

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários intracelulares obrigatórios da família Tripanossomatidae, da ordem Kinetoplastidae, do gênero *Leishmania*. A maioria das espécies que causam leishmaniose visceral (LV) pertence ao complexo *L. donovani*: *L. donovani* (sin. *Leishmania archibaldi*) e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) (MAURICIO *et al.*, 2000; IBRAHIM e BARKER, 2001; MAURICIO *et al.*, 2001; LUKES *et al.*, 2007). Os vetores são flebotomíneos conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui. No Brasil, duas espécies estão relacionadas com a transmissão da doença, *Lutzomyia longipalpis* e *Lu.cruzi* (LAINSON e RANGEL, 2005). No ambiente silvestre, os reservatórios de *Leishmania* são principalmente as raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*, *D. marsupialis*). O cão (*Canis familiaris*) é aceito como o principal reservatório doméstico da infecção, mas o verdadeiro papel do homem na transmissão da doença ainda não está totalmente definido (COSTA *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2005).

A infecção por *Leishmania* resulta em distintas situações clínicas e imunopatológicas. A LV é a forma mais grave da doença, caracterizada por febre, emagrecimento, hepatoesplenomegalia e pancitopenia, constitui sério problema de saúde pública em diversas regiões tropicais e subtropicais e tem sido alvo de especial atenção nas duas últimas décadas, quando grandes epidemias foram descritas no Sudão, na Índia, em Bangladesh e no Brasil (RAHMAN e ISLAM, 1983; THAKUR, 1984; COSTA *et al.*, 1990; COLLIN S, 2004). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que aproximadamente 500.000 casos da doença e 50.000 óbitos ocorram a cada ano nos 88 países onde a LV é endêmica (WHO, 2002) (DESJEUX, 2004). Estes números representam aproximações, pois a notificação é compulsória em somente 32 dos países endêmicos e mesmo nestes acredita-se que considerável proporção de casos não seja notificada (COLLIN *et al.*, 2006; MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2007).

A primeira identificação de *Leishmania* em material de biópsia hepática *post mortem* no Brasil foi feita em 1934 (PENNA, 1934) e o primeiro caso da doença em indivíduo vivo foi relatado em 1936 (CHAGAS, 1936). A LV foi descrita como endemia predominantemente rural em diversas regiões do país desde então (ALENCAR, 1977), embora a ocorrência da doença de forma endêmica em meio urbano tenha sido relatada desde 1955 (DEANE e DEANE, 1955). Contudo, somente a partir de 1980 epidemias foram notificadas em cidades

do Nordeste e avançaram para as regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste, onde a doença apresenta-se de forma especialmente grave em crianças (COSTA *et al.*, 1990; JERONIMO *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2001; PEDROSA e DA ROCHA, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006; DAHER *et al.*, 2008) e em pessoas portadoras de imunodeficiências e origina quadros de difícil diagnóstico e tratamento (SINHA *et al.*, 2005; CRUZ *et al.*, 2006). As condições que propiciaram a instalação da leishmaniose em regiões urbanas do Brasil relacionam-se possivelmente ao desmatamento, às condições precárias de saneamento decorrentes do crescimento desordenado das cidades que favoreceram a adaptação do vetor *Lu. longipalpis* e propiciaram o contato direto entre os ciclos silvestre e urbano da LV. Por outro lado, o êxodo rural intenso nas últimas décadas, as moradias superpovoadas e a abundância de reservatórios caninos no peridomicílio facilitaram o contato de pessoas suscetíveis com o parasito (COSTA *et al.*, 1990; COSTA *et al.*, 2005; LAINSON e RANGEL, 2005) e contribuíram para a emergência da primeira epidemia urbana de LV ocorrida em Teresina, Piauí, entre 1981 e 1985, quando aproximadamente 1000 casos da doença foram detectados. A segunda epidemia nesta capital começou no início da década 1990 e entre 1993 e 1995 foram notificados mais de 1200 casos. Níveis endêmicos elevados têm se mantido desde então (WERNECK *et al.*, 2002). É possível que alguma parcela desta epidemia tenha sido o resultado do melhor reconhecimento da doença ou da maior acessibilidade aos serviços de saúde, com aumento da visibilidade da endemia pré-existente (DESJEUX, 1996).

A letalidade da LV no Brasil apresenta tendência crescente, com oscilação entre 7 e 13,3% (REY *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006; CAVALCANTE, 2007), níveis comparáveis aos encontrados em campos de refugiados no Sudão (SEAMAN *et al.*, 1996; COLLIN S, 2004). O rápido processo de urbanização da doença, a expansão da epidemia de AIDS, o acometimento de grupos vulneráveis em consequência da grande força de transmissão da infecção e o diagnóstico tardio são condições possivelmente relacionadas a este desfecho desfavorável. Os fatores de risco para o óbito em pacientes com LV não são suficientemente conhecidos, mas as infecções bacterianas e os distúrbios da coagulação têm sido identificados como os mais importantes preditores do mau prognóstico (ANDRADE *et al.*, 1990; SEAMAN *et al.*, 1996; PASTORINO *et al.*, 2002; ABDELMOULA *et al.*, 2003; WERNECK *et al.*, 2003).

