



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS  
DE ZINCO E RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE HUMANA**

**GISÉLIA DOS SANTOS SANTANA**

**Salvador - Bahia - Brasil  
2004**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS  
DE ZINCO E RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE HUMANA**

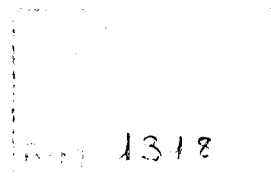
**GISÉLIA DOS SANTOS SANTANA**

**Orientador: Johan Van Weyenbergh**

Dissertação apresentada para  
obtenção de grau de Mestre em  
Patologia, área de concentração  
em Patologia Experimental

Salvador-Bahia

2004



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM /FIOCRUZ  
Salvador - Bahia.

Santana, Gisélia dos Santos

S232e Estudo da associação entre os níveis plasmáticos de zinco e a resposta imune na Leishmaniose humana [manuscrito]. / Gisélia dos Santos Santana. - 2004.  
26 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina.  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2004.

Orientador: Prof. Dr. Johan Van Weyenbergh. Laboratório de Imuno Regulação e Microbiologia.

1. Leishmaniose. 2. Zinco. 3. Cobre. 4. Imunidade Celular. 5. Imunidade humoral. I. Título.

CDU

616.993.161:661.847.532

ME  
1994

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ZINCO E RESPOSTA  
IMUNE NA LEISHMANIOSE HUMANA.

**GISÉLIA DOS SANTOS SANTANA**


FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dr. Roque Pacheco de Almeida  
Professor Adjunto  
FAMED - UFBA



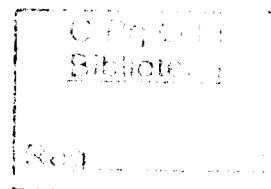
---

Dr. Mitermayer Galvão dos Reis  
Pesquisador Titular  
CPqGM - FIOCRUZ



---

Dr. Johan Van Weyenbergh  
Pesquisador Associado  
CPqGM - FIOCRUZ



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, razão de minha existência

À minha mãe, pelo seu amor, carinho, apoio e por tudo que me ensinou

A Johan, pela sua orientação, disponibilidade e incentivo

Ao Dr. Manoel Barral-Netto, por ter me concedido a oportunidade de iniciar minha trajetória na pesquisa, junto aos pesquisadores do LIM1

Aos membros da banca, Prof. Roque Pacheco Almeida, Prof. Mitermayer Galvão dos Reis e Prof. Jackson Costa, pela contribuição na versão final da dissertação

À Prof. Maria das Graças Korner e ao Prof. Aníbal Freitas Santos Jr. do Instituto de Química/UFBA pela realização das dosagens dos metais

À equipe clínica: Dra. Aldina Barral, Dr. Argemiro d'Oliveira Jr., Dr. Edgar Marcelino Carvalho, Dra. Arlene Caldas, Dr. Jackson Costa e Dr. Carlos Henrique Costa

Aos pacientes e voluntários que participaram deste estudo

Aos amigos do laboratório ( LIM1 e LIP), pelo incentivo constante e solidariedade

Aos colegas do mestrado, pelos momentos agradáveis de aprendizado e amizade

A Jorge Tolentino, Silvia, Cláudio, Cecília, Dirceu , Sebastião, João Paulo, Vera, José Carlos e Maria Lizete pela colaboração no desenvolvimento do trabalho

A Aline, Cristiano, Daniele, Adriana, George, Gilvaneia, Lourdes, Maria da Purificação e Ricardo pelo trabalho em equipe

À Theolis, pela convivência e incentivo

À minha amiga Amanda Alexandra Guimarães Costa

Aos meus queridos professores do Instituto de Biologia/UFBA, pela importante contribuição na minha formação acadêmica

A Rosália Meire e Rosecarla, pelo carinho e atenção constante

Ao curso de Pós-graduação e aos professores, pela dedicação

Às bibliotecárias Ana Maria Fiscina e Adelvane, pela ajuda na obtenção e organização das referências bibliográficas

Aos setores de comunicação visual e informática, pelo apoio na elaboração dos recursos visuais necessários para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, pela disponibilidade de espaço físico, pessoal e recursos que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao PIBIC/UFBA pelo incentivo na Iniciação científica

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

# SUMÁRIO

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1. Considerações gerais</b>	<b>1</b>
<b>2. Desnutrição e doenças carenciais</b>	<b>6</b>
<b>3. Interação resposta imune e nutrição</b>	<b>8</b>
<b>HIPÓTESE</b>	<b>10</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>12</b>
<b>MANUSCRITO</b>	
<b>DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS</b>	<b>13</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>16</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>17</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>23</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LM	Leishmaniose Mucosa
LV	Leishmaniose Visceral
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
Th	Células T auxiliar
IFN- $\gamma$	Interferon Gama
IL	Interleucina
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
NK	Natural Killer
Cu	Cobre
Zn	Zinco
OMS	Organização Mundial de Saúde



## RESUMO

---

### ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ZINCO E RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE HUMANA. GISÉLIA DOS SANTOS SANTANA.

A leishmaniose mucosa, cutânea localizada, e visceral, são caracterizadas por apresentar uma resposta imune celular exacerbada, intermediária e ineficiente, respectivamente. Foi investigado os níveis de cobre e zinco em diferentes formas clínicas da leishmaniose e a correlação da resposta imune humoral e/ou celular contra o parasita. Foi coletado sangue de 32 pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL), mucosa (LM) ou visceral (LV), bem como de 25 controles urbanos e de área endêmica. Os níveis plasmáticos de Cu e Zn foram quantificados por espectrofotometria de absorção atômica. A resposta imune celular e humoral anti-*Leishmania* foram avaliadas por quantificação de IgG plasmática específica, linfoproliferação e produção de citocinas, respectivamente. Uma diminuição significativa de Zn no plasma foi observada em todos os três grupos de pacientes, quando comparados com controles, mas apenas nos pacientes com LV (7/10) e LM (1/7) foi observada uma deficiência aguda de Zn. Os níveis plasmáticos de Cu estavam aumentado nos pacientes com LCL e LV, mas não em LM, e correlacionaram-se significativamente com IgG anti-*Leishmania*. A razão Cu/Zn foi elevada em pacientes com deficiência na resposta imune celular ( $LV << LCL < LM$ ) e exacerbada resposta imune humoral ( $LV > LCL > ML$ ). A possível associação de deficiência de Zn com dados clínicos foi avaliada em estudo prospectivo de 12 pacientes com LV, nos quais os níveis de Zn eram preditivos para a evolução do tamanho de baço. Concluímos que deficiência de Zn em LV e LM indica a possibilidade da administração terapêutica de Zn nessas formas severas da leishmaniose, e que o aumento da razão Cu/Zn pode ser um marcador da disfunção imune na leishmaniose.

Palavras-chave: leishmaniose, zinco, cobre, imunidade celular, imunidade humoral

## ABSTRACT

---

### STUDY OF THE ASSOCIATION BETWEEN PLASMA ZINC LEVELS AND IMMUNE RESPONSE IN HUMAN LEISHMANIASIS. GISÉLIA DOS SANTOS SANTANA.

Mucosal (ML), localized cutaneous (LCL) and visceral leishmaniasis (VL) are characterized by exacerbated, intermediate and inefficient cellular immune response, respectively. We investigated if zinc and copper levels differ in distinct clinical forms of leishmaniasis, and if they correlate to humoral and/or cellular immune response towards the parasite. Blood was collected from 32 patients with either localized cutaneous (LCL), mucosal (ML) or visceral (VL) leishmaniasis, as well as from 25 controls from endemic and non-endemic areas. Plasma levels of Cu and Zn were quantified by atomic absorption spectrophotometry. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune response were evaluated by quantifying specific plasma IgG, lymphoproliferation and cytokine production, respectively. A significant decrease in plasma Zn was observed in all three patient groups, as compared to controls, but only VL (7/10) and ML (1/7) patients displayed overt Zn deficiency. Plasma Cu was increased in LCL and VL but not in ML, and was strongly correlated to anti-*Leishmania* IgG. Cu/Zn ratios were highest in patients with deficient cellular (VL<<LCL<ML) and exacerbated humoral (VL>LCL>ML) immune response. A possible association between Zn deficiency and clinical findings was investigated in a prospective study of 12 VL patients, for whom Zn levels were found to be predictive for spleen size evolution. In conclusion, Zn deficiency in VL and ML indicate possible therapeutic administration of Zn in these severe forms of leishmaniasis and increased Cu/Zn ratio can be a useful marker for immune dysfunction in leishmaniasis.

Key Words: leishmaniasis, zinc, copper, cellular immunity, humoral immunity

# INTRODUÇÃO

## 1. Fundamentação Teórica

Denominam-se leishmanioses ao conjunto de síndromes clínicas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas pela picada de inseto do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomya* (Novo Mundo) (PEARSON *et al.*, 1983). Encontram-se entre as seis doenças responsáveis pelas grandes endemias no mundo, ocupando o segundo lugar em importância médica entre as doenças causadas por protozoários (OMS, 1990). Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram em todo o mundo, um total de 350 milhões de indivíduos expostos ao risco de contrair a infecção por *Leishmania*, com incidência anual de 12 milhões de casos (WHO, 1990; ABRAMSON, *et al.* 1995).

Características epidemiológicas distinguem dois padrões da doença no Brasil:

- 1) surtos epidêmicos associados à derrubada de matas, com a finalidade de construção de estradas e instalação de novos povoados e a exploração desordenada da floresta para a extração de madeira, utilização do solo na agricultura, pecuária, entre outras, caracterizando a doença como uma zoonose de animais silvestres como o gambá e o rato do mato, podendo atingir o homem quando esse mantiver contato com os focos zoonóticos;
- 2) leishmaniose em regiões de colonização antiga, está relacionada ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados semiurbanizados na periferia de centros urbanos, não associados à derrubada das matas. Neste padrão outros animais estão envolvidos na transmissão da doença, servindo como reservatórios: cães, eqüinos e roedores. (MS-FNS, 1998 & 2000).

