

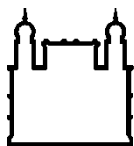
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LEPTINA,
LIPOPOLISSACARÍDEO, IMUNOGLOBULINAS 1 E 3 COMO
FATORES ASSOCIADOS A GRAVIDADE NA LEISHMANIOSE
VISCERAL

ALINE MIREILLE DA CUNHA FIÉVEZ

Fortaleza - Ceará
Julho/2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

ALINE MIREILLE DA CUNHA FIÉVEZ

**AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LEPTINA,
LIPOPOLISSACARÍDEO, IMUNOGLOBULINAS 1 E 3 COMO FATORES
ASSOCIADOS A GRAVIDADE NA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Medicina Tropical.

Orientador (es): Profa. Dra. Alda Maria da Cruz
Prof. Dr. Anastácio de Queiroz Sousa

Fortaleza - Ceará
Julho/2017

da Cunha Fiévez, Aline Mireille .

Avaliação das concentrações séricas de leptina, lipopolissacarídeo, imunoglobulinas 1 e 3 como fatores associados a gravidade na Leishmaniose visceral / Aline Mireille da Cunha Fiévez. - Rio de Janeiro, 2017.
93 f.; il.

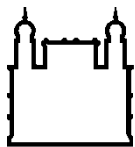
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Orientadora: Alda Maria da Cruz.

Co-orientador: Anastácio de Queiroz Sousa.

Bibliografia: f. 60-67

1. Leishmaniose visceral. 2. Diagnóstico. 3. Biomarcadores. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

ALINE MIREILLE DA CUNHA FIÉVEZ

AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LEPTINA,
LIPOPOLISSACARÍDEO, IMUNOGLOBULINAS 1 E 3 COMO FATORES
ASSOCIADOS A GRAVIDADE NA LEISHMANIOSE VISCERAL

Orientador (es): Profa. Dra. Alda Maria da Cruz
Prof. Dr. Anastácio de Queiroz Sousa

Aprovada em: 19/07/2017

Examinadores:

Prof. Dr. Filipe Aníbal Carvalho Costa – Presidente - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação
Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Prof. Dra. Lilia Maria Câmara – Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu – Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Érico Antônio Gomes de Arruda – Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz – Universidade Federal do Ceará

Fortaleza, 19 de julho de 2017.



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa da tese de doutorado em Medicina Tropical de **Aline Mireille da Cunha Fievez**, sob orientação da Dr^a. Alda Maria da Cruz e Dr. Anastácio de Queiroz Sousa. Ao décimo nono dia do mês de julho de dois mil e dezessete, realizou-se às oito horas, no Auditório do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, o exame da tese de doutorado intitulada: **“Avaliação das concentrações séricas de leptina, lipopolissacarídeo, imunoglobulinas 1 e 3 como fatores associados à gravidade na leishmaniose visceral”** no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Relação Parasito - Hospedeiro. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Lilia Maria Carneiro Câmara - UFC/CE; Dr^a. Margarida Maria de Lima Pompeu - UFC/CE; Dr. Érico Antônio Gomes de Arruda - UFCF/CE, Dr. José Ajax Nogueira Queiroz - UFC/CE e como suplentes: Dr^a. Maria Jânia Teixeira - UFC/CE e Dr^a. Cristiane Cunha Frota - UFC/CE. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr^a. Martha Cecilia Suárez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 19 de Julho de 2017.

Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa (Presidente da Banca):

Dr^a. Lilia Maria Carneiro Câmara (Membro da Banca):

Dr^a. Margarida Maria de Lima Pompeu (Membro da Banca):

Dr. Érico Antônio Gomes de Arruda (Membro da Banca):

Dr. José Ajax Nogueira Queiroz (Membro da Banca):

Dr^a. Martha Cecilia Suárez Mutis (Coordenadora do Programa):

DECICATÓRIA

À minha mãe, Jeanne Marie da Cunha Fiévez (*in memoriam*), que sempre foi abrigo, alívio e compreensão. Do seu exemplo de força faço a minha força, para poder ser feliz e realizar os sonhos que almejo na minha vida.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela vida e pelas bênçãos que me tens dado.

Ao coordenador da Pós-Graduação em Medicina Tropical, Professor **Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa**, pelo convívio, pelas discussões e incentivo na elaboração deste trabalho.

À professora e coordenadora do curso, professora **Dra. Cristiane Cunha Frota**, pelo apoio e colaboração.

À minha orientadora, professora **Dra. Alda Maria da Cruz**, por sua orientação, confiança, sabedoria, paciência.

Ao meu co-orientador, professor **Dr. Anastácio de Queiroz Sousa**, pela experiente orientação e pelo seu exemplo de dedicação à Ciência.

À **todos os professores do curso**, pelos conhecimentos compartilhados, incentivo e entusiasmo.

À **todos do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas**, por serem acolhedores, e em especial à Joanna Reis Santos Oliveira e Maria Luciana Silva de Freitas, pela generosa contribuição na realização dos experimentos.

À **Valéria Cordeiro de Oliveira**, secretária da pós-graduação, pela estima e suporte em nossas atividades no departamento.

Ao **Laboratório de Patologia Clínica do Hospital São José de Doenças Infecciosas**, por viabilizar a realização deste estudo.

Ao **SAME, Setor de Epidemiologia do Hospital São José de Doenças Infecciosas**, em especial à Maria Silvia Helena da Silva Costa e equipe, pela ajuda dispensada na identificação de pacientes internados por leishmaniose visceral.

Ao **SAME, Setor de Prontuários do Hospital São José de Doenças Infecciosas**, em especial à Francisca Lisieth Fernandes Costa, pela gentil disponibilidade e atenção.

Ao **Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas Prof. Eurico Litton Pinheiro Freitas – LACT** em especial à Gdayllon Cavalcante Meneses e Gabriela Freire Bezerra, pelo companheirismo e suporte para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao **HEMOCE** em especial à Mestre Francisca Vânia Barreto Aguiar Ferreira Gomes, diretora da Divisão de Ensino e Pesquisa, José Lúcio Jorge Barbosa e Elaine Amarílio Ximenes Nepomuceno, responsáveis pelo setor de Sorologia, pela contribuição para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço a **todos os pacientes** que aceitaram em colaborar com este estudo. Meu respeito e gratidão.

Aos **amigos de curso**, por compartilharem comigo os momentos de alegria e pelo apoio nos momentos difíceis.

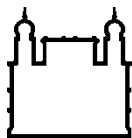
Aos **meus familiares**, especialmente Yvonne Anderson, Jean Pierre e Dominique pelo incentivo e por se fazerem tão presentes apesar da distância.

Aos **meus amigos**, pela amizade sincera de sempre.

Aos **membros da banca examinadora**, pela cordialidade, de terem aceitado participar da discussão da minha tese.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

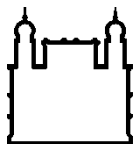
Fundação Oswaldo Cruz

AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LEPTINA, LIPOPOLISSACARÍDEO, IMUNOGLOBULINAS IgG1 E IgG 3 COMO FATORES ASSOCIADOS A GRAVIDADE NA LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) é a forma clínica mais grave das leishmanioses, devido às frequentes complicações e potencial de evolução para a morte, quando não tratada. Apresenta ampla distribuição geográfica, prevalecendo em condições de pobreza, o que contribui para manutenção do quadro de desigualdade social. O propósito desta tese foi i) Descrever as características sociodemográficas de indivíduos com LV atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ); ii) Avaliar as características clínicas e laboratoriais dos indivíduos com LV não coinfectados pelo HIV; iii) Avaliar se os níveis séricos das interleucinas (IL) 6 e 10 estão aumentados em indivíduos com LV, nas fases ativa e pós-tratamento; iv) Correlacionar as concentrações séricas de leptina e lipopolissacarídeo com indicadores hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com LV e v) Observar se as subclasses de imunoglobulinas IgG1 e IgG3 podem ser preditivas de prognóstico de evolução clínica na LV. No período de maio de 2015 a agosto de 2016, foram selecionados 64 casos, 53 (83%) eram do sexo masculino e 11 (17%) do feminino. A idade média foi de 43 anos, tendo participantes de 7 a 85 anos, internados ou em atendimento ambulatorial. O tempo médio para o diagnóstico de LV foi de 65 dias. Os indivíduos foram entrevistados e tiveram suas amostras sanguíneas colhidas para avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos, em períodos definidos como fase ativa e um mês pós-tratamento (1mpt). Desta população, foram identificados 31 indivíduos não coinfectados, de 18 a 60 anos e que, por apresentarem algum parâmetro de gravidade, foram internados para tratamento. Para a realização das quantificações séricas de leptina, subclasses de IgG1 e IgG3 e IL-6 e IL-10, foram utilizados ensaio imunoenzimático (ELISA) e para a quantificação de lipopolissacarídeo (LPS), o ensaio do Lisado de Amebócitos do *Limulus* (LAL). Doadores de sangue sem LV e sem HIV (N=10) constituíram o grupo controle. Em relação aos biomarcadores, os níveis elevados de LPS e de IL-6 e IL-10 na fase ativa da LV e diminuídas no pós-tratamento corroboram com a hipótese de que a translocação bacteriana ocorre na LV e deve ser um fator adicional a contribuir na ativação celular. Foram encontradas correlações significativas ($p < 0,05$) entre a leptina e as contagens de leucócitos, dosagens de hemoglobina e albumina e o LPS teve correlação com as contagens de leucócitos, demonstrando que estes biomarcadores estão associados aos parâmetros de gravidade laboratoriais. O maior decréscimo dos níveis de IgG3, após um mês de tratamento, sugere que este critério laboratorial pode ser utilizado para avaliar a evolução clínica na LV.

Palavras-chaves: leishmaniose visceral, diagnóstico, biomarcadores.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

EVALUATION OF SERUM CONCENTRATIONS OF LEPTIN, LIPOPOLYSACARID, IMMUNOGLOBULINS, IgG1 AND IgG 3 AS FACTORS ASSOCIATED TO SEVERITY IN VISCERAL LEISHMANIOSIS

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) is the most severe clinical form of leishmaniasis, due to the frequent complications and the potential for evolution to death, when left untreated. It has a wide geographical distribution, prevailing in conditions of poverty, which contributes to maintaining the situation of social inequality. The purpose of this thesis was i) To describe the sociodemographic characteristics of individuals with VL treated at Hospital São José de Infectious Diseases (HSJ); ii) Assess the clinical and laboratory characteristics of individuals with VL not co-infected with HIV; iii) Assess whether serum levels of interleukins (IL) 6 and 10 are increased in individuals with VL, in the active and post-treatment phases; iv) Correlate serum leptin and lipopolysaccharide concentrations with hematological and biochemical indicators used as severity parameters in individuals with VL and v) Observe whether the subclasses of immunoglobulins IgG1 and IgG3 can be predictive of the prognosis of clinical evolution in VL. From May 2015 to August 2016, 64 cases were selected, 53 (83%) were male and 11 (17%) female. The average age was 43 years, with participants from 7 to 85 years old, hospitalized or in outpatient care. The mean time to diagnosis of VL was 65 days. The individuals were interviewed and had their blood samples collected for evaluation of hematological and biochemical parameters, in periods defined as the active phase and one month after treatment (1mpt). Of this population, 31 non-coinfected individuals, aged 18 to 60 years, were identified and, for presenting some severity parameter, were admitted for treatment. To perform serum leptin quantifications, subclasses of IgG1 and IgG3 and IL-6 and IL-10, immunoenzymatic assays (ELISA) were used and for the quantification of lipopolysaccharide (LPS), the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) assay). Blood donors without VL and without HIV (N = 10) constituted the control group. Regarding biomarkers, high levels of LPS and IL-6 and IL-10 in the active phase of VL and decreased in post-treatment corroborate the hypothesis that bacterial translocation occurs in VL and should be an additional contributing factor in cell activation. Significant correlations ($p < 0.05$) were found between leptin and leukocyte counts, hemoglobin and albumin measurements and LPS correlated with leukocyte counts, demonstrating that these biomarkers are associated with laboratory severity parameters. The greatest decrease in IgG3 levels, after one month of treatment, suggests that this laboratory criterion can be used to assess the clinical evolution in VL.

Keywords: visceral leishmaniasis, diagnosis, biomarkers.

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia da leishmaniose visceral	1
1.2 Vetor e ciclo biológico da <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	3
1.3 Imunopatogênese da Leishmaniose visceral.....	5
1.4 Quadro clínico	8
1.5 Diagnóstico	10
1.5.1. Diagnóstico clínico	10
1.5.2 Diagnóstico parasitológico	10
1.5.3 Diagnóstico sorológico	11
1.6 Biomarcadores envolvidos na Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica	11
1.7 Biomarcadores utilizados para avaliação e seguimento do processo infeccioso por <i>Leishmania</i>	14
1.7.1 Lipopolissacarídeo (LPS)	14
1.7.2 Leptina (LPT).....	16
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
4. PACIENTES E MÉTODOS	25
4.1 Desenho do estudo e casuística	25
4.2 Critérios de inclusão, exclusão e grupo controle não-LV	25
4.3 Aspectos éticos	26
4.4 Avaliação prospectiva de parâmetros hematológicos e bioquímicos e dos biomarcadores leptina, lipopolissacarídeo, imunoglobulinas 1 e 3	26
4.4.1 Análises laboratoriais	26
4.4.2 Parâmetros hematológicos	27
4.4.3 Parâmetros bioquímicos	27
4.4.4 Quantificação de Leptina	27
4.4.5 Quantificação de Lipopolissacarídeo.....	28
4.4.6 Quantificação de Imunoglobulina IgG1.....	29
4.4.7 Quantificação de Imunoglobulina IgG3.....	29
4.4.8 Quantificação de Interleucina 6	30
4.4.9 Quantificação de Interleucina 10	31
4.4.10 Análises Estatísticas	31

4.5 Estudo da correlação entre as concentrações sanguíneas de leptina, lipopolissacarídeo, imunoglobulinas 1 e 3 com indicadores hematológicos e bioquímicos utilizados como marcadores de gravidade	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Características sociodemográficas dos indivíduos com leishmaniose visceral não coinfectados pelo HIV atendidos no Hospital São José	33
5.2 Características clínicas e laboratoriais dos indivíduos com leishmaniose visceral não coinfectados pelo HIV	37
5.3 Avaliação dos níveis séricos de leptina, lipopolissacarídeo, imunoglobulinas anti- <i>Leishmania</i> , interleucina 6 e 10	41
5.3.1 Níveis séricos de leptina em indivíduos com leishmaniose visceral nas fases ativa e pós-tratamento	41
5.3.2 Níveis séricos de lipopolissacarídeos em indivíduos com leishmaniose visceral nas fases ativa e pós-tratamento	42
5.3.3 Níveis séricos de imunoglobulinas anti- <i>Leishmania</i> G1 (IgG1) e G3 (IgG3) em indivíduos com leishmaniose visceral nas fases ativa e pós-tratamento.....	44
5.3.4 Níveis séricos de interleucinas 6 e 10 em indivíduos com leishmaniose visceral nas fases ativa e pós-tratamento	46
5.4 Correlação das concentrações séricas de leptina, lipopolissacarídeo, imunoglobulinas anti- <i>Leishmania</i> e interleucina-6 com indicadores hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com leishmaniose visceral não coinfectados pelo HIV	47
5.4.1 Correlação das concentrações séricas de leptina com indicadores hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com leishmaniose visceral não coinfectados pelo HIV	47
5.4.2 Correlação das concentrações séricas de lipopolissacarídeo com indicadores hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com leishmaniose visceral não coinfectados pelo HIV	51
5.4.3 Correlação das concentrações séricas de IgG1 com indicadores hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com leishmaniose visceral não coinfectados pelo HIV	52
5.4.4 Correlação das concentrações séricas de IgG3 com indicadores hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com leishmaniose visceral não coinfectados pelo HIV	53
6. CONCLUSÕES	58
7. PERSPECTIVAS	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
9. ANEXOS	68
ANEXO A	68
ANEXO B	70
ANEXO C	74
ANEXO D	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição da endemicidade da leishmaniose visceral no mundo	1
Figura 2	Fêmea de flebotomíneo adulto, engurgitada	4
Figura 3	Ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i>	5
Figura 4	Ativação do Sistema Complemento	6
Figura 5	Fatores de virulência da <i>Leishmania spp.</i>	7
Figura 6	Mecanismos específicos de ação patogênica de <i>Leishmania spp.</i>	8
Figura 7	Esplenomegalia	9
Figura 8	Hepatoesplenomegalia	10
Figura 9	Formas amastigotas	11
Figura 10	Perfil de citocinas na infecção por leishmania	12
Figura 11	Morfologia da parede celular de bactérias Gram-negativa e Gram-positiva	14
Figura 12	Estrutura do lipopolissacarídeo	15
Figura 13	Possível modelo de ação de leptina sobre susceptibilidade à infecção e autoimunidade	16
Figura 14	Formas dos receptores de leptina	17
Figura 15	Forma curta e longa de Ob-R	18
Figura 16	Efeitos da leptina nas respostas imunes inatas e adaptativas	19
Figura 17	Regulação da leptina	20
Figura 18	Efeito da leptina na ativação de macrófagos	21
Figura 19	Representação da reação em cascata entre o Lipopolissacarídeo (LPS) e o Lisado de Amebócitos <i>Limulus</i> (LAL)	28
Figura 20	Distribuição dos 34 casos de leishmaniose visceral coinfectados ou não pelo vírus HIV, identificados na região metropolitana de Fortaleza.....	33
Figura 21	Níveis de leptina sérica em indivíduos com leishmaniose visceral (LV)	42
Figura 22	Níveis de lipopolissacarídeo sérico em indivíduos com leishmaniose visceral (LV)	43

Figura 23	Títulos de anti- <i>Leishmania infantum</i> G1 (IgG1) em indivíduos com leishmaniose visceral (LV)	45
Figura 24	Títulos de anti- <i>Leishmania infantum</i> G3 (IgG3) em indivíduos com leishmaniose visceral (LV)	45
Figura 25	Correlação da concentração de leptina sérica com os resultados de parâmetros hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com leishmaniose visceral	49
Figura 26	Correlação da concentração de LPS sérica com os resultados de parâmetros hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com leishmaniose visceral	51
Figura 27	Correlação dos títulos de anti- <i>Leishmania infantum</i> G1 (IgG1) com os resultados de parâmetros hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com leishmaniose visceral	54
Figura 28	Correlação dos títulos de anti- <i>Leishmania infantum</i> G3 (IgG3) com os resultados de parâmetros hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com leishmaniose visceral	56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Dados sociodemográficos dos indivíduos com leishmaniose visceral (LV) não coinfetados pelo HIV atendidos no Hospital São José de maio de 2015 a agosto de 2016	35
Tabela 2	Manifestações clínicas presentes na avaliação inicial dos casos de leishmaniose visceral coinfetados e não coinfetados pelo HIV	37
Tabela 3	Caracterização da celularidade sanguínea e dos níveis de hemoglobina apresentados pelos indivíduos com leishmaniose visceral, sem e com associação com HIV, analisados antes e após o tratamento anti- <i>Leishmania</i>	39
Tabela 4	Caracterização dos parâmetros bioquímicos apresentados pelos indivíduos com leishmaniose visceral, sem e com associação com HIV, analisados antes e após o tratamento anti- <i>Leishmania</i>	40
Tabela 5	Níveis séricos de interleucinas-6 e 10 em indivíduos com leishmaniose visceral não coinfetados pelo HIV avaliados antes e após o tratamento da leishmaniose visceral	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

C3	Complemento 3
C3b	Componente 3b do complemento
C5	Complemento 5
C5b	Componente 5b do complemento
C9	Complemento 9
CD34 ⁺	Marcador de superfície celular de células precursoras
CP	Cisteína protease
CR1	Receptor do complemento 1
CR3	Receptor do complemento 3
DAT	Teste de aglutinação direta
DTH	Reação de hipersensibilidade de tipo retardada
ELISA	Ensaio imunoenzimático
G-CSF	Fator estimulador de colônias granulocíticas
GIPL	Glicosilinositolfosfolípido
gp63	Glicoproteína de 63KD
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
iC3b	Componente 3b hidrolisado do complemento
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFABP2	Proteína 2 de ligação aos ácidos graxos intestinais
IFN- γ	Interferon gama
IgG-	Imunoglobulina 1, 2, 3, 4
IL-	Interleucina-1, 1 α , 1 β , 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18
IMC	Índice de massa corporal
iNOs	Óxido nítrico sintetase induzido
JAK/STAT	Via de sinalização Janus Kinase/Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição
Kd	Kilodaltons
LAL	Lisado de Amebócitos do <i>Limulus</i>
LAT	Teste de aglutinação em látex
LEP-R ou Ob-R	Receptor de leptina
LPG	Lipofosfoglicano

LPS	Lipopolissacarídeo
LPT	Leptina
LV	Leishmaniose visceral
LV-HIV	Coinfecção Leishmaniose visceral e HIV
MIF	Fator inibidor da migração de macrófagos
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
Ob-Rb	Receptor de leptina de forma longa
OSM	Oncostatina M
PaCO ₂	Pressão parcial de gás carbônico
PPG	Proteofosfoglicano
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
rK39	Antígeno K-39 recombinante
ROs	Radicais livres de oxigênio
SAP	Fosfatase ácida
sCD14	CD14 solúvel
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
<i>Splicings</i>	Rearranjo gênico para retirada de íntrons
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
Th1	Células TCD4+ secretoras do padrão 1 de citocinas (IL-2, IFN-γ)
Th2	Células TCD4+ secretoras do padrão 2 de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10)
TLR-	Receptor <i>Toll-like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TR	Teste rápido

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV), popularmente conhecida por calazar (febre negra, do hindu *Kala-azar*) é uma doença causada por protozoários intracelulares pertencentes ao gênero *Leishmania*, pertencentes ao complexo *L. (L.) donovani*. No Brasil, o agente etiológico é a *L. (L.) infantum*, anteriormente chamada *L. chagasi*.

A leishmaniose é considerada endêmica em 98 países, com mais de 350 milhões de pessoas em condições de risco e estima-se que aproximadamente 200.000 a 400.000 casos novos de leishmaniose visceral e de 700.000 a 1.2 milhões de casos novos de leishmaniose cutânea ocorrem cada ano em todo o mundo. Mais de 90% dos casos de LV ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (Figura 1) (WHO 2015).

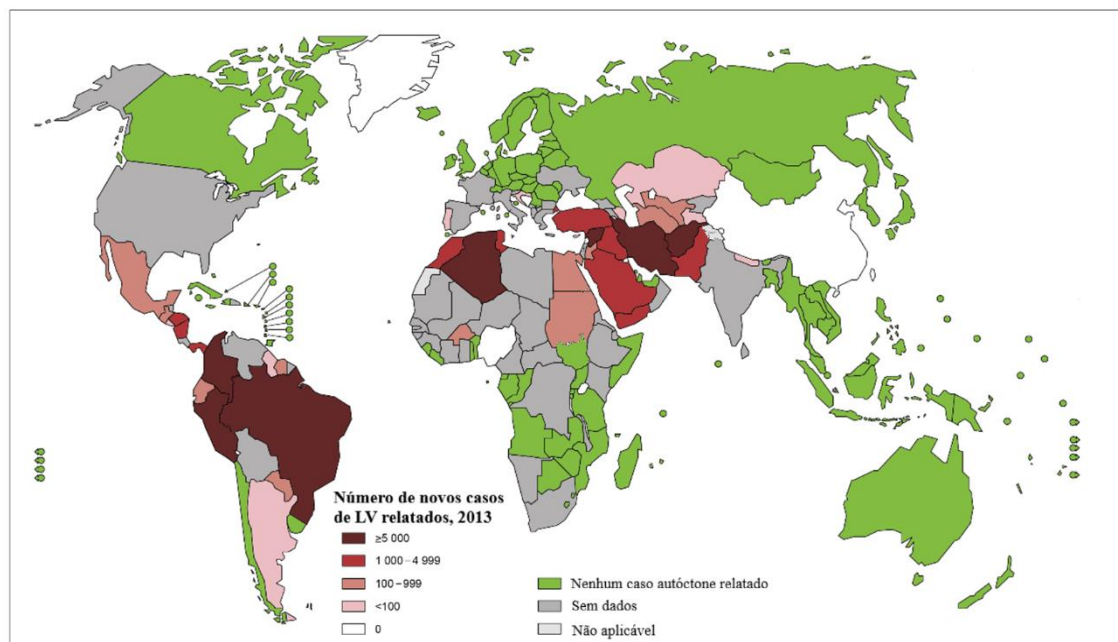


Figura 1: Distribuição da endemicidade da leishmaniose visceral no mundo. Fonte: adaptado de WHO acessado em 19/06/2017.