A pouca eficácia das medidas do controle de vetores e de reservatórios em reduzir a transmissão da *Leishmania* remete a solução imediata para este grave problema de saúde pública ao diagnóstico e ao tratamento das pessoas acometidas. A compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da LV poderá contribuir para a identificação precoce dos

pacientes com maior risco de evolução desfavorável, para a prevenção destas complicações ou para novas propostas de tratamento que possam em curto prazo, reduzir o impacto da letalidade da LV.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Manifestações clínicas na leishmaniose visceral americana

As manifestações da LV podem variar desde a infecção assintomática até a doença progressiva e potencialmente fatal, caracterizada por febre, emagrecimento, pancitopenia, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia e caquexia, mas com grande variabilidade entre os indivíduos (ZIJLSTRA *et al.*, 1991; BERMAN, 1997; HERWALDT, 1999). O período de incubação varia de três a oito meses (PISCOPO e MALLIA AZZOPARDI, 2007), mas pode ser tão breve quanto 10 dias (MANSON-BAHR e APTED, 1982) apud (PEARSON e SOUSA, 1995), tão longo quanto 34 meses (STONE *et al.*, 1952) ou até maior que quatro anos (NETO, 1978).

A LV predomina em crianças nos primeiros anos de vida, e associa-se a grande morbidade e elevado número de óbitos (AL-JURAYYAN *et al.*, 1995; GRECH *et al.*, 2000; ABDELMOULA *et al.*, 2003; PEDROSA e DA ROCHA, 2004; MINODIER *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005). Em contraposição, na vida adulta a letalidade aumenta proporcionalmente à idade, especialmente após 60 anos de idade (CALDAS *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Contudo, muito pouco se conhece sobre o efeito da idade sobre as diferenças entre a resposta imune contra *Leishmania*. É bem reconhecido que a susceptibilidade dos animais às infecções aumenta com o envelhecimento, um processo denominado imunosenescência (TRAMONT e HOOVER, 1995; KUMAR e BURNS, 2008). Adicionalmente, outros fatores sociais e ambientais concorrem para explicar a predisposição às infecções em diferentes idades. Em estudos experimentais, foi verificado que o número de formas amastigotas de *Leishmania donovani* no baço de animais jovens era significativamente mais elevado nos primeiros dias após a infecção quando comparado ao grupo de animais adultos (SINGH *et al.*, 2007). Em um estudo prospectivo no Irã foi relatado que a soroprevalência assim como o risco de desenvolvimento de LV após infecção por *Leishmania infantum* decrescia com o avanço da idade. (DAVIES e MAZLOUMI GAVGANI, 1999). Foi verificado, na Índia, que as crianças com LV apresentavam, antes do tratamento, níveis mais altos de IL-10 que os adultos (ANSARI *et al.*, 2006). Como os níveis de IL-10 estão ligados à maior carga parasitária, maior persistência parasitária e maior gravidade da doença (GROUX *et al.*, 1999; ALVES *et al.*, 2009), os níveis elevados desta citocina nos primeiros anos de vida podem explicar, pelo menos em parte, porque aproximadamente metade dos pacientes com

LV no mundo são crianças. Foi relatado, no Brasil, que a duração da doença é maior em adultos com LV e que estes apresentam mais sangramento e mais linfonomegalia, mas que as crianças estão em maior risco de apresentar doença grave, evidenciada pela maior incidência de hepatomegalia e de anemia. (CALDAS *et al.*, 2006).

A distribuição da doença entre os sexos é semelhante durante a infância, mas predomina em homens a partir da adolescência (DEANE e DEANE, 1962; EVANS *et al.*, 1992; PEDROSA e DA ROCHA, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Estudos em animais sugerem que hormônios sexuais como a testosterona (MOCK e NACY, 1988) ou os estrogênios (PUNG *et al.*, 1985) alteram a susceptibilidade à infecção por parasitos intracelulares. Ademais, os hábitos de vida relacionados à maior permanência dos homens fora do domicílio, com maior superfície corporal exposta aumentam a vulnerabilidade à infecção (COSTA *et al.*, 1990; CALDAS *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Quando a doença segue curso subagudo ou crônico, há apresentação insidiosa de febre, adinamia, inapetência, perda de peso, palidez e aumento do volume abdominal decorrente da hepatoesplenomegalia. À época do diagnóstico o paciente pode apresentar-se debilitado e incapacitado de exercer suas atividades usuais (DESJEUX, 1996). Os sintomas podem persistir por semanas ou meses (HERWALDT, 1999). A febre pode ser intermitente ou remitente, mas costuma ser bem tolerada. A presença de calafrios pode sugerir a possibilidade de malária ou de bacteriemia (JERONIMO *et al.*, 2005). Um estudo encontrou associação entre hipotermia ou ausência de febre com a morte (ABDELMOULA *et al.*, 2003). A hepatoesplenomegalia está presente na maioria dos pacientes e o aumento do baço quase sempre é mais evidente que o aumento do fígado (JERONIMO *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2006; CAVALCANTE, 2007). O aumento dos linfonodos é muito freqüente na LV do velho mundo (ZIJLSTRA *et al.*, 1991; RATHORE *et al.*, 1996; BABIKER *et al.*, 2007), mas é menos evidente na leishmaniose americana. No Brasil, alguns autores relataram altas prevalências de linfonomegalia (PRATA, 1957; ALENCAR, 1959; PASTORINO *et al.*, 2002; DAHER *et al.*, 2008), enquanto outros não fizeram referência a aumento dos linfonodos (SILVA *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2001; PASTORINO *et al.*, 2002; GUERRA *et al.*, 2004; QUEIROZ *et al.*, 2004; CAVALCANTE, 2007).