As leishmanioses podem ocorrer na forma tegumentar (LT) ou visceral (LV). A tegumentar caracteriza-se por apresentar diferentes manifestações clínicas como a leishmaniose cutânea (LC), que apresenta lesões que regridem espontaneamente ou respondem bem ao tratamento; a leishmaniose mucosa (LM), resultante da disseminação do parasita de lesões primárias para regiões de mucosa e a leishmaniose cutânea difusa (LCD), que produz lesões disseminadas que não regridem espontaneamente e são refratárias ao tratamento. A forma visceral é uma manifestação sistêmica da doença, que envolve progressão difusa do parasita direto para baço, fígado e medula óssea. É também conhecida por calazar, apresenta maior mortalidade em indivíduos sem tratamento (BITTENCOURT e BARRAL-NETTO, 1995).

No Brasil, a distribuição geográfica da LT é ampla e apenas o estado do Rio Grande do Sul não é atingido. A região Norte representou 36,5%, a Nordeste 38,9%, Centro-Oeste 15,1%, Sudeste 7,3% e a região Sul 2,2% dos casos de LT notificados em 1995. Além da melhoria do fluxo de informação que aumentou a notificação dos casos de LT, houve expansão tanto em número de casos quanto de áreas geográficas. Entre os anos de 1985-1999, foram notificados no país 388.155 casos autóctones de LT, sendo o Norte a região com o maior coeficiente de detecção (CD). (FNS-MS, 1998 & FNS-MS, 2000). Entre 1985-2002, foram notificados 34.884 casos de LV. Os estados mais afetados foram Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí (FNS-MS, 2002).

As leishmanias envolvidas na transmissão da LT no Brasil são: *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guayanensis*, *Leishmania braziliensis*, cujos principais vetores são espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomya*. A *Leishmania amazonensis*, tem como seus principais vetores os *Lutzomya flaviscuetellata*, *Lutzomya reducta* e *Lutzomya olmeca*, encontrados principalmente

nos estados do Amazonas e Rondônia, podendo ocorrer ainda em outras regiões do país, porém, com baixa frequência. A *L. amazonensis* é responsável pela forma LCL, podendo alguns indivíduos desenvolverem a forma LCD, (VEXENAT *et al.*, 1986; FNS-MA, 1991; 2000; BARRAL *et al.*, 1991; COSTA *et al.*, 1998). A *L. guayanensis* apresenta como seus principais vetores *Lutzomyia anduzei*, *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia umbratilis*, sua ocorrência foi relatada no norte da Bacia Amazônica nos estados do Amapá, Roraima e Pará. Indivíduos, quando infectados por essa espécie desenvolvem lesões únicas ou múltiplas (LAINSON *et al.*, 1981; FNS-MS, 2000). A *L. braziliensis*, encontra-se amplamente distribuída do sul do Pará ao Nordeste brasileiro, atingindo também o centro sul do país e algumas áreas da Amazônia Oriental, seus principais vetores são *Lutzomyia. intermédia*, *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia whitmani*. Indivíduos quando infectados por essa espécie de *Leishmania*, desenvolvem a LCL, cuja principal complicação é a evolução para LM (VEXANET *et al.*, 1986; SILVEIRA, *et al.*, 1991; PASSOS *et al.*, 1993; QUEIROZ *et al.*, 1994; FNS-MS, 2000).

Na LV, as leishmanias envolvidas são: *L. chagasi*, *L. infantum* e *L. donovani*, sendo no Brasil a *L. chagasi* responsável pela doença, a qual apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados em função da sua ampla distribuição geográfica, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, sendo o Nordeste responsável por 90% dos casos em nosso país durante a década de 90, principalmente nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. (MS-FNS, 1998 & 2000).

Em relação ao ciclo de transmissão da LV, observa-se que os reservatórios silvestres da *L. chagasi* são as raposas (*Cercopithecus thous* e *Dusycion vetulus*) e marsupiais (*Didelphis sp*), e no ambiente doméstico o cão (*Canis familiares*). O *Lutzomyia longipalpis* é a espécie mais conhecida

como transmissora da *L.chagasi*, tendo sido recentemente incriminado o *Lutzomya.cruzi* como vetor no estado de Mato Grosso do Sul (LAINSON & SHAW, 1987; MS. 2003).

As manifestações clínicas da LV podem ser agrupadas em três formas:

1 - assintomática caracteriza-se por positividade no exame sorológico para *Leishmania*, sem nenhuma manifestação clínica;

2 – oligossintomática, encontrada na área endêmica, apresenta exame sorológico positivo e presença de sinais e sintomas discretos, como febre, hepatomegalia e/ ou esplenomegalia de pequeno grau;

3 – clinicamente manifesta (aguda/clássica), caracteriza-se por hepatoesplenomegalia volumosa, febre, pancitopenia, comprometimento do estado geral. A desnutrição está presente, com acentuada hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia (SILVA, 1957; BADARÓ *et al.*, 1986). A preferência por crianças menores de cinco anos de idade, é a principal característica da forma neo-tropical da LV e se relaciona, provavelmente, com o comprometimento da resposta imune, própria dos estados de desnutrição que geralmente acometem as crianças dessa faixa etária em algumas regiões dos continentes americano, africano e asiático, funcionando como um fator predisponente para a doença (CAMPOS Jr., 1995; SILVA, *et al.*, 1997).

A *Leishmania* apresenta duas formas distintas em seu ciclo de vida, a promastigota e amastigota. A promastigota é afilada, móvel, apresenta flagelo e através da picada do inseto vetor é transmitida ao hospedeiro vertebrado. Na pele do hospedeiro vertebrado, promastigotas são internalizados por fagócitos mononucleares, perdem (internalizam) o flagelo e diferenciam-se em amastigotas. As amastigotas apresentam uma forma arredondada, móvel e com flagelo interno. A progressão da infecção ocorre quando há ruptura de macrófagos, resultando na liberação de

amastigotas no meio extracelular e infecção subsequente de células adjacentes. O ciclo de vida da *Leishmania* continua quando um outro inseto se alimenta do sangue de um hospedeiro infectado e ingere macrófagos da pele contendo amastigotas. No intestino do inseto, as amastigotas são liberadas de macrófagos infectados e diferenciam-se em promastigotas, aproximadamente 12-18 horas após ingestão. A seqüência de acontecimentos, a partir do momento da picada do inseto vetor até o aparecimento de sinais e sintomas da doença, depende da espécie de *Leishmania* envolvida e de fatores intrínsecos do hospedeiro, incluindo, características genéticas e resposta imunológica. A expressão clínica da doença resulta, da interação do parasita com o hospedeiro vertebrado nas várias fases da infecção (LAINSON *et al.*, 1987; BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995).

O conhecimento da imunidade nas leishmanioses tem sido facilitado pelo uso de linhagens de camundongos que são susceptíveis à espécie *L. major*. Embora tanto camundongos C57BL/6 quanto BALB/C sejam susceptíveis à infecção por *L. major*, camundongos C57BL/6 são usados como modelo experimental de linhagens resistentes pelo fato de resolverem a infecção resultando na cura, enquanto camundongos BALB/C falham no controle local da replicação do parasita, levando a progressão da doença e morte desses animais. Esses modelos foram importantes para a definição dos dois tipos de resposta imune, onde sub-populações diferentes Th1 e Th2 participam dessa resposta imune levando a cura ou à progressão da doença (SCOTT *et al.*, 1989; HEINZEL *et al.*, 1989). Nessa dicotomia, vê-se que a susceptibilidade de camundongos BALB/C é dependente da produção de IL-4 no início da infecção, enquanto, o controle da infecção e resistência à re-infecção observada em camundongos C57BL/6 é dependente de IFN- $\gamma$ . Logo dois perfis distintos de células T CD4+ foram identificados. Uma sub-população que apresenta fenótipo Th1 que

produz IL-2, TNF- $\alpha$  e principalmente IFN- $\gamma$  e outra sub-população com fenótipo Th2 que produz citocinas como IL-5, IL-10 e principalmente IL-4 que conferem o fenótipo de susceptibilidade e progressão da doença. Alguns estudos demonstraram que células Th1 são requeridas para ativar imunidade dependente de fagocitose, consistentes com dados vistos na leishmaniose, uma infecção intracelular de macrófagos. Em contraste, células Th2 são requeridas por ativar imunidade independente de fagocitose, sendo seu papel ainda implicado em doenças alérgicas e infecções helmínticas. (FREDERICK *et al.*, 1989; LOCKSLEY *et al.*, 1999).

Além da infecção por parasitas intracelulares, outro fator bem estudado de falha na resposta imune é o estado nutricional. Alguns estudos têm demonstrado que a condição nutricional é um determinante crítico da resposta imune, e a desnutrição mostra-se como uma das causas de imunodeficiência por todo mundo (BADARO *et al.*, 1986; EVANS *et al.*, 1992; DYE & WILLIAMS, 1993; CHANDRA, 1997).

## **2. Desnutrição e Doenças Carenciais**

A nutrição estuda os alimentos, micro e macro nutrientes e o próprio ato de se alimentar. Um dos grandes problemas na determinação do estado nutricional é classificar o tipo de desnutrição, uma vez que esta tem causas diversas, além disso, os padrões utilizados para classificação do estado nutricional, baseiam-se em índice de referências mundial, o que pode não estar refletindo a realidade local, devido às diferenças culturais (OMS, 1999).