A leishmaniose visceral é autóctone em 12 países das Américas (Conceição-Silva 2014), sendo registrado no período de 2001 a 2015 o total de 52.176 casos, com média anual de 3.835 casos. Em 2015, um total de 3.456 casos foi registrado em oito países, dentro de 56 estados e distribuídos em 928 municípios. Os países que concentram o maior número de casos são Brasil com

95% (3.289) dos casos, seguidos do Paraguai, 2,7% (92) e Venezuela, 1,1% (37); sendo que Brasil e Paraguai apresentaram as maiores taxas de incidência, com 4,35 e 3,85 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (OPAS 2016).

A taxa de cura foi de 68,6% (2.372). Foram relatados 268 casos de óbitos. No Brasil (251), na Venezuela (9) e no Paraguai (8), com uma taxa de letalidade de 7,6%, 24% e 8,7%, respectivamente, representando um aumento nesta taxa nos três países, quando comparado a anos anteriores (OPAS 2017).

No Brasil, as estratégias de controle estão centradas e dirigidas verticalmente para o controle do reservatório canino (inquérito sorológico canino e eutanásia em cães sororreagentes), bem como para a aplicação de inseticidas, diagnóstico e tratamento adequado dos casos humanos registrados. Entretanto, a complexidade da ecologia e epidemiologia da doença, com o vetor apresentando elevada capacidade de adaptação a diferentes ambientes, inclusive o urbano, associado à ocupação urbana desordenada, criando condições insalubres de moradia e saneamento básico, além das dificuldades no acesso aos serviços de saúde, contribuem para a continuidade da transmissão da LV (Brasil 2014).

Nos anos 80, a doença, antes restrita às áreas rurais do nordeste brasileiro, avançou para outras regiões alcançando inclusive a periferia de grandes centros urbanos, causando uma transformação drástica na distribuição geográfica da LV no Brasil. A partir dos anos 90, os estados Pará e Tocantins (região Norte), Mato Grosso do Sul (região Centro Oeste) e Minas Gerais e São Paulo (região Sudeste) passaram a influir de maneira significativa nas estatísticas da LV no Brasil. Atualmente, a doença encontra-se amplamente difundida no país, com casos registrados nas cinco regiões brasileiras e 21 Unidades Federadas (Brasil 2014).

No Ceará, os primeiros casos notificados de leishmaniose visceral datam da década de 30. A partir de 1986, a doença começa a ser descrita de forma contínua (Badaró et al 1986b). No período de 2007 a 2016, foram notificados 9.228 casos e destes 5.657 (61,3%) foram confirmados. A média anual de leishmaniose visceral, no período, foi de 565 casos confirmados e a incidência de 6,3 casos/100.000 hab. É possível observar redução no número de casos ao longo dos anos sendo que em 2007 foram registradas 719 ocorrências da doença e em 2015 esse número passou para 542, o que representa uma queda

de 24%. Os homens, historicamente, são mais acometidos pela doença do que as mulheres (em média 66% dos casos). Ao analisar a faixa etária dos casos confirmados de leishmaniose visceral, observa-se que os adultos de 20 a 39 anos são os mais acometidos pela doença, somando 24,3% (1.375/5.657), seguido das crianças de 1 a 4 anos, que representam 23,8% (1.348/5.657) das notificações (Governo do Estado do Ceará 2016).

Entre 2007 e 2015, houve aumento de 41,7% no número de óbitos, passando de 29 para 41 ocorrências e a média anual foi de 34 óbitos. A taxa de letalidade apresentou média de 6,1%, atingindo o maior percentual em 2011 (8,1%) e reduzindo para 7,6% em 2015. No mesmo período, ocorreram 342 mortes pela doença no Ceará. Dos 80 municípios que registraram óbitos, Fortaleza (132), Sobral (18), Caucaia (18), Maracanaú (17) e Juazeiro do Norte (13) aparecem com maior número de confirmações (Governo do Estado do Ceará 2016).

1.2 Vetor e ciclo biológico da *Leishmania (Leishmania) infantum*

A principal forma de transmissão do parasita para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos e popularmente por mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros. No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença, a *Lutzomyia longipalpis* e *Lu. cruzi*. Esses insetos são pequenos, medindo de 1 a 3 mm de comprimento. Possuem o corpo revestido por 3 elos e são de coloração clara (castanho claro ou cor de palha). O desenvolvimento de ovo ao inseto adulto, decorre um período de aproximadamente 30 a 40 dias, de acordo com a temperatura. A atividade dos flebotomíneos é crepuscular e noturna. A *Lu. longipalpis* adapta-se facilmente ao peridomicílio e a variadas temperaturas, podendo ser encontrada no interior dos domicílios e em abrigos de animais domésticos. Há indício de que o período de maior transmissão da LV, ocorra durante e logo após a estação chuvosa, quando há um aumento da densidade populacional do inseto (Brasil 2014)



Figura 2: Fêmea de flebotomíneo adulto, engurgitada (em aumento). Fonte: Brasil, 2014.

A infecção do vetor ocorre durante o repasto sanguíneo das fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados. São ingeridos macrófagos parasitados por formas amastigotas, que no intestino do vetor se diferenciam rapidamente em formas flageladas denominadas promastigotas. Ocorre a diferenciação para as formas promastigotas metacíclicas que se alojam nas glândulas salivares do vetor. O ciclo do parasito no vetor dura em torno de 72 horas. As fêmeas ao realizarem um novo repasto, liberam as formas promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro, desencadeando uma reação inflamatória local com acúmulo de leucócitos no sítio de infecção. A saliva dos flebotomíneos tem um importante papel na transmissão da leishmania, sendo constituída de um rico conjunto de substâncias com atividades farmacológicas, tais como vasodilatadoras, antiagregadoras de plaquetas, antihemostáticas, imunossupressoras, exacerbadoras da infecção e indutoras de infecciosidade das leishmanias para o hospedeiro vertebrado (Soares & Turco 2003).

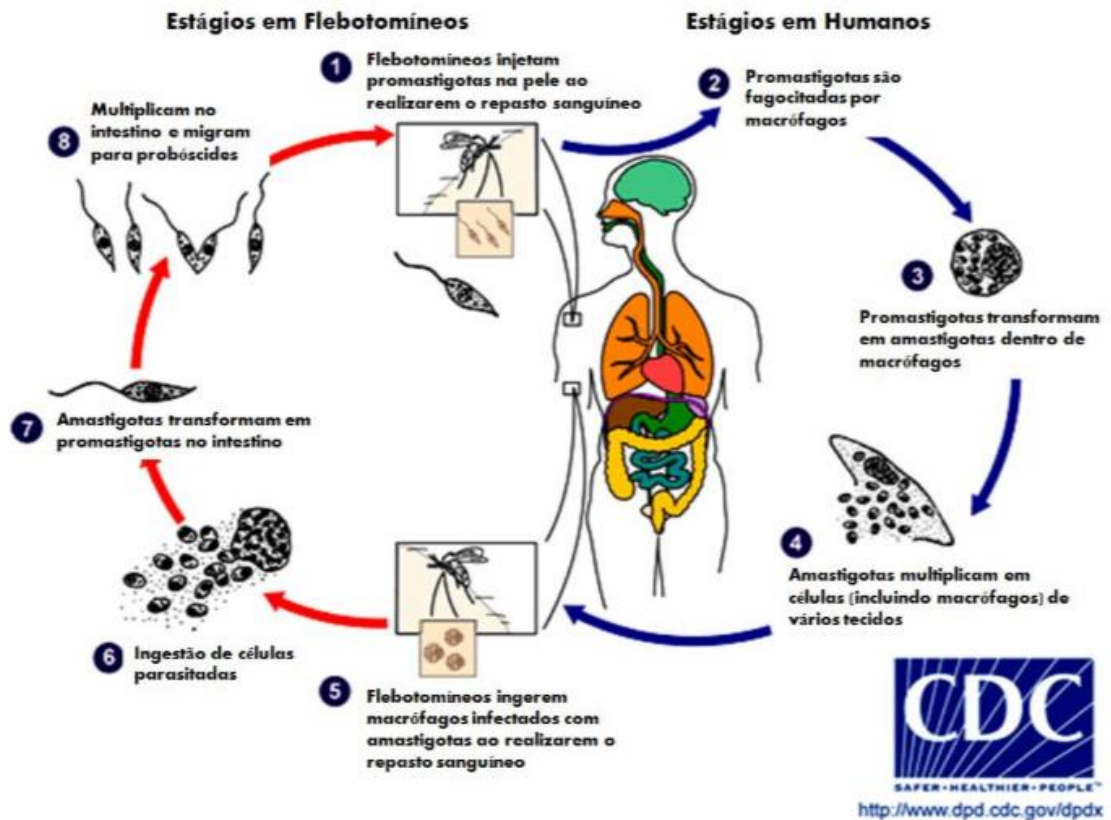


Figura 3: Ciclo de vida de *Leishmania spp.* Fonte: adaptado de CDC acessado em 19/06/2017.

1.3 Imunopatogênese da Leishmaniose visceral

Em contato com o soro humano normal, as promastigotas ativam o complemento pela via clássica e via alternativa simultaneamente. Aproximadamente 90% dos parasitos, são lisados pelo sistema complemento, através do complexo de ataque à membrana (C5b-C9). Como mecanismo de escape, os parasitos que expressam proteínas quinases que fosforilam C3, C5 e C9 inibem a via terminal do sistema complemento. A opsonização por C3b/C3bi, favorece que o parasito ligue-se à receptores CR1 e CR3 para o sistema complemento na superfície de macrófagos (Stebut 2007).

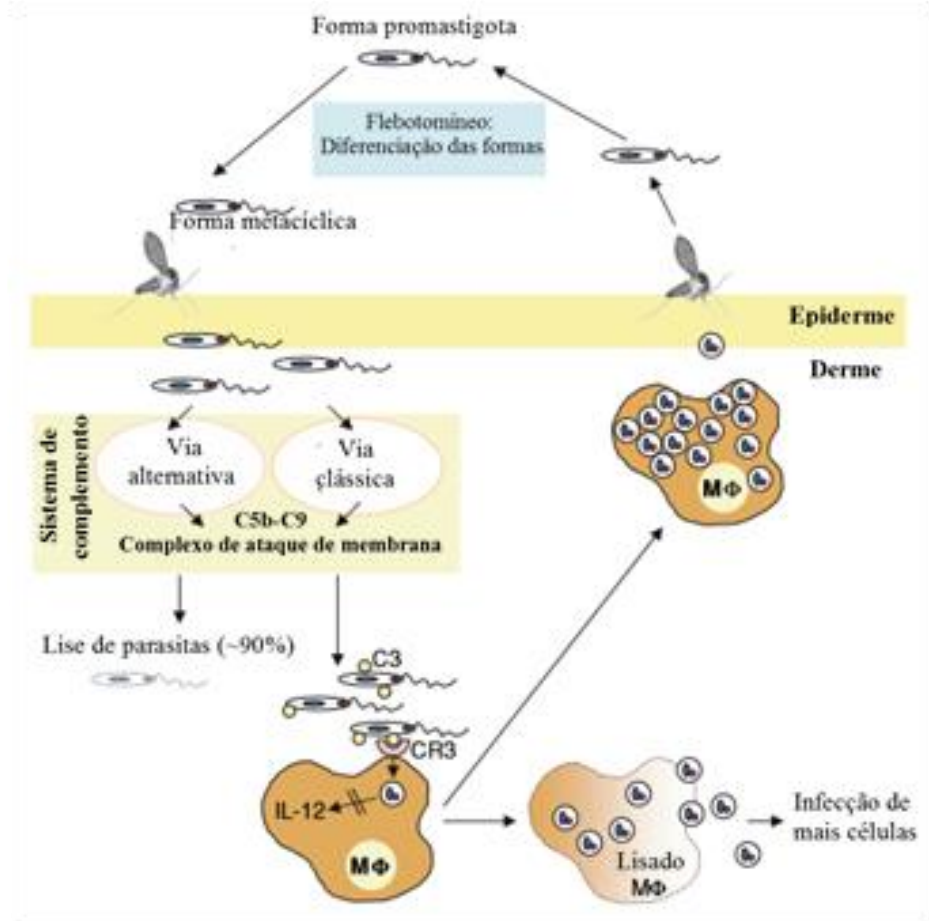


Figura 4: Ativação do Sistema Complemento. Fonte: adaptado de Stebut *et al.*, 2007.

Várias moléculas de superfície de promastigotas, tais como lipofosfoglicano (LPG), glicosilinositolfosfolípidos (GIPLs), cisteína protease (CP) e gp63, são citadas como as principais ligantes para a fixação aos macrófagos. A gp63 é uma metaloproteínase, distribuída de forma abundante na superfície de promastigotas e em menor intensidade nas amastigotas. A gp63 favorece que o parasito ligue-se a receptores CR3, para fibronectina e porção Fc de imunoglobulinas (Olivier *et al.* 2012). A família de fosfoglicanos compreende os glicolípídios, como o lipofosfoglicano (LPG) e as proteínas fosfoglicosiladas, tais como as fosfatases ácidas (SAPs) e os proteofosfoglicanos (PPG). O LPG é um complexo de glicolípídios, que forma uma camada densa sobre toda a superfície das promastigotas, favorecendo a ligação a receptores CR1, CR3, receptor para manose (Alexander *et al.* 1999) e inibindo a atividade da Proteína C Reativa (Figura 5) (Giorgione 1996).

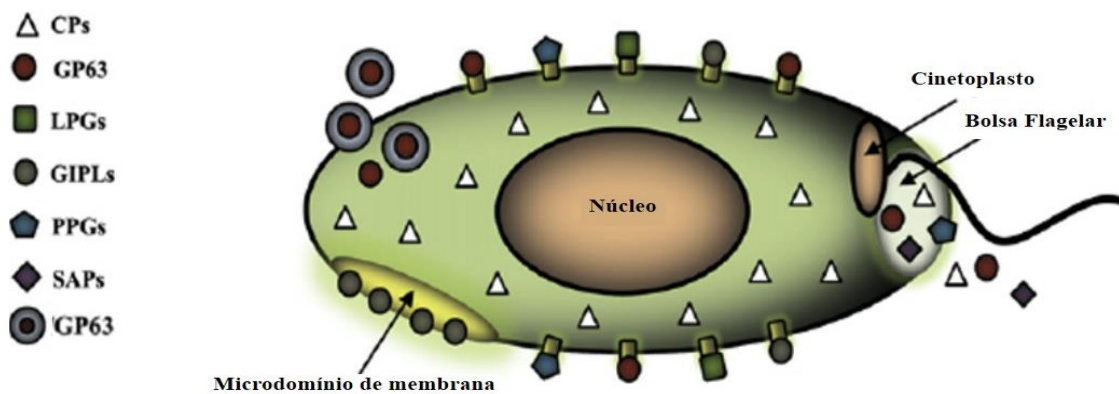


Figura 5: Fatores de virulência da *Leishmania* spp.. Fonte: adaptado de Olivier *et al.*, 2012.

Dentro dos fagossomos, as formas promastigotas metacíclicas se transformam em formas amastigotas, que são as formas intracelulares do parasito. Após a fagocitose, o LPG promove a sobrevivência intracelular de promastigotas, inibindo, no interior do macrófago, a fusão do fagossomo com os lisossomos (Desjardins & Descoteaux 1997), eliminando radicais livres de oxigênio (Chan *et al.* 1989), suprimindo a expressão do gene da óxido nítrico sintetase (iNOS), resultando na ausência da produção de óxido nítrico (NO) (Figura 6) (Proudfoot *et al.* 1996).

Após formação do fagolisossomo, a gp63 assume função protetora, inibindo as enzimas fagolisossomais (Alexander & Russell 1992, Sorensen 1994, Barros *et al.* 2012). Outros mecanismos de escape são observados nos macrófagos infectados, como a inibição da produção da citocina inflamatória IL-12 e degradação da molécula de classe II. Desta maneira, estas formas se multiplicam intensamente no interior dos macrófagos até o rompimento dos mesmos. Assim, ocorre a liberação das amastigotas, que serão fagocitadas por novos macrófagos em um processo contínuo até a disseminação hematogênica para outros tecidos como linfonodos, fígado, baço e medula (Figura 6) (Shio *et al.* 2012).

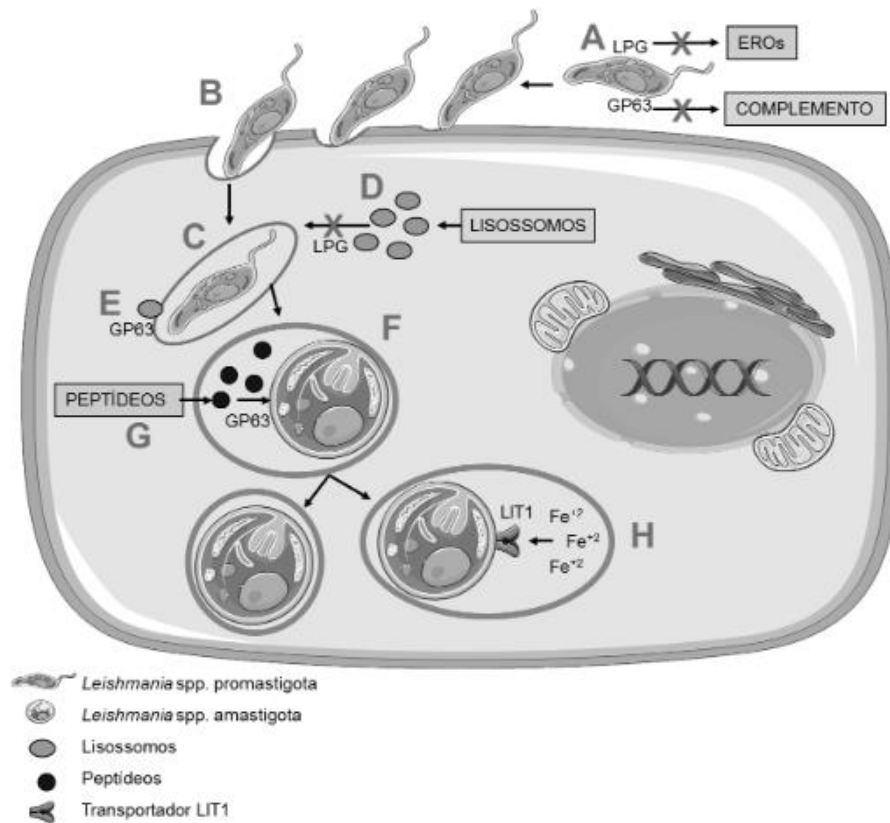


Figura 6: Mecanismos específicos de ação patogênica de *Leishmania spp.* (A) Lipofosfoligano (LPG) e glicoproteína de superfície principal (GP63) na superfície do promastigota, proteção contra espécies reativas de oxigênio (EROs) e evasão do sistema complemento; (B) Adesão e fagocitose de promastigotas pelo macrófago; (C) Formação do fagossomo; (D) LPG, inibição da fusão do fagossomo com os lisossomos; (E) gp63, inibição das enzimas fagolisossomais, caso haja formação de fagolisossomo; (F) Amastigotas nos fagolisossomos; (G) gp63, inibição da degradação de peptídeos; (H) Transportador LIT1, capta ferro do fagolisossomo. Fonte: adaptado de Barros *et al.*, 2012.

1.4 Quadro clínico

As formas clínicas da leishmaniose, refletem a dinâmica relação entre o parasita e os fagócitos mononucleares, a resposta imune do hospedeiro e as alterações resultantes da infecção.

Alguns aspectos inerentes ao hospedeiro como: fatores genéticos (Fakiola *et al.* 2013), o estado nutricional (Hughes & Kelly 2006), a idade (Badaro *et al.* 1986)a, Queiroz *et al.*, 2004) e a resposta imune desencadeada pela infecção (Faleiro *et al.* 2014), foram associados à suscetibilidade para o desenvolvimento da forma clínica clássica da LV.

A *L. infantum* se dissemina por todo o sistema fagocítico mononuclear (Pearson & Sousa 1996) e a infecção pode permanecer assintomática ou

subclínica ou apresentar um curso agudo, subagudo ou crônico (Badaro et al. 1986).

Os casos assintomáticos e sintomáticos podem apresentar exames sorológicos e/ou parasitológicos positivos. Alterações laboratoriais inespecíficas incluem pancitopenia (anemia, trombocitopenia, leucopenia com neutropenia, eosinopenia e linfomonocitose relativa) e hipergamaglobulinemia (predomínio de IgG a partir de ativação policlonal de linfócitos B) com hipoalbuminemia. Na forma aguda da doença, a manifestação dos sintomas é abrupta. A forma clássica, apresenta longa evolução dos sintomas, deficiência nutricional, perda de cabelos, crescimento dos cílios, febre, perda de peso e caquexia, hepatoesplenomegalia (Figura 7) e palidez intensa na pele e mucosa devido à anemia. Na maioria dos casos, a febre é o primeiro sintoma e pode ser alta, contínua ou intermitente, com duração de uma ou duas semanas (Pearson & Sousa 1996, Herwaldt 1999). Infecções bacterianas e virais, principalmente no trato respiratório, são as complicações mais comuns e com maior impacto sobre a evolução da doença (Maltezou et al. 2000, Brasil 2006).



Figura 7: Esplenomegalia. Fonte: CDC acessado em 22/11/2016.

A forma grave é geralmente associada a um diagnóstico tardio, onde o paciente refere uma história clínica com meses de evolução. Nesta forma, é observada condição clínica comprometida, perda de peso, febre, palidez, diarreia, aumento do volume abdominal e outras manifestações. São encontradas hepatoesplenomegalia, hipoalbuminemia, alterações das funções

hepáticas e renais. A progressão da doença leva à falência cardíaca, edema evoluindo para anasarca, caquexia, icterícia e infecções bacterianas secundárias. Os títulos dos anticorpos estão bastante elevados e o teste de hipersensibilidade tardia é negativo. A morte geralmente sobrevém de uma septicemia ou por hemorragia (Badaró et al. 1986a, Marzochi & Marzochi 1994, Medeiros et al. 1998, Murray et al. 2005, Peruhype-Magalhães et al. 2006, Brasil 2009).

1.5 Diagnóstico

1.5.1. Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico é complexo, pois a doença no homem pode apresentar sinais e sintomas que são comuns a outras patologias. Esse diagnóstico pode ser feito com base em várias indicações, como: febre baixa recorrente, envolvimento linfático, anemia, leucopenia, hepatoesplenomegalia e caquexia (Figura 8), combinados com a história de residência em uma área endêmica (Brasil 2006).



Figura 8: Hepatoesplenomegalia. Fonte: BRASIL, 2014.

1.5.2 Diagnóstico parasitológico

O aspirado de medula óssea e do baço, geralmente mostram presença de formas amastigotas do parasita (Figura 9). Na forma oligossintomática, a punção aspirativa de medula óssea pode ou não, mostrar a presença da leishmania, não sendo, a princípio, indicada a sua realização (Brasil 2014).

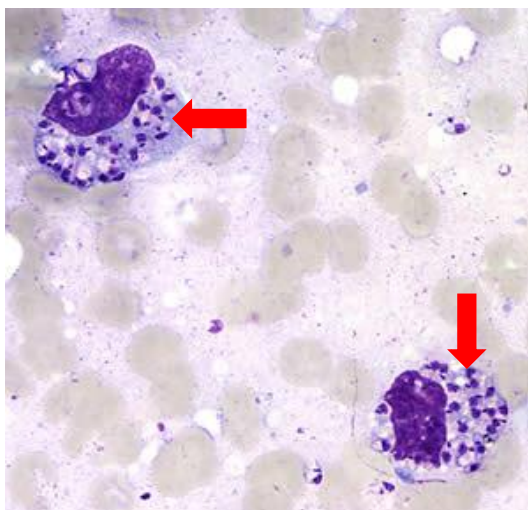


Figura 9: Formas amastigotas (setas). Fonte: CDC acessado em 05/07/17.

