumina (o nome comercial é Glucantime). Existem outros dois remédios chamados Anfotericina B desoxicolato e Anfotericina B lipossomal e a escolha de qual deles será usado depende do estado de saúde geral de cada paciente porque todos os remédios até hoje desenvolvidos para o tratamento da leishmaniose visceral têm algum efeito indesejado ou não podem ser usados se o paciente tem determinados problemas de saúde.

No Brasil, faltam pesquisas completas que comparem as vantagens e as desvantagens destes remédios e o seu uso em combinação. É preciso comparar para saber quais os que curam melhor e causam menos problemas ao paciente ou se todos têm o mesmo efeito. É por isto que o Ministério da Saúde chamou pesquisadores de várias instituições de pesquisa e ensino do Brasil e está financiando este estudo.

Descrição do estudo

Serão convidados para participar desta pesquisa homens, mulheres e crianças com mais de seis meses e menos de 50 anos, que tenham leishmaniose visceral, atendidos nos Centros de

Data: 24-05-2010

1


Prof. Dr. Carlos Ernando da Silva
Comitê de Ética em Pesquisa - UFPI
COORDENADOR

TCLE – versão 1.0 - Estudo multicêntrico de eficácia e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil.

Referência para leishmanioses que participam do estudo. Não poderão participar da pesquisa, pacientes menores de seis meses de idade ou maiores do que 50 anos. Também não poderão participar mulheres que estejam amamentando ou grávidas, e pacientes que tenham alguma condição clínica que não permita o uso de um dos remédios que serão estudados.

É importante para a pesquisa que os grupos de pacientes que vão receber cada um dos quatro tipos de tratamentos sejam compostos por pacientes com características parecidas, como idade, tempo de doença e outras. Para que isto aconteça, foi preparada uma lista por sorteio. Somente no momento de receitar é que o médico e o paciente ficam sabendo qual o tratamento que o paciente vai receber.

Assim, você poderá receber um dos quatro tratamentos, todos eles são tomados com injeção pela veia: 1) Glucantime, que é o remédio mais usado para pacientes com leishmaniose visceral e que é administrado por 20 dias; 2) desoxicolato de anfotericina, por 14 dias; 3) anfotericina B lipossomal, por sete dias seguidos; ou 4) anfotericina B lipossomal, por 1 dia combinada com Glucantime por 10 dias seguidos. O tratamento será completamente supervisionado no hospital, hospital dia ou por equipes de atendimento domiciliar devidamente capacitadas.

Você será acompanhado através de exame clínico e de exames de sangue até seis meses após o tratamento, nos dias 3, 7, 14, 21, 30, 60, 90 e 180. É muito importante que você considere se aceita participar do estudo em todas estas datas, até o final.

Riscos possíveis

Os possíveis riscos da participação no estudo estão principalmente relacionados às reações adversas que podem acontecer com cada um dos remédios.

No caso da anfotericina B, no momento da aplicação do remédio, podem ocorrer aumento da temperatura, calafrios, falta de fome, enjôo e irritação na veia em que está sendo aplicado o remédio. Estas reações podem ser evitadas ou tratadas com outros remédios. Outros efeitos colaterais podem aparecer durante o tratamento: anemia, alterações do rim, baixa de potássio e alterações no coração. Você será acompanhado antes e durante todo o tratamento com a realização de exames da função rim, hemograma (exame do seu sangue) e eletrocardiograma (exame do seu coração). Para realizar os exames de sangue haverá necessidade de extrair sangue da veia como se faz rotineiramente durante o acompanhamento dos pacientes com leishmaniose visceral independentemente de que estejam ou não participando de um projeto de pesquisa. Portanto, a quantidade de sangue extraída não será maior pelo fato do paciente participar do projeto.