A desnutrição grave pode apresentar-se como marasmo (deficiência calórica) ou kwashiorkor (deficiência protéica). A obtenção e a manutenção de um peso apropriado para a altura, sexo, idade e a atividade física durante o período de vida de um indivíduo é importante para evitar diversos problemas de saúde, e também para o desenvolvimento cognitivo (DILLINGHAM & GUERRANT, 2004). Desnutrição é comumente associada com infecções crônicas, doenças endócrinas e auto-imunes, câncer e AIDS (VICTORA *et al.*, 1986).

O resultado da infecção por *Leishmania* é provavelmente dependente de múltiplos fatores. Dois estudos realizados no Nordeste do Brasil sugerem que a desnutrição é um deles. A primeira evidência que demonstrou que a desnutrição está associada com o desenvolvimento da LV, resultou dos estudos de HARRISON *et al.* (1983), em que o estado nutricional de crianças com LV da mesma idade e sexo e que residem na mesma casa, foi comparado com crianças controles randomicamente selecionadas da vizinhança de algumas classes sociais, usando medidas antropométricas. O estudo foi conduzido em uma área de alta endemicidade no estado do Ceará - Brasil, onde aproximadamente 80% dos casos de LV ocorrem em crianças menores de 10 anos de idade. Os dados deste estudo sugerem uma associação entre desnutrição e desenvolvimento de LV grave, utilizando no período pré-infecção a área de gordura de pacientes que residem na mesma casa, como indicativo do estado nutricional. Um outro estudo na Bahia demonstrou que desnutrição está associada com a progressão da infecção por LV grave, o risco relativo de desenvolvimento de LV severa foi de 8.7 vezes maior entre crianças com desnutrição severa a moderada que entre crianças com estado nutricional normal ou que tem apenas desnutrição leve (BADARÓ *et al.*, 1988). Esses estudos não estabeleceram uma relação causal entre desnutrição e o desenvolvimento de LV, contudo essas são consideradas evidências por indicar que desnutrição pode resultar em imunodeficiência em humanos.

Desnutrição protéico-calórica está associada com falha significativa da resposta imune mediada por célula: na função fagocitária, no sistema de complemento, e na produção de citocinas. Deficiência de um único nutriente como: zinco, selênio, ferro, cobre, vitaminas A, C, E e B6 ou ácido fólico tem resultado em alterações da resposta imune. Por exemplo, a vitamina A é considerada anti-infecciosa e sua deficiência está associada a um maior risco de infecções graves, como demonstrado em estudo realizado em crianças com LV onde o nível sérico de vitamina A encontrava-se diminuído quando comparado com controles de área endêmica (CHANDRA, 1997; LUZ *et al.*, 2001; PRASAD 2002).

### **3. Interação Resposta Imune e Nutrição**

De um modo geral, déficits imunológicos correlacionam-se bem com mudanças observadas no tamanho e peso do timo e linfonodos vistas em crianças e adultos com desnutrição, tais alterações ocorrem devido a diminuição do número de células imune (CHANDRA, 1997 & RINK, 2000).

Na imunidade inata, defeitos na ativação do complemento e das funções de polimorfonucleares têm também sido relatados, além da atividade de células NK encontrar-se diminuída em crianças com kwashiokor e marasmo.

Na imunidade adquirida, a resposta imune celular parece ser o componente da imunidade mais frequentemente afetado. Anormalidade na hipersensibilidade cutânea tardia para uma variedade de antígenos dependentes de células T tem sido demonstrado em crianças desnutridas. A atividade tímica também encontra-se comprometida pela redução da atividade da timulina, que é o

hormônio tímico responsável pela maturação e ativação de células T. A desnutrição provavelmente afeta a expansão da proteção potencial antígeno-específico de sub-população de células T produtoras de interferon-gama, que são mediadores diretos da morte de patógenos intracelulares (CHANDRA, 1997, RINK & KIRCHNER 2000).

Tanto a desnutrição, quanto à deficiência de micro-nutrientes específicos, parecem interferir na resposta imune sendo, portanto, um fator importante na susceptibilidade e progressão de doenças infecciosas.

## **HIPÓTESE**

Zinco influencia a resposta imune na leishmaniose humana.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral:**

Estudar a possível associação entre os níveis plasmáticos de zinco e a resposta imune na leishmaniose humana.

### **Objetivos específicos:**

1. Quantificar níveis plasmáticos de zinco, cobre e ferro em pacientes com leishmaniose cutânea localizada, mucosa e visceral, comparando com controles urbanos e de áreas endêmicas;
2. Quantificar resposta imune celular anti-*Leishmania* in vitro (linfoproliferação e produção de citocinas) nos mesmos grupos;
3. Quantificar resposta imune humoral (IgG anti-*Leishmania* plasmático) nos mesmos grupos.

## JUSTIFICATIVA

Segundo a OMS, as leishmanioses encontram-se entre as seis doenças infecto-contagiosas de maior importância no mundo desde o último século, sendo esta a causa de sofrimento de 350 milhões de mulheres, homens e crianças em 88 países. Noventa por cento de todos os casos de LV ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão e 90% dos casos de LC ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. Apesar das medidas adotadas nos programas de controle, nos últimos 10 anos, a doença vem se tornando endêmica em várias regiões do mundo, aumentando sua incidência. (OMS, on line, 2004).

Várias estratégias têm sido desenvolvidas com a finalidade de controlar a doença, desde entender a biologia dos vetores, identificar possíveis reservatórios e eliminação quando infectados, identificação de área endêmica e/ ou novo foco, diagnóstico dos pacientes e ensaios com vacinação. Além disso, fatores sócio-econômicos e culturais são importantes para compreender a distribuição da doença nas diversas regiões brasileiras, como no Nordeste, que apresenta baixas condições sócio-econômicas associadas à maior incidência e prevalência da LC e LV (MS-FNS, 2000; MS, 2003).

Estudos demonstraram o papel da nutrição na resposta imune (OLIVEIRA *et al*, 1990; BEISEL 1995; CHANDRA, 1997; PRASAD, 2000). A desnutrição pode ser causada pela falta de vários nutrientes e/ou micro-nutrientes, ou mesmo pela falta de apenas um nutriente ou micro-nutriente. O zinco (Zn) é um micro-nutriente importante para o sistema imune e a sua deficiência leva a falha da resposta imune. Alguns estudos, demonstraram a importância do papel do zinco na resposta imune *in vitro e in vivo* em doenças infecciosas e não infecciosas

(PRASAD, 1983, 1995 e 2000; TURK, 1996; SAZAWAL *et al.*, 1998). O Zn apresenta papel importante no metabolismo de macrófagos, sendo um fator essencial na imunidade inata, e tem sido demonstrado seu papel crucial na imunidade mediada por células (PRASAD, 1995 & CHANDRA, 1997). A relevância do Zn na resistência a infecções por vírus, fungos e bactérias é reconhecido por sua eficiência em ativar o sistema imune, em particular em indivíduos soropositivos para HIV (MOCHEGANI & MUZZIOLO, 2000). Evidências experimentais com humanos e animais têm demonstrado que deficiência de zinco aumenta a susceptibilidade a doenças infecciosas e não infecciosas e diminui a sobrevivência em camundongos sendo, entretanto, corrigido com a sua suplementação (PRASAD, 1991; MOCHEGANI *et al.*, 1998). Em pessoas idosas saudáveis, foi observada diminuição da produção de citocinas Th1 como interferon-gama, o qual mostrou correlação com baixos níveis de zinco no soro, sendo a sua produção restaurada por adição de quantidades fisiológicas de zinco *in vitro*, enquanto que a produção de IL-4 (citocina Th2) não foi afetada pela adição de zinco (PRASAD, 2000).

A Tabela 1 (anexo 1) e Tabela 2 (anexo 2) mostra o efeito da deficiência de zinco no sistema imune durante infecção e o aumento da susceptibilidade (MOCHEGANI & MUZZIOLO, 2000; FRAKER *et al.*, 2000). Na Tabela 2 (anexo 3), observa-se redução significativa da ocorrência de infecção por suplementação de zinco na hanseníase, malária, diarreia, herpes congênita, desnutrição e acrodermatite enteropática ((MOCHEGANI & MUZZIOLO, 2000).

Nossos dados anteriores (anexo 4) demonstram que o zinco, em concentrações fisiológicas de 10 e 30 $\mu$ M, exerce atividade leishmanicida em monocitos e macrófagos humanos infectados com *L.amazonensis* *in vitro*, sugerindo um possível papel protetor do zinco na patogênese da leishmaniose humana.