A desnutrição tem sido descrita como fator de risco para a aquisição da LV, especialmente em crianças vivendo em áreas endêmicas (BADARÓ, JONES, LORENCO *et al.*, 1986; HARRISON *et al.*, 1986; CERF *et al.*, 1987; DYE e WILLIAMS, 1993; ANSTEAD *et al.*, 2001; CALDAS *et al.*, 2002; MACIEL *et al.*, 2008) mas ainda se discute sobre o prognóstico da doença em relação ao estado nutricional. Alguns estudos realmente

relataram que os pacientes desnutridos têm pior prognóstico, maior letalidade e maior índice de complicações como infecções bacterianas (CUNHA *et al.*, 1995; SEAMAN *et al.*, 1996; PASTORINO *et al.*, 2002; COLLIN S, 2004; REY *et al.*, 2005; CAVALCANTE, 2007). Foi observado que camundongos BALB/c. recebendo dietas deficientes em proteínas, ferro e zinco, e posteriormente vacinados com antígenos de *L.infantum*, apresentaram cargas parasitárias hepática e esplênica mais intensas quando desafiados com injeção de promastigotas e que mesmo após a recuperação nutricional, a produção de IFN- $\gamma$  se manteve reduzida, numa evidência de que a desnutrição altera a resposta imune à *Leishmania*. (MALAFAIA *et al.*, 2009). Níveis baixos de zinco foram relatados na LV assim como em outras formas da leishmaniose e os níveis mais altos de cobre associaram-se à inibição da produção de IFN-g e maior susceptibilidade para a doença (VAN WEYENBERGH *et al.*, 2004; BERN *et al.*, 2007). Os efeitos globais da desnutrição protéico-calórica e da deficiência seletiva de oligoelementos em pessoas com infecção por *Leishmania*, contudo, ainda não estão elucidados. Muitos pacientes com LV apresentam-se caquéticos (MARTINS *et al.*, 1965; QUEIROZ *et al.*, 2004), principalmente quando a duração da doença é muito longa (PRATA, 1957; ALENCAR, 1977). Este estado de consumo nutricional é possivelmente mediado pelos efeitos de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  que têm efeitos catabólicos e anoréticos (DINARELLO *et al.*, 1986; PEARSON *et al.*, 1992).

As complicações mais frequentemente associadas ao óbito são as infecções bacterianas e os distúrbios da coagulação sanguínea. A frequência de infecções bacterianas na LV varia de 11% (QUEIROZ *et al.*, 2004) a 60% (ANDRADE *et al.*, 1990) nos relatos nacionais publicados e podem ser a primeira manifestação da LV (GARCÉS *et al.*, 1990). Diversos patógenos e diversas formas de apresentação destas infecções foram descritas, mas as infecções respiratórias e urinárias parecem ser as mais importantes (ANDRADE *et al.*, 1990; KADIVAR *et al.*, 2000; BARATI *et al.*, 2008). As alterações da coagulação sanguínea foram descritas nos primeiros relatos da doença no Brasil (PRATA, 1957; ALENCAR, 1977) e são fortemente associadas ao risco de morte. Equimoses, epistaxes, petéquias, sangramentos digestivos e de mucosas gengivais podem ocorrer isoladamente ou em associação e podem ocasionar complicações graves com choque seguido de morte (KOTWAL *et al.*, 2000).

O acometimento hepático na LV é bem reconhecido e formas graves têm sido descritas (KHALDI *et al.*, 1990; BARANWAL *et al.*, 2007; ASHKAN e RAHIM, 2008). Uma possível ativação do sistema fagocítico mononuclear tem sido proposta como explicação fisiopatológica deste fenômeno (KHALDI *et al.*, 1990), com base imunológica (EL HAG *et al.*, 1994).

Alterações renais ocorrem em grande proporção dos pacientes, mas tendem a ser leves e reversíveis após o tratamento (DUTRA *et al.*, 1985). Contudo, síndrome nefrítica aguda (SALGADO-FILHO *et al.*, 2003), nefrite intersticial e insuficiência renal foram descritas (CARAVACA *et al.*, 1991; DAHER *et al.*, 2008).