Os eventos adversos mais frequentes com o tratamento com antimoniato de meglumina (Glucantime) são dores nas juntas e dores musculares, falta de fome, enjôo, vômitos, dor na barriga e dor no local da aplicação da injeção. Outras reações são menos frequentes, como febre e alterações do coração, rins, fígado e pâncreas. Os pacientes serão acompanhados por meio de exames clínicos e de exames de sangue, e receberão o tratamento adequado se surgirem reações causadas pelo remédio.

Armazenamento de amostras biológicas para uso em pesquisas futuras

As amostras de sangue, soro e medula dos ossos que serão utilizadas para confirmar que você tem leishmaniose visceral e para o seu seguimento serão guardadas nos laboratórios dos centros de referência para que possam ser utilizados em novas pesquisas que precisem de amostras de pacientes com a mesma doença, principalmente para desenvolver novas formas de confirmar que a pessoa tem leishmaniose visceral e para avaliação a cura após o tratamento, e assim facilitar o cuidado aos pacientes que sofrem de leishmaniose visceral no Brasil e em outras partes do mundo.

Data: 24-05-2010

2


Prof. Dr. Carlos Fernando da Silva
Comitê de Ética em Pesquisa - UFPI
COORDENADOR

TCLE – versão 1.0 - Estudo multicêntrico de eficácia e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil.

Esclarecimentos sobre as garantias aos pacientes que participarem do estudo

1. Você pode pedir esclarecimento aos profissionais de saúde, em qualquer momento, se tiver alguma dúvida em relação à participação na pesquisa, ou sobre riscos, benefícios e resultados.

2. A sua participação nesta pesquisa é totalmente voluntária. Se você não quiser mais participar da pesquisa você pode retirar seu consentimento a qualquer momento. Isto não vai trazer nenhum prejuízo ao atendimento rotineiro, a que tem direito na unidade de saúde aonde vem sendo tratado. Os responsáveis pelo estudo poderão interromper a participação dos pacientes voluntários neste estudo se eles acharem que esta seja a melhor conduta para você, nesse caso o médico responsável pelo seu tratamento informará a você oportunamente sobre essa decisão e sobre as alternativas que serão oferecidas para continuar o seu tratamento. Este estudo também pode ser interrompido pelo Ministério da Saúde, nesse caso você também será informado oportunamente sobre essa decisão e continuará recebendo tratamento na unidade de saúde onde vem sendo tratado. O centro de atendimento onde você será tratado assume a responsabilidade pelo seu tratamento e pelo tratamento das eventuais complicações que possam se apresentar durante o mesmo.

3. Todas as informações da pesquisa serão sigilosas. Ninguém divulgará o nome dos participantes e os resultados dos exames identificados com o nome dos participantes, a não ser para os pais ou responsáveis, no caso dos menores de idade. Se for solicitado por lei, somente o grupo de estudo, o Ministério da Saúde (Brasil) e os Comitês de Ética terão acesso às informações confidenciais que identificam o paciente pelo nome. Você não será identificado em qualquer relatório ou publicação que resulte deste estudo.

4. Em caso de emergência, se você tiver qualquer dúvida com relação ao tratamento ou se achar que está ocorrendo algum problema relacionado ao estudo, você deverá avisar ao médico imediatamente.

5. Durante o acompanhamento você terá direito ao ressarcimento das despesas com transporte para as visitas à unidade de saúde relacionadas com a pesquisa.

6. As amostras de sangue ou outro material biológico que serão guardadas nos laboratórios dos centros de referência só serão utilizadas para novos estudos após a aprovação dos respectivos comitês de ética em pesquisa e o sigilo sobre as informações particulares de cada pessoa que participou da pesquisa será mantido. Em cada centro serão mantidas as informações de contato de cada um dos pacientes dos quais foram obtidas as amostras caso haja necessidade de informá-lo sobre novos resultados de exames realizados após a finalização do estudo que possam ser de benefício no cuidado da sua saúde.