1.5.3 Diagnóstico sorológico

A detecção da resposta imune específica pode ser realizada pela detecção de anticorpos anti-*Leishmania* do *Complexo donovani* pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático de ELISA, teste de aglutinação direta (DAT), teste rápido de imunocromatografia (TR), imunoblotting (Western-blotting) e teste de aglutinação em látex (LAT) (Elmahallawy et al. 2014).

O teste rápido Imunocromatográfico, utiliza o antígeno recombinante (rK39), trata-se de um método sensível, específico e de rápida execução (5-10 minutos) (Assis et al. 2008). Os exames sorológicos, Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) são variavelmente reativos e a Intradermorreação de Montenegro (IDRM), negativa (Brasil 2014).

1.6 Biomarcadores envolvidos na Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica

Um biomarcador é indicador de um processo biológico normal, de um processo patogênico ou de uma resposta farmacológica a um tratamento. Pode ser usado para identificar indivíduos com risco aumentado de desfechos

desfavoráveis, ajudando a estabelecer um tratamento mais rápido, mais eficaz e menos dispendioso (Pierrakos & Vincent 2010).

Na resposta imunológica de indivíduos com LV, através da avaliação de citocinas, observa-se um equilíbrio entre as respostas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e regulatórias (Th1/Th2). Se a resposta for do tipo Th1, citocinas como IL-2, IFN- γ , TNF e IL-12 estarão em concentrações elevadas, ativando macrófagos na intenção de eliminar os parasitos. Na resposta do tipo Th2, há alta produção de IL-4 e IL-10 (Barral-Netto et al. 1992, Peruhype-Magalhães et al. 2006, Costa et al. 2010, Rodrigues et al. 2016).

Em casos mais graves da doença, pode ocorrer uma falha na geração de IFN- γ e a ausência desta citocina leva à baixa produção de fatores microbicidas dos macrófagos, como o óxido nítrico (NO) e os radicais livres de oxigênio (Ros) (Jeronimo et al. 2007, Rodrigues et al. 2016). Os elevados níveis de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β (Barral-Netto et al. 1992, Caldas et al. 2005, McConville & Handman 2007) também influenciam na sobrevivência da leishmania dentro dos macrófagos, ao impedir a superprodução das moléculas leishmanicidas, como NO e Ros, e estão diretamente correlacionadas com a progressão e gravidade da doença (Rodrigues et al. 2016) (Figura 10).

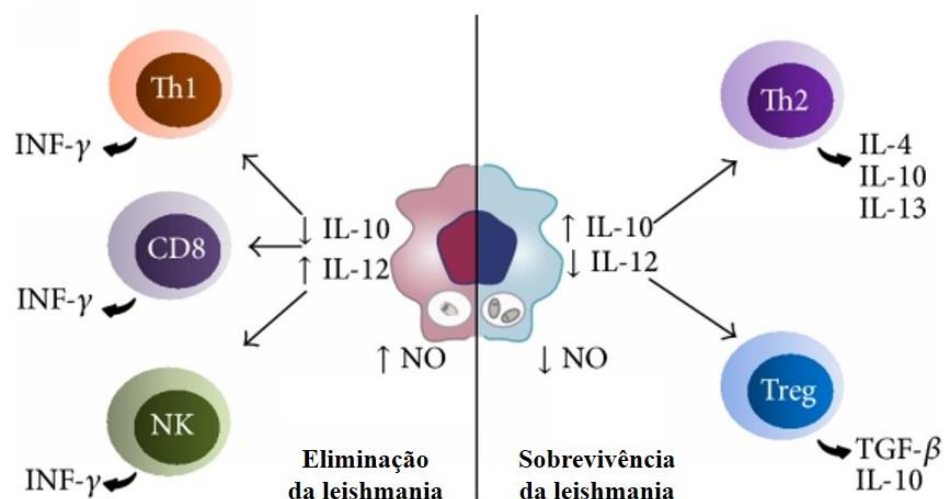


Figura 10: Perfil de citocinas na infecção por leishmania. Fonte: adaptado de Rodrigues *et al.*, 2016.

A Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) é a resposta do organismo a eventos variados (trauma, pancreatite, grande queimado, infecção sistêmica), com a presença de pelo menos dois dos seguintes critérios: a)

temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ ou $<36^{\circ}\text{C}$; b) frequência cardíaca > 90 batimentos/minuto; c) frequência respiratória > 20 movimentos/min ou $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg ($< 4,3$ kPa); e d) leucócitos > 12.000 células/ mm^3 , ou < 4.000 células/ mm^3 ou $> 10\%$ de formas jovens (Levy et al. 2003)

Uma característica marcante e invariável da SIRS consiste na indução e liberação de citocinas e proteínas de fase aguda, tanto pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias, cujos níveis séricos se elevam durante a resposta inflamatória (Costa et al. 2010). Vários estudos têm documentado que as concentrações das principais citocinas (TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e IL-18) e alguns de seus receptores solúveis, por exemplo, receptor TNF-R55, estão aumentados (Takala et al. 1999, Rodríguez-Gaspar et al. 2001, Costa et al. 2010).

A SIRS pode acometer indivíduos com LV e quando associada a uma infecção, resultará em sepse, que pode estar associada com disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão. A continuidade da sepse pode levar à hipotensão grave que apesar da reanimação fluídica, resultará em choque séptico (Levy et al. 2003, Valeiro & Silva 2012).

Na infecção ativa também são detectados níveis elevados de imunoglobulinas anti-*Leishmania*, com relatos de redução significativa destes níveis em indivíduos clinicamente curados. Estudo realizado por Gomes *et al.* (2010), utilizando citometria de fluxo, demonstrou que antes do tratamento etiológico, o perfil de subclasses de IgG foi caracterizado por $\text{IgG1} > \text{IgG3}$ com a ausência de IgG2 e IgG4. Resultados negativos de IgG3, foram constatados em 90,5% dos indivíduos, após 2 meses do tratamento e em 95,2% após 6 meses. O estudo foi concordante com estudos anteriores que utilizaram a técnica de ELISA e sugeriu o uso da diminuição dos níveis de IgG3 como um biomarcador útil para monitorar a cura pós-terapêutica na LV humana (Gomes et al. 2010).

1.7 Biomarcadores utilizados para avaliação e seguimento do processo infeccioso por *Leishmania*

Para esta avaliação foram realizadas as dosagens de Lipopolissacarídeo (LPS) e Leptina (LPT).

1.7.1 Lipopolissacarídeo (LPS)

As bactérias são classificadas em dois grupos, com base em um procedimento de coloração. Esta resposta de coloração é uma consequência da composição de suas membranas. As bactérias Gram-positivas apresentam um polímero reticulado multicamadas de peptidoglicano, que circunda sua membrana plasmática, enquanto as bactérias Gram-negativas possuem essencialmente uma monocamada. A membrana externa Gram-negativa é uma bicamada lipídica assimétrica intercalada com proteínas. O lipídio desta membrana externa é quase exclusivamente constituído por moléculas de LPS.

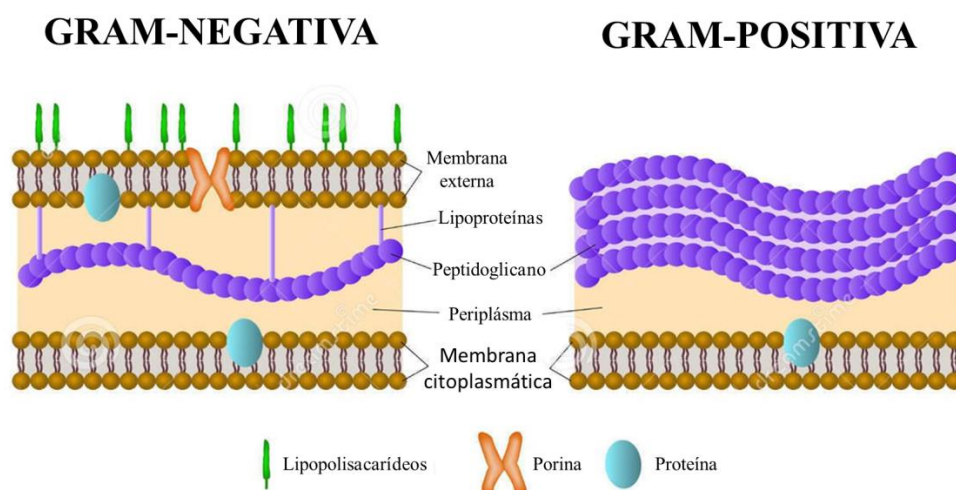


Figura 11: Morfologia da parede celular de bactérias Gram-negativa e Gram-positiva. Fonte: adaptado do 123RF - banco de imagens, acessado em 20/03/2017.

O LPS também conhecido como endotoxina, é uma molécula composta por três segmentos covalentemente ligados: o Lipídio A, o Core ou Núcleo e o Antígeno O (Figura 12). A atividade tóxica da endotoxina é atribuída ao Lipídeo A e sua liberação ocorre quando a bactéria se multiplica ou quando é fagocitada e degradada pelas células de defesa (Tuin et al. 2006, Leon et al. 2008).

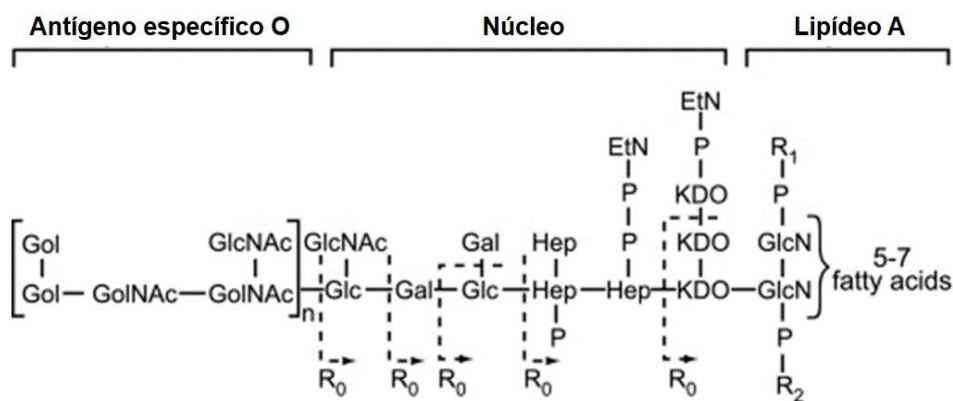


Figura 12: Estrutura do lipopolissacarídeo. Fonte: adaptado de Leon *et al.*, 2008.

Os receptores *Toll like* (TLRs) são proteínas transmembranares do tipo I com terminal amino extracelular e um domínio intracelular carboxi terminal. O domínio extracelular do TLR4, contém mais de 600 aminoácidos e é altamente polimórfico em comparação aos domínios transmembranar e citoplasmático. O TLR4 é o receptor de sinalização central para LPS em mamíferos (Leon et al. 2008).

Após a ligação desta molécula ao receptor TLR4, ocorre a ativação de diversas vias de sinalização, as quais aumentam a produção e secreção de moléculas pró-inflamatórias pelos monócitos e macrófagos, que causa a ativação de células T. Essa contínua estimulação, contribui para a depleção das células T. Esta depleção favorece a quebra da barreira imunológica do intestino, que ao sofrer a ação do parasitismo pelas amastigotas, sofre extenso dano, favorecendo a passagem de bactérias para a circulação sanguínea, translocação microbiana, definindo um quadro de endotoxemia (Leon et al. 2008, Santos-Oliveira et al. 2011).

Em um estudo realizado com 10 indivíduos com LV no Brasil, foram detectados níveis plasmáticos elevados de LPS, acompanhados da expressão elevada de sCD14, fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), proteína 2 de ligação aos ácidos graxos intestinais (IFABP2) e aumento da ativação de células T. A liberação destes mediadores indicam que esse produto bacteriano pode contribuir para o comprometimento da função imunológica efetora e que a antibioticoterapia preventiva, juntamente com o tratamento preconizado para leishmaniose, pode contribuir para a redução da letalidade da doença (Santos-Oliveira et al. 2011).

1.7.2 Leptina (LPT)

A leptina foi descrita em 1994 por Zhang e colaboradores, em um estudo experimental com camundongos obesos e diabéticos. A leptina (da palavra grega leptos, que significa “fino”) é codificada pelo gene *Lep*, localizado no cromossomo 7, é uma proteína composta por 167 aminoácidos e tem um peso molecular de aproximadamente 16Kd (Zhang et al. 1994, Münzberg & Morrison 2015). Produzida e secretada na proporção da quantidade de gordura corporal, principalmente pelo tecido adiposo. Porém, existem evidências de sua produção em outros tecidos como na placenta, ovários, estômago e músculo esquelético (Matarese et al. 2005, Münzberg & Morrison 2015). Em humanos, pode-se observar uma alta correlação entre o índice de massa corporal (IMC) e os níveis circulantes de leptina. Quanto maior a quantidade de tecido adiposo, maior os níveis da proteína no plasma (Figura 13).

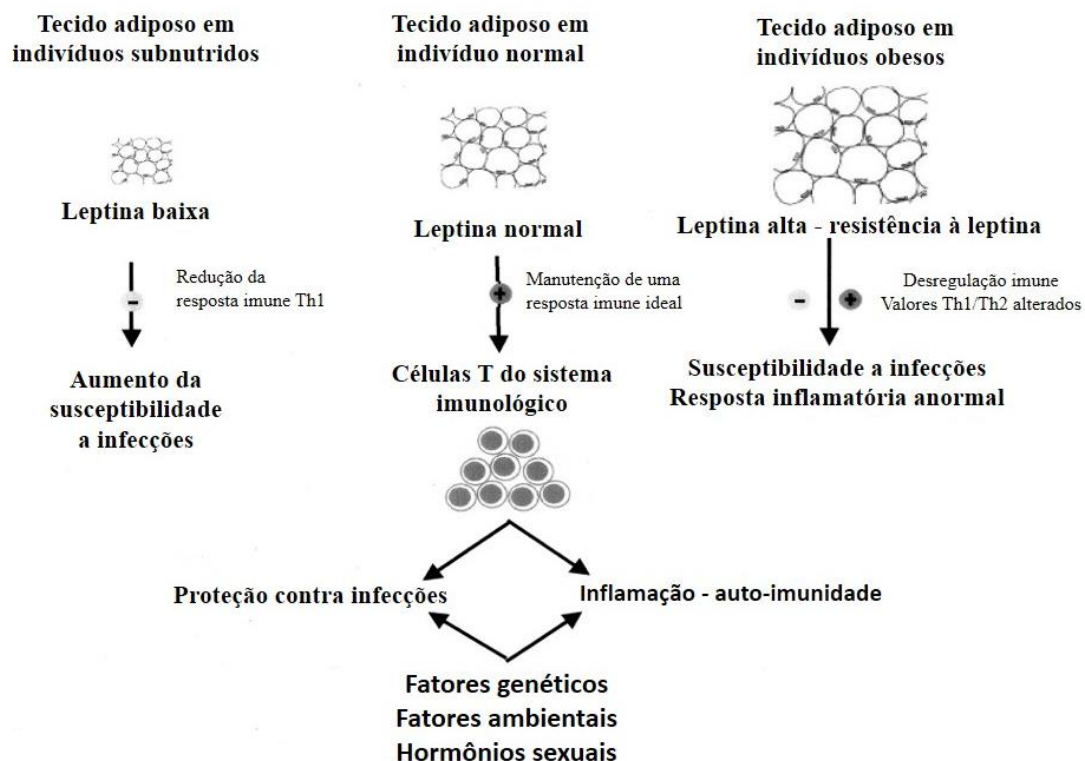


Figura 13: Possível modelo de ação de leptina sobre susceptibilidade a infecção e auto-imunidade. Em indivíduos desnutridos (Esquerda), a baixa massa de adipócitos causa redução da leptina no soro e conseqüente comprometimento da resposta imune Th1; Em indivíduos obesos não leptínicos (Direita), os níveis elevados de leptina refletem a resistência à leptina e a regulação negativa da Ob-R. Isso poderia levar a uma desregulação imune e a uma alteração no equilíbrio Th1 / Th2. Em indivíduos normais

(meio), a presença de leptina sustenta e regula uma resposta imune ideal. Fonte: adaptado de Matarese *et al.*, 2005.

A leptina se liga a receptores transmembrana, chamados LEP-R ou Ob-R, da classe I de receptores de citocinas, sintetizados a partir do gene *db* que tem *splicings* distintos para a produção de seis isoformas diferentes (Figura 14). As formas curtas do receptor de leptina são expressas por vários tecidos não imunes e parecem mediar o transporte e a degradação da leptina.

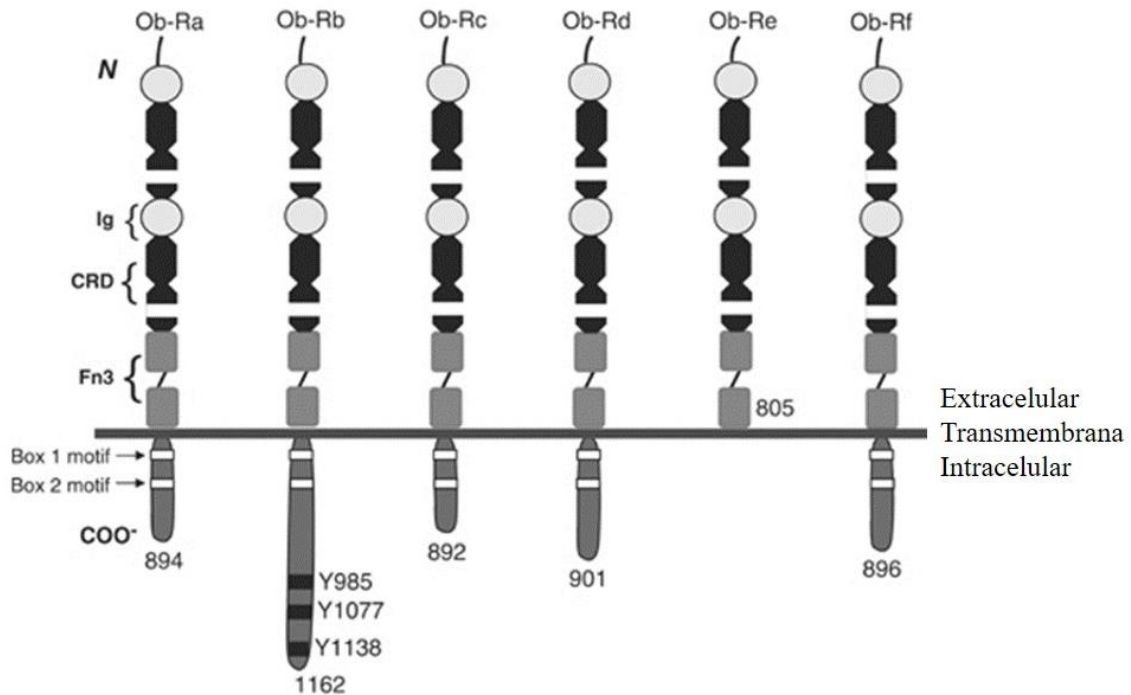


Figura 14: Formas dos receptores de leptina. Fonte: Pescarmona, 2010 acessado em 22/01/2017.

A forma longa de Ob-R, conhecida como Ob-Rb, contém motivos intracelulares necessários para a ativação da via de transdução de sinal JAK / STAT e é considerado o receptor funcional. É expressa no hipotálamo, em áreas que são responsáveis pela secreção de neuropeptídeos e neurotransmissores que regulam o apetite, peso corporal e massa óssea. O Ob-Rb também é expresso por células endoteliais, células β pancreáticas, no ovário, células precursoras CD34⁺ da medula óssea, monócitos/macrófagos e células T e B (Tartaglia 1997) (Figura 15). Após a sua ligação ao receptor, ocorre a ativação de diferentes vias de sinalização (Frühbeck 2006).

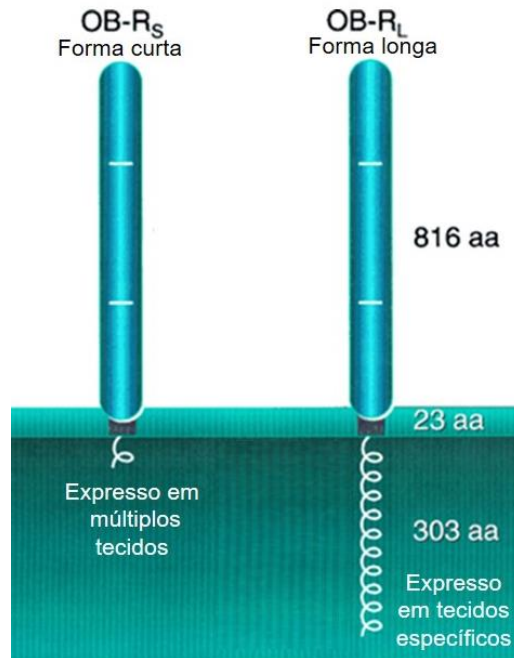


Figura 15: Forma curta e longa de Ob-R. Fonte: adaptado de Tartaglia, 1997.

A leptina possui uma estrutura terciária semelhante à dos membros da família de citocinas de cadeia longa tais como, IL-6, IL-12, IL-15, Fator estimulante das colônias de granulócitos (G-CSF), oncostatina M (OSM), prolactina e hormônio de crescimento (La Cava & Matarese 2004, Matarese et al. 2005).

Na imunidade inata, a leptina produzida por adipócitos presentes no tecido adiposo perilinfonodal e no próprio nódulo linfático, atua sobre os macrófagos, regulando a função fagocítica através da ativação da fosfolipase, bem como regula a secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-6 e IL-12, contribuindo para a modulação da resposta imune do tipo Th1. Em células polimorfonucleares, a leptina estimula a produção de espécies reativas de oxigênio e a quimiotaxia, através de um mecanismo que envolve a interação com os monócitos. Nas células B, a leptina induz a síntese e secreção de citocinas (IL-6, TNF e IL-10). Em células *natural killer* (NK), a leptina está envolvida em todos os processos do desenvolvimento da célula, a diferenciação, a proliferação, a ativação, citotoxicidade e aumenta a secreção de perforina e IL-2 (Martín-Romero et al. 2000, La Cava & Matarese 2004, Matarese et al. 2005, Naylor & Petri Jr 2016).

Em um experimento animal, observou-se que na imunidade adaptativa, a leptina afeta a geração, maturação e sobrevivência de células T tímicas, reduzindo a sua taxa de apoptose. Nas respostas de células T virgens, a leptina aumenta a proliferação e secreção de IL-2. Nas células T de memória, a leptina promove a mudança para as respostas imunes de células T helper 1 (Th1) aumentando a secreção de IFN- γ , de TNF- α , a produção de IgG2a por células B e reação de hipersensibilidade de tipo retardada (DTH) (Matarese et al. 2005).