Sintomas pulmonares são comuns em pacientes com LV e frequentemente são atribuídos a complicações bacterianas (PRATA, 1957; ALENCAR, 1959; ANDRADE *et al.*, 1990; KADIVAR *et al.*, 2000), mas pneumonite intersticial foi descrita em autópsia de paciente com LV (ANDRADE, 1959). O acometimento pulmonar na LV foi descrito em estudos histopatológicos e ultraestruturais usando modelos animais {Duarte, 1987 #176}. Este estudo mostrou que as alterações pulmonares na LV ocorrem em três fases distintas caracterizadas como exudativa, celular e fibrótica, envolvendo principalmente o septo interalveolar, com participação de células mononucleares intersticiais e inclusões lipídicas, e com envolvimento mínimo dos brônquios e alvéolos. (DUARTE *et al.*, 1989). Mais recentemente foi descrito que esta pneumonite intersticial é um processo inflamatório com padrão Th2 (TUON *et al.*, 2009), o que aumenta a chance de infecção bacteriana secundária e é consistente com o acometimento de outros órgãos.

Diversas outras manifestações podem ser vistas de forma menos consistente em pacientes com LV, como tosse, vômitos, cefaléia, diarreia (CAMPOS-JR., 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2006), artralgia, dor abdominal (SINGH *et al.*, 1999; QUEIROZ *et al.*, 2004), púrpura (RIZOS *et al.*, 2005), glomerulonefrite (CHAIGNE *et al.*, 2004), nefrite intersticial (DUARTE *et al.*, 1983) e síndrome hemofagocítica (GAGNAIRE *et al.*, 2000; AGARWAL *et al.*, 2006; SOTUCA FERNANDEZ *et al.*, 2008), síndrome de Guillain-Barré (ATTARIAN *et al.*, 2003).

Nas duas últimas décadas a LV foi reconhecida como importante doença oportunista em pacientes com HIV e mudou a história natural da LV. A coinfeção LV/HIV já foi notificada em pelo menos 35 países em uma proporção que varia de 2 a 12% com tendências a aumentar dramaticamente (WHO, 2007; ALVAR *et al.*, 2008). Em regiões onde ambas as infecções são endêmicas, a incidência de LV em indivíduos infectados pelo HIV pode ultrapassar 30% (LYONS *et al.*, 2003). A infecção pelo HIV eleva a chance de um indivíduo desenvolver LV em 100 a 1000 vezes, reduz as possibilidades terapêuticas e aumenta consideravelmente a possibilidade de reativações (GUERIN *et al.*, 2002; DESJEUX, 2004; WHO, 2004). A maior incidência da coinfeção *Leishmania*/HIV tem sido observada na bacia do Mediterrâneo, com mais de 2000 casos notificados à Organização Mundial de Saúde (OMS). No Brasil a coinfeção LV/HIV tem sido descrita em pequenas séries de casos, mas a real incidência pode

estar subestimada devido a falhas do sistema de vigilância epidemiológica (RABELLO *et al.*, 2003; CRUZ *et al.*, 2006). No Piauí, a LV foi diagnosticada em 8,2% de uma série de 828 pacientes internados com HIV/AIDS, mas não foi identificada associação com o óbito (SOARES *et al.*, 2008). A doença pode se apresentar com as mesmas características da população geral, mas manifestações atípicas ocorrem em aproximadamente 15% dos casos (CRUZ *et al.*, 2006) e a doença é marcada por alto índice de reativações (LOPEZ-VELEZ *et al.*, 2004). O envolvimento do trato gastrointestinal, trato respiratório, linfonodos, pele ou sistema nervoso é mais frequentemente observados em pacientes imunodeprimidos (PETERS *et al.*, 1990; SINHA *et al.*, 2005). Ambos, HIV e *Leishmania* podem se multiplicar nas mesmas células, como macrófagos e células dendríticas e estabelecer infecção latente. A ativação imune crônica mediada por citocinas induzidas por um dos patógenos pode alterar o curso da doença causada pelo outro patógeno, levando a um ciclo vicioso de multiplicação incontrolada tanto do HIV quanto da *Leishmania*. (BENTWICH *et al.*, 1998; WOLDAY *et al.*, 1999; GARG *et al.*, 2007). Discute-se se a coinfeção LV/HIV resultaria de infecção primária ou de reativação, uma vez que a infecção primária por *Leishmania* poderia favorecer a imunossupressão em paciente previamente infectado pelo HIV ou, de igual modo, a infecção latente por *Leishmania* poderia ser reativada pela depleção imunológica da AIDS (PAREDES *et al.*, 2003; MARQUES *et al.*, 2007).