**Subject Heading: Clinical Immunology**

## **ZINC/COPPER IMBALANCE AS A MARKER FOR IMMUNE DYSFUNCTION IN LEISHMANIASIS**

**Johan Van Weyenbergh<sup>1</sup>, Gisélia Santana<sup>1</sup>, Argemiro D'Oliveira Jr<sup>3</sup>,  
Aníbal F Santos Jr<sup>4</sup>, Arlene Caldas<sup>5</sup>, Jackson M Costa<sup>5</sup>, Carlos H  
Costa<sup>6</sup>, Edgar M Carvalho<sup>3</sup>, Aldina Barral<sup>2</sup>, Manoel Barral-Netto<sup>1</sup>**

**Running title: Copper/zinc imbalance in leishmaniasis**

**<sup>1</sup>LIMI, <sup>2</sup>LIP, Gonçalo Moniz Research Center-Oswaldo Cruz Foundation, <sup>3</sup>Serviço de Imunologia, HUPES, <sup>4</sup>Instituto de Química, UFBA, Salvador-BA, <sup>5</sup>Núcleo de Medicina Tropical, UFMA, São Luis-MA, and <sup>6</sup>Infectious Disease Hospital, UFPI, Teresina-PI, Brazil**

**Corresponding author: Dr. Johan Van Weyenbergh, Fundação Oswaldo Cruz, CPqGM-LIMI, Rua Waldemar Falcão 121, 40295-001 Salvador-BA, Brazil, Tel. +55 71 356 4320, Fax +55 71 356 2255, E-mail: [johan@cpqgm.fiocruz.br](mailto:johan@cpqgm.fiocruz.br)**

## ABSTRACT

Mucosal (ML), localized cutaneous (LCL) and visceral leishmaniasis (VL) are characterized by exacerbated, intermediate and inefficient cellular immune response, respectively. We investigated if zinc and copper levels differ in distinct clinical forms of leishmaniasis, and if they correlate to humoral and/or cellular immune response towards the parasite. Blood was collected from 32 patients with either localized cutaneous (LCL), mucosal (ML) or visceral (VL) leishmaniasis, as well as from 25 controls from endemic and non-endemic areas. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune response were evaluated by quantifying specific plasma IgG, lymphoproliferation and cytokine production, respectively. A significant decrease in plasma Zn was observed in all three patient groups ( $p < 0.01$  for LCL and ML,  $p < 0.001$  for VL), as compared to controls, but only VL (7/10) and ML (1/7) patients displayed overt Zn deficiency. Plasma Cu was increased in LCL and VL ( $p < 0.001$ ) but not in ML, and was strongly correlated to anti-*Leishmania* IgG (Spearman  $r = 0.65$ ,  $p = 0.0028$ ). Cu/Zn ratios were highest in patients with deficient cellular ( $VL \ll LCL < ML$ ) and exacerbated humoral ( $VL > LCL > ML$ ) immune response. In a prospective study of 12 VL patients, clinical and immunological data were obtained during a one-year follow-up. Zn deficient VL patients displayed a significant delay in spleen size normalization after treatment ( $p = 0.013$ ).

**Conclusions** 1. Zn deficiency in VL and ML indicate possible therapeutic administration of Zn in these severe forms of leishmaniasis. 2. Plasma Cu positively correlates to humoral immune response across patient groups. 3. Increased Cu/Zn ratio can be a useful marker for immune dysfunction in leishmaniasis. 4. In VL patients, Zn levels may predict spleen size evolution.

## ABBREVIATIONS

ML: mucosal leishmaniasis, LCL: localized cutaneous leishmaniasis, VL: visceral leishmaniasis.



## Introduction

Leishmaniasis is endemic in several parts of the world, with a global prevalence of over 12 million cases and 600,000 new cases emerging every year (1). The infection is caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*, transmitted through the bite of the sand fly vector. Several *Leishmania* species are able to cause a wide spectrum of clinical manifestations, ranging from the mild cutaneous form, the disfiguring mucosal form and the life-threatening visceral form, also known as kala-azar. In Brazil, *Leishmania (L.) braziliensis* causes cutaneous and mucosal disease, *L. amazonensis* causes cutaneous and, sporadically, visceral disease, while *L. chagasi* is exclusively associated with visceral disease. The clinical outcome of infection thus not only depends on the species involved, but also on the patient's immunocompetence. In recent years, a protective immune response against intracellular pathogens, such as *Leishmania*, *Listeria* and mycobacteria, has been defined as type 1 (Th1), whereas protection against extracellular pathogens, such as helminths, requires a type 2 (Th2) response. The murine model of experimental leishmaniasis has been instrumental for the elaboration of the Th1/Th2 paradigm, inasmuch as the preferential action of Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ ) or Th2 cytokines (IL-4, IL-5, IL-10) results in cure or progression of the disease, respectively (2, 3). In human leishmaniasis, this Th1/Th2 dichotomy is much less explicit for in vitro or ex vivo cytokine production. However, striking differences in cellular (lymphoproliferation and IFN- $\gamma$  production) and humoral (total and anti-*Leishmania* IgG) immune response can be observed in different clinical forms of the disease. Our group has recently shown that patients with localized cutaneous leishmaniasis (LCL) display a diminished Th1 response during the early phase of disease, which is reverted after treatment (4). In mucosal leishmaniasis (ML), on the other hand, an exacerbated Th1 response with increased IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels, is believed to provoke tissue destruction (5). In patients with visceral

leishmaniasis (VL), characterized by immunosuppression and absence of and IFN- $\gamma$  production (6), we were able to show the beneficial effect IFN- $\gamma$  *in vivo* (7). Zinc deficiency has been shown to lead to a selective Th1 deficiency in human volunteers (8). Surprisingly, only very few data are available on the role of Zn and Cu in human leishmaniasis (9). In this study, we investigated if Zn and Cu levels differ in different clinical forms of the disease, and if these trace metals might be correlated to *ex vivo* immune response towards the parasite.

## Methods

Blood samples (10 ml heparinized tubes, Vacutainer) from 22 patients and 15 healthy controls (mostly patient's relatives) were obtained in an outpatient clinic in the district of Corte de Pedra, (Bahia state, Northeast of Brazil). This rural area has a low socio-economic status and a high incidence of infection with *Leishmania braziliensis* and, sporadically, *Leishmania amazonensis*. During a one year period, 15 patients with LCL (single lesion with less than 4 weeks of duration) were selected and treated (20 mg/kg of Sb<sup>V</sup> (Glucantime) i.v. during 20 days). Of those, only 7 patients returned to draw blood after 3 months of treatment, but all patients cured during follow-up. Seven patients with ML were selected after several rounds of unsuccessful treatment and severe disease progression. Blood samples from 10 patients with VL were obtained from two different urban areas (Salvador-Bahia and Teresina-Piauí). Ten healthy urban controls were recruited among students and laboratory staff (Salvador-Bahia). Serial blood samples of 12 children with VL (São Luis-Maranhão) were obtained in a prospective study (one-year clinical and immunological follow-up).

Diagnosis was confirmed by Montenegro skin test, serology, direct culture of parasites from lesions (4) or bone marrow aspiration for VL (7). This study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Edgard Santos, Salvador.

Cu and Zn were quantified by atomic absorption spectrophotometry (Varian 220) using an air/acetylene flame. One ml of plasma was diluted tenfold with 0.05 % Triton X-100, 1 % HNO<sub>3</sub>, sonicated for 10 min and analysed in triplicate. All reagents used were analytical grade (Merck). Due precautions were taken to avoid external and internal (hemolysis) trace metal contamination.

In order to investigate the influence of trace metals, antibodies and other endogenous plasma components, such as cytokines, on the *ex vivo* cellular immune response, we used a recently described model using whole blood and live *Leishmania* promastigotes (10), closely mimicking the early *in vivo* events following a sandfly bite. Whole blood was diluted tenfold in culture medium (RPMI supplemented with L-glutamine and gentamycin, all from Gibco-BRL) and stimulated with *L. amazonensis* promastigotes (10<sup>5</sup>/mL). Supernatants were collected after 72 h of culture and frozen in aliquots for cytokine determination. Lymphoproliferation was quantified by measuring [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation after 120 h of culture. IFN- $\gamma$  in culture supernatants was quantified using a commercial ELISA kit (DuoSet, Genzyme).

All results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical evaluation of data was performed using Mann-Whitney test for comparing patients and control groups, Spearman rank test for correlation, a p-value <0.05 was considered significant.

## Results

A significant decrease in plasma Zn was observed for both LCL and ML patients, as compared to controls from the same endemic area ( $0.80 \pm 0.04$  and  $0.77 \pm 0.05$  vs.  $1.01 \pm 0.06$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $p < 0.01$ , Figure 1A), and in VL patients, as compared to urban controls ( $0.55 \pm 0.08$  vs.  $0.83 \pm 0.03$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $p < 0.001$ , Figure 1A). Zn deficiency (plasma Zn  $< 0.65$   $\mu\text{g/mL}$ ), however, was observed only in VL (7/10) and ML (1/7) patients. As shown in Fig. 1B, plasma Cu was significantly increased in LCL ( $1.32 \pm 0.10$  vs.  $1.01 \pm 0.05$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $p < 0.001$ ) and VL ( $1.42 \pm 0.13$  vs.  $0.72 \pm 0.06$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $p < 0.001$ ), but not in ML ( $1.04 \pm 0.05$  vs.  $1.01 \pm 0.05$ ). After three months of treatment, plasma Zn increased and Cu decreased in LCL patients, resulting in values indistinguishable from endemic controls. Although within normal physiological ranges (11), Cu and Zn levels were significantly increased in healthy controls from the endemic area, as compared to urban controls ( $p < 0.01$ , Fig. 1A and 1B). Cu/Zn ratios, however, were similar in both control groups ( $p = 0.115$ ), but significantly increased in all three patient groups (Fig. 1C), reaching a three-fold molar excess of Cu to Zn in VL patients.

To determine if these observations reflect possible changes in the patients' immune status, we quantified humoral and cellular anti-*Leishmania* immune response *ex vivo* and correlated them to trace element levels. When comparing patient groups, a stepwise increase in anti-*Leishmania* IgG and Cu/Zn ratio can be observed, with  $\text{ML} < \text{LCL} < \text{VL}$  (Table I and Fig. 1). In addition, a highly significant correlation between plasma Cu, but not Zn or Cu/Zn ratio, and anti-*Leishmania* IgG was observed across patient groups (Fig. 2, Spearman  $r = 0.65$ ,  $p = 0.0028$ ). Since lymphoproliferation and IFN- $\gamma$  production were virtually absent in VL, correlation with trace element levels across patient groups could not be calculated, but an inverse order was observed,

with  $ML > LCL \gg VL$  (Table I) as compared to Cu/Zn ratio with  $ML < LCL \ll VL$  (Fig. 1), confirming reciprocal regulation of Th1/cellular immune response and Th2/humoral immune response.