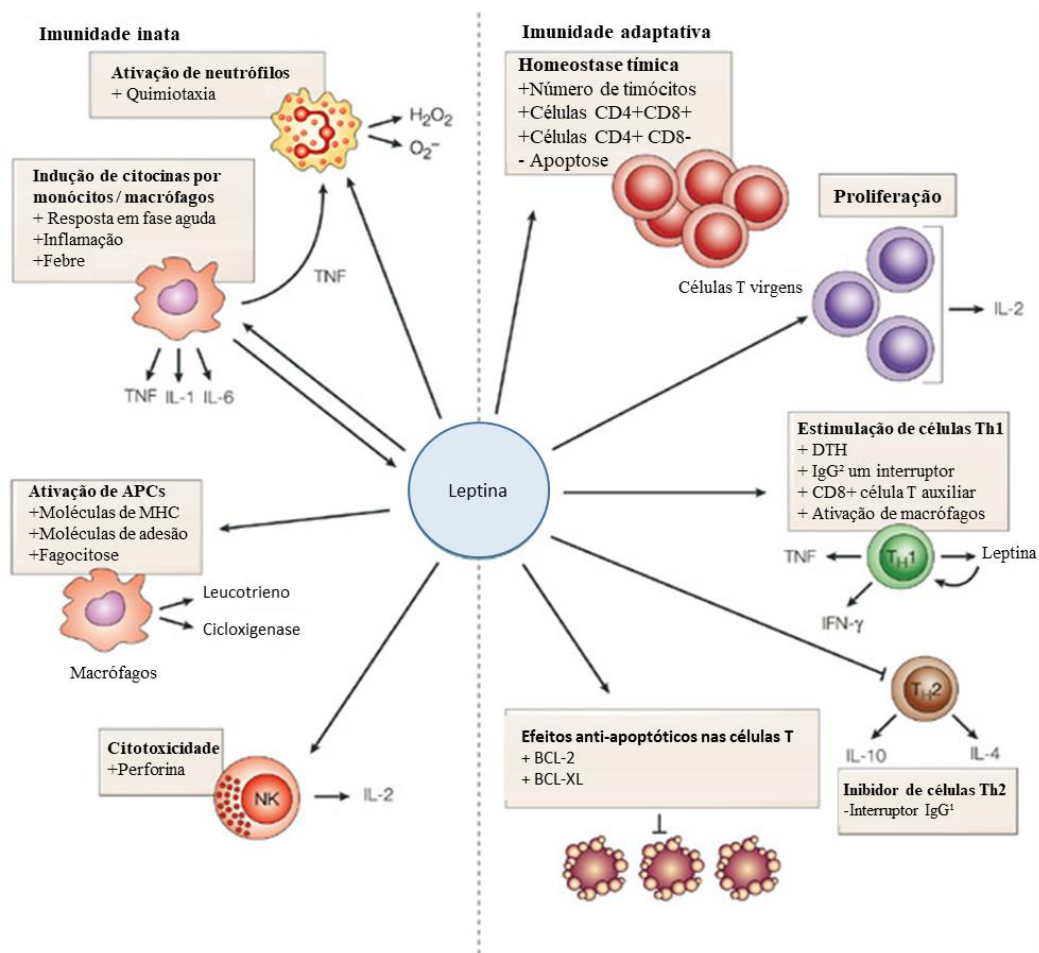


Figura 16: Efeitos da leptina nas respostas imunes inatas e adaptativas. Fonte: adaptado de La Cava & Matarese, 2004.

Em 2010, Mancuso *et al.* relataram estudos experimentais, nos quais a deficiência de leptina ou de receptor da leptina, aumentava a susceptibilidade a infecções bacterianas e pneumonia. Posteriormente, surge a hipótese de que o nível de leptina pode estar reduzido em casos de LV devido a perda de peso, seja por desnutrição prévia ou emagrecimento durante o curso da doença e que esta redução diminuiria a função fagocítica dos macrófagos para responder contra os

antígenos da leishmania (Figura 17) . Relataram também, que a leptina poderia ser utilizada como adjuvante no tratamento da LV, reduzindo a duração do tratamento e conseqüentemente, a toxicidade das drogas químicas atualmente recomendadas (Martín-Romero et al. 2000, La Cava & Matarese 2004, Matarese et al. 2005, Dayakar et al. 2011).

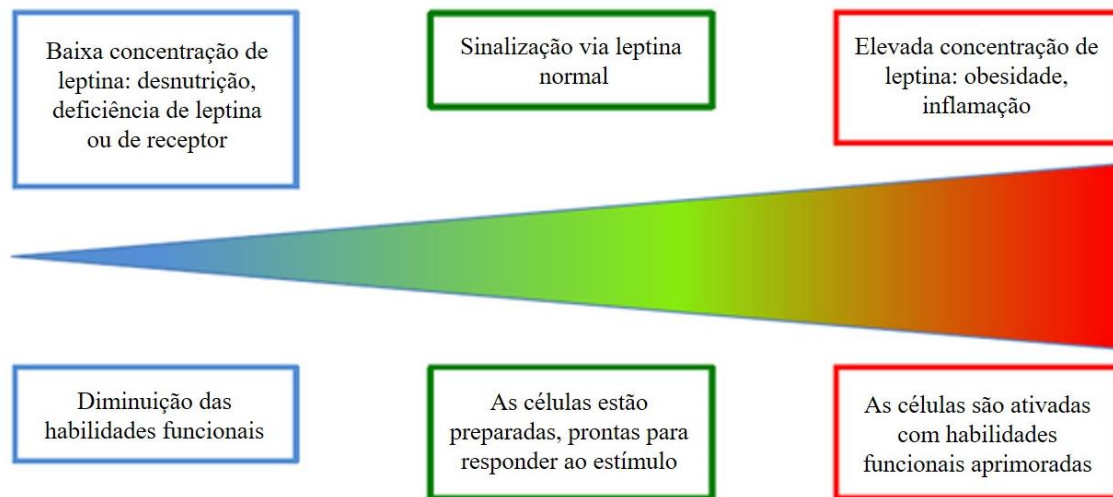


Figura 17: Regulação da leptina em geral. Fonte: adaptado de Naylor *et al.*, 2016.

Em um estudo recente (Dayakar, 2016), macrófagos de linhagem leucêmica de leucemia monocítica e células polimorfonucleares, foram infectados com *L. donovani*, em meios de cultura com leptina humana recombinante, em concentrações crescentes. Observou-se que a atividade fagocítica de ambos os tipos celulares, foi estimulada com o aumento da concentração de leptina. A leptina favoreceu a ativação dos macrófagos e regulou positivamente a geração de reativos de oxigênio e de citocinas como IL-1 α , IL-1 β , IL-8 e TNF, assim como regulou positivamente a produção de IFN- γ , IL-12 e IL-2 pelas células polimorfonucleares.

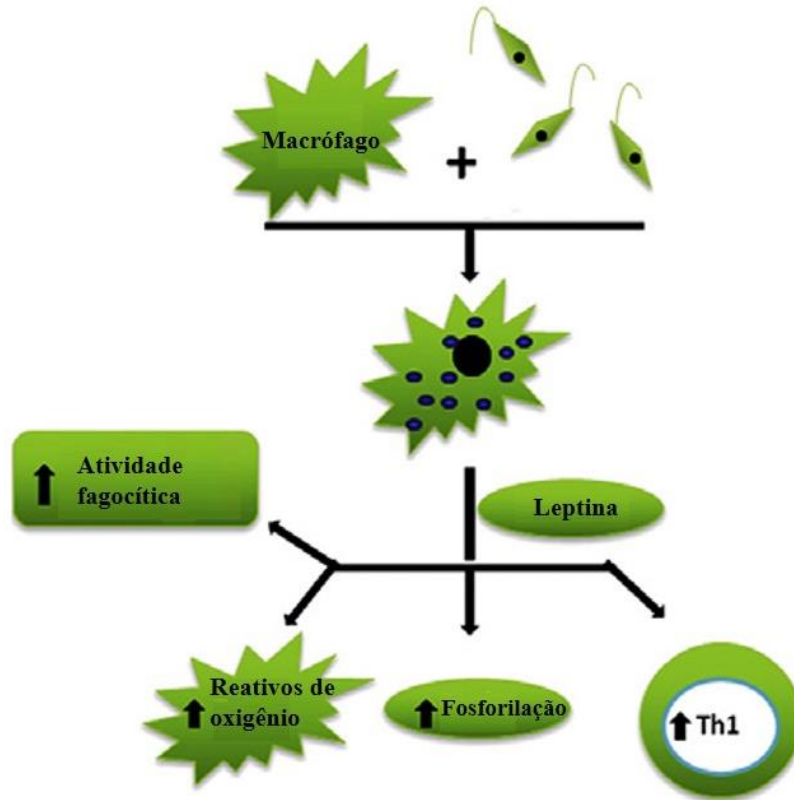


Figura 18: Efeito da leptina na ativação de macrófagos. Fonte: adaptado de Dayakar *et al.*, 2016.

Em um estudo recente, Maurya *et al.* (2016), demonstraram que o tratamento com leptina recombinante reduziu a carga parasitária esplênica de cobaias em comparação com cobaias infectadas não tratadas. A diminuição da carga parasitária correlacionou-se com uma indução de resposta imune inata por células apresentadoras de antígenos que mostraram um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, interferon gamma (IFN- γ) e interleucinas (IL-12 e IL-1 β), indicando um aumento da resposta Th1 de proteção do hospedeiro mediada por leptina.

2. JUSTIFICATIVA

Um dos aspectos das doenças consideradas negligenciadas é que estas não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países. No Brasil, temos como exemplo de doenças relacionadas à pobreza, a dengue, a doença de Chagas, a esquistossomose, a hanseníase, a malária, a tuberculose, a leishmaniose, entre outras (Brasil 2010).

No Brasil, em 2015, foram registrados 3.289 novos casos de leishmaniose visceral, sendo 1.806 casos no Nordeste, 539 (30%) no Maranhão, 419 (23%) no Ceará e 320 (18%) na Bahia (Brasil 2015^a).

A leishmaniose visceral era, primariamente, uma zoonose caracterizada como doença de caráter eminentemente rural, entretanto, tem sido observada nas últimas décadas uma tendência de alteração no seu padrão revelado por uma periurbanização e urbanização da doença. Neste contexto, no período de 2013 a 2015, somaram-se no Ceará 1.765 casos, e destes, 456 (26%) foram registrados na Região Metropolitana de Fortaleza (Governo do Estado do Ceará 2016).

Em relação à evolução da doença, observa-se que a letalidade tende a aumentar quando a leishmaniose visceral acomete crianças menores de um ano e idosos acima de 60 anos (Brasil 2006). No País, a letalidade em 2015 foi de 7,8% e no Ceará foi de 8,4%. Esta letalidade pode aumentar quando há a coinfeção com o HIV, afetando indivíduos adultos (20 a 59 anos) numa faixa etária que apresenta uma menor letalidade na ausência da coinfeção com o HIV (Brasil 2015b).

O aumento da taxa de letalidade em indivíduos com LV pode estar associado ao diagnóstico tardio, imunidade deficiente, desnutrição e comorbidades, o que favorece a evolução da doença para casos graves, assim como a falta de fatores de prognósticos de gravidade, principalmente laboratoriais.

Neste sentido, esta pesquisa pretende contribuir para o conhecimento da participação da leptina e LPS durante a fase aguda e pós-tratamento da leishmaniose visceral, buscando caracterizá-los como marcadores prognósticos.

Pretende-se ainda, relatar as condições sociodemográficas dos indivíduos deste estudo com LV atendidos em um hospital de referência em Fortaleza.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as concentrações séricas de leptina, LPS e imunoglobulinas 1 e 3 como fatores associados à gravidade na leishmaniose visceral.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1. Descrever as características sociodemográficas da população estudada, de voluntários com leishmaniose visceral não coinfectados pelo HIV.

3.2.2. Avaliar as características clínicas e laboratoriais dos voluntários com leishmaniose visceral não coinfectados pelo HIV.

3.2.3. Avaliar os níveis séricos das interleucinas 6 e 10 em indivíduos com leishmaniose visceral não coinfectados pelo HIV, nas fases ativa e pós-tratamento.

3.2.4. Correlacionar as concentrações séricas de leptina e LPS com indicadores clínicos, hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com leishmaniose visceral não coinfectados pelo HIV.

3.2.5. Observar se as subclasses IgG1 e IgG3 podem ser preditivas de prognóstico de evolução clínica na LV.

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo e casuística

Realizou-se um estudo do tipo série de casos, descritivo, incluindo 64 indivíduos com leishmaniose visceral não coinfetados como HIV, atendidos de maio/2015 a agosto/2016, no Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ), localizado em Fortaleza, vinculado à Secretaria da Saúde do Estado do Ceará. Este grupo de indivíduos foi submetido a entrevista presencial, para coleta de dados para o perfil sociodemográfico. Esta entrevista abordou as seguintes variáveis: i) idade; ii) estado civil; iii) escolaridade; iv) local de residência; v) tipo de domicílio; vi) atividade ocupacional; vii) renda familiar; viii) número de pessoas que contribuem para a renda familiar e ix) número de pessoas sustentadas com a renda familiar. A entrevista foi realizada no momento do diagnóstico da LV, no ambulatório do HSJ. Neste momento, foram coletadas as amostras de sangue da fase ativa da doença para as análises laboratoriais.

As amostras pós-tratamento foram colhidas na primeira consulta de retorno após o tratamento específico com anfotericina B lipossomal ou N-Metil-Glutamina (Glucantime®), que ocorre com aproximadamente 30 dias (1mpt).

Fase ativa

- No dia do diagnóstico ou antes início do tratamento
- 01 alíquota de 1 mL de sangue total
- 06 alíquotas de 150 µL de soro

Pós-tratamento (1mpt)

- Na consulta de retorno (\pm 30 dias após o fim do tratamento)
- 06 Aliquotas de 150 µL de soro

4.2 Critérios de inclusão, exclusão e grupo controle não-LV

O critério de inclusão foi definido pelo diagnóstico inicial de LV, à admissão, realizado através do teste rápido imunocromatográfico para pesquisa de anticorpos específicos para o antígeno recombinante (rK39) (Teste anti- K39) e a pesquisa direta de amastigotas no aspirado de medula óssea, positivos, conforme recomendação do Ministério da Saúde. Dos 74 participantes, 51 foram hospitalizados e 13 seguiram tratamento ambulatorial.

Foram excluídos indivíduos com recidiva de LV, gravidez, indivíduos com doenças autoimunes, indivíduos com imunossupressão por droga ou outras doenças.

Na avaliação das concentrações sanguíneas de leptina, LPS e imunoglobulinas IgG1 e IgG3 foram incluídos como controles amostras séricas de 10 doadores de sangue do Centro de Hemoterapia e Hematologia do Estado do Ceará – HEMOCE.

4.3 Aspectos éticos

O estudo foi iniciado após aprovação em Comitê de Ética, sob o protocolo nº 922.417 (ANEXO A). Os indivíduos que atenderem aos critérios de inclusão foram convidados a participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – ANEXO B).

4.4 Avaliação prospectiva de parâmetros hematológicos e bioquímicos e dos biomarcadores leptina, lipopolissacarídeo, imunoglobulinas 1 e 3 e interleucinas 6 e 10

Como relatado acima, na fase ativa foram incluídos 74 indivíduos não coinfectados com o HIV. Na fase pós-tratamento, devido às perdas ocasionadas por óbito, transferências para unidades básicas de saúde ou falta de comparecimento a consulta de retorno, foram incluídos 39 indivíduos.

As alíquotas de soro das fases ativa e pós-tratamento (1mpt) foram armazenadas em freezer à - 80°C no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas Prof. Eurico Litton Pinheiro Freitas – LACT/Farmácia/UFC até o momento das análises das moléculas propostas neste estudo no Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Medicas/IOC - FIOCRUZ.

4.4.1 Análises laboratoriais

Exames laboratoriais foram realizados para verificar as alterações consideradas significativas em indivíduos com LV, tais como, leucometria menor ou igual à 1.000 células/mm³, neutropenia menor ou igual à 500 células/mm³, plaquetopenia menor que 50.000/mm³, hemoglobina menor que 7,0 g/dL,

aumento da creatinina sérica de 2 vezes o valor de referência, bilirrubina total acima do valor de referência, aumento das aminotransferases de 5 vezes o valor de referência e albumina menor do que 2,5 g/dL (Brasil 2006).

4.4.2 Parâmetros hematológicos

Para a realização do hemograma completo foram coletadas amostras de sangue periférico em tubos contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) nos quatro momentos distintos. O hemograma completo foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica/HSJ, no setor de Hematologia, em aparelho automatizado – Sysmex 4000 XT – Roche®, que utiliza metodologia de impedância associada à citometria de fluxo. A contagem de hemácias, leucócitos, plaquetas e a dosagem da hemoglobina do grupo LV e grupo LV-HIV, são apresentados na tabela 3.

4.4.3 Parâmetros bioquímicos

As coletas de sangue para a realização de dosagens bioquímicas foram realizadas utilizando tubos com gel separador. As dosagens bioquímicas foram realizadas no setor de Bioquímica do Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ) utilizando aparelho automatizado – CT 300i – Wiener Lab®, que utiliza os métodos colorimétrico e turbidimétrico. Os resultados das dosagens de creatinina, bilirrubina total, TGO/AST, TGP/ALT e albumina do grupo LV e Grupo LV-HIV, são apresentados na tabela 4.

4.4.4 Quantificação de Leptina

A dosagem de leptina foi feita empregando-se um teste imunoenzimático do tipo captura ou sanduíche (R&D Systems®, Minneapolis, USA). Foi adicionado 100 µL de diluente de amostra em cada poço da microplaca, seguido de 100 µL dos padrões, amostras-testes e amostras-controles em uma microplaca sensibilizada com anticorpo monoclonal específico para a leptina humana e incubadas em temperatura ambiente por 2 horas. Após a lavagem, o anticorpo policlonal ligado à enzima (conjugado), específico para a leptina humana foi adicionado aos poços. Incubou-se a placa por 1 hora. Após a lavagem. O substrato foi adicionado aos poços. Incubou-se as placas por 30 minutos e a cor

desenvolveu-se proporcionalmente à quantidade de leptina ligada presente nos padrões e amostras. A reação enzimática que se expressa pelo desenvolvimento da cor foi parada com a adição da solução de parada e a intensidade da cor foi medida. A absorbância foi medida em leitor de microplaca (Benchmark – Bio Rad®, Hercules, CA, EUA) com filtro de 450 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.4.5 Quantificação de Lipopolissacarídeo

Foi utilizado o ensaio do Lisado de Amebócitos do *Limulus* (LAL) do tipo Cromogênico End Point (LONZA®). O reagente LAL é um extrato aquoso de amebócitos de caranguejo ferradura da espécie *Limulus*, um teste quantitativo, composto de enzimas que reagem em presença de pequenas quantidades de LPS.

O método quantitativo permite detectar resultados em poucos minutos. Se houver endotoxina presente na amostra, uma cascata enzimática será ativada até clivar o substrato cromogênico gerando cor amarela (Figura 19). A concentração de endotoxina em amostras desconhecidas é calculada a partir de uma curva padrão.

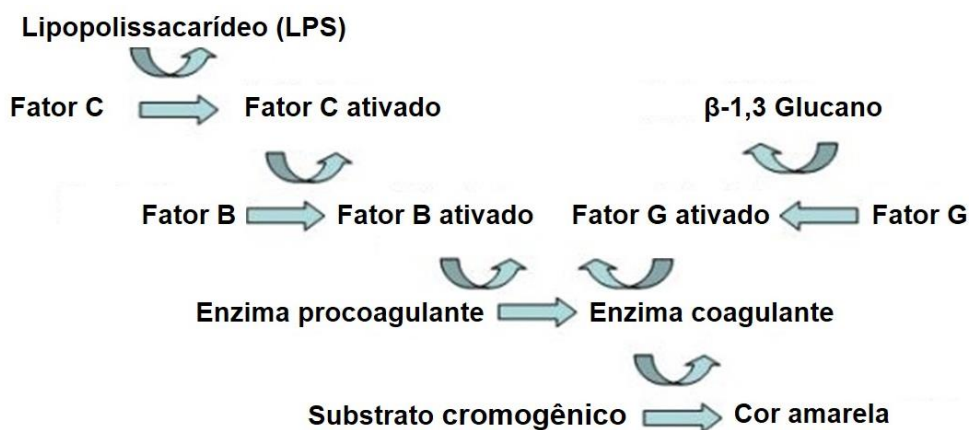


Figura 19: Representação da reação em cascata entre o lipopolissacarídeo e o Lisado de Amebócitos do *Limulus* (LAL). Fonte: adaptado de Fukumori, 2008.

Todas as soluções foram preparadas conforme descrito no manual que acompanha o kit comercial *Limulus amoebocyte lysate* QCL-1000 (Cambrex, Milão, Itália). A absorbância foi medida em leitor de microplaca (Benchmark –

Bio Rad®, Hercules, CA, EUA) com filtro de 405 nm com nível de sensibilidade de 10 pg/mL.

4.4.6 Quantificação de Imunoglobulina IgG1

Foi utilizado ensaio imunoenzimático tipo captura ou sanduíche. Microplacas de poliestireno de fundo chato de 96 poços (Nunc-Immuno, Roskilde®, Dinamarca) foram sensibilizadas com 50 µL de antígeno solúvel de promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75), na concentração de 40µg/mL, em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M pH 9,6 e incubadas em câmara úmida por *overnight* a 4°C. Seguiu-se a lavagem das placas por duas vezes com solução tampão de fosfato contendo 0,05% de *tween* 20 (PBS-T). O bloqueio foi realizado com solução PBS-T contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, São Paulo, Brasil) com incubação em câmara úmida, por 2 horas, à temperatura ambiente. Seguiu-se novamente a lavagem das placas por duas vezes com PBS-T. As amostras dos soros testes e amostras-controle foram pipetadas em duplicata, na diluição 1:50, em PBS com 10% SFB e incubadas em câmara úmida por *overnight* à 4°C. As placas foram lavadas por cinco vezes com PBS-T. O conjugado anti-IgG1 (Zymed Laboratories Inc.®, San Francisco, Califórnia, USA) com peroxidase foi diluído em 1:200 em PBS-T com 10% SFB e acrescentou-se 50µL de conjugado por poço e a incubação foi de 1 hora em câmara úmida. As placas foram lavadas por sete vezes com PBS-T. Acrescentou-se 50 µL de substrato em cada poço e seguiu-se a incubação por 10 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Utilizou-se 25µL de H₂SO₄ 2N como solução de parada. A absorbância foi medida em leitor de microplaca (Benchmark – Bio Rad®, Hercules, Califórnia, EUA) com filtro de 490 nm. Os resultados foram expressos em índice de ELISA (IE).

4.4.7 Quantificação de Imunoglobulina IgG3

Foi utilizado ensaio imunoenzimático tipo captura ou sanduíche. Microplacas de poliestireno de fundo chato de 96 poços (Nunc-Immuno®, Roskilde, Dinamarca) foram sensibilizadas com 50 µL de antígeno solúvel de promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75), na concentração de 40µg/mL, em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M pH 9,6 e incubadas em

câmara úmida por *overnight* à 4°C. Seguiu-se a lavagem das placas por duas vezes com solução tampão de fosfato contendo 0,05% de *tween* 20 (PBS-T). O bloqueio foi realizado com solução PBS-T contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, São Paulo, Brasil) com incubação em câmara úmida, por 2 horas, à temperatura ambiente. Seguiu-se novamente a lavagem das placas por duas vezes com PBS-T. Amostras-testes e amostras-controles foram pipetadas em duplicata, na diluição 1:50, em PBS com 10% SFB e incubadas em câmara úmida por *overnight* à 4°C. As placas foram lavadas por cinco vezes com PBS-T. O conjugado anti-IgG1 (Zymed Laboratories Inc®, San Francisco, Califórnia, USA) com peroxidase foi diluído em 1:400 em PBS-T com 10% SFB e acrescentou-se 50µL de conjugado por poço e a incubação foi de 1 hora, em câmara úmida. As placas foram lavadas por sete vezes com PBS-T. Acrescentou-se 50 µL de substrato em cada poço e seguiu-se a incubação por 10 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Utilizou-se 25µL de H₂SO₄ 2N como solução de parada. A absorbância foi medida em leitor de microplaca (Benchmark – Bio Rad®, Hercules, Califórnia, EUA) com filtro de 490 nm. Os resultados foram expressos em índice de ELISA (IE).

4.4.8 Quantificação de Interleucina 6

Os níveis de Leptina e IL-6 foram determinados por Enzime-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), usando um kit comercial Human IL-6 Quantikine® ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MD, EUA). O diluente de ensaio foi adicionado em todos os poços da microplaca de 96 poços fornecido pelo kit, e depois adicionaram-se 100 µL de amostras por poço. A curva padrão foi de sete pontos com padrão diluído com diluente do calibrador e um poço em branco que foram realizados em duplicatas. O conjugado de IL-6 foi adicionado em cada poço e incubado durante uma hora. Uma reação colorimétrica ocorreu depois que a solução de substrato foi adicionada na microplaca. A reação enzimática que se expressa pelo desenvolvimento da cor foi parada com a adição da solução de parada e a intensidade da cor foi medida. A densidade óptica foi determinada a um comprimento de onda de 450 nm por espectrofotometria e os resultados foram expressos em picogramas por mililitro (pg/mL).