## **2.2. Diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral**

O diagnóstico da LV é complexo pela diversidade das manifestações clínicas, comuns a outras condições como malária, hipertensão porta, esquistossomose, tripanossomíase africana, tuberculose miliar, brucelose, AIDS, febre tifóide, endocardite bacteriana, histoplasmose, leucemias, aplasia de medula (HERWALDT, 1999; AL-GHAZALY *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2008). A confirmação laboratorial é, portanto, necessária e requer um sensível balanço entre a sensibilidade e a especificidade e entre o custo e os riscos.

Os achados laboratoriais inespecíficos incluem anemia, leucopenia, plaquetopenia, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia, com múltiplos fatores envolvidos na sua gênese, como hiperesplenismo, resposta imune e deficiências nutricionais (KOTWAL *et al.*, 2000). A anemia pode ser normocítica e normocrômica (PRATA, 1957), microcítica e hipocrômica (ALENCAR, 1959; AL-JURAYYAN *et al.*, 1995; SINGH *et al.*, 1999; GRECH *et al.*, 2000) ou megaloblástica (SINHA *et al.*, 2006) e pode ser muito intensa e levar à descompensação hemodinâmica (QUEIROZ *et al.*, 2004). Acreditava-se inicialmente que estas alterações

fossem conseqüentes à insuficiência medular secundária ao parasitismo, contudo, os estudos posteriores revelaram que a medula óssea é quase sempre hiper celular ou normocelular (MOURÃO, 1960; AL-JURAYYAN *et al.*, 1995). Não há evidências de que esta anemia seja devida a eritropoiese deficiente. Estudo realizado em Israel sugeriu que a pancitopenia é facilitada pela resposta imune através da opsonização de hemácias, leucócitos e plaquetas por autoanticorpos (POLLACK *et al.*, 1988). Mais recentemente tem sido sugerido que estas alterações sejam relacionadas à destruição periférica aumentada de células no baço coordenada pela resposta inflamatória. (WOODRUFF *et al.*, 1972). Foi observado que citocinas inflamatórias estavam associadas à produção deficiente de eritropoietina em culturas de células (FAQUIN *et al.*, 1992), e esta é uma atraente explicação patogenética da anemia das doenças crônicas. A descrição de anemia associada a hipoferrinemia e aumento das reservas de ferro no organismo durante a LV (PIPPARD *et al.*, 1986) sugere que a hiperplasia reticuloendotelial seja acompanhada da retenção anormal de ferro nos macrófagos, típica da anemia das doenças crônicas. Neste sentido, a hepcidina, uma proteína da fase aguda da inflamação, com secreção mediada pela ação da citocina IL-6 durante a inflamação e responsável pela hipoferrinemia dos estados de inflamação (NEMETH *et al.*, 2004) pode estar envolvida. A hepcidina é um importante regulador da absorção e da distribuição de ferro no organismo e tem sido associada à anemia em diversas entidades inflamatórias crônicas como insuficiência renal crônica (KULAKSIZ *et al.*, 2004; TOMOSUGI *et al.*, 2006) e artrite reumatoide (DEMIRAG *et al.*, 2009). Seu papel na gênese da anemia da LV, contudo, ainda não foi investigado.

O diagnóstico pode ser confirmado por diversas formas: (i) visualização direta de parasitos em amostras de tecido, cultura ou inoculação em animais; (ii) detecção de ácido desoxirribonucléico (DNA) em amostras de tecido ou (iii) imunodiagnóstico através da detecção de antígenos do parasito em amostras de tecido, sangue, urina ou através da detecção de anticorpos antileishmania (SUNDAR e RAI, 2002). Os exames parasitológicos constituem a referência do diagnóstico, mas exigem procedimentos invasivos e têm sensibilidade dependente do treinamento dos laboratoristas e do tempo dedicado à busca (SILVA *et al.*, 2005). O exame microscópico de aspirado esplênico possui alta sensibilidade que varia entre 95 e 98% (KAGER *et al.*, 1983; ZIJLSTRA *et al.*, 1992), mas exige procedimentos invasivos com complicações potencialmente graves, mesmo com as técnicas consideradas mais seguras (CHULAY e BRYCESON, 1983). A sensibilidade na detecção de formas amastigotas em esfregaços de medula óssea tem sensibilidade de 70% (ZIJLSTRA *et al.*, 1992; CHOUHI *et al.*, 2008), mas que pode ultrapassar 95% quando o material é examinado por técnico

experiente durante 60 minutos (SILVA *et al.*, 2005). Os parasitos também podem ser detectados no material de biópsia hepática ou de linfonodos, mas com menor sensibilidade (ZIJLSTRA *et al.*, 1992). O cultivo de parasitos em diversos meios de cultura como meio monofásico de Schneider ou meio difásico de Novy-McNeal Nicolle (NNN) paralelo à pesquisa direta pode aumentar a sensibilidade da detecção. A cultura de medula óssea tem sensibilidade de aproximadamente 70% e a cultura do creme leucocitário do sangue periférico alcança sensibilidade de 60% (CHOUHI *et al.*, 2008), aproxima-se a 70% em pacientes co-infectados pelo HIV (LOPEZ-VELEZ *et al.*, 1995) e pode ser útil em situações em que o aspirado de medula óssea não possa ser viabilizado. As técnicas tradicionais de cultura exigem período de incubação de até quatro semanas (SUNDAR e RAI, 2002), mas novas técnicas de microcultura utilizando tubos capilares ou técnicas de minicultura usando placas de 96 poços ou microtubos (*Eppendorf*) demonstraram vantagens relacionadas ao menor custo, simplicidade no preparo e manuseio, maior sensibilidade e menor tempo de incubação, mesmo com baixas parasitemias (ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2005; IHALAMULLA *et al.*, 2005; HIDE *et al.*, 2007; BOGGILD *et al.*, 2008).