Since Zn deficiency was striking in VL patients, we evaluated its clinical and immunological impact in a prospective study comprising 12 children with VL. Fifty percent (6/12) were Zn deficient before treatment (Table II), one quarter (3/12) remained Zn deficient after treatment (30 days), but all of them returned to normal values at three months of treatment (data not shown). All patients restored clinical and immune parameters during a one-year follow-up. No significant differences were observed in cellular (DTH conversion and in vitro IFN- $\gamma$  production) and humoral (anti-*Leishmania* IgG) immune response between Zn deficient and Zn sufficient patients (Table II). However, Zn deficient patients displayed a significantly lower decrease in spleen size after treatment (30 days), as compared to Zn sufficient patients (Table II,  $p = 0.013$ ), three of which had already complete regression of spleen size.

## Discussion

Although plasma Zn was significantly decreased in all three patient groups, plain Zn deficiency was only observed in seven VL patients and one ML patient, being absent in LCL patient and in both control groups. In parallel, plasma Cu in VL patients increased to levels which have been shown to be toxic in vitro (12). In addition, a highly significant positive correlation between plasma Cu and parasite-specific IgG across patient groups suggests that the trace element might interfere in anti-*Leishmania* immune response, e.g. by leading to a non-protective Th2/humoral immune response, known to be exacerbated in visceral leishmaniasis. Increased plasma Cu cannot be considered as a mere marker of inflammation, since it was not observed in

ML, a chronic inflammatory condition characterized by high production of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  (5). Since our *in vitro* findings indicate Zn as a macrophage activator (Van Weyenbergh et al., unpublished results), the significant decrease in Zn in ML patients might be responsible for the inability of the patients to clear the parasite, in spite of high IFN- $\gamma$  levels and several rounds of treatment. A direct correlation between Zn levels and parasite burden was also suggested by the significant delay in spleen size normalization in Zn deficient VL patients (Table II).

LCL patients represent an intermediate group between ML and VL, displaying a detectable, but variable humoral and cellular immune response with production of both Th1 and Th2 cytokines, undergoing a shift towards the Th1/cellular pole after successful treatment (4). We observed a reciprocal association between Cu/Zn levels and humoral and cellular immune response in untreated LCL patients, and a complete reversal of increased Cu/Zn ratios after treatment. Taken together, these data indicate that Cu/Zn imbalance might serve as a marker for decreased Th1 response and immunodeficiency in leishmaniasis, being more pronounced in its most severe and possibly fatal visceral form. Concordant with this hypothesis, VL patients from Teresina display increased Cu/Zn ratios (Fig. 1), as compared to VL patients from São Luis (Table II), all of which effectively cured with standard antimonial therapy. Unfortunately, no clinical follow-up was possible in Teresina, but mortality, mostly due to coinfections, and therapeutic failure occur in 6,1 % of the cases (13, 14), whereas mortality and therapeutic failure has been absent in a large cohort of VL patients in São Luis followed for the last four years (Caldas A. & Costa J., unpublished results).

It is tempting to speculate that environmental exposure to copper might increase susceptibility to *Leishmania* and other intracellular pathogens, such as *Listeria* and mycobacteria, e.g. by directly interfering with cytokine production as previously shown (15). Increased plasma Cu in

endemic controls might reflect the use of Cu as a fungicide in cocoa plantations in the Corte de Pedra area. It should be stated that spouses and relatives were preferentially chosen as endemic controls, since environmental exposure and nutritional status are far more important determinants for Cu and Zn levels than sex or age (11). Long-term follow-up of treated patients and comparison with other endemic areas might learn if trace metal levels have predictive value for clinical evolution of and/or susceptibility to leishmaniasis. In addition, we propose that trace metal levels should be taken into account in vaccine strategies for leishmaniasis, because of the importance of Zn in a protective Th1 response (8) and because of the possibly deleterious effect of Cu described in this study. Two recent large-scale vaccination trials for cutaneous and visceral leishmaniasis (16, 17) were carried out in regions where Zn deficiency is prevalent, namely Iran and Sudan, which might have contributed in part to the low protection rate observed in both trials.

Administration of Zn in vivo has been shown to down-regulate increased Cu levels in patients with Wilson disease and to revert its toxicity (18), suggesting that systemic administration of Zn might be beneficial in addition to its direct immunostimulatory effect (8). A recent report (19) demonstrated the safety and efficiency of oral Zn in Old World cutaneous leishmaniasis, a mild and self-healing form of the disease, with patients displaying normal Zn levels. Our results strongly suggest that zinc therapy should be considered in the mucosal and visceral forms of leishmaniasis, associated with high morbidity and mortality, as well as frequent failure of antimonial therapy.

In conclusion, our data indicate that Cu/Zn imbalance can be a useful marker for immune dysfunction in leishmaniasis and suggest that trace metals are implicated in anti-*Leishmania* immune response, which should direct future therapeutic intervention.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patients, their families, the field workers and the medical staff from the Corte de Pedra outpatient clinic and from UFMA and UFPI University Hospitals; André Báfica, George Soares, Jorge Tolentino and Silvia Cardoso for practical assistance; Dr Maria das Graças Korner for advice on trace element analysis and Dr Cláudia Brodskyn for critical reading of the manuscript. Financial support: NIH (TMRC grant AI-30639), PIBIC-UFBA, CAPES, CNPq (Brazilian National Research Council) and PRONEX. EMC, AB and MBN are CNPq investigators.



**REFERENCES**

1. Desjeux P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Stat Q* 1992; 45:267-75.
2. Coffman RL, Chatelain R, Leal LM, Varkila K. *Leishmania major* infection in mice: a model system for the study of CD4+ T-cell subset differentiation. *Res Immunol* 1991;142:36-40.
3. Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 1995;13:151-77.
4. Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, de Jesus AR, Filho DC, Filho AC. et al. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 1999;180:1731-4.
5. Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 1998;31:143-8.
6. Carvalho EM, Badaro R, Reed SG, Jones TC, Johnson WD Jr. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest* 1985;76:2066-9.
7. Badaro R, Falcoff E, Badaro FS, Carvalho EM, Pedral-Sampaio D, Barral A. et al. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. *N Engl J Med* 1990; 322:16-21.
8. Beck FW, Prasad AS, Kaplan J, Fitzgerald JT, Brewer GJ. Changes in cytokine production and T cell subpopulations in experimentally induced zinc-deficient humans. *Am J Physiol* 1997;272:E1002-7.

9. Kocyigit A, Erel O, Gurel MS, Avci S, Akteje N. Alterations of serum selenium, zinc, copper, and iron concentrations and some related antioxidant enzyme activities in patients with cutaneous leishmaniasis. *Biol Trace Elem Res* 1998;65:271-81.
10. Dominguez M, Torano A. Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of *Leishmania* infection. *J Exp Med* 1999;189:25-35.
11. Bogden JD, Kemp FW, Han S, Li W, Bruening K, Denny T, et al. Status of selected nutrients and progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Am J Clin Nutr* 2000;72:809-15.
12. Aston NS, Watt N, Morton IE, Tanner MS, Evans GS. Copper toxicity affects proliferation and viability of human hepatoma cells (HepG2 line). *Hum Exp Toxicol* 2000;19:367-76.
13. Santos MA, Marques RC, Farias CA, Vasconcelos DM, Stewart JM, Costa DL, Costa CH. Predictors of an unsatisfactory response to pentavalent antimony in the treatment of American visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002;35:629-33.
14. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. Werneck GL, Batista MS, Gomes JR, Costa DL, Costa CH. *Infection* 2003;31:174-7.
15. Theocharis S, Margeli A, Panayiotidis P. Effects of various metals on DNA synthesis and lymphokines production by human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Comp Biochem Physiol C* 1991;99:131-3.
16. Sharifi I, FeKri AR, Aflatonian MR, Aflatonian MR, Khamesipour A, Nadim A. et al. Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. *Lancet* 1998;351:1540-3.

17. Khalil EA, El Hassan AM, Zijlstra EE, Mukhtar MM, Ghalib H W, Musa B. et al. Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. *Lancet* 2000;356:1565-9.
18. Brewer GJ Recognition, diagnosis, and management of Wilson's disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;223:39-46.
19. Sharquie KE, Najim RA, Farjou IB, Al-Timimi DJ. Oral zinc sulphate in the treatment of acute cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 2001;26:21-6.

**TABLE I : Characteristics and immune parameters of patient groups and controls**

<b>Group (n)</b>	<b>Age</b>	<b>Male/ Female</b>	<b>Anti- <i>Leishmania</i> IgG (arbitrary units)</b>	<b>Lympho- proliferation (cpm)<sup>b</sup></b>	<b>IFN-<math>\gamma</math> (pg/mL)<sup>b</sup></b>
<b>Urban controls (10)</b>	24.9 (2.0)	7/3	< cut-off	< 100	< 20
<b>Endemic controls (15)</b>	28.7 (8.8)	3/12	< cut-off <sup>a</sup>	ND	< 20
<b>LCL0 (15)</b>	28.4 (12.7)	11/4	177.5 (73.0)	2737 (1178)	612 (207)
<b>LCL3 (7)</b>	28.5 (11.2)	5/2	73.5 (20.9)	ND	685 (348)
<b>ML (7)</b>	44.4 (11.9)	5/2	15.8 (4.6)	> 5000	> 2000
<b>VL (10)</b>	18.4 (3.8)	6/4	187.8 (72.1)	< 100	< 20

Results are expressed as mean (SEM). ND: not done. LCL0 and LCL3, localized cutaneous leishmaniasis at 0 and 3 months of treatment, ML mucosal leishmaniasis, VL visceral leishmaniasis.

<sup>a</sup> One endemic control displayed positive serology and was discarded from analysis.