4.4.9 Quantificação de Interleucina 10

Os níveis de IL-10 foram determinados por Enzime-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), utilizando um kit comercial Duoset® (R&D Systems, EUA). De acordo com as recomendações do fabricante, os anticorpos de captura (anti-IL-10 e anti-IFN γ) foram diluídos em PBS e foram adicionados 100 μ L dos anticorpos diluídos por poço em uma microplaca de 96 poços que foi incubada durante a noite. A microplaca foi anteriormente bloqueada com diluente de reagente e foram adicionados 100 μ L de amostras ou padrões por poço. O anticorpo de detecção foi diluído de acordo com o protocolo e incubado durante 2 horas. A reação colorimétrica ocorreu após à estreptavidina-HRP e depois à solução de substrato (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) que foram adicionadas na microplaca. A reação enzimática que se expressa pelo desenvolvimento da cor foi parada com a adição da solução de parada e a intensidade da cor foi medida. A leitura foi realizada em um espectrômetro com um comprimento de onda de 450 nm e os resultados foram expressos em picogramas por mililitro (pg/mL).

4.4.10 Análises Estatísticas

Análise estatística foi realizada com *GraphPad Prism*® (versão do software *GraphPad* 4.0 para Windows® 10; San Diego, CA, EUA). Os dados foram apresentados como média e desvio padrão. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.5 Estudo da correlação entre as concentrações sanguíneas de leptina, lipopolissacarídeo, imunoglobulinas IgG1 e IgG3 com indicadores hematológicos e bioquímicos utilizados como marcadores de gravidade

Foram excluídos para esta análise os indivíduos com idade acima de 60 anos, bem como crianças e adolescentes. Como citado acima, foram incluídos como controles para a avaliação das concentrações dos biomarcadores, 10 amostras de doadores de sangue do Centro de Hemoterapia e Hematologia do Estado do Ceará – HEMOCE. O estudo da correlação foi realizado por regressão linear simples, calculando-se os coeficientes de correlação com posterior teste

de significância estatística. Para esta análise, consideraram-se como variáveis dependentes, nos diferentes tempos de acompanhamento: i) contagem sanguínea de leucócitos (células/mm³); ii) contagem sanguínea de plaquetas (mil/mm³); iii) dosagem de hemoglobina sanguínea (g/dL); iv) dosagem sérica de TGO (UI/L); v) dosagem sérica de albumina (g/dL). Como variáveis independentes foram consideradas: i) a dosagem sérica de leptina (pg/mL), ii) dosagem sérica de LPS (pg/mL), iii) dosagem sérica de IgG1 (índice de ELISA – IE) e iv) dosagem sérica de IgG3 (índice de ELISA – IE). Para todas as análises, estabeleceu-se um nível de significância estatística de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características sociodemográficas dos indivíduos com leishmaniose visceral não coinfectados pelo HIV atendidos no Hospital São José

Os participantes foram entrevistados por um profissional capacitado, seguindo um questionário específico e os dados foram incluídos no programa *Microsoft® Office Excel 2016* para posterior análise. Dentre os 74 participantes, 33 residiam na região metropolitana de Fortaleza, distribuídos em 28 bairros e outros 13 residiam em 7 municípios (Cascavel, Maranguape, Itaitinga, Eusébio, Maracanaú, Caucaia e Pacajus) os outros 28 voluntários residiam em demais cidades do Estado.



Figura 20: Localização dos casos de leishmaniose visceral não coinfectados com o HIV em bairros de Fortaleza.

Observamos o predomínio do sexo masculino (63/74); 20,3% encontravam-se na faixa etária acima dos 60 anos; 39,2% com idade de 40 a 59 anos, 24,3% entre 20 e 39 anos, 8,1% entre 15 e 19 anos, 8,1% com menos de 14 anos. Quanto ao estado civil, quase metade dos casos era casado (45,9%); 41,9% era solteiro; 5,4% divorciados e 6,8% viúvos. Em relação à escolaridade, 71,6% informaram que cursaram o ensino fundamental; 6,8% cursaram ensino

médio e 21,6% não estudaram. Eram provenientes predominantemente de zona urbana (70,3%) e habitavam em casas (97,3%). Somente 2,7% dos casos foram de voluntários vivendo em condição de rua. No que se refere à ocupação, 48,6% apenas trabalhavam, chegando a alcançar até 02 salários mínimos (60,8%). Na maioria dos casos somente o indivíduo era responsável pela renda familiar (54,1%), sendo responsável pelo sustento de pelo menos quatro pessoas (32,4%) (Tabela 1). Em relação aos 05 óbitos, 04 eram do sexo masculino e tinham em média 56 anos; 02 trabalhavam, 01 recebia auxílio doença e 01 era aposentado.

Tabela 1: Dados sociodemográficos dos indivíduos com leishmaniose visceral (LV) não coinfectados pelo HIV atendidos no Hospital São José de maio de 2015 a agosto de 2016.

Variável	LV (n= 74)	
	n	%
Idade		
≤ 14 anos	6	8,1
15 a 19 anos	6	8,1
20 a 39 anos	18	24,3
40 a 59 anos	29	39,2
≥ 60 anos	15	20,3
Estado civil		
Solteiro(a)	31	41,9
Casado(a)	34	45,9
Divorciado, separado	4	5,4
Viúvo(a)	5	6,8
Escolaridade		
Ensino fundamental	53	71,6
Ensino Médio	5	6,8
Não estudou	16	21,6
Localização da residência		
Zona rural	22	29,7
Zona urbana	52	70,3
Tipo de domicílio		
Casa	72	97,3
Apartamento	0	0,0
Cômodo	0	0,0
Em condição de rua	2	2,7
Situação ocupacional		
Apenas estuda	8	10,8
Apenas trabalha	36	48,6
Desempregado (a)	10	13,5
Licença ou incapacitado	3	4,1
Aposentado (a)	13	17,6
Não trabalha nem estuda	4	5,4
Renda (salário mínimo)^a		
≤ 1	23	31,1
1 a 2	45	60,8
2 a 5	6	8,1
Nº pessoas que contribuem para a renda familiar		
1	40	54,1
2	27	36,5
3	3	4,1
4	3	4,1
5	1	1,4

> 5	0	0,0
Nº pessoas sustentadas com a renda familiar		
1	12	16,2
2	10	13,5
3	12	16,2
4	24	32,4
5	5	6,8
> 5	11	14,9

^a Salário mínimo Ano Base 2017= R\$ 937,00

A idade média geral foi de 43 anos, tendo indivíduos de 7 a 86 anos. As maiores percentagens foram observadas acima dos 20 anos, porém, os adultos de 40 a 59 anos foram os mais acometidos pela doença, somando 39,2% (29/74). Este dado é discordante da faixa etária citada no Boletim Epidemiológico de 2016, que relatou que os adultos de 20 a 39 anos são os mais acometidos pela doença (Governo do Estado do Ceará 2016).

Segundo o Ministério da Saúde, o risco de letalidade é considerado mais elevado nos casos que afetam crianças e indivíduos acima de 60 anos, bem como em adultos jovens, nos casos de coinfeção com o HIV (Brasil 2014). Nesta casuística, 13,5% eram de voluntários menores de 18 anos com idade mínima de 7 anos; 20,3% de casos acima de 60 anos e neste grupo ocorreu um óbito (6,7%).

Em relação à escolaridade, esta foi baixa entre os indivíduos deste estudo. No Ceará, a ocorrência de um alto percentual de baixa ou nenhuma escolaridade, em indivíduos com LV, já foi relatada na literatura e pode ser considerada um fator limitante para a compreensão de práticas de promoção, prevenção e recuperação da saúde que possam ser desenvolvidas nas comunidades (Oliveira et al. 2013, Cavalcante & Vale 2014).

Pela procedência de cada indivíduo observamos um menor percentual dos casos de LV na zona rural, sendo de apenas 29,7% dos casos. Os demais indivíduos demonstram a distribuição e a extensão dos casos de LV para zonas urbanas, em áreas que possivelmente apresentam condições precárias de infraestrutura, uma vez que os indivíduos desta pesquisa, em sua maioria, apenas trabalhavam ou eram aposentados, alcançando um ganho salarial de até dois salários mínimos para o sustento de três ou mais pessoas. Apenas 3% dos indivíduos relataram viver em condição de rua. Esta situação de rendimentos

familiares baixos impedem os indivíduos de terem acesso às melhores condições de saúde e moradia, favorecendo a manutenção do vetor e do reservatório (Brasil 2006, 2014). Esta urbanização da LV em áreas sob condições socioeconômicas desfavoráveis vem sendo demonstrada em Fortaleza (Albuquerque et al. 2009) e em outras cidades do Nordeste (Harhay et al. 2011a, Lima et al. 2012) e regiões do país (Brasil 2006).

5.2 Características clínicas e laboratoriais dos indivíduos com leishmaniose visceral não coinfetados pelo HIV

O tempo entre o início dos sintomas e a 1ª consulta médica, quando acima de 56 dias é considerado um fator associado ao mau prognóstico da doença (Brasil 2006). O tempo médio para o diagnóstico relatado pelos indivíduos desta pesquisa foi de 62 dias. No momento do diagnóstico, o relato de febre esteve presente na maioria dos casos (98,6%), assim como outras manifestações clínicas, como emagrecimento (63,5%); astenia (59,4%); hepatoesplenomegalia (55,4%); hiporexia (51,3%); palidez (22,9%); diarreia (12,1%) e sangramento (2,7%) (Tabela 2).

Tabela 2: Manifestações clínicas presentes na avaliação inicial dos casos de leishmaniose visceral (LV) não coinfetados com o HIV no Ceará de maio de 2015 a agosto de 2016.

Manifestações clínicas	LV (n=74)	
	n	(%)
Febre	73	98,6
Emagrecimento	47	63,5
Astenia	44	59,4
Hepatoesplenomegalia	41	55,4
Hiporexia	38	51,3
Palidez	17	22,9
Diarreia	9	12,1
Sangramento	2	2,7

As manifestações clínicas apresentadas pelos indivíduos do estudo atual estão em consonância com os definidos pelo Ministério da Saúde (Brasil 2011), e relatados por vários estudos. A exemplo, Oliveira *et al.*, em 2010, que relatou as principais manifestações clínicas apresentadas em 55 indivíduos atendidos em hospitais de Campo Grande/MS, onde destacavam-se a febre, em 89,1% dos casos, seguida por emagrecimento (74,5%), esplenomegalia (71%), hepatomegalia (71%) e palidez (69%).

Um estudo caso-controle foi desenvolvido em Teresina/PI, em 2003, em indivíduos que morreram durante o tratamento (n= 12). As variáveis significativamente associadas à morte foram anemia grave, febre por mais de 60 dias, diarreia e icterícia. O sistema prognóstico baseado nestas quatro variáveis mostrou uma sensibilidade de 85,7% e uma especificidade de 92,5% (Werneck *et al.* 2003). Nos cinco casos de óbitos observados no estudo atual essas variáveis, no momento do diagnóstico, tinham intensidades distintas. Todos relataram febre com mais de 30 dias e apresentaram níveis de hemoglobina abaixo de 10,5 g/dL; apenas um indivíduo relatou diarreia e outro apresentou icterícia.

Em relação às contagens celulares, os indivíduos apresentaram melhora dos parâmetros após o tratamento. De 18 voluntários que relataram palidez, 16 apresentaram dosagem de hemoglobina abaixo de 10,5 g/dL e 02 relataram episódios de sangramento na fase ativa. Em dois casos a trombocitopenia se correlacionou com episódios de sangramento. Sendo que a baixa contagem de plaquetas é um preditor forte e a sua simples identificação pode auxiliar a classificação do risco e guiar o tratamento (Levi & Lowenberg 2008).

As dosagens de creatinina e bilirrubina total apresentaram-se dentro dos valores de normalidade na fase ativa; TGO e TGP elevados e albumina abaixo dos limites. No pós-tratamento (1mpt), todos os parâmetros normalizaram.

Tabela 3: Caracterização da celularidade sanguínea e dos níveis de hemoglobina apresentados pelos indivíduos de leishmaniose visceral (LV) não coinfectados com HIV, analisados antes e após o tratamento anti-*Leishmania* – Ceará – Maio/15 a Agosto/16.

Hemograma	Fase ativa	1mpt
	LV (n=74)	LV (n=39)
	Média (± DP)	Média (± DP)
Hemácias (milhões/mm ³)	3,3 (±0,6)	4,5 (±0,6)
Hemoglobina (g/dL)	8,4 (±1,8)	13 (±1,9)
Plaquetas (mil/mm ³)	96.473 (±70.697)	203.263 (±72181)
Leucócitos (mm ³)	2.327 (±1.149,90)	7.165 (±2524,8)
Neutrófilos (mm ³)	1.160 (±633,9)	4.124 (±1867,7)
Linfócitos (mm ³)	916 (±565,7)	2.159 (±746,2)
Monócitos (mm ³)	222 (±177,7)	529 (±271,7)
Eosinófilos (mm ³)	28 (±77,3)	333 (±379,4)

Legenda: 1mpt= 1 mês após o tratamento; DP = desvio-padrão.

Tabela 4: Caracterização dos parâmetros bioquímicos apresentados pelos indivíduos de leishmaniose visceral (LV) não coinfectados com HIV, analisados antes e após o tratamento anti-*Leishmania* – Ceará – Maio/15 a Agosto/16.

Bioquímica	Fase ativa	1mpt
	LV (n=74)	LV (n=39)
	Média (± DP)	Média (± DP)
Creatinina (mg/dL)	1,2 (±1,2)	0,9 (±0,3)
Bilirrubina total (mg/dL)	1,3 (±1,4)	0,6 (±0,3)
TGP/AST (UI/L)^a	79,6 (±140,1)	34,9 (±31,1)
Albumina (g/dL)	3,1 (±0,7)	4,4 (±0,3)

Legenda: 1mpt= 1 mês após o tratamento; DP = desvio-padrão; ^a = Transaminase glutâmico-oxalacética/Aspartato aminotransferase.

O Ministério da Saúde, desde 2006, correlaciona parâmetros clínicos (idade inferior a 6 meses ou superior a 65 anos, desnutrição grave, comorbidades, icterícia, fenômenos hemorrágicos, edema generalizado, sinais de toxemia e radiografia de tórax com imagem sugestiva de infecção ou de edema pulmonar) e parâmetros laboratoriais (leucometria ≤ 1.000 células/mm³, neutropenia ≤ 500 células/mm³, plaquetopenia <50.000 /mm³, hemoglobina $<7,0$ g/dL, creatinina sérica ($\uparrow 2X$ o valor de referência (VR)), Atividade de protrombina (menor que 70%), bilirrubina total (maior que o VR), aminotransferases ($\uparrow 5X$ o VR) e albumina (menor do que 2,5 g/dL) que quando associados caracterizam um possível mal prognóstico de LV (Brasil 2006, 2009).

Neste estudo, as alterações hematológicas e bioquímicas demonstraram uma tendência para a normalização após tratamento, como relatado anteriormente por Caldas et al. (2006), salientando que a regressão total pode levar alguns meses, porém os parâmetros hematológicos melhoram a partir da segunda semana (Brasil 2011).

5.3 Avaliação dos níveis séricos de leptina, lipopolissacarídeo, imunoglobulinas anti-*Leishmania*, interleucina 6 e 10

5.3.1 Níveis séricos de leptina em indivíduos com leishmaniose visceral nas fases ativa e pós-tratamento

Os níveis de leptina foram medidos no soro de 19 indivíduos, do sexo masculino, com tempo médio para o diagnóstico de 87 dias, para avaliar uma possível atuação imunomoduladora na LV. Os indivíduos com LV avaliados na fase ativa (mediana: 1.178 pg/mL; IIQ: 568-1.448%) apresentaram níveis mais baixos de leptina sérica em comparação com controles sem LV (mediana: 1.455 pg/mL; IIQ: 948-1.585%). Os indivíduos avaliados 1 mês pós-tratamento (1mpt) mostraram um aumento significativo nos níveis dessa molécula (mediana: 1.490 pg/mL; IIQ: 1.297-1.555%) quando comparado à fase ativa ($p < 0,05$) (Figura 21).

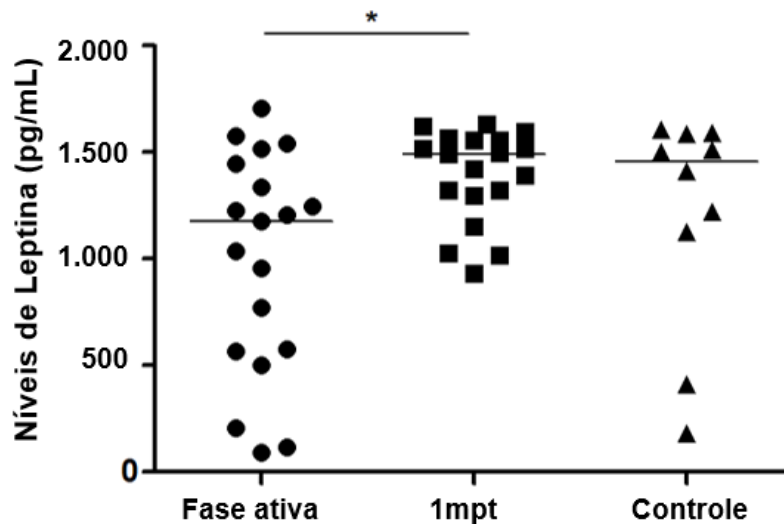


Figura 21: Níveis de leptina sérica em indivíduos com leishmaniose visceral (LV). Níveis de leptina na fase ativa e com um 1 mês após o tratamento (1mpt). Cada símbolo representa um indivíduo. A barra horizontal representa os valores de mediana. Os asteriscos indicam uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, * $p < 0,05$.

A perda ponderal quando associada a desnutrição, causa baixa imunidade e maior susceptibilidade em adquirir as doenças infecto-parasitárias, como a LV (Malafaia 2008, 2010). Em 2010, Oliveira e colaboradores, analisaram prontuários de pacientes que tiveram a leishmaniose visceral como causa de óbito e a desnutrição esteve presente em 32,7% dos casos, sendo considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da forma sintomática da doença. A análise dos casos de leishmaniose visceral notificados no município de Bauru (SP), no período de 2004 a 2012, também cita a desnutrição como a terceira manifestação clínica mais frequente nos casos e como um fator de risco para o óbito (Ortiz & Anversa 2015).

Uma das formas de avaliação de risco nutricional de pacientes é através da dosagem de albumina sérica, que se caracteriza como um marcador bioquímico. A hipoalbuminemia é definida quando abaixo de 3,5 g/dL e foi constatada em 42% dos casos na fase ativa e em 5%, 1 mês pós-tratamento. Estudos correlacionam baixas concentrações séricas de albumina com aumentada incidência de complicações clínicas, mortalidade e a morbidade (Maicá & Schweigert 2008, Paz & Couto 2016).

Observamos que dos 19 casos em que foram dosadas a leptina, 15 (79%) relataram emagrecimento. Foram encontrados registros de pesagem antes e

depois do tratamento destes casos. Observamos que as duas variáveis, albumina e peso, estavam correlacionadas positivamente.

De acordo com Arnardottir e colaboradores (2012), existe uma alta correlação entre o índice de massa corporal (IMC) e os níveis circulantes de leptina. Quanto maior a quantidade de tecido adiposo, maior os níveis da proteína no plasma.

As variáveis leptina e peso, apresentaram uma tendência de elevação similar em 10 casos. Em 02 casos, verificamos uma pequena perda ponderal que foi acompanhada pelo declínio na concentração da leptina. Em outros 03 casos, houve também uma ligeira perda ponderal mas que não afetou a elevação da concentração da leptina.

5.3.2 Níveis séricos de lipopolissacarídeos em indivíduos com leishmaniose visceral nas fases ativa e pós-tratamento

Os voluntários com LV na fase ativa (n=21) apresentaram níveis significativamente mais elevados de LPS (mediana: 54,7 pg/mL, IIQ: 36,6-71,3 %) quando comparados aos voluntários saudáveis (mediana: 25,4 pg/mL, IIQ: 23,5-27,7%) (Figura 22).

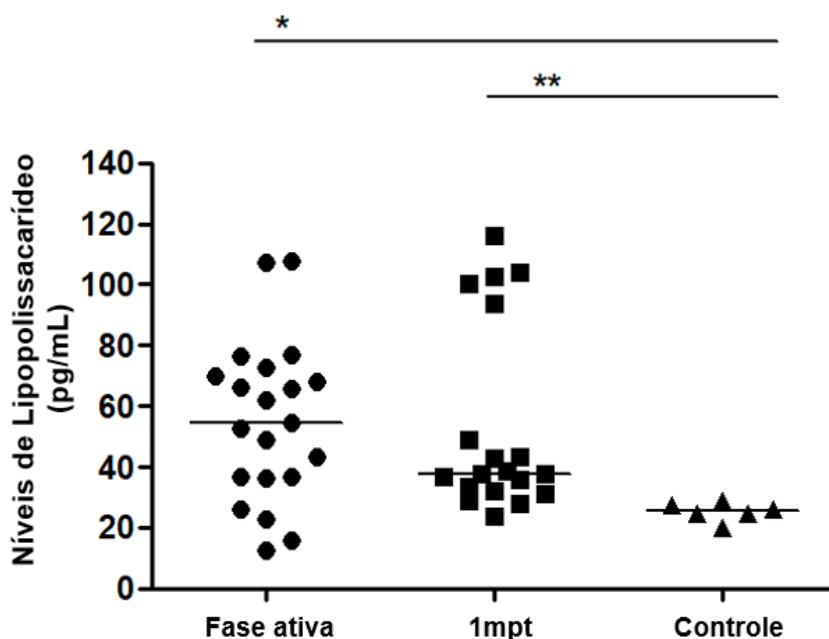


Figura 22: Níveis de lipopolissacarídeo sérico em indivíduos com leishmaniose visceral (LV). Níveis de LPS na fase ativa e com um 1 mês após o tratamento (1mpt). Cada símbolo representa um indivíduo. A barra horizontal representa os valores das

medias. Os asteriscos indicam uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Dentre os 21 pacientes analisados, somente 03 relataram epis3dios de diarreia na fase ativa da doença. Apesar da diarreia pode ser um dos marcadores de mau progn3stico, as vari3veis, LPS e diarreia n3o estavam correlacionadas positivamente.

5.3.3 N3veis s3ricos de imunoglobulinas anti-*Leishmania* G1 (IgG1) e G3 (IgG3) em indiv3duos com leishmaniose visceral nas fases ativa e p3s-tratamento

A maioria dos indiv3duos com LV apresentou n3veis elevados de IgG1 anti-*Leishmania* (n=21, mediana: 14,5 IE; IIQ: 10,3-18,6%) e IgG3 (n=21, mediana: 5,9 IE; IIQ: 4,0-9,1%) na fase ativa. Entretanto, os n3veis ap3s 1 m3s de p3s-tratamento (1mpt) apresentaram uma diminui3o significativa dos n3veis de IgG1 anti-*Leishmania* (mediana: 8,5 IE; IIQ: 5,3-17,5%) ($p < 0,05$) e, especialmente, de IgG3 (mediana: 1,5 IE; IIQ: 0,7-2,9%) ($p < 0,0001$). Quando comparados aos controles sem LV, os indiv3duos com LV apresentaram n3veis significativamente maiores de anticorpos anti-*Leishmania* IgG1 e IgG3, em todas as fases avaliadas (medias de controle saud3veis: 0,9 e 0,9 IE; IIQ: 0,7-1,2% e 0,4-1,6%, respectivamente). Os indiv3duos com 1 m3s de p3s-tratamento apresentaram uma mediana dos n3veis de anti-*Leishmania* IgG3 semelhantes a indiv3duos sem LV (Figura 23).