A detecção de DNA do parasito em amostras de sangue, medula óssea ou produtos de biópsias mediante a reação de polimerização em cadeia (*Polimerase chain reaction, PCR*) é promissora, mas falta padronização da técnica e sua aplicabilidade ainda é restrita pelo custo elevado (RABELLO *et al.*, 2003). A técnica apresenta sensibilidade superior à pesquisa direta em microscópio ótico (ALAM, SHAMSUZZAMAN *et al.*, 2009), e é comparável à pesquisa de amastigotas em aspirado esplênico. O método de PCR em tempo real apresenta as mesmas dificuldades da técnica convencional, apresenta sensibilidade comparável, mas pode ter utilidade no acompanhamento da carga parasitária durante o tratamento (LACHAUD *et al.*, 2000), na definição da cura da infecção (BASTIEN *et al.*, 2008) e na identificação de recidivas (BOURGEOIS *et al.*, 2008).

Os métodos imunodiagnósticos que detectam anticorpos ou antígenos são úteis em situações em que não foi possível detectar o parasito. Os testes baseados em antígenos são mais específicos que os testes baseados em anticorpos e são promissores para casos em que a produção de anticorpos é insuficiente, como em pacientes com AIDS (SUNDAR e RAI, 2002), além de apresentar bom valor prognóstico, com utilidade no acompanhamento do tratamento (COLMENARES *et al.*, 1995). Vários métodos imunodiagnósticos baseados na detecção de anticorpos como difusão em gel, reação de fixação de complemento, teste de hemaglutinação indireta, teste indireto de anticorpos fluorescentes e contraímuno eletroforese têm sido alvo de progressivos aperfeiçoamentos, mas ainda

apresentam limitações relacionadas à sensibilidade e à especificidade (SUNDAR e RAI, 2002). O teste de aglutinação direta (DAT) é simples e de baixo custo, apresenta sensibilidade e especificidade entre 70 e 100% (PEDRAS *et al.*, 2008) e tem se mostrado útil como primeiro instrumento diagnóstico em área endêmica (BOELAERT *et al.*, 2004). Os testes imunocromatográficos são de fácil execução e interpretação, não necessitam infra-estrutura laboratorial, não exigem laboratoristas especializados, e são hoje promissores para o diagnóstico rápido em áreas endêmicas onde o acesso às técnicas laboratoriais é dificultado. A sensibilidade e a especificidade do teste em diversos estudos têm sido acima de 98% (SUNDAR *et al.*, 1998; BERN *et al.*, 2000). Uma meta-análise recentemente publicada analisou o desempenho do DAT e dos testes imunocromatográficos que utilizam o antígeno rK39, e classificou-os como bons a excelentes, e comparáveis entre si (CHAPPUIS *et al.*, 2006). Um estudo multicêntrico com um teste comercial para detecção de anticorpo contra o antígeno rK39 da *L.chagasi* realizado no Brasil mostrou sensibilidade de 93% e especificidade de 97% (ASSIS *et al.*, 2008) e abre a perspectiva para o diagnóstico rápido, de fácil realização e interpretação.

### **2.3. Citocinas proinflamatórias na leishmaniose visceral**

Os mecanismos da eliminação de *Leishmania* do organismo ou a predisposição à infecção não são totalmente compreendidos. A participação da resposta imune adaptativa nas alterações observadas em pacientes com LV é reforçada por diversas evidências: a hipergamaglobulinemia é constante nestes pacientes; o teste de Coombs pode ser positivo em pacientes com LV clássica ou associada à anemia hemolítica (POLLACK *et al.*, 1988; MAHAJAN e MARWAHA, 2007); a melhora clínica, parasitológica e hematológica é precedida da liberação de imunocomplexos circulantes (PEARSON *et al.*, 1983). A resposta humoral que se segue à infecção é caracterizada por estimulação policlonal das células B e produção de anticorpos anti-leishmania (EL AMIN *et al.*, 1986), responsável pela hipergamaglobulinemia quase sempre presente em pessoas com LV (PEARSON e SOUSA, 1995). É possível que os anticorpos desempenhem função importante nas interações precoces entre promastigotas e macrófagos, que são críticas para o desenvolvimento da infecção (PEARSON *et al.*, 1983). No entanto, para outros, o real papel da resposta imune humoral na LV não está esclarecido (SAHA *et al.*, 2006). O teste cutâneo de Montenegro é negativo na fase de atividade da doença, quando altos níveis de anticorpos contra os antígenos de *Leishmania* são detectáveis e torna-se positivo após o tratamento, mas não está associado ao

prognóstico da doença (WILSON *et al.*, 2005; ALMEIDA SILVA *et al.*, 2006). A ocorrência de infecções subclínicas ou assintomáticas em uma grande proporção de indivíduos que residem nas áreas endêmicas associada à detecção de anticorpos anti- *Leishmania* (BADARÓ, JONES, CARVALHO *et al.*, 1986) constitui evidência da participação de imunidade naturalmente adquirida no curso da infecção.