<sup>b</sup> Following stimulation of tenfold diluted whole blood with live *Leishmania* promastigotes.

**TABLE II : Characteristics and immune parameters of prospectively studied VL patients**

	<b>Zn deficient (n = 6)</b>	<b>Zn sufficient (n = 6)</b>	<b>Statistical analysis</b>
<b>Age (years)</b>	2.8 ± 0.9	4.4 ± 1.1	p = 0.30
<b>Sex</b>	2F/4M	4F/2M	p = 0.57
<b>Plasma Zn (µg/ml)</b>	0.46 ± 0.02	1.05 ± 0.05	<b>p &lt; 0.0001</b>
<b>Plasma Cu (µg/ml)</b>	0.64 ± 0.15	0.85 ± 0.11	p = 0.30
<b>Cu/Zn ratio</b>	1.45 ± 0.26	0.83 ± 0.13	p = 0.11
<b>Disease duration (weeks)</b>	5.0 ± 1.0	10.3 ± 5.2	p = 0.34
<b>Spleen before treatment (cm)</b>	6.8 ± 0.5	5.3 ± 1.2	p = 0.28
<b>Spleen after treatment (cm)</b>	3.7 ± 0.3	1.5 ± 0.7	<b>p = 0.013</b>
<b>Liver before treatment (cm)</b>	7.3 ± 0.6	7.3 ± 0.4	p = 1.00
<b>Liver after treatment (cm)</b>	5.2 ± 0.7	5.0 ± 0.5	p = 0,85
<b>DTH conversion (months)</b>	8.8 ± 1.3	8.5 ± 1.6	p = 0.87
<b>IgG anti-<i>Leishmania</i> (OD)</b>	0.51 ± 0.16	0.57 ± 0.18	p = 0.80
<b>IFN-γ (pg/ml)</b>	< 20	25 ± 21	p = 0.29

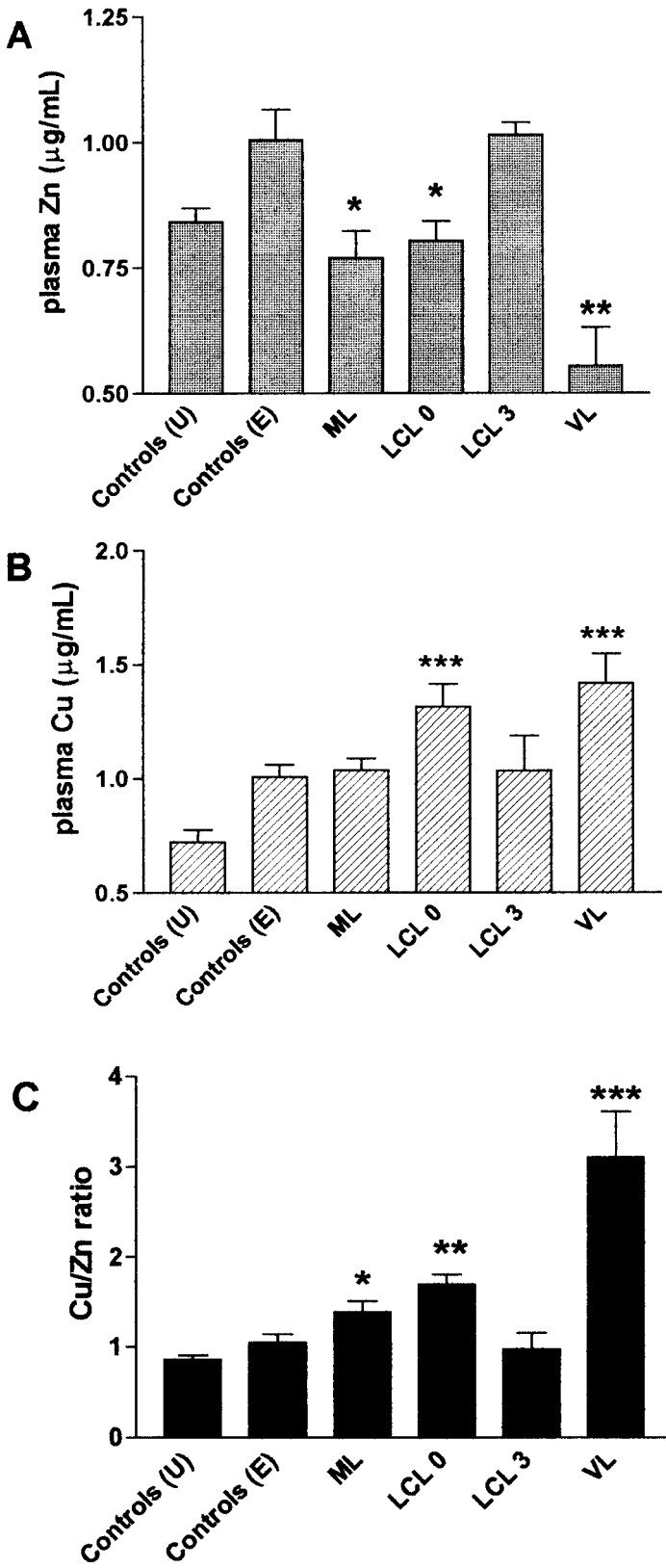
## FIGURE LEGENDS

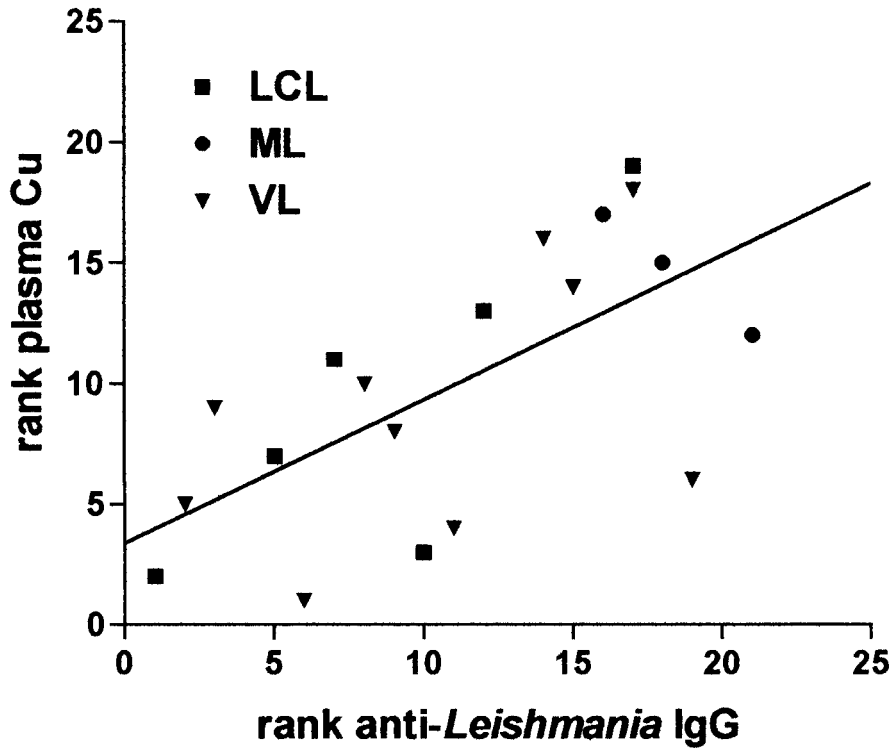
### Figure 1: Plasma levels of Zn and Cu in controls and patients

Bars represent mean ( $\pm$  SEM) Zn (A) and Cu (B) plasma levels, and plasma Cu/Zn ratios (C) of urban (U) and endemic (E) controls; and patients with mucosal leishmaniasis (ML), localized cutaneous leishmaniasis before (LCL0) and after 3 months of treatment (LCL3), and visceral leishmaniasis (VL). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  for LCL0 and ML vs. E and for VL vs. U (Mann-Whitney test).

### Figure 2 : Correlation between plasma Cu and anti-*Leishmania* IgG

Plasma levels of Cu and anti-*Leishmania* IgG were positively correlated in patients with localized cutaneous leishmaniasis before treatment (LCL), mucosal leishmaniasis (ML) and visceral leishmaniasis (VL) (Spearman  $r = 0.65$ ,  $p = 0.0028$ ).







## DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

Doenças parasitárias e desnutrição permanecem como os maiores problemas de saúde nas áreas tropicais e subtropicais. A atenção tem sido recentemente focalizada na desnutrição como fator de risco para o desenvolvimento de tais doenças e vice versa. Estudos clínicos têm sido limitados pela multiplicidade de fatores que contribuem para a desnutrição, como: variações nas deficiências que resultam em um quadro de desnutrição, alta frequência de parasitas e infecções bacterianas entéricas entre pessoas que vivem em áreas com condições higiênicas precárias. Contudo, de acordo com a OMS, crianças gravemente desnutridas têm infecções bacterianas na ocasião da admissão para tratamento hospitalar, principalmente infecções do trato respiratório inferior. Diferentemente das crianças bem nutridas, que respondem a infecções como febre e inflamação, crianças desnutridas com infecções sérias podem se tornar apenas apáticas ou sonolentas, sendo, portanto, importante o tratamento precoce de infecções bacterianas com antimicrobiano efetivo, a fim de melhorar a resposta nutricional à alimentação.

Alguns autores propõem, a partir de estudos sobre LV em áreas endêmicas no Brasil e de infecção experimental com hamster sírio, que a doença constitui um excelente modelo para avaliar a inter-relação entre desnutrição e infecção parasitária. A desnutrição parece influenciar no curso da doença, mas não na susceptibilidade da infecção. Porém, outros estudos têm demonstrado que a infecção por *L.chagasi* ocorre em crianças de áreas endêmicas independentemente do estado nutricional (CALDAS *et al.*, 2001).