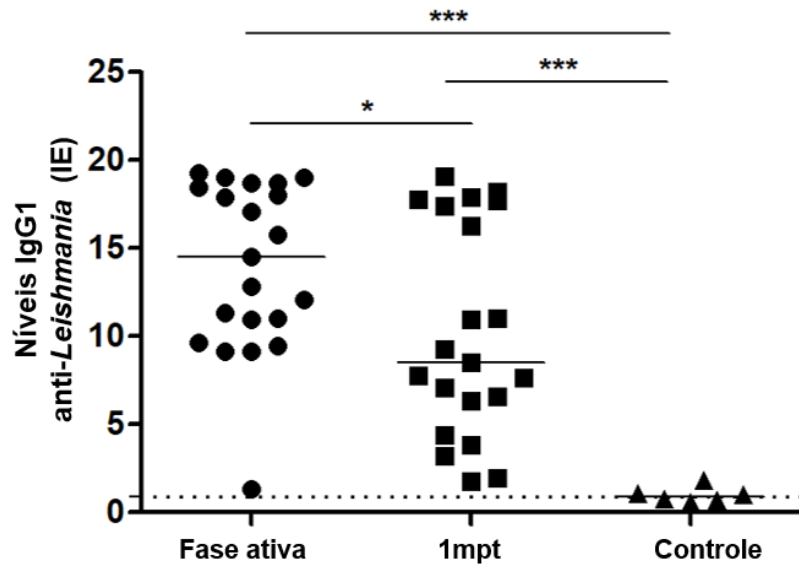


Figura 23: Títulos de anti-*Leishmania infantum* G1 (IgG1) em indivíduos com leishmaniose visceral (LV). Títulos de IgG1 na fase ativa e com um 1 mês após o tratamento (1mpt). Cada símbolo representa um voluntário. A barra horizontal representa os valores das medianas. A linha tracejada representa o valor da mediana dos níveis de IgG1 em indivíduos sem LV. O asterisco indica a diferença estatisticamente significativa entre os grupos, * $p < 0,05$.

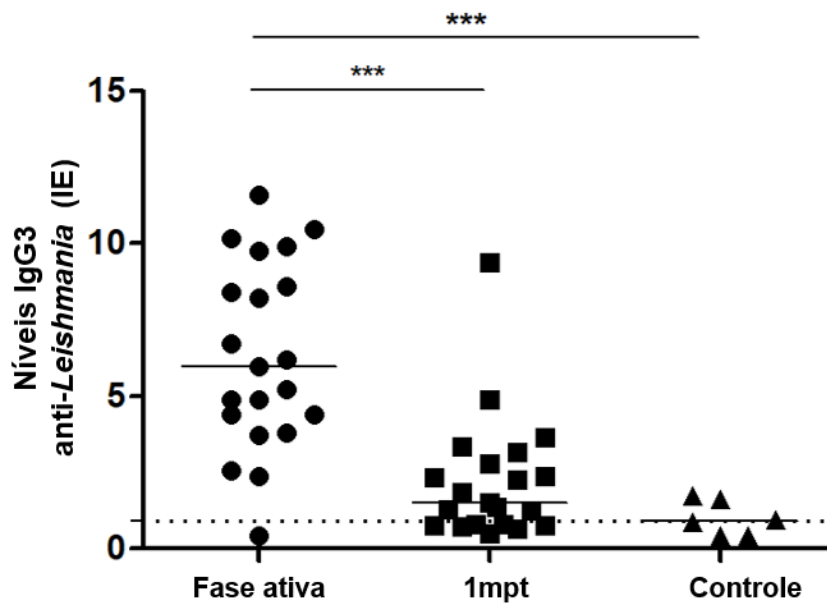


Figura 24: Títulos de anti-*Leishmania infantum* G3 (IgG3) em indivíduos com leishmaniose visceral (LV). Títulos de IgG3 na fase ativa e com um 1 mês após o tratamento (1mpt). Cada símbolo representa um voluntário. A barra horizontal representa os valores das medianas. A linha tracejada representa o valor da mediana dos níveis de IgG3 em indivíduos sem LV. O asterisco indica a diferença estatisticamente significativa entre os grupos, *** $p < 0,0001$.

5.3.4 Níveis séricos de interleucinas 6 e 10 em indivíduos com leishmaniose visceral nas fases ativa e pós-tratamento

A IL-6 é uma citocina com atuação nas respostas imunes inata e adaptativa. É sintetizada por monócitos, células endoteliais e outras células em resposta a microrganismos. A IL-6 é expressa normalmente em níveis baixos, exceto durante infecções.

A IL-10 é um inibidor de macrófagos e células dendríticas ativadas participando no controle da resposta inflamatória. Em doenças infecciosas, a resposta inflamatória é necessária para prevenir a proliferação parasitária e a IL-10 pode impedir uma resposta ideal.

Tabela 5: Níveis séricos de interleucinas 6 e 10 em indivíduos com leishmaniose visceral não coinfectados com o HIV avaliados antes e após o tratamento da leishmaniose visceral – Ceará – Maio/15 a Agosto/16.

Paciente	IL-6 (pg/mL)		IL-10 (pg/mL)	
	Fase ativa	1mpt	Fase ativa	1mpt
Paciente 01	7	ND	ND	ND
Paciente 09	24,4	ND	25,6	ND
Paciente 10	51	ND	5,1	ND
Paciente 13	ND	///	ND	///
Paciente 17	33,8	ND	117,5	ND
Paciente 18	43,9	ND	ND	///
Paciente 22	120,3	78,1	317,1	ND
Paciente 23	112,3	ND	199,7	ND
Paciente 30	33,1	ND	ND	ND
Paciente 37	40,8	ND	138,3	///
Paciente 38	2,7	///	ND	///
Paciente 45	129,7	ND	1,5	ND
Paciente 46	ND	///	ND	///
Paciente 48	3,6	2,8	ND	ND
Paciente 49	36,8	ND	28	ND
Paciente 52	356,4	ND	64,2	ND
Paciente 56	ND	///	***	///
Paciente 58	25	ND	166,2	ND
Paciente 61	5,5	9,6	ND	ND
Paciente 64	30,9	ND	***	///
Paciente 68	19,2	218,3	ND	ND
Paciente 69	3,7	ND	10,6	///
Paciente 76	11,9	25,1	***	ND
Paciente 77	15,6	///	ND	///

Paciente 82	95,2	ND	332	ND
Paciente 88	535,4	///	478,6	///
Paciente 89	223,3	///	147,9	///
Paciente 93	8,9	///	ND	///
Paciente 102	79,7	///	354,5	///
Paciente 103	169,9	///	ND	///

Legenda: 1mpt= 1 mês após o tratamento; ND = abaixo da sensibilidade do teste; *** indivíduos não avaliados na fase ativa; /// indivíduos não avaliados após o tratamento

Dentre os 30 indivíduos analisados na fase ativa, 27 tiveram níveis detectáveis de IL-6. Na avaliação feita nos indivíduos após o tratamento (20 casos), a maioria ficou abaixo do limite de detecção (15/20).

Na análise de IL-10, foram detectadas 12 amostras abaixo do limite de detecção na fase ativa (12/30). Nos indivíduos analisados após o tratamento, todos ficaram abaixo do limite de detecção.

Os dados sobre IL-6 e IL-10 corroboram com relatos anteriores de Caldas *et al.*, (2005), Santos-Oliveira *et al.*, (2011) e dos Santos *et al.*, (2016), que em seus estudos observaram níveis elevados destas citocinas durante a fase ativa da LV, que decaíram significativamente após o tratamento.

5.4 Correlação das concentrações séricas de leptina, lipopolissacarídeo, imunoglobulinas anti-*Leishmania* e interleucina-6 com indicadores hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com leishmaniose visceral não coinfectados com o HIV

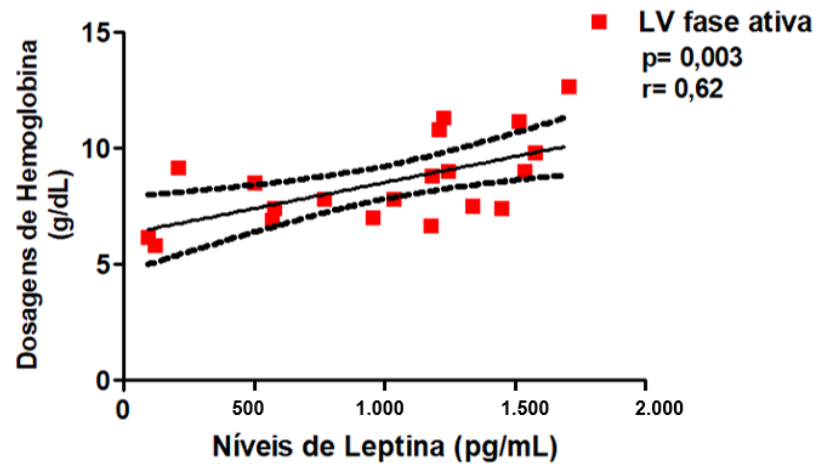
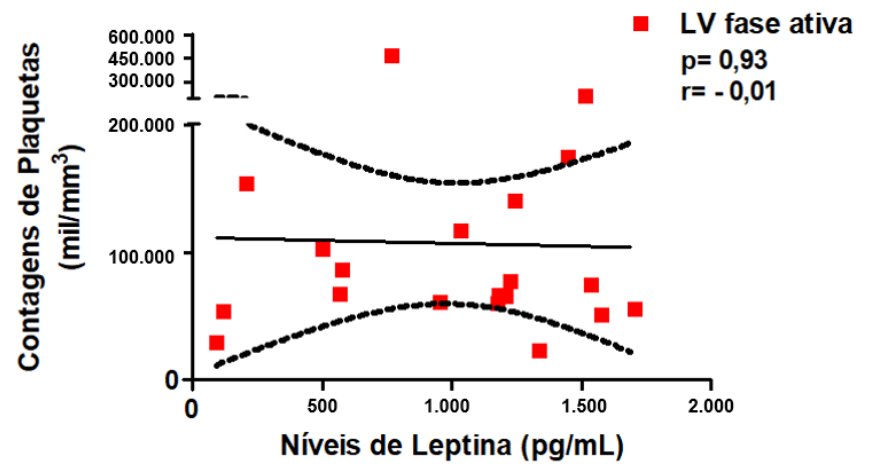
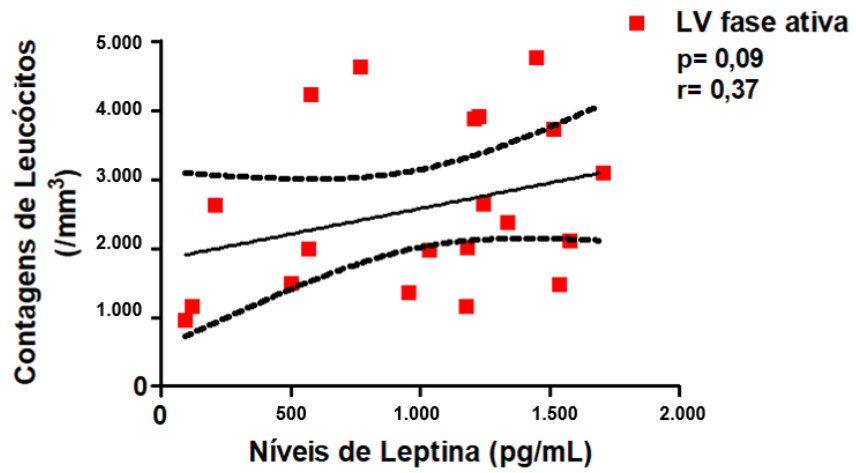
5.4.1 Correlação das concentrações séricas de leptina com indicadores hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com leishmaniose visceral não coinfectados com o HIV

Na fase ativa da doença, os níveis de leptina sérica (n= 19) tiveram uma correlação positiva com os parâmetros laboratoriais, como contagens de leucócitos, dosagens de hemoglobina ($p=0,003$) e albumina ($p=0,01$). A correlação com a imunoglobulina IgG1 foi negativa ($p=0,04$) e positiva com os níveis de IgG3 (Figura 25).

A astenia foi relatada na maioria dos casos (73,6%), assim como o emagrecimento (78,9%). A LV pode evoluir para formas graves apresentando

alterações hematológicas e bioquímicas significativas, incluindo leucopenia, neutropenia anemia, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. Neste grupo, na fase ativa, a contagem média de leucócitos foi de 2.574/mm³ sendo a leucopenia um parametro de gravidade quando abaixo de 1.000/mm³ e foi detectada em 1 indivíduo. A neutropenia, abaixo de 500 células/mm³, foi detectada em 1 indivíduo. A dosagem média de hemoglobina foi de 9,0 mg/dL e quando abaixo de 7,0 g/dL é também considerado um parâmetro de gravidade, que observou-se em 4 indivíduos. A plaquetopenia, abaixo de 50.000/mm³, foi observada em 1 caso. Outros indicativos de gravidade são os níveis de albumina abaixo de 2,5 g/dL, que foram detectados em 02 indivíduos e a hiperglobulinemia que foi observada em 07 casos. Em relação às imunoglobulinas, a detecção das subclasses é utilizada como avaliação precoce de cura pós-tratamento da LV quando seus níveis encontram-se elevados. Foi observado uma maior concentração de IgG1 em relação a IgG3 na fase ativa e, posteriormente, um maior decaimento bastante precoce dos níveis de IgG3 após 1 mês de tratamento (1mpt) (Figuras 23 e 24). Estes dados estão de acordo com o estudo demonstrado por Gomes em 2010, que detectou a elevação dos níveis de IgG1 e IgG3, assim como sua diminuição, chegando a registrar resultados negativos em indivíduos com 2 a 6 meses pós-tratamento.

Desde a proposta de Dayakar em 2011, sobre a atuação da leptina na resposta imune, estudos de experimentação animal têm sido realizados (Di Loria et al. 2014, Shivahare et al. 2015, Maurya et al. 2016). Em 2016, outro estudo foi realizado com cultura de células humanas infectadas por *L. donovani* (Dayakar et al. 2016). Estes estudos são relevantes em tentar compreender a ativação celular durante a infecção por *Leishmania*.



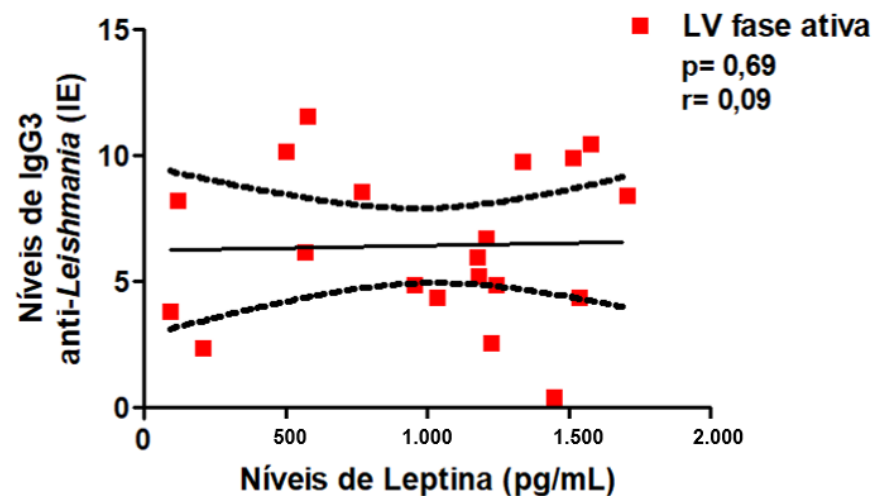
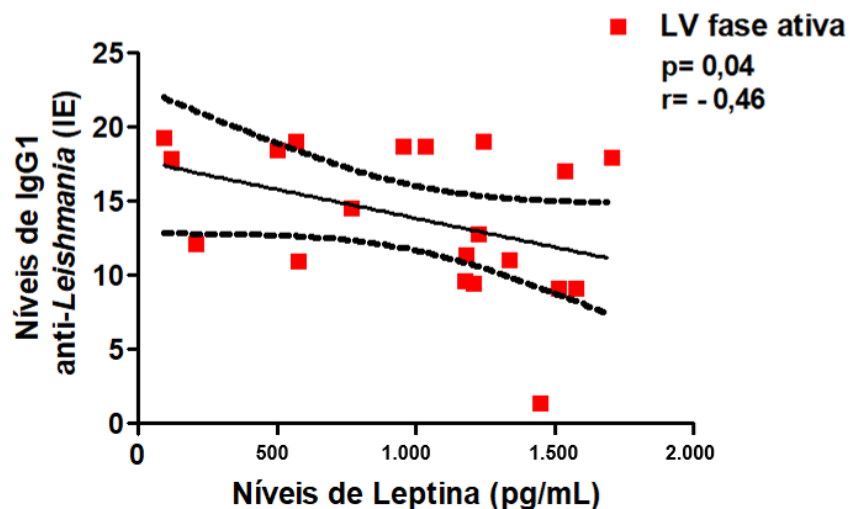
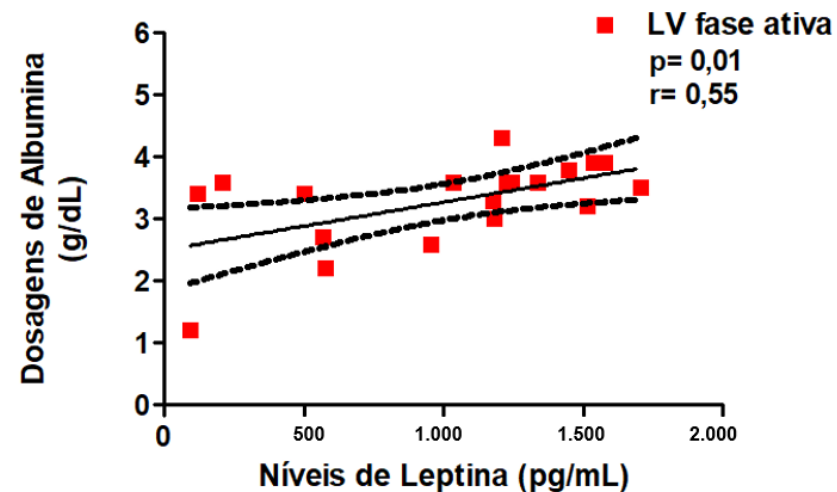
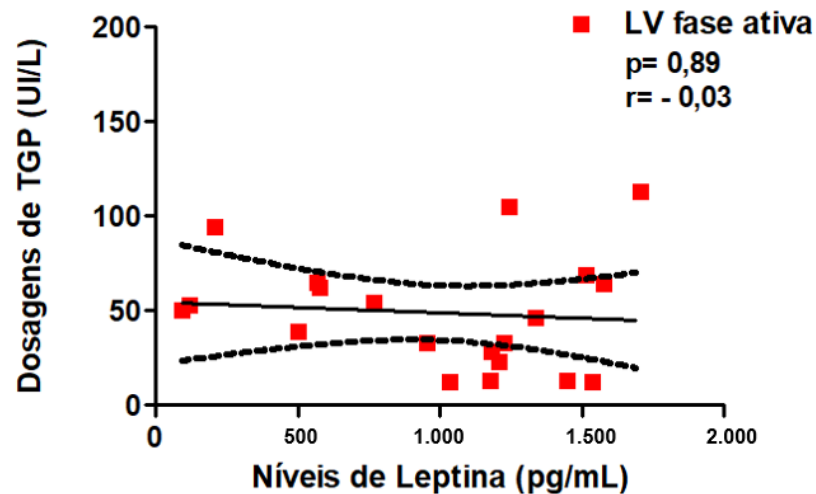
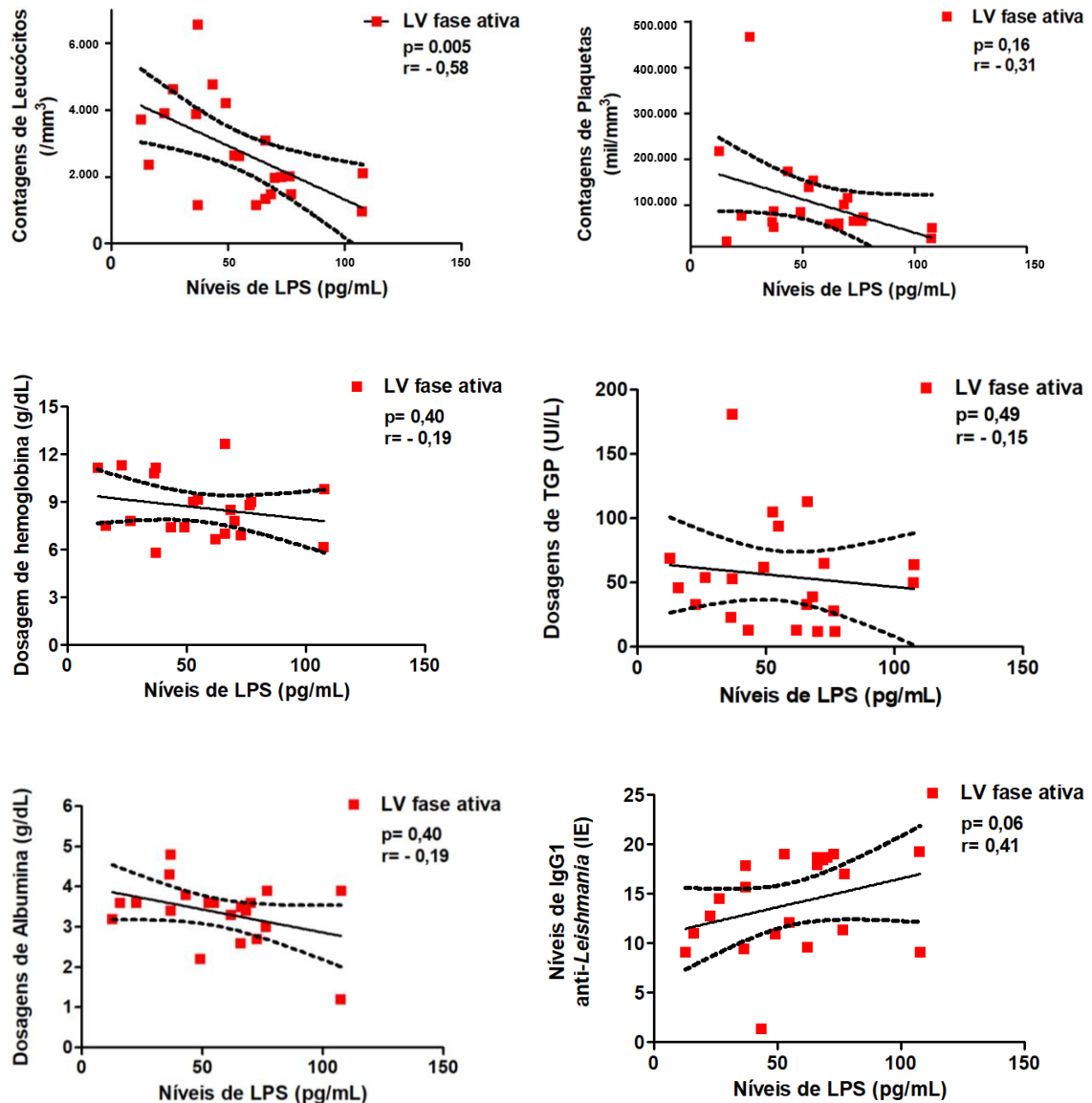


Figura 25: Correlação da concentração de leptina sérica com os resultados de parâmetros hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com leishmaniose visceral.

5.4.2 Correlação das concentrações séricas de lipopolissacarídeo com indicadores hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com leishmaniose visceral não infectados com HIV

Na fase ativa da doença, os níveis de LPS (n= 21) foram correlacionados negativamente com as contagens de leucócitos ($p=0,005$) e não observamos demais correlações com contagens de plaquetas e dosagens de hemoglobina, TGP e albumina.



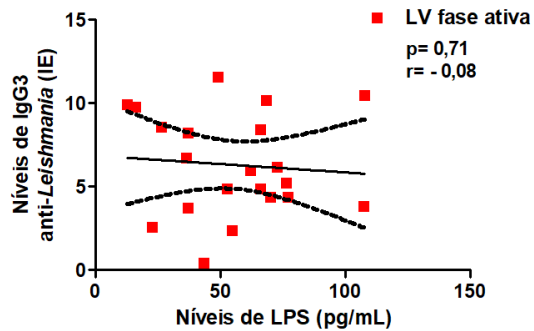


Figura 26: Correlação da concentração de lipopolissacarídeo (LPS) sérico com os resultados de parâmetros hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com leishmaniose visceral não coinfectados com HIV

Considerando que o LPS é um cofator para o aumento das ativações celulares, avaliamos os níveis de LPS, na fase ativa. Neste momento, a média das contagens de leucócitos foi de $2.327/\text{mm}^3$. Observamos que após 1 mês de tratamento, a média das contagens de leucócitos aumentou para $7.080/\text{mm}^3$ e o LPS ainda apresentava-se acima dos níveis dos indivíduos sem LV (Figura 22).