Dados de identificação do voluntário e do responsável

Nome do paciente: _____ Sexo : M F
 Endereço: _____
 Bairro: _____ Cidade _____ Estado: _____
 CEP _____ Telefone: () _____
 Responsável Legal _____ Sexo: M F
 Grau de parentesco _____

Data: 24-05-2010

3


 Prof. Dr. Carlos Ernando da Silva
 Comitê de Ética em Pesquisa - UFPI
 COORDENADOR

TCLE – versão 1.0 - Estudo multicêntrico de eficácia e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: *Estudo multicêntrico de eficácia e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil*

Pesquisadores responsáveis: Carlos Henrique Nery Costa e Dorcas Lamounier Costa
 Telefone e Fax: (86) 3221 2424
 e-mail: secretariaidtnp@gmail.com

INFORMAÇÕES AOS PAIS OU AO RESPONSÁVEL LEGAL DE VOLUNTÁRIOS MENORES DE 18 ANOS

Estamos convidando o seu (sua) filho(a) ou o menor sob sua responsabilidade para participar como voluntário de um projeto de pesquisa desenvolvido por pesquisadores desta e de outras instituições brasileiras. A pesquisa tem como objetivo comparar os efeitos de cura e os efeitos indesejados dos principais medicamentos disponíveis para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil.

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é uma doença causada por um micróbio chamado leishmania que infecta o ser humano por meio da picada de um inseto chamado flebótomo (também conhecido como mosquito palha). O doente apresenta febre, palidez, emagrecimento, cansaço e crescimento do abdome. O diagnóstico é feito pelo exame do material da medula óssea, que é a parte interior de um dos ossos do corpo, geralmente da bacia ou do tórax. O diagnóstico pode também ser feito por exame de sangue.

A doença tem cura, mas pode ser grave e pode matar se não for tratada. No Brasil, o tratamento é fornecido pelo Ministério da Saúde, sem custo para o paciente. O medicamento mais usado é o antimoniatado de meglumina (o nome comercial é Glucantime). Existem outros dois medicamentos chamados Anfotericina B desoxicolato e Anfotericina B lipossomal e a escolha de qual deles será usado depende do estado de saúde geral de cada paciente porque todos os medicamentos até hoje desenvolvidos para o tratamento da leishmaniose visceral têm algum efeito indesejado ou não podem ser usados se o paciente tem determinados problemas de saúde.

No Brasil, faltam pesquisas completas que comparem as vantagens e as desvantagens destes medicamentos. É preciso comparar para saber quais os que curam melhor e causam menos problemas ao paciente ou se todos têm o mesmo efeito. É por isto que o Ministério da Saúde chamou pesquisadores de várias instituições de pesquisa e ensino do Brasil e está financiando este estudo.

Descrição do estudo

Serão convidados para participar desta pesquisa homens, mulheres e crianças com mais de seis meses e menos de 50 anos, com diagnóstico de leishmaniose visceral atendidos nos Centros de Referência para leishmanioses que participam do estudo. Não poderão participar da pesquisa, pacientes menores de seis meses de idade ou maiores do que 50 anos. Também não poderão participar mulheres que estejam amamentando ou gestantes e pacientes que tenham alguma condição clínica que não permita o uso de um dos medicamentos que serão estudados.

É importante para a pesquisa que os grupos de pacientes que vão receber cada um dos três tipos de medicamentos sejam compostos por pacientes com características parecidas, como idade, tempo de doença e outras. Para que isto aconteça, foi preparada uma lista por sorteio. Somente no

Data da modificação 24-05-2010

1


 Prof. Dr. Carlos Ernando da Silva
 Comitê de Ética em Pesquisa - UFPI
 COORDENADOR

TCLE – versão 1.0 - Estudo multicêntrico de eficácia e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil.

momento de receitar é que o médico e o paciente ficam sabendo qual o medicamento que o paciente vai receber.