Apesar de existirem estudos dedicados à importância do zinco na resposta imune *in vitro* e *in vivo* em algumas doenças infecciosas e não-infecciosas (PRASAD, 1995), poucos são os

dados sobre o possível papel do zinco na patogênese da leishmaniose humana. Apenas um estudo mostra baixos níveis séricos de zinco e de ferro em pacientes turcos com LC, ambos corrigidos após tratamento com antimonial pentavalente ( $Sb^{+5}$ ) (KOCYIGIT *et al.*, 1998). Esta diminuição, ou até marcante deficiência de zinco, como observamos em nossos pacientes, é um assunto de significativo interesse para o entendimento do processo patológico, considerando que o zinco é essencial para o funcionamento da imunidade celular (CHANDRA, 1997). Tanto em pacientes como em modelos animais de leishmaniose, a imunidade celular é capaz de conferir proteção, enquanto que a ativação da imunidade humoral correlaciona com susceptibilidade e progressão da doença. Nossos dados, não permitem estabelecer uma causalidade entre distúrbios e/ou deficiências no metabolismo do zinco e evolução da doença, mas, indicam este metal como alvo terapêutico. Por outro lado, apesar de estar significativamente diminuídos nos pacientes com LV, os níveis plasmáticos de ferro não se correlacionaram com a resposta imune anti-*Leishmania* em nenhum dos grupos estudados (dados não mostrados).

O zinco é freqüentemente utilizado como terapia da doença de Wilson, doença autossômica recessiva na qual ocorre desordem levando o acúmulo de cobre (Cu) primariamente dentro do fígado e subseqüentemente no sistema neurológico e em outros tecidos, caso o tratamento específico não seja feito, o acúmulo de cobre é progressivo e fatal (SCHILSKY *et al.*, 2001). O zinco atua tanto na competição com o Cu por absorção no sítio luminal do epitélio intestinal, quanto na indução da síntese da metalotioneína, reduzindo dessa maneira os níveis de Cu e prevenindo sua reacumulação em tecidos (BREWER *et al.*, 1998). Nossos dados mostram um aumento nos níveis plasmáticos de cobre, aparente tanto nos pacientes com LCL e LV, como nos controles da área endêmica, sugerindo que, além da patologia, fatores exógenos (exposição ambiental, nutrição, ...) podem interferir com o metabolismo do cobre e do zinco.

Sharquie *et al.* (2001), em ensaio clínico randomizado incluindo 102 pacientes Iraquianos acometidos pela LCL causada por *L.major* e *L.tropica* e tratados com sulfato de zinco por via oral, observaram cura acelerada da doença, mesmo na ausência de deficiência de zinco. As reações adversas foram brandas, demonstrando o zinco como uma boa opção terapêutica das manifestações cutâneas da leishmaniose no Velho Mundo.

Em conclusão, o nosso estudo poderia indicar futuros ensaios clínicos utilizando o zinco, na forma tópica ou oral, na LT e LV no Brasil. Vale ressaltar as vantagens do uso terapêutico do zinco, já comprovado no tratamento de diversas doenças, que são o baixo custo e a quase ausência de toxicidade ou efeitos colaterais, em contraste ao tratamento atual com antimoniais pentavalentes (antimoniato-N-metilglucamina e estibogluconato de sódio).

## CONCLUSÕES

1. A deficiência de Zn na LV e LM indica a possibilidade da administração terapêutica de Zn nessas formas severas da leishmaniose;
2. Os níveis plasmáticos de Cu correlacionaram-se positivamente com resposta imune humoral entre os pacientes com LV, LCL e LM;
3. A razão Cu/Zn pode funcionar como marcador de disfunção imune nas leishmanioses humana;
4. A deficiência de zinco pode ser preditivo de retardo na diminuição de tamanho do baço em pacientes com LV.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BADARÓ, R. Editorial. Progressos nas pesquisas de Leishmaniose visceral na área endêmica de Jacobina-Bahia 1934-1989. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **21**:159-164, 1998.
- BADARÓ, R.; JONES, T.C.; LORENÇO, R.; CERF, B.J. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J. Infect. Dis.**, **154**:1003-1011, 1986.
- BARRAL, A.; PEDRAL, S. D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON, P.D., RIBEIRO, A.J.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med.Hyg**, **44**:536, 1991.
- BEISEL, R.W.; HERMAN, A. L. Infection-induced malnutrition- from cholera to cytokines. **Am. J. Clin. Nutr.**, **62**:813-819, 1995.
- BITTENCOURT, A.L.; BARRAL-NETTO, M. Leishmaniasis. In: DOERR, W.; SEIFERT, G. (Eds.). **Tropical Pathogy**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.597-651.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Fundação Nacional de Saúde, **Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil**. 5-54, 1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Fundação Nacional de Saúde, **Manual de Controle de Leishmaniose Tegumentar Americana**. 7-59, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 9:83, 2003.

BREWER, G.J.; DICK, R.D.; JOHNSON, V.D.; BRUNBERG, J.A.; KLUIN, K.J.; FINK, J.K. Treatment of Wilson's disease with zinc: XV long-term follow-up studies. **J. Lab. Clin. Med.**, **132**:264-268, 1998.

CALDAS, A.J.M.; AQUINO, D.M.C.; BARRAL, A.P.; COSTA, J.M.L. Avaliação nutricional das crianças de zero a cinco anos de idade de área endêmica de leishmaniose visceral americana (LVA). **Rev. Hosp. Univ. Maranhão**, **2**:9-14, 2001.

CAMPOS JUNIOR, D. Características clínico-epidemiológicas do calazar na criança. **J. Pediatr.**, **71**:261-265, 1995.

CHANDRA, R.K. Nutrition and the immune system: an introduction. **Am. J. Clin. Nutr.**, **66**: 460S, 1997. Suplemento.

DE OLIVEIRA, J.E.; FAVARO, R.M.; DESAI, I.D. Progress in the diagnosis of hypovitaminosis A: clinical and biochemical correlations. **Arch. Latinoam. Nutr.**, **40**:333-348, 1990.

DILLINGHAM, R.; GUERRANT R.L.; Childhood stunting: measuring and stemming the staggering costs of inadequate water and sanitation. **Lancet**, **363**:94-95, 2004.

DYE, C.; WILLIAMS B.G. Malnutrition, age and the risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revisited. **Proc. R. Soc. London**, **254**, 33-39, 1993.

FRAKER, P.J.; KING, L.E.; LAAKKO, T.; VOLLMER, T.L. The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. **J. Nutr.**, **130**:1399S, 2000.

HARRISON, L.H.; NAIDU, T.G., DREW, J.S.; ALENCAR, J.E.; PEARSON, R.D. Reciprocal relationships between undernutrition and the parasitic disease visceral leishmaniasis. **Rev. Infect. Dis.**, **8**:447-452, 1986.

HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; HOLADAY, B.J.; COFFMAN, R.L.; LOCKSLEY, R.M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **J. Exp. Med.**, **169**: 59, 1989.

KOCYIGIT, A.; EREL, O.; GUREL, M.S.; AVCI, S.; AKTEJE, N. Alterations in serum selenium, zinc, copper and iron concentrations and some related antioxidant enzyme activities in patients with cutaneous leishmaniasis. **Biol. Trace Elem. Res.**, **65**:271-281, 1998.

LAINSON, R.; SHAW J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETER, W.; KILLICH, R.K. **The Leishmaniasis in the New World. Biology And Medicine.** London: Academic Press, 1987.

LAINSON, R.; SHAW J.J.; READY, P.D.; MILES, M.A.; POVOA, M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Para State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **75**:530-536, 1981.

LOCKSLEY, R.M.; PINGEL, S.; LACY, D.; WAKIL, A.E.; BIX, M.; FOWELL, D.J. Susceptibility to infectious diseases: *Leishmania* as a paradigm. **J. Infect. Dis.**, **179**: Suppl 2, S305, 1999.

LUZ, G.K.; SUCCI, M.C.R.; TORRES, E. Nível sérico da vitamina A em crianças portadoras de leishmaniose visceral. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **34**:381-384, 2001.

MOCCHEGIANI, E.; MUZZIOLI, M. Therapeutic application of zinc in human immunodeficiency virus against opportunistic infections. **J. Nutr.**, **130**:1424S, 2000.

MOCCHEGIANI, E.; SANTARELLI, L.; TIBALDI, A.; MUZZIOLI, M.; BULIAN, D.; CIPRIANO, K.; OLIVIERI, F.; FABRIS, N. Presence of links between zinc and melatonin during

the circadian cycle in old mice: effects on thymic endocrine activity and on the survival. **J. Neuroimmunol**, **86**:111, 1998.

PASSOS, V.M.; FALCAO A.L.; MARZOCHI M.C.; GONTIJO C.M.; DIAS E.S.; BARBOSA, E.G.S.; GUERRA H.L.; KATZ, N. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **1**:103-110, 1993.

PEARSON, R.D.; WHEELER, D.A.; HARRISON, L.H.; KAY, H.D.; The immunobiology of leishmaniasis. **Rev. Infect. Dis.**, **5**:907-927, 1983.

PRASAD, A.S. Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. **Am. J. Clin. Nutr.**, **53**:403, 1991.

PRASAD, A.S. Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. **J. Infect. Dis.**, **182**: Suppl 1, S62, 2000.

PRASAD, A.S. Zinc: an overview. **Nutrition**, **11**:93, 1995.

PRASAD, A.S. Clinical, Biochemical and Nutritional Spectrum of Zinc deficiency in Human Subjects: An Update. **Nutr. Rev.**, **41**:197-208, 1983.

PRASAD, A.S. Zinc deficiency. **B.M.J.**, **326**:409-10, 2003.