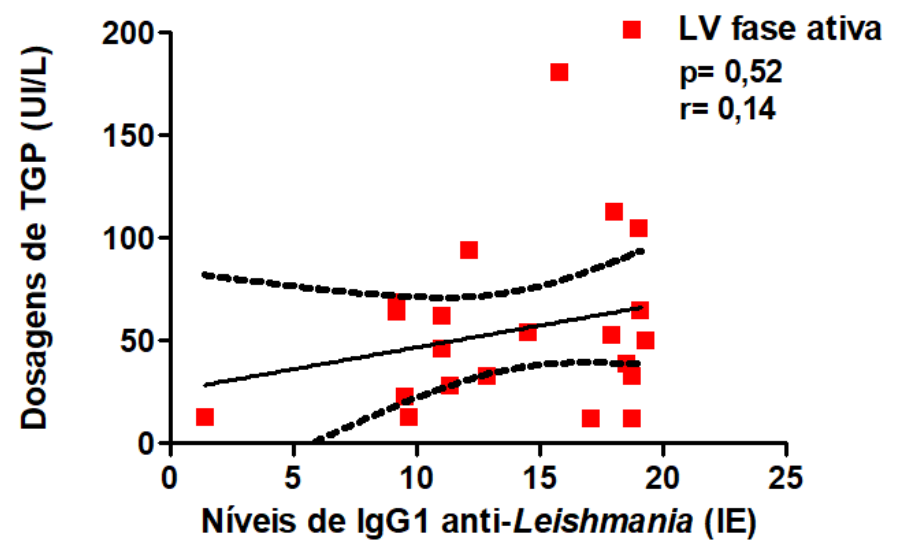
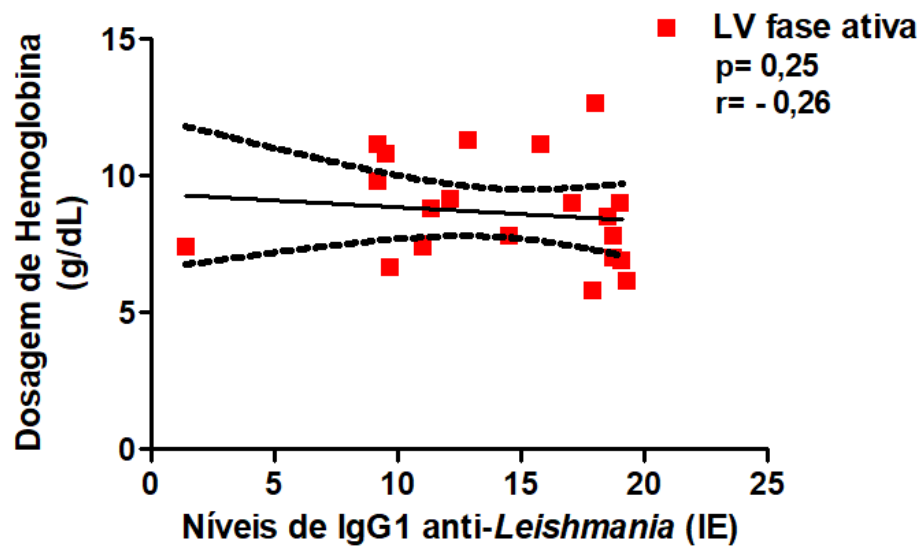
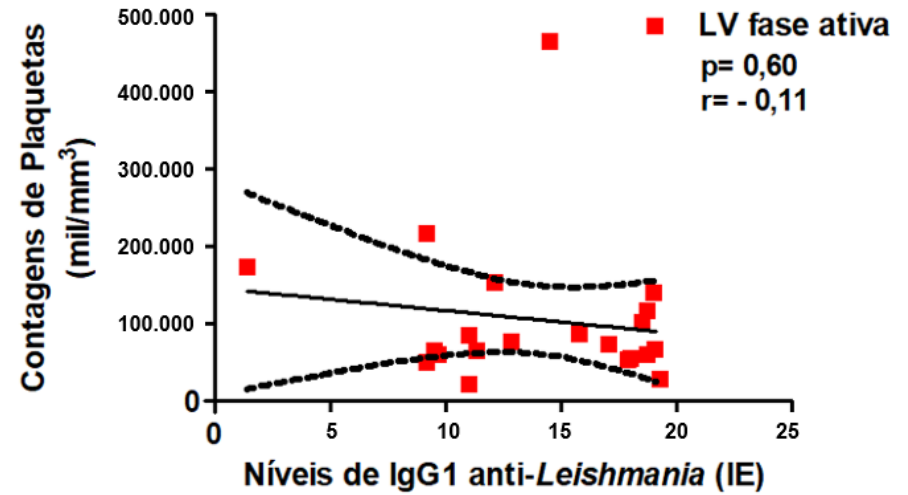
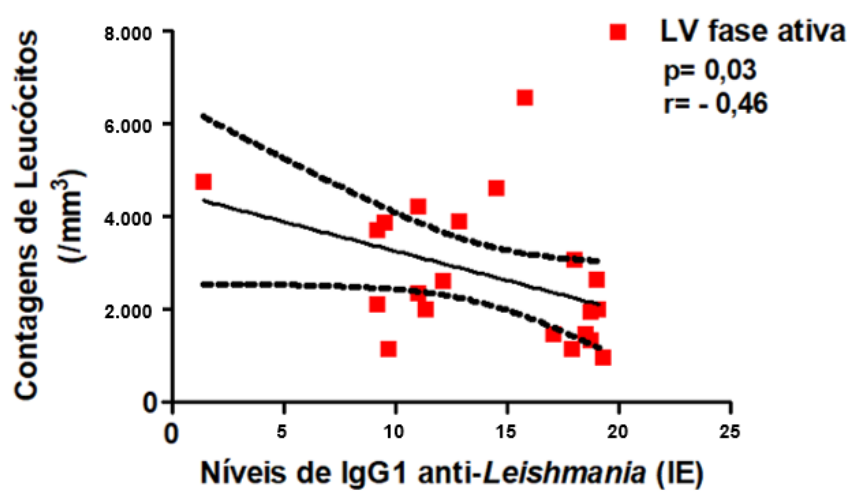
Os dados observados neste estudo corroboram com os achados mais recentes de Santos-Oliveira *et al.*, (2011) que também relatou a presença de níveis elevados de LPS na fase ativa, antes do tratamento, e diminuídos porém persistindo acima dos níveis detectados em indivíduos sem LV, após o tratamento.

5.4.3 Correlação das concentrações séricas de IgG1 com indicadores hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com leishmaniose visceral não coinfectados pelo HIV

Na fase ativa da doença, os níveis de IgG1 ($n= 21$) tiveram correlação negativa com a contagem de leucócitos ($p= 0,03$), não observamos correlações com as demais contagens de plaquetas e dosagens de hemoglobina, TGP e albumina.

5.4.4 Correlação das concentrações séricas de IgG3 com indicadores hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com leishmaniose visceral não coinfetados pelo HIV

Na fase ativa da doença, os níveis de IgG3 (n= 21) não apresentaram correlações com contagens de leucócitos, plaquetas e dosagens de hemoglobina, TGP e albumina.



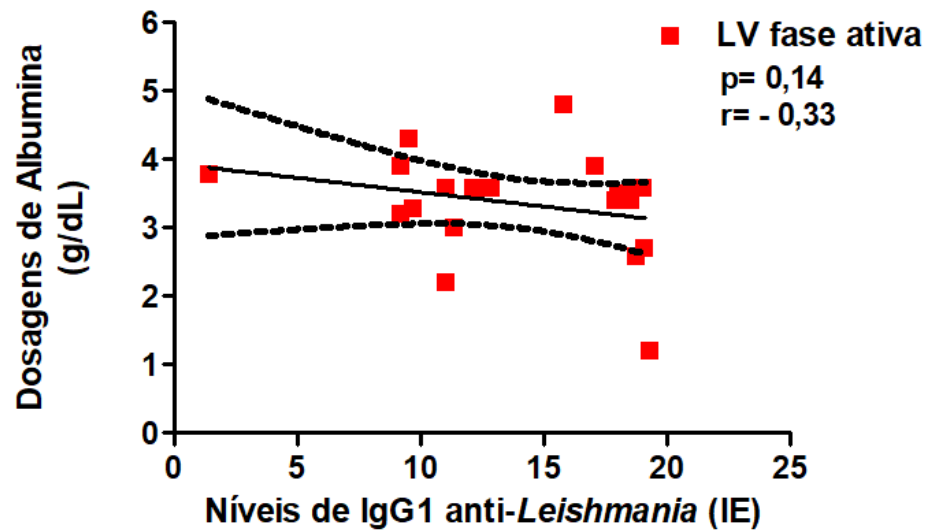
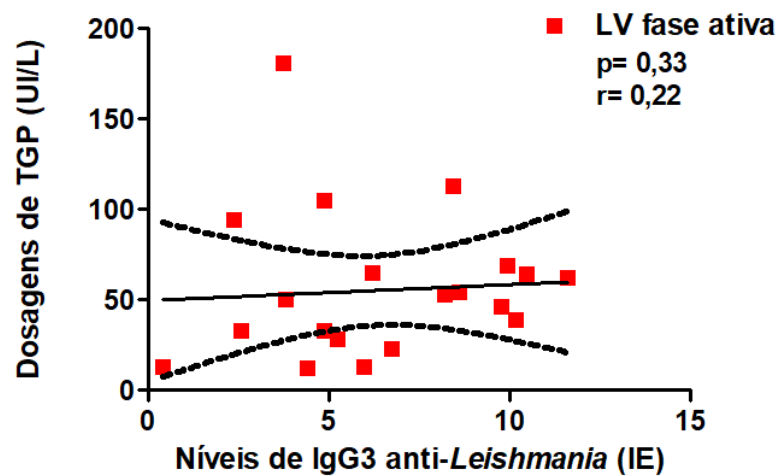
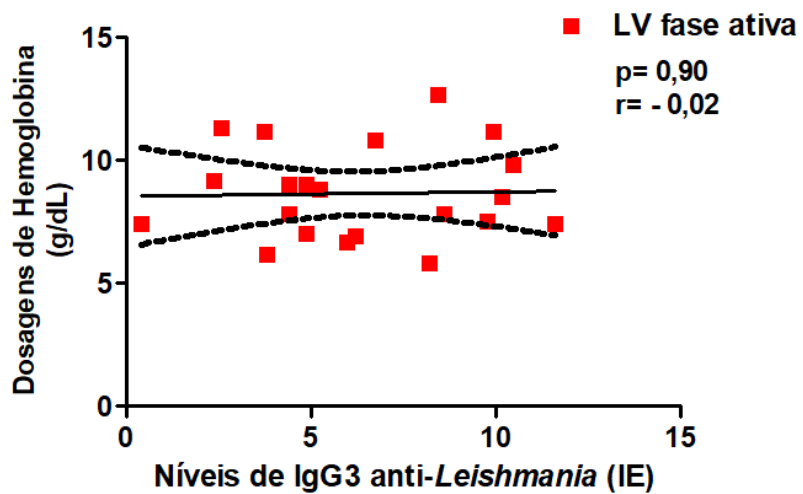
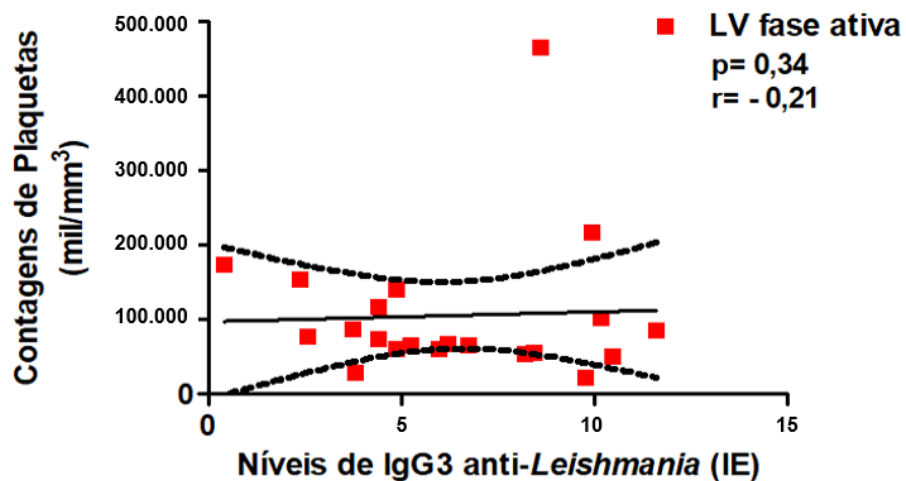
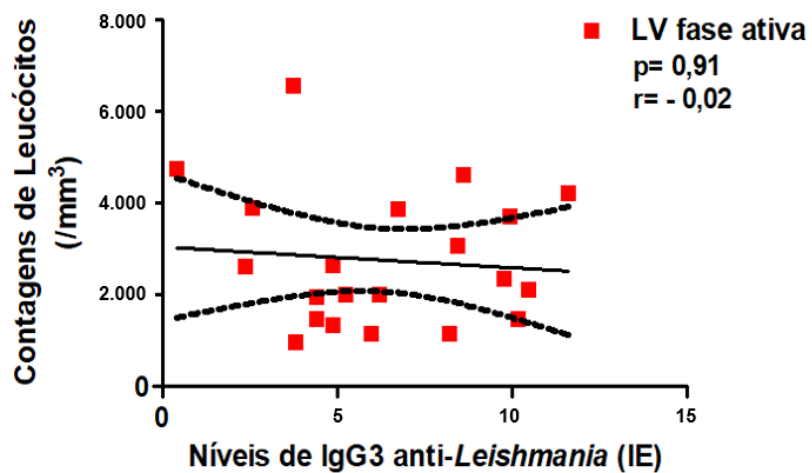


Figura 27: Correlação dos títulos de anti-*Leishmania infantum* G1 (IgG1) com os resultados de parâmetros hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com leishmaniose visceral



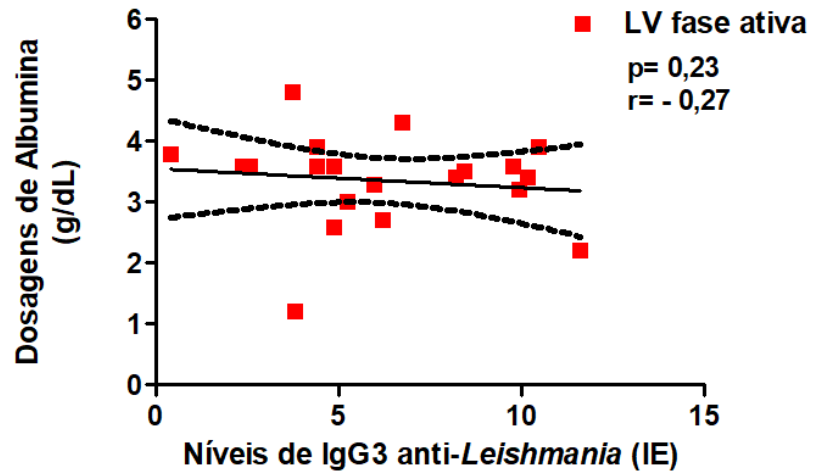


Figura 28: Correlação dos títulos de anti-*Leishmania infantum* G3 (IgG3) com os resultados de parâmetros hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de gravidade em indivíduos com leishmaniose visceral

6. CONCLUSÕES

- A leptina estar significativamente reduzida na fase ativa da LV pode indicar que a desnutrição prévia ou o emagrecimento durante o curso da LV implica na diminuição dos níveis séricos da leptina reduzindo sua possível participação na ativação celular.
- O fato dos níveis de leptina estarem correlacionados à redução do peso, das contagens de leucócitos, diminuição nas dosagens de hemoglobina e albumina, apontam que a mesma está associada com a gravidade da doença potencialmente utilizada como um marcador prognóstico.
- O LPS bem como as interleucinas 6 e 10 estavam aumentados na fase ativa da LV e mostraram uma tendência a queda no pós-tratamento, corroborando a hipótese de que translocação bacteriana ocorre na LV e deve ser um fator adicional a contribuir na ativação celular e consequente intensa resposta proinflamatória.
- A IgG1 e IgG3 estavam aumentadas na fase ativa, sendo que a IgG3 apresentou uma redução significativa logo após o tratamento, podendo ser utilizada como ferramenta para diagnóstico e seguimento até a cura clínica.

7. PERSPECTIVAS

- 1) Identificar qual o mecanismo associado à diminuição dos níveis da leptina e qual o impacto desta redução na evolução clínica, considerando que em torno de 50% dos indivíduos mantiveram níveis comparáveis aos controles.
- 2) Verificar se a tendência de redução de IL-6, IL10 e LPS serão confirmadas em indivíduos com mais tempo de cura pós-tratamento.
- 3) Aprimorar a investigação sobre as consequências da translocação bacteriana na evolução clínica da LV, utilizando abordagens metodológicas mais apuradas como sCD14, IFAB (Proteína intestinal de ligação a ácidos graxos) e detecção de evidências da infecção por bactérias G negativas.
- 4) Investigar se outras proteínas inflamatórias como a procalcitonina, a proteína C reativa e os D-dímeros, também estão comprometidas na LV.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque PL, Silva Junior GB, Freire CC, Oliveira SB, Almeida DM, Silva HF, et al. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceara, Brazil. *Rev Panam Salud Publica*. 2009; 26: 330–333.

Alexander J, Russell D. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv. Parasitol*. 1992; 31: 175–254.

Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J. Cell Sci*. 1999; 3002: 2993–3002.

Alvarenga D, Escalda P, Costa A, Monreal M. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2010; 43: 194–197.

Arnardottir E S, G M, N J, Schwab RJ, Benediktsdottir B, Teff K, Juliusson S, Pack AI, Gislason T. The Role of Obesity, Different Fat Compartments and Sleep Apnea Severity in Circulating Leptin Levels: The Icelandic Sleep Apnea Cohort Study. *Int J Obes*. 2012; 37: 835–842.

Assis TSM, Braga AS da C, Pedras MJ, Barral AMP, Siqueira IC, Costa CHN, et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2008;17: 107–116.

Badaro R, Jones T, Carvalho E, Sampaio D, Reed S, Barral A, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis*. 1986; 154: 1003–1011.

Badaró R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J. Infect. Dis*. 1986; 154: 639–649.

Banco de imagens 123RF. https://br.123rf.com/photo_32520410_as-bact%C3%A9rias.-diferen%C3%A7a-de-bact%C3%A9rias-gram-positivas-a-partir-de-bact%C3%A9rias-gram-negativas..html. Acesso em: 20/03/2017

Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky Y, Ellingsworth LR, Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science*. 1992; 257: 545–548.

Barros MP, De Narjara G, Duarte M. Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários intracelulares: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp*, *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium spp*. *Revista Liberato*. 2012; 13: 1–19.

Brasil 2006. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmaniose Visceral Grave Normas e condutas. Ministério da Saúde, Brasília.

Brasil 2009. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde 2009. Guia de Vigilância em Saúde - Leishmaniose visceral. Ministério da Saúde, Brasília.

Brasil 2010. Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia 2010. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. Rev. Saúde Pública 44(1): 200–202.

Brasil 2011. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade. Ministério da Saúde, Brasília.

Brasil 2014. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde, Brasília.

Brasil 2015a. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015. Ministério da Saúde, Brasília.

Brasil 2015b. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Letalidade de Leishmaniose Visceral. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2015. Ministério da Saúde, Brasília.

Caldas AJ, Costa J, Aquino D, Silva AAM, Barral-Netto M, Barral A. Are there differences in clinical and laboratory parameters between children and adults with American visceral leishmaniasis? Acta tropica. 2006; 97(3), 252-258.

Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, Weyenbergh J van, Brodskyn C, et al. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. BMC Infect. Dis. 2005; 5: 113.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Leishmaniasis. <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/disease.html>. Acesso em 22/11/2016

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Leishmaniasis. <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. Acesso em: 19/06/17.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Leishmaniasis. https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/images/2/leish_amasti_touchprep_mn.jpg. Acesso em: 05/07/17

Cavalcante I, Vale M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral (calazar) no Ceará no período de 2007 a 2011. Rev. Bras. Epidemiol. 2014; 14: 911–924.

Chan J, Fujiwarat T, Brennan P, Mcneilf M, Turco SJ, Sibille J, et al. Microbial glycolipids: Possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989; 86: 2453–2457.

Conceição-Silva F. Leishmanioses do continente americano. Editora Fiocruz. 2014; Rio de Janeiro.

Costa CHN, Werneck GL, Costa DL, Holanda TA, Aguiar GB, Carvalho AS, et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2010; 43: 386–392.

Dayakar A, Chandrasekaran S, Veronica J, Maurya R. Role of leptin in human visceral leishmaniasis? *Med. Hypotheses.* 2011; 77: 416–418.

Dayakar A, Chandrasekaran S, Veronica J, Maurya R. Leptin induces the phagocytosis and protective immune response in *Leishmania donovani* infected THP-1 cell line and human PBMCs. *Exp Parasitol.* 2016; 160: 54–59.

Desjardins BM, Descoteaux A. Inhibition of Phagolysosomal Biogenesis by the Leishmania Lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 1997; 185.

Di Loria A, Squillacioti C, Luca A De, Veneziano V, Mirabella N, Guccione J, Santoro D. Increased leptin mRNA expression in the blood of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. J.* 2014; 202: 634–636.

Dos Santos PL, de Oliveira FA, Santos MLB, Cunha LCS, Lino MTB, de Oliveira MFS, et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2016; 10; 1: 1-16.

Elassad AM, Younis SA, Siddig M, Grayson J, Petersen E, Ghalib HW. The significance of blood levels of IgM, IgA, IgG and IgG subclasses in Sudanese visceral leishmaniasis patients. *Clinical and Experimental Immunology.* 1994; 95(2), 294–299.

Elmahallawy E, Sampedro Martinez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro MJ, Gutierrez Fernandez J. Diagnosis of leishmaniasis. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2014; 8: 961–972.

Fakiola M, Strange A, Cordell HJ, Miller EN, Pirinen M, Su Z, et al. Common variants in the HLA-DRB1-HLA-DQA1 Class II region are associated with susceptibility to visceral leishmaniasis. *Nat. Genet.* 2013; 45: 208–213.

Faleiro RJ, Kumar R, Hafner LM, Engwerda CR. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases.* 2014; 8(7), e2914.

Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J.* 2006; 393: 7–20.

Fukumori NT, Silva OCPG. 2008. Determinação de endotoxina bacteriana (pirogênio) em radiofármacos pelo método de formação de gel. Validação. Dissertação Mestrado; IPEN-CNEN/SP.

Giorgione JR. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93: 11634–11639.

Gomes IT, Carvalho SF, Rocha RD, Peruhype-Magalhães V, Dietze R, Martins-Filho OA, Lemos EM. Anti-*Leishmania chagasi* immunoglobulin G3 detected by flow cytometry for early cure assessment in American visceral leishmaniasis. J Immunol Methods. 2010; 360: 76–83.

Governo do Estado do Ceará. Secretaria da Saúde do Estado do Ceará (SESA/CE) 2016. Boletim Epidemiológico Leishmaniose Visceral.

Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. Trends Parasitol. 2011a; 27: 403–409.

Harhay MO, Olliaro PL, Vaillant M, Chappuis F, Lima MA, Ritmeijer K, Balasegaram M. Who Is a Typical Patient with Visceral Leishmaniasis? Characterizing the Demographic and Nutritional Profile of Patients in Brazil, East Africa, and South Asia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2011b; 84: 543–550.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. Lancet 1999; 354: 1191–1199.

Hughes S, Kelly P. Interactions of malnutrition and immune impairment, with specific reference to immunity against parasites. Parasite Immunol. 2006; 28: 577–588.

Jeronimo SMB, Duggal P, Ettinger N a, Nascimento ET, Monteiro GR, Cabral AP, et al. Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genomewide scan. J. Infect. Dis. 2007; 196: 1261–1269.

La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. Nat. Rev. Immunol. 2004; 4: 371–379.