Assim, o seu (sua) filho (a) ou o menor sob sua responsabilidade poderá receber um dos quatro tratamentos, todos eles administrados pela veia: 1) Glucantime, que é o medicamento mais para pacientes com leishmaniose visceral e que é administrado por 30 dias; 2) desoxicolato de anfotericina, por 14 dias, em dias alternados ou 3) anfotericina B lipossomal, por sete dias seguidos. O tratamento será completamente supervisionado no hospital, hospital dia ou por equipes de atendimento domiciliar devidamente capacitadas.

O paciente será acompanhado através de exame clínico e de exames laboratoriais até seis meses após o tratamento, nos dias 3, 7, 14, 21, 30, 60, 90 e 180. É muito importante que você considere se aceita participar do estudo em todas estas datas, até o final.

Riscos possíveis

Os possíveis riscos da participação no estudo estão principalmente relacionados às reações adversas que podem acontecer com cada um dos medicamentos.

No caso da anfotericina B, no momento da aplicação do medicamento, podem ocorrer elevações da temperatura, calafrios, falta de apetite, náuseas e irritação na veia em que está sendo aplicado o medicamento. Estas reações podem ser evitadas ou tratadas com outros medicamentos. Outros efeitos colaterais podem aparecer durante o tratamento: anemia, alterações do rim, baixa de potássio e alterações no coração. O paciente será acompanhado antes e durante todo o tratamento com a realização de provas de função renal, hemograma e eletrocardiograma. Para realizar os exames de sangue haverá necessidade de extrair sangue da veia como se faz rotineiramente durante o acompanhamento dos pacientes com leishmaniose visceral independentemente de que estejam ou não participando de um projeto de pesquisa. Portanto, a quantidade de sangue extraída não será maior pelo fato do paciente participar do projeto.

Os eventos adversos mais frequentes com o tratamento com antimoniato de meglumina (Glucantime) são dores nas articulações e dores musculares, falta de apetite, náuseas, vômitos, dor abdominal e dor no local da aplicação. Outras reações são menos frequentes, como febre e alterações do coração, rins, fígado e pâncreas. Os pacientes serão acompanhados por meio de exames clínicos e laboratoriais e receberão o tratamento adequado se surgirem reações causadas pelo medicamento.

Armazenamento de amostras biológicas para uso em pesquisas futuras

As amostras de sangue, soro e medula dos ossos que serão utilizadas para confirmar o diagnóstico da leishmaniose visceral serão guardadas nos laboratórios dos centros de referência para que possam ser utilizados em novas pesquisas que precisem de amostras de pacientes com diagnóstico confirmado de leishmaniose, principalmente para desenvolver novos métodos de diagnóstico que permitam facilitar o cuidado aos pacientes que sofrem de leishmaniose visceral no Brasil e em outras partes do mundo.

Esclarecimentos sobre garantias aos pacientes que aceitarem participar do estudo.

1. Você pode pedir esclarecimento aos profissionais de saúde, em qualquer momento, se tiver alguma dúvida em relação à participação na pesquisa, ou sobre riscos, benefícios e resultados.
2. A participação do seu (sua) filho(a) ou do menor sob sua responsabilidade nesta pesquisa é totalmente voluntária. Se você não quiser mais participar da pesquisa você pode retirar seu

Data da modificação 24-05-2010

2


Prof. Dr. Carlos Fernando da Silva
Comitê de Ética em Pesquisa - UFPI
COORDENADOR

TCLE – versão 1.0 - Estudo multicêntrico de eficácia e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil.

consentimento a qualquer momento. Isto não vai trazer nenhum prejuízo ao atendimento rotineiro, a que tem direito na unidade de saúde aonde vem sendo tratado. Os responsáveis pelo estudo poderão interromper a participação dos pacientes voluntários neste estudo se eles acharem que esta seja a melhor conduta para você, nesse caso o médico responsável pelo seu tratamento informará a você oportunamente sobre essa decisão e sobre as alternativas que serão oferecidas para continuar o seu tratamento. Este estudo também pode ser interrompido pelo Ministério da Saúde, nesse caso você também será informado oportunamente sobre essa decisão e continuará recebendo tratamento na unidade de saúde onde vem sendo tratado. O centro de atendimento onde você será tratado assume a responsabilidade pelo seu tratamento e pelo tratamento das eventuais complicações que possam se apresentar durante o mesmo.