QUEIROZ, R.G.; de VASCONCELOS, I.A.; VASCONCELOS, A.W.; PESSOA, F.A.; de SOUSA, R.N.; DAVID, J.R. Cutaneous leishmaniasis in Ceara state in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturite municipality. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **50**:693-698, 1994.

RINK, L.; KIRCHNER, H. Zinc-Altered Immune Function and Cytokine Production. **J. Nutr.**, **130**:1407S-1411S, 2000.



SAZAWAL, S.; BALCK R.E.; JALLA, S.; MAZUMDAR, S.; SINHA, A.; BHAN M.K. Zinc Supplementation Reduces the Incidence of Acute Lower Respiratory Infections in Infants and Preschool Children: A Double-blind, Controlled Trial. **Pediatrics**, **102**:1-5, 1998.

SCHILSKY, M.L. Diagnosis and treatment of Wilson's disease. **Pediatr. Transpl.**, **6**:15, 2002.

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R.L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **J. Exp. Med.**, **168**:1675-1684, 1989.

SHARQUIE, K.E.; NAJIN, R.A.; FARJOU, I.B.; AL-TIMIMI, D.J. Oral zinc sulphate in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, **26**:21-26, 2001.

SILVA, A.R.; VIANA, G.M.C.; VARONIL, C.; PIRES, B.; NASCIMENTO, M.D.S.B.; COSTA, J.M.L. Leishmaniose Visceral (calazar) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. Evolução e perspectivas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **30**:359-368, 1997.

SILVA, J.R. **Leishmaniose visceral (Calazar)**. 1957. Tese (Doutorado) – Serviço de Educação Sanitária. Rio de Janeiro.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; SHAW J.J.; de SOUZA, A.A.; ISHIKAWA, E.A.; BRAGA, R.R. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **85**:735-738, 1991.

TURK, S.; BOZFAKIOGLU, S.; ECDER, S.T.; KAHRAMAN, T.; GUREL, N.; ERKOÇ, R.; AYSUNA, N.; TURKMEN, A.; BEKIROGLU, N.; ARK, E. Effects of zinc supplementation on the immune system and on antibody response to multivalent influenza vaccine in hemodialysis patients. **Int. J. Artif. Organs**, **21**:274-278, 1998.

VEXENAT, J.A.; BARRETTO, A.C.; CUBA, C.A.C.; MARSDEN, P.D. Epidemiological Characteristics of American cutaneous leishmaniasis in an endemic region of the State of Bahia. III. Phlebotomine fauna. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **81**:293-301, 1986a.

VICTORA, G. C.; VAUGHAN P.J.; KIRKWOOD, R.B.; MARTINES, C.J.; BARCELOS, B.L. Risk Factors for Malnutrition in Brazilian Children: the role of social and environmental variables. **Bull. WHO**, **64**:299-309, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Control of the leishmaniasis. **WHO. Tech. Rep. Ser.**, **793**:1-158, 1990.

## ANEXO 1

**TABLE 1**

*Effect of zinc deficiency on immune system during infection and susceptibility to various pathogens during infectious episodes*

Immune system effect <sup>1</sup>	Pathogens <sup>2</sup>
Thymic atrophy in HIV	Herpes simplex virus
Decreased thymocytes count	Semliki forest virus
Decreased thymulin levels	<i>Francisella tularensis</i>
Decreased peripheral T-cell count	<i>Listeria monocytogenes</i>
Decreased delayed hypersensitivity	<i>Salmonella enteritidis</i>
Decreased proliferative response to PHA	Gram-negative bacteria
Decreased T-cell cytotoxic activity	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Decreased T-helper function	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Decreased natural killer activity	<i>Trypanosoma musculi</i>
Decreased macrophage function	<i>Trypanosoma gondii</i>
Decreased neutrophil function	<i>Plasmodium yoelii</i>
Decreased antibody formation	<i>Candida albicans</i>
Decreased IL-2, IL-12, IFN- $\alpha$	<i>Plasmodium phalloparum</i>
Increased IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>
Increased thymic apoptosis	<i>Strongyloides ratti</i>
Reduced DNA-Repaire	<i>Trichinella spiralis</i>
Altered extrathymic T-cell pathway	<i>Fasciola hepatica</i>
	<i>Schistosoma mansoni</i>
	Lepromatous leprosy
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	<i>Haemophilus influenza</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

<sup>1</sup> See Fabris and Mocchegiani (1995).

<sup>2</sup> See Shankar and Prasad (1998).

Extraída de Mocchegiani e Muzzioli, 2000.

## ANEXO 2

**TABLE 2**

*Examples of diseases and conditions where zinc deficiency can alter host defense capacity*

Subjects	Zinc status	Immune parameter(s)
Sickle Cell Anemia <sup>1</sup> 28 yr old subjects	90 µg/dL where 115 µg/dL was normal	NK <sup>4</sup> function 50% normal Decreased IL-2 Anergic DTH <sup>4</sup> 25% increase in urinary infections
Single adult <sup>2</sup> GI disorder Prolonged TPN <sup>4</sup>	40 µg Zn/dL	40% lymphocytes 30% TH 10% NK activity 48% mitogen response
Elderly <sup>1</sup>	108 µg Zn/ dL	Decreased numbers of neutrophils and lymphocytes and decreased IL-2 production
AIDS <sup>3</sup>	Marginally zinc- deficient and/or Se- deficient	Reduced T helper cells Reduced antibody mediated responses Reduced cell mediated responses Increased infection and morbidity

<sup>1</sup> Kaplan et al. 1988.

<sup>2</sup> Allen et al. 1983.

<sup>3</sup> Baum et al. 1995.

<sup>4</sup> Abbreviations used: AIDS, acquired immunodeficiency syndrome; DTH, delayed type hypersensitivity; GI, gastrointestinal; NK, natural killer cells; TPN, total parenteral nutrition; IL, interleukin.

Extraída de Fraker *et al.*, 2000.

## ANEXO 3

**TABLE 2**

*Effect of zinc-adequate diet and supplementation with zinc on frequency of infectious episodes in infected experimental animals and in various congenital and acquired diseases or conditions in humans, respectively*

Pathogens in experimental animals	Reduction (%)	Reference	Disease or condition in humans	Reduction (%)	Reference
<i>Candida albicans</i> (mice)	35	Salvin et al. 1997, Singh et al. 1992	Down's syndrome	50	Licastro et al. 1994
<i>Plasmodium yoelii</i> (mice)	30	Shankar et al. 1995	Malnutrition	35	Castillo-Duran et al. 1987
<i>Trypanosoma cruzi</i> (mice)	35	Fraker et al. 1982	Acrodermatitis enteropathica	38	Chandra 1980
<i>Toxoplasma gondii</i> (mice)	40	Tasci et al. 1995	Congenital herpes (herpes simplex II)	50	Jones 1979
<i>Trichinella spiralis</i> (rat)	40	Fenwick et al. 1990	Leprosy	40	Mathur et al. 1984
			Malaria	35	Shankar et al. 1997
			Chronic diarrhea	30	Sazawal et al. 1995, Ruel et al. 1997
			Acute lower respiratory infection	35	Sazawal et al. 1998
			Burns	30	Berger et al. 1998

The zinc-adequate diet in experimental animals was carried out for 2-3 mo. Supplementation with zinc in humans was carried out for 1-2 mo at physiological dose (USDA 1976). The data for percent reduction in experimental animals was obtained 2 months before and at the end of zinc-adequate diet. The data for humans was obtained 6 mo or 1 y before and 6 mo or 1 y after zinc supplementation.

Extraída de Mocchegiani e Muzzioli, 2000.

## ANEXO 4

### **IN VITRO ZINC SUPPLEMENTATION OF HUMAN MACROPHAGES INFECTED WITH DIFFERENT LEISHMANIA SPECIES STRONGLY REDUCES INTRACELLULAR PARASITE LOAD**

**Santana G., Bahia C., Silva M.P., Báfica A., Barral-Netto M. & Van Weyenbergh J.**

**LIMI - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - Fundação Oswaldo Cruz, Salvador-BA, Brasil.**

In spite of the large amount of literature dedicated to the importance of zinc to the immune response *in vitro* and *in vivo* in numerous infectious and non-infectious diseases, no data exist on the possible role of zinc ( $Zn^{2+}$ ) in leishmaniasis. However, a recent publication describes low serum zinc and iron levels in cutaneous leishmaniasis patients in Turkey (Kocyigit et al., 1998). This zinc deficiency in patients with active disease is of significant interest, considering that zinc is essential to the functioning of cellular immunity, which correlates to resistance and cure in human as well as experimental murine leishmaniasis, while humoral immunity does not. Therefore, we were interested in a possible effect of zinc supplementation *in vitro* on the immune capacity of human macrophages infected with different *Leishmania* species.

Our results show that addition of zinc (as  $ZnCl_2$ ) to macrophages infected with *L. amazonensis* dramatically decreased intracellular parasite load. This leishmanicidal effect of zinc was already observed at 24 h of treatment and gradually increased with time. Reduction in parasite load was maximal at 10  $\mu M$  of  $Zn^{2+}$  and decreased at 30  $\mu M$ , while there was no significant effect at 100  $\mu M$ . Similar results were obtained with macrophages infected with *L. braziliensis* or *L. major*, indicating that the action of zinc was not species-specific.  $Zn^{2+}$  at 10 or 30  $\mu M$  slowed down proliferation of axenically grown *L. amazonensis* promastigotes, but did not have an overt cytotoxic effect, suggesting that the observed leishmanicidal effect of zinc is mediated by the host cell. The molecular mechanism through which zinc reduces intracellular parasite burden is currently under investigation.

XXV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease XIV Meeting of Brazilian Society of Protozoology, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 93: 255, Suppl. II, 1998.