É bem aceito que a resposta imune mediada por células desempenha importante função na susceptibilidade e na resistência à infecção e também na resposta à quimioterapia (AWASTHI *et al.*, 2004). Duas populações de linfócitos T auxiliares (T *helper*-Th) com diferentes papéis de proteção e diferentes tipos de reações imunopatológicas participam da produção de citocinas. Células T-*helper* tipo-1 (Th1) produtoras de IFN- $\gamma$  produzem IFN- $\gamma$  e IL-2 e sua ativação promove a opsonização dos antígenos fixadores de complemento, ativação de macrófagos, respostas citotóxicas dependentes de anticorpos e hipersensibilidade tardia. Por estas razões as células Th1 são consideradas responsáveis pela resposta imune dependente de macrófagos e responsável pela eliminação da *Leishmania* com conseqüente resistência à doença (AWASTHI *et al.*, 2004). A população de linfócitos CD4 denominada T-*helper* tipo-2 (Th2) por outro lado, é produtora de fatores de estimulação de linfócitos B como as IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, sendo essencial na resposta humoral (ROMAGNANI, 1996) e associa-se a maior sobrevivência do parasito no meio intracelular (GAMA *et al.*, 2004). Fatores ambientais e genéticos agem em concerto para determinar a polarização Th1 ou Th2 (ROMAGNANI, 2000). Em modelos animais esta imunidade mediada por células é nitidamente polarizada. Animais resistentes à infecção produzem grande quantidade de IFN- $\gamma$  em resposta aos antígenos da *Leishmania* enquanto animais susceptíveis produzem mais IL-4 (HEINZEL *et al.*, 1989). Esta polaridade não é tão clara na infecção humana e a resposta imune Th1/Th2 mista tem sido observada em diversos estudos (BERMAN, 1997)).

As citocinas são produzidas em resposta a diferentes antígenos e podem estimular diversas respostas celulares envolvidas na imunidade e na inflamação. A ação das citocinas frequentemente é pleiotrópica e redundante. As citocinas geralmente influenciam a síntese e a ação de outras citocinas, levando a uma cascata onde a segunda ou a terceira citocina pode mediar os efeitos biológicos da primeira. Duas citocinas, ademais, podem ter efeitos antagônicos ou sinérgicos, locais ou sistêmicos. As respostas às citocinas consistem em mudanças na expressão genética nas células alvo, o que resulta em novas funções e algumas vezes, na proliferação de células-alvo. As citocinas são classificadas em três categorias: mediadores e reguladores da imunidade inata, mediadores e reguladores da imunidade adaptativa, e estimuladores da hematopoiese. Em geral as citocinas da imunidade inata e

adaptativa são produzidas por diferentes populações de células e agem em diferentes células-alvo. Estas distinções não são absolutas, uma vez que uma mesma citocina pode ser produzida durante reações da imunidade inata ou adaptativa e diferentes citocinas podem ter ações sobrepostas. As citocinas da imunidade inata são mediadores locais ou sistêmicos da inflamação, produzidas em grande quantidade principalmente pelos macrófagos, neutrófilos e células *natural-killer* (NK) em resposta a agentes infecciosos, apresentam efeitos locais e sistêmicos e usualmente são detectáveis no soro. Diferentemente, as citocinas da imunidade adaptativa regulam o crescimento e a ativação de linfócitos de células efetoras. Estas citocinas são produzidas principalmente pelos linfócitos T, em pequenas quantidades, em resposta ao reconhecimento específico de antígenos estranhos, usualmente são indetectáveis no soro e quase sempre têm apenas efeito local (ABBAS *et al.*, 2007).