3. Todas as informações da pesquisa serão sigilosas. Ninguém divulgará o nome dos participantes e os resultados dos exames identificados com o nome dos participantes, a não ser para os pais ou responsáveis, no caso dos menores de idade. Se for solicitado por lei, somente o grupo de estudo, o Ministério da Saúde (Brasil) e os Comitês de Ética terão acesso às informações confidenciais que identificam o paciente pelo nome. Você não será identificado em qualquer relatório ou publicação que resulte deste estudo.

4. Em caso de emergência, se você tiver qualquer dúvida com relação ao tratamento ou se achar que está ocorrendo algum problema relacionado ao estudo, você deverá avisar ao médico imediatamente.

5. Durante o acompanhamento você terá direito ao ressarcimento das despesas com transporte para as visitas à unidade de saúde relacionadas com a pesquisa.

6. As amostras de sangue ou outro material biológico que serão guardadas nos laboratórios dos centros de referência só serão utilizadas para novos estudos após a aprovação dos respectivos comitês de ética em pesquisa e o sigilo sobre as informações particulares de cada pessoa que participou da pesquisa será mantido. Em cada centro serão mantidas as informações de contato de cada um dos pacientes dos quais foram obtidas as amostras caso haja necessidade de informá-lo sobre novos resultados de exames realizados após a finalização do estudo que possam ser de benefício no cuidado da sua saúde.

Observações complementares

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato:

Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI - Campus Universitário Ministro Petrônio Portella -
Bairro Ininga. Centro de Convivência L09 e 10- CEP: 64.049-550. Teresina-PI.

Tel.: (86) 3215.5734. email: cep.ufpi@ufpi.br . web: www.ufpi.br/cep

Dados de identificação do voluntário e do responsável

Nome do paciente: _____ Sexo : M F

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade _____ Estado: _____

CEP _____ Telefone: () _____

Responsável Legal _____ Sexo: M F

Grau de parentesco _____

Data da modificação 24-05-2010

3


Prof. Dr. Carlos Ernando da Silva
Comitê de Ética em Pesquisa - UFPI
COORDENADOR

TCLE – versão 1.0 - Estudo multicêntrico de eficácia e segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, antes de dar o consentimento assinando este documento, afirmo que fui suficientemente informado(a) de todo o estudo e dos tratamentos que serão utilizados, os inconvenientes, os perigos e os eventos adversos que podem acontecer. Eu conversei diretamente com profissional de saúde envolvido no estudo que respondeu todas as minhas perguntas satisfatoriamente em relação ao estudo e voluntariamente autorizo o meu filho (a) ou o menor sob minha responsabilidade _____ a participar da pesquisa. Eu autorizo os pesquisadores a utilizarem as anotações médicas do meu (minha) filho(a) ou do menor sob minha responsabilidade para obterem a informação necessária para avaliar a eficácia e os efeitos adversos do tratamento que está sendo estudado. Autorizo ainda o armazenamento de amostras biológicas obtidas durante este estudo para a realização de pesquisas a serem realizadas após a finalização do presente estudo. Tenho conhecimento que a minha cooperação em acompanhar o voluntário com os compromissos marcados (consultas, exames) é essencial para o êxito do projeto.

Nome do voluntário

Assinatura ou impressão digital pai/mãe ou do responsável legal pelo menor

____/____/____ às ____ horas
Data Hora

Declaração da testemunha:

Eu presenciei a explicação acima descrita, posso confirmar a oportunidade concedida ao voluntário de fazer perguntas e a assinatura do mesmo.