Leon CG, Tory R, Jia J, Sivak O, Wasan KM. Discovery and development of toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other diseases. Pharm. Res. 2008; 25: 1751–1761.

Levi M, Lowenberg EC. Thrombocytopenia in critically ill patients. Semin. Thromb. Hemost. 2008; 34: 417–424.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit. Care Med. 2003; 31: 1250–1256.

Lima ID, Queiroz JW, Lacerda HG, Queiroz PVS, Pontes NN, Barbosa JDA, Jeronimo SMB. *Leishmania infantum chagasi* in Northeastern Brazil: Asymptomatic Infection at the Urban Perimeter. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2012; 86: 99–107.

Maicá AO, Schweigert ID. Avaliação nutricional em pacientes graves. *Rev. Bras. Ter. Intensiva.* 2008; 20: 286–295.

Mancuso, P. Obesity and lung inflammation. *Journal of Applied Physiology.* 2010; 108(3), 722–728.

Malafaia G. O Sinergismo entre a desnutrição proteíco-calórica e a leishmaniose visceral. *Rev. Saúde. Com.* 2008; 4: 134–147.

Malafaia G. Leishmaniose visceral e desnutrição: uma relação ainda muito negligenciada. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2010; 43: 478–479.

Maltezou HC, Siafas C, Mavrikou M, Spyridis P, Stavrinnadis C, Karpathios T, Kafetzis DA. Visceral leishmaniasis during childhood in southern Greece. *Clin. Infect. Dis.* 2000; 31: 1139–1143.

Martín-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Sánchez-Margalet V. Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. *Cell. Immunol.* 2000; 199: 15–24.

Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Caderno de saúde pública / Minist. da Saúde, Fund. Oswaldo Cruz, Esc. Nac. Saúde Pública* 1994; 10 Suppl 2: 359–375.

Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. Leptin in immunology. *J. Immunol.* 2005; 174: 3137–3142.

Maurya R, Bhattacharya P, Ismail N, Dagur PK, Joshi AB, Razdan K, et al. Differential Role of Leptin as an Immunomodulator in Controlling Visceral Leishmaniasis in Normal and Leptin-Deficient Mice. 2016; 95: 109–119.

McConville MJ, Handman E. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *Int. J. Parasitol.* 2007; 37: 1047–1051.

Medeiros I, Castelo A, Salomão R. Presence of circulating levels of Interferon- γ , Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- α in patients with Visceral Leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 1998; 40: 31–34.

Muessig KE, Cohen MS. Advances in HIV Prevention for Serodiscordant Couples. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2014; 11: 434–446.

Münzberg H, Morrison CD. Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism*. 2015; 64: 13–23.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005; 366: 1561–1577.

Naylor C, Petri Jr WA. Leptin Regulation of Immune Responses. *Trends Mol. Med*. 2016; 22: 88–98.

Oliveira JM de, Fernandes AC, Dorval MEC, Alves TP, Fernandes TD, Oshiro ET. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010; 43(2), 188-193.

Oliveira LS, Neto RVD, Braga PET 2013. Perfil epidemiológico dos casos de Leishmaniose Visceral em Sobral, Ceará no período de 2001 a 2010. *S A N A R E - Rev. Políticas Públicas* 12.

Olivier M, Diniz VA, Isnard A, Hassani K, Shio MT. Leishmania virulence factors: Focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect*. 2012; 14: 1377–1389.

OPAS Organização Panamericana da Saúde. Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas. Washington. 2016.

Ortiz R, Anversa L. Epidemiologia da leishmaniose visceral em Bauru, São Paulo, no período de 2004 a 2012: um estudo descritivo. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2015; 24: 97–104.

Paz LSC, Couto A V. Avaliação nutricional em pacientes críticos: revisão de literatura. *Braspen J*. 2016; 31: 269–277.

Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis*. 1996; 22: 1–13.

Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, A. Silva L De, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, et al. Mixed inflammatory / regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon- g and interleukin- 10 and low frequency of tumour necrosis factor- a + monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infectin. *Clin Exp Immunol*. 2006; 146: 124–132.

Pescarmona, 2010. Receptores de leptina. <http://flipper.diff.org/app/pathways/Leptin>. Acesso em: 22/01/2017.

Pierrakos C, Vincent J. Sepsis biomarkers: a review. *Crit. Care*. 2010; 1–18.

Proudfoot L, Nikolaevt A V, Feng G, Wei X, Ferguson MAJ, Brimacombe JS, Li FYL. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal

activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; 93: 10984–10989.

Queiroz MJ, Alves JGB, Correia JB. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. *J Pediatr*. 2004; 80(2): 141-6.

Rodrigues V, Cordeiro da Silva A, Laforge M, Silvestre R, Estaquier J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasit. Vectors*. 2016; 9: 118–130.

Rodríguez-Gaspar M, Santolaria F, Jarque-López A, González-Reimers E, Milena A, la Vega MJ, et al. Prognostic value of cytokines in SIRS general medical patients. *Cytokine*. 2001; 15(4): 232–236.

Santos-Oliveira JR, Regis EG, Leal CRB, Cunha R V, Bozza PT, Da-Cruz AM. Evidence that lipopolisaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2011; 5: e1198.

Shio MT, Hassani K, Isnard A, Ralph B, Contreras I, Gomez MA, et al. Host Cell Signalling and *Leishmania* Mechanisms of Evasion. *J. Trop. Med*. 2012.

Shivahare R, Ali W, Vishwakarma P, Natu SM, Puri SK, Gupta S. Leptin augments protective immune responses in murine macrophages and enhances potential of miltefosine against experimental visceral leishmaniasis. *Acta Trop*. 2015; 35–41.

Soares RPP, Turco SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. 2003; 75: 301–330.

Sorensen, Anne L., Hey, Adam S., Kharazmi A. *Leishmania major* surface protease Gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand*. 1994; 102: 265–271.

Stebut E Von. Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. 2007; 340–346.

Takala A, Jousela I, Olkkola KT, Jansson SE, Leirisalo-Repo M, Takkunen O, Repo H. Systemic inflammatory response syndrome without systemic inflammation in acutely ill patients admitted to hospital in a medical emergency. *Clin. Sci. (Lond)*. 1999; 96: 287–295.

Tartaglia LA. The Leptin Receptor. *J Biol Chem*. 1997; 272: 6093–6096.

Tuin A, Vlag AH Der, Meijer DKF, Poelstra K, Vlag AH Der, Meijer DKF, Poelstra K. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 290: 377–385.

Valeiro DF, Silva RSU. Diagnóstico da síndrome da resposta inflamatória sistêmica e sepse. *Rev Bras Clin Med*. São Paulo. 2012; 10: 5–10.

Werneck GL, Batista MS a, Gomes JRB, Costa DL, Costa CHN. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Infection*. 2003; 31: 174–177.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis 2015. Nota descritiva nº375. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/> Acesso em: 19/06/17.

WHO. World Health Organization. Number of cases of visceral leishmaniasis reported Data by country 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.NTDLEISHVNUMv> Acesso em: 02/07/17.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994; 372: 425–432.

9. ANEXOS

ANEXO A

HOSPITAL SÃO JOSÉ DE
DOENÇAS INFECCIOSAS - HSJ
/ SECRETARIA DE SAÚDE DE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E FATORES SÓCIO-DEMOGRÁFICOS ASSOCIADOS AO PROGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE

Pesquisador: Anastácio de Queiroz Sousa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35821414.5.0000.5044

Instituição Proponente: Hospital São José de Doenças Infecciosas - HSJ / Secretaria de Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 907.717

Data da Relatoria: 13/11/2014

Apresentação do Projeto:

A Leishmaniose é uma doença crônica grave que envolve todo o sistema reticuloendotelial, podendo cursar desde a forma mais branda até grave. Os sintomas clássicos incluem deficiência nutricional, febre, perda de peso, caquexia, hepatoesplenomegalia e palidez na pele e mucosa. Complicações são comuns no diagnóstico tardio e avança com infecções bacterianas e virais graves do trato respiratório. A não intervenção leva à falência cardíaca, edema e morte por consequência de septicemia ou hemorragia. Assim, vários biomarcadores participam no combate, controle e resposta inflamatória do organismo frente ao protozoário. O estudo a ser desenvolvido em 130 pacientes atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas é do tipo transversal e prospectivo e com abordagem quali-quantitativa. Após consentimento, ocorrerá entrevista e até 4 coletas de sangue nos pacientes com diagnóstico de Leishmaniose visceral.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o potencial de biomarcadores e das condições sócio-demográficas no prognóstico de gravidade na Leishmaniose Visceral.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os possíveis riscos e desconfortos são aqueles relacionados a coleta sanguínea, causado pela ansiedade ou pela necessidade de jejum, podendo ocorrer tonturas, desmaios, além de dor e/ou

Endereço: Rua Nestor Barbosa, 315

Bairro: Parquelândia

CEP: 60.455-610

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3452-7880

Fax: (85)3101-2319

E-mail: melmedeiros@hotmail.com

HOSPITAL SÃO JOSÉ DE
DOENÇAS INFECCIOSAS - HSJ
/ SECRETARIA DE SAÚDE DE



Continuação do Parecer: 907.717

hematoma.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

No curso da doença de Leishmaniose é observado, através de citocinas, mudanças nas respostas inflamatórias e regulatórias. O desfecho pode ser o agravamento do quadro e instalação de infecções levando a quadros sépticos e descontrole da resposta imune. A melhor compreensão da dinâmica desses marcadores de resposta, pode contribuir para maior capacidade na intervenção da infecção, e conseqüentemente, reduzir a letalidade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O referido projeto apresentou todos os termos e compromissos necessários para aprovação e viabilidade ética.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José ANALISOU e NÃO INDICOU PENDÊNCIAS concluindo parecer favorável à realização do projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FORTALEZA, 10 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Melissa Soares Medeiros
(Coordenador)

Endereço: Rua Nestor Barbosa, 315
Bairro: Parquelândia **CEP:** 60.455-610
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3452-7880 **Fax:** (85)3101-2319 **E-mail:** melmedeiros@hotmail.com

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(1ª via do pesquisador, 2ª via do paciente)

TÍTULO DA PESQUISA: AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LEPTINA, LIPOPOLISSACARÍDEO, IMUNOGLOBULINAS 1 E 3 COMO FATORES ASSOCIADOS À GRAVIDADE NA LEISHMANIOSE VISCERAL

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO ADULTO

NOME DO PACIENTE: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: _____

SEXO: M F DATA NASCIMENTO (dd/mm/aaaa) _____

ENDEREÇO: _____, Nº _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____

CEP: _____ TEL: () _____

Nº DO PACIENTE NA PESQUISA: _____

Pesquisador (a) Responsável: _____

Data de preenchimento: (dd/mm/aaaa) _____

Assinatura do pesquisador responsável

INFORMAÇÕES AO VOLUNTÁRIO ADULTO

Você está sendo convidado a participar de um estudo em que os pesquisadores querem avaliar a concentração de algumas moléculas – leptina, lipopolissacarídeo e imunoglobulinas 1 e 3 - presentes no sangue na intenção de avaliar a evolução da sua doença - leishmaniose visceral ("calazar").

Caso decida participar da pesquisa, você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento. Você não receberá nenhum tipo de pagamento, mas também não terá despesas com os exames laboratoriais, pois os exames desta pesquisa serão realizados juntamente com os exames que já serão realizados normalmente durante o seu tratamento, não sendo necessário colher mais sangue para isso.

Se conseguirmos comprovar que estas moléculas aumentam sua concentração nos casos mais graves de leishmaniose visceral, estes exames poderão beneficiar outros pacientes, pois poderemos saber mais cedo quais pacientes seriam mais graves e precisariam de cuidados especiais.

Os resultados dos exames serão mantidos em sigilo e os pesquisadores não identificarão o paciente quando forem expor ou publicar os resultados. Você poderá ser informado dos resultados da pesquisa a qualquer momento, para isto, entre em contato com o pesquisador, Dr. Anastácio Queiroz de Souza, no Hospital São José ou pelo telefone 3101-2352. Você poderá ainda procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José pelos telefones 3101-2322 ou 3101-2368 se quiser esclarecer alguma dúvida sobre a ética da pesquisa ou apresentar reclamações em relação a este estudo.

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 exames laboratoriais que serão acrescentados aos exames laboratoriais realizados durante o tratamento. Eu conversei diretamente com o profissional de saúde envolvido no estudo que respondeu todas as minhas perguntas satisfatoriamente e voluntariamente aceito a participação. Eu autorizo os pesquisadores a utilizarem as anotações médicas a meu respeito para obterem a informação necessária para avaliar a evolução da leishmaniose visceral ("calazar"). 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.

Localidade: _____ Data: _____

Assinatura do participante voluntário

Caso o paciente não seja alfabetizado, uma testemunha independente, se possível identificada pelo paciente, e que não seja o pai/mãe ou representante legal, deve estar presente durante todo o processo de obtenção do termo de assentimento. De qualquer forma, o voluntário participante deve fornecer sua digital no campo de assinatura abaixo.

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha

Nome do profissional responsável pelo TCLE: _____

Assinatura do pesquisador responsável

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA PAIS OU RESPONSÁVEIS DE PACIENTES MENORES DE 18 ANOS)

(1ª via do pesquisador, 2ª via do paciente)

TÍTULO DA PESQUISA: AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LEPTINA, LIPOPOLISSACARÍDEO, IMUNOGLOBULINAS 1 E 3 COMO FATORES ASSOCIADOS À GRAVIDADE NA LEISHMANIOSE VISCERAL

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO E DO RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: _____

SEXO: M F DATA NASCIMENTO (dd/mm/aaaa) _____

ENDEREÇO: _____ .Nº _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____

CEP: _____ TEL: () _____

2. PAIS OU RESPONSÁVEL LEGAL _____

GRAU DE PARENTESCO _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: _____

SEXO: M F DATA NASCIMENTO (dd/mm/aaaa) _____

ENDEREÇO: _____ Nº _____

BAIRRO: _____ CIDADE _____

CEP _____ TEL: () _____

Nº DO PACIENTE NA PESQUISA: _____

Pesquisador(a) Responsável: _____

Data de preenchimento: (dd/mm/aaaa) _____

Assinatura do pesquisador responsável

INFORMAÇÕES PARA OS PAIS OU AO RESPONSÁVEL LEGAL DO VOLUNTÁRIO MENOR DE 18 ANOS

Você está sendo convidado a participar de um estudo em que os pesquisadores querem avaliar a concentração de algumas moléculas – leptina, lipopolissacarídeo e imunoglobulinas 1 e 3 - presentes no sangue na intenção de avaliar a evolução da sua doença - leishmaniose visceral (“calazar”).

Caso decida participar da pesquisa, você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento. Você não receberá nenhum tipo de pagamento, mas também não terá despesas com os exames laboratoriais, pois os exames desta pesquisa serão realizados juntamente com os exames que já serão realizados normalmente durante o seu tratamento, não sendo necessário colher mais sangue para isso.

Se conseguirmos comprovar que estas moléculas aumentam sua concentração nos casos mais graves de leishmaniose visceral, estes exames poderão beneficiar outros pacientes, pois poderemos saber mais cedo quais pacientes seriam mais graves e precisariam de cuidados especiais.

Os resultados dos exames serão mantidos em sigilo e os pesquisadores não identificarão o paciente quando forem expor ou publicar os resultados. Você poderá ser informado dos resultados da pesquisa a qualquer momento; para isto, entre em contato com o pesquisador, Dr. Anastácio Queiroz de Souza, no Hospital São José ou pelo telefone 3101-2352. Você poderá ainda procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José pelos telefones 3101-2322 ou 3101-2368 se quiser esclarecer alguma dúvida sobre a ética da pesquisa ou apresentar reclamações em relação a este estudo.

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 exames laboratoriais que serão acrescentados aos exames laboratoriais realizados durante o tratamento. Eu conversei diretamente com profissional de saúde envolvido no estudo que respondeu todas as minhas perguntas satisfatoriamente e voluntariamente autorizo o meu filho(a)/menor sob minha responsabilidade _____ a participar da pesquisa. Eu autorizo os pesquisadores a utilizarem as anotações médicas do meu filho(a)/menor sob minha responsabilidade para obterem a informação necessária para avaliar a evolução da leishmaniose visceral (“calazar”). 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.

Localidade: _____ Data: _____

Assinatura do participante voluntário

Caso o paciente não seja alfabetizado, assim como, o pai/mãe ou representante legal, uma testemunha independente, se possível identificada pelo paciente deve estar presente durante todo o processo de obtenção do termo de assentimento. De qualquer forma, o voluntário participante deve fornecer sua digital no campo de assinatura abaixo.

Nome da testemunha: _____

Assinatura do pai/mãe ou responsável legal

Nome do profissional responsável pelo TCLE: _____

Assinatura do pesquisador responsável

ANEXO C

FICHA DE COLETA DE DADOS EM PRONTUÁRIO HOSPITALAR

ID: _____ Nº DO PRONTUÁRIO: _____ IDADE: _____

Exames Laboratoriais	Fase ativa	1mpt	Valores de referência
	/ /	/ /	
Leucócitos			4,0 - 10,0 10 ³ µL
Neutrófilos			1,6 - 7,5 10 ³ µL
Linfócitos			0,8 - 4,50 10 ³ µL
Monócitos			0,08 - 1,0 10 ³ µL
Eosinófilos			0,04 - 0,6 10 ³ µL
Basófilos			0,0 - 0,09 10 ³ µL
Hemácias			3,9 - 6,5 milhões
Hemoglobina			11,4 - 18,0 g/dL
Plaquetas			150 - 400 10 ³ µL
Uréia			10,0 - 50,0 mg/dL
Creatinina			0,5 - 1,4 mg/dL
TGO/AST			0,0 - 32,0 U/L
TGP/ALT			0,0 - 31,0 U/L
Bilirrubina total			0,0 - 1,0 mg/dL
Bilirrubina direta			0,0 - 0,5 mg/dL
Bilirrubina indireta			0,0 - 1,0 mg/dL
Proteínas totais			6,1 - 7,9 g/dL
Albumina			3,5 - 4,8 g/dL
Globulina			2,5 - 3,3 mg/dL
K-39			
Aspirado de medula			

Avaliação fase ativa

Peso: _____ Altura: _____ Temperatura: _____ PA: _____ FC: _____

Manifestação hemorrágica: _____

Coinfecção bacteriana: _____

R-X de tórax (imagem sugestiva de infecção ou edema pulmonar): _____

Avaliação 1 mês após tratamento (1mpt):

Peso: _____ Altura: _____ Temperatura: _____ PA: _____ FC: _____

Manifestação hemorrágica: _____

Coinfecção bacteriana: _____

R-X de tórax (imagem sugestiva de infecção ou edema pulmonar): _____

ANEXO D

QUESTIONÁRIO SÓCIO-ECONÔMICO

Nº DO PACIENTE: _____ DATA DA ENTREVISTA: ____ / ____ / ____

Quando surgiram os sintomas da Calazar? _____

Quais foram os sintomas:

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Febre irregular, prolongada | <input type="checkbox"/> Diarreia |
| <input type="checkbox"/> Fraqueza | <input type="checkbox"/> Sangramento |
| <input type="checkbox"/> Perda de apetite | <input type="checkbox"/> Palidez |
| <input type="checkbox"/> Emagrecimento, quantos quilos?
_____ | <input type="checkbox"/> Aumento do volume abdominal (baço, fígado) |
| | <input type="checkbox"/> Outros _____ |

O que é Calazar?

Diga quatro palavras que vêm à sua cabeça quando você ouve falar em Calazar:

Sobre você

1. Qual a sua idade?

- (A) Menos de 18 anos
- (B) 18 anos
- (C) Entre 19 e 25 anos
- (D) Entre 26 e 33 anos
- (E) Entre 34 e 41 anos
- (F) Entre 42 e 49 anos
- (G) 50 anos ou mais

2. Como você se considera:

- (A) Branco(a)
- (B) Pardo(a)
- (C) Preto(a)
- (D) Amarelo(a)
- (E) Indígena

3. Qual seu estado civil?

- (A) Solteiro(a)
- (B) Casado(a) / mora com um(a) companheiro(a)
- (C) Separado(a) / divorciado(a) / desquitado(a)
- (D) Viúvo(a)

11. Qual é o nível de escolaridade do seu pai?

- (A) Da 1ª à 4ª série do Ensino Fundamental (antigo primário)
- (B) Da 5ª à 8ª série do Ensino Fundamental (antigo ginásio)
- (C) Ensino Médio (antigo 2º grau)
- (D) Ensino Superior
- (E) Especialização
- (F) Não estudou
- (G) Não sei

12. Qual é o nível de escolaridade da sua mãe?

- (A) Da 1ª à 4ª série do Ensino Fundamental (antigo primário)
- (B) Da 5ª à 8ª série do Ensino Fundamental (antigo ginásio)
- (C) Ensino Médio (antigo 2º grau)
- (D) Ensino Superior
- (E) Especialização
- (F) Não estudou
- (G) Não sei

4. Sua casa está localizada em?

- (A) Zona rural
- (B) Zona urbana
- (C) Comunidade indígena

5. Qual o tipo do domicílio:

- (A) Casa
- (B) Apartamento
- (C) Cômodo
- (D) Outros _____

6. Este domicílio é:

- (A) Próprio com título
- (B) Próprio em aquisição
- (C) Alugado
- (D) Cedido
- (E) Invasão
- (F) Outra condição _____

7. Qual o material predominante na construção?

- (A) Alvenaria
- (B) Madeira
- (C) Tijolo sem revestimento
- (D) Outros _____

8. Quantas pessoas moram com você? (incluindo filhos, irmãos, parentes e amigos)

- (A) Moro sozinho
- (B) Uma a três
- (C) Quatro a sete
- (D) Oito a dez
- (E) Mais de dez

9. Onde e como você mora atualmente?

- (A) Em casa ou apartamento, com minha família
- (B) Em casa ou apartamento, sozinho(a)
- (C) Em quarto ou cômodo alugado, sozinho(a)
- (D) Em habitação coletiva: hotel, hospedaria, quartel, pensionato, república etc
- (E) Outra situação _____

10. Qual o seu grau de instrução?

- (A) Da 1ª à 4ª série do Ensino Fundamental (antigo primário)
- (B) Da 5ª à 8ª série do Ensino Fundamental (antigo ginásio)
- (C) Ensino Médio (antigo 2º grau)
- (D) Ensino Superior
- (E) Especialização
- (F) Não estudou

13. Atualmente você:

- (A) Apenas estuda
- (B) Trabalha e estuda
- (C) Apenas trabalha
- (D) Está desempregado (a)
- (E) Está de licença ou incapacitado de estudar / trabalhar
- (F) Está aposentado (a)
- (G) Não trabalha nem estuda

14. Se trabalha, qual é o seu trabalho ou ocupação principal?

- (A) Empregado doméstico mensalista ou diarista
- (B) Empregado que ganha por produção (comissão)
- (C) Estagiário remunerado
- (D) Bolsista
- (E) Trabalha por conta própria, é autônomo
- (F) É dono de negócio, empregador
- (G) Trabalha em negócio familiar sem remuneração
- (H) Presta serviço militar obrigatório, assistencial ou religioso com alguma remuneração

15. Quantas pessoas contribuem para a obtenção desta renda familiar?

- (A) 1 uma
- (B) 2 duas
- (C) 3 três
- (D) 4 quatro
- (E) 5 cinco
- (F) Mais de cinco

16. Somando a sua renda com a renda das pessoas que moram com você, quanto é, aproximadamente, a renda familiar?

- (A) Até 1 salário mínimo
- (B) De 1 a 2 salários mínimos
- (C) De 2 a 5 salários mínimos
- (D) De 5 a 10 salários mínimos
- (E) Mais de 10 salários mínimos

17. Quantas pessoas são sustentadas com a renda familiar?

- (A) Uma
- (B) Duas
- (C) Três
- (D) Quatro
- (E) Cinco
- (F) Mais de cinco

18. Qual das atividades abaixo ocupa a maior parte do seu tempo livre?

- (A) TV
 - (B) Religião
 - (C) Teatro
 - (D) Cinema
 - (E) Música
 - (F) Bares e Boates
 - (G) Leitura
 - (H) Internet
 - (I) Esportes
 - (J) Outra
-