Nome da testemunha

Assinatura ou impressão digital da testemunha

____/____/____ às ____ horas
Data Hora

Declaração do investigador:

Eu expliquei o objetivo deste estudo ao voluntário. No melhor do meu conhecimento, ele entendeu o objetivo, procedimentos, riscos e benefícios deste estudo. Declaro também que o paciente recebeu uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Nome do investigador

Assinatura do investigador

____/____/____ às ____ horas
Data Hora

Data da modificação 24-05-2010

4


Prof. Dr. Carlos Ernando da Silva
Comitê de Ética em Pesquisa - UFPI
COORDENADOR

Fadiga/astenia: _____ (0= não; 1= sim)

Vômitos: _____ (0= não; 1= sim)

Sonolência: _____ (0= não; 1= sim)

Insônia: _____ (0= não; 1= sim)

Inapetência: _____ (0= não; 1= sim)

Aumento do volume abdominal: _____ (0= não; 1= sim)

Diarreia: _____ (0= não; 1= sim)

Constipação: _____ (0= não; 1= sim)

Dor abdominal: _____ (0= não; 1= sim)

Tosse: _____ (0= não; 1= sim)

Dispneia: _____ (0= não; 1= sim)

	Sim	Não	Descrição
Pele e fâneros:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Músculo-esquelético:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Cabeça, olhos, ouvidos, nariz e garganta:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Cardiovascular:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Respiratório:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Gastrointestinal:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hepático:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Geniturinário:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hematológico:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Neurológico:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Psiquiátrico:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Neoplasias:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Diabetes:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Está em uso de medicação? Se sim anotar na descrição	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Apresenta qualquer alergia a medicamentos? Se sim especificar e detalhar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Data da última menstruação: ___/___/___ (sexo feminino).			

Alteração na cor da urina:_____ (0= não; 1= sim)

Oligúria:_____ (0= não; 1= sim)

Alopécia:_____ (0= não; 1= sim)

Edema:_____ (0= não; 1= sim)

Petéquias:_____ (0= não; 1= sim)

Equimoses:_____ (0= não; 1= sim)

Epistaxes:_____ (0= não; 1= sim)

Sangramento gengival:_____ (0= não; 1= sim)

Sangramentos em locais de punção:_____ (0= não; 1= sim)

Sangramento digestivo:_____ (0= não; 1= sim)

Hematúria macroscópica:_____ (0= não; 1= sim)

História Progressa

Cirurgias prévias:_____(0= não; 1= sim) Especificar:_____

Doenças da infância:____ (0= não; 1= sim) Especificar:_____

Outras doenças da progressas:____ (0= não; 1= sim) pecificar:_____

Recebeu hemoderivados: ____ (0= não; 1= sim) Especificar: _____

Hospitalizações: _____ (0= não; 1= sim) Especificar: _____

Outros: _____ (0= não; 1= sim) Especificar: _____

História de Leishmaniose Visceral

Tempo de vida em área endêmica de leishmaniose visceral: _____ anos _____ meses

Tempo desde o início dos sintomas: _____ (dias)

Local provável de infecção (comunidade, cidade e estado): _____

EXAME FÍSICO

Sinais vitais, peso e altura:

Pulso: _____ bpm FR: _____ irpm TAX: _____ °C PA: _____ mmHg

Peso: _____ Kg Altura: _____ cm TAX máxima na internação: _____ °C

Aparelhos	Normal	Anormal	Descrição dos achados de exame físico
Estado Geral:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Ocular:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Otorrinolaringológico:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Cardiovascular:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Pulmonar/Respiratório:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Linfonodos:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Abdomen:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Músculo-esquelético:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Neurológico:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Pele e fâneros	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Outros (especificar):			

Sintomas: (0=ausente;1=presente)

Fraqueza: _____; perda de peso: _____; anorexia: _____; náuseas: _____; Vômitos: _____; diarreia: _____; dor abdominal: _____; epistaxe: _____; outros: _____

Especificar outros sintomas: _____

Sinais: (0=ausente;1=presente)

Mucosas hipocoradas:____; icterícia:____; hepatomegalia:____; esplenomegalia:_____

Sangramentos:____; edema:____: outros:____(especificar:_____)

Baço:_____ cm do BCE Fígado: _____ cm do BCD

Descrição de outras Alterações ou achados relevantes:

Terapêutica utilizada: 0. Não 1.sim

Terapia de suporte:

Antibióticos:____; concentrado de hemácias:____; plaquetas:____; plasma:_____

Vitamina K:____; outros:____(especificar:_____)

Terapia específica anti- *Leishmania*:

Antimonial de N metil glutamina:____: anfotericina B lipossomal:____; terapia combinada:_____

Complicações: 0. Não 1.sim

Infecção urinária:____; insuficiência renal:____; infecção cutânea:____; sepse:____; hemorragia:____; convulsões:_____

Evolução clínica:

Tempo de febre após início da terapia:__(dias)

Evolução Clínica – Visitas de Seguimento do estudo

Iniciais do Paciente: _____ N° Prontuário IDTNP: _____ Idade: _____

Data de nascimento: ___/___/___ Data admissão: ___/___/___

Data da avaliação: ___/___/___ Sexo: ___ (1= feminino; 2=masculino)

Procedência(UF): ___ Zona: _____ (urbana=1; 2=rural)

Município de residência: _____ Informante: _____

Evolução desde a última avaliação: queixas, uso de medicação. Anotar principais achados clinicamente significativos:

EXAME FÍSICO

Sinais vitais, peso e altura:

Pulso: _____ bpm FR: _____ irpm/min Temp.axilar: _____ °C PA: _____ mmHg
 Peso: _____ Kg Altura: _____ cm

Avaliação Clínica:

Sintomas: (0=ausente;1=presente)

Fraqueza: _____; perda de peso: _____; anorexia: _____; náuseas: _____; vômitos: _____;
 diarreia: _____; dor abdominal: _____; epistaxe: _____; outros: _____

Especificar outros sintomas: _____

Sinais: (0=ausente;1=presente)

Mucosas hipocoradas: _____; icterícia: _____; hepatomegalia: _____; esplenomegalia: _____

Sangramentos: _____; edema: _____; outros: _____ (especificar: _____)

Baço: _____ cm do BCE Fígado: _____ cm do BCD _____

Avaliações clínicas do quadro de Leishmaniose Visceral e seu seguimento:

Avaliação referente ao 30° dia de tratamento:

Interpretação geral do tratamento: () Melhora clínica () Falha terapêutica precoce

Avaliação referente aos 60° e 90° dias de tratamento:

Interpretação geral do tratamento: () Melhora clínica () Recidiva de LV

Avaliação final referente 180° dia de tratamento: () Cura

() Falha terapêutica precoce () Recidiva de LV () Perda de seguimento

Assinatura e carimbo do Médico

ANEXO F: Cronograma de avaliação laboratorial

Exame laboratorial	Dia zero	7º dia	14º dia	21º dia	30º dia	180º dia
Hemograma com plaquetas	x	x	x	x	x	x
Pcr	x					
Proteínas totais	x					x
Albumina	x					x
Amilase	x	x	x	x		
Lipase	x	x	x	x		
Sumário de urina	x	x				
Ast	x	x	x	x	x	
Alt	x	x	x	x	x	
Creatinina	x	x	x	x	x	
Tempo de protombina	x	x	x	x	x	
Bilirrubinas	x	x	x	x	x	
Parasitológico de fezes	x					
Urocultura	x					
Hemocultura	x					
Rx de tórax	x					