### 2.3.1. Propriedades e ações das citocinas estudadas

Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é o principal mediador da resposta inflamatória aguda e é responsável por várias complicações da infecção grave. A maior fonte de TNF são as células mononucleares ativadas. TNF estimula a migração dos neutrófilos e monócitos para os locais da infecção, induz a expressão de moléculas de adesão e a secreção de quimiocinas pelo endotélio. TNF também estimula a secreção de IL-1 que tem funções muito próximas às dele próprio. Em infecções graves, o TNF é produzido em grandes quantidades e induz febre, inibição da contratilidade miocárdica, ativação endotelial, hipoglicemia. A produção prolongada de TNF leva à caquexia. O choque séptico, a complicação mais grave da sepse, é caracterizado por colapso circulatório, CID, e alterações metabólicas devidos à produção de TNF, IL-12, INF- $\gamma$ , e IL-1. A citocina TNF $\alpha$  tem sido associada à anemia das doenças crônicas como acontece na insuficiência renal crônica (COOPER *et al.*, 2004). Uma recente revisão sobre as funções desta citocina na fisiopatologia das doenças pulmonares revela a sua ampla participação em diversas situações como a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), pneumonia bacteriana, lesão pulmonar aguda (LPA), doença pulmonar obstrutiva crônica, asma e bronquite crônica (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2006). Diante disto evidencia-se a importância de se buscar terapias anti-TNF para as doenças inflamatórias.

Interleucina 1 (IL-1), conhecida como pirogênio endógeno, produzida principalmente pelas células mononucleares, é importante mediador da resposta inflamatória aguda, com

função semelhante ao TNF- $\alpha$ , embora seus receptores sejam estruturalmente diferentes. Está ainda envolvida na formação de granuloma e tem ação sobre a resolução da infecção por diversos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Toxoplasma gondii* e *Schistosoma mansoni*. A ação conjunta de IL-1 e IL-6 aumenta a síntese hepática de certas proteínas, constituindo a fase aguda da resposta inflamatória. Uma recente discussão sobre a importância desta citocina (DINARELLO, 2009) afirma que o domínio citoplasmático do receptor de IL-1 é altamente homólogo aos domínios de todos os receptores *Toll-like* (TLRs). Assim, respostas inflamatórias fundamentais como a indução de cicloxigenase, aumento da expressão de moléculas de adesão ou síntese de óxido nítrico induzidas por IL-1 são indistinguíveis das mesmas respostas induzidas por TLRs. Tanto IL-1 como TLRs afeta o reconhecimento de antígenos e a função dos linfócitos. A secreção de IL-1 $\beta$  por células mononucleares circulantes de pacientes durante a fase aguda da LV *in vitro* é reduzida em comparação aos controles (ZWINGENBERGER *et al.*, 1991) e também no período pós-tratamento (HO *et al.*, 1992).

Quimiocina CXCL-8, originalmente chamada IL-8 e também denominada fator quimiotático de neutrófilos: As quimiocinas (citocinas quimiotáticas) são citocinas que estimulam o movimento de neutrófilos e macrófagos, e regulam a migração de leucócitos do sangue para os tecidos e constituem a primeira linha de defesa contra infecções.. As quimiocinas envolvidas na resposta inflamatória são produzidas pelos leucócitos e por diversos tipos de células como células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos e recrutam as células de defesa para os sítios de infecção. CXCL-8 é produzida em grande quantidade no curso de doenças agudas inflamatórias como sepse (FUJISHIMA, S *et al.*, 1996; BOZZA *et al.*, 2007). A quimiocina CXCL-8 age principalmente recrutando neutrófilos, em cooperação às citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1. Níveis elevados de CXCL-8 no plasma de pacientes com infecção por *L.chagasi* associam-se a forte efeito quimiotático, ativação de citocinas e efeito anti-apoptose dos neutrófilos induzidos por *Leishmania* (PERUHYPE-MAGALHAES *et al.*, 2006).

Interleucina 12 (IL-12), também chamada fator estimulador de células *natural killer*, é o principal mediador da resposta imune inata imediata e é crítica para iniciar a sequência de respostas envolvendo macrófagos, células NK, e linfócitos T citotóxicos, estimulando a produção de IFN- $\gamma$ . Conjuntamente, IL-12 e IFN- $\gamma$  agem na ativação de macrófagos que

promoverão a morte de micróbios fagocitados. IL-12 é uma importante ligação entre a imunidade adaptativa e inata, pois induz a resposta Th1 e exerce efeito regulatório sobre a resposta Th2 pela produção de IL-10, inibindo a produção de IFN- $\gamma$  através da supressão da síntese de IL-12 (BACELLAR *et al.*, 2000). Foi demonstrado em experimento *in vitro* que, na presença de IL-12 a produção de IL-4 por linhagens de células era reduzida, enquanto a produção de IFN- $\gamma$  era exacerbada (MANETTI *et al.*, 1993). Outro experimento revelou que a adição de IL-12 ou de anti-IL-10 pode restaurar a produção de IFN- $\gamma$  em culturas de células e que, inversamente, a neutralização da cultura com anti-IL-12 ou receptores de IL-10 inibe a produção de IFN- $\gamma$  (BACELLAR *et al.*, 2000). O efeito contra-regulatório de IL-10 sobre IL-12 é de fundamental importância na modulação da resposta imune Th1/Th2.

Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ): Os interferons são citocinas que participam da imunidade inata precoce contra infecções virais e promove a imunidade celular contra micróbios intracelulares. IFN- $\gamma$  aumenta a atividade citotóxica de células NK, estimula o desenvolvimento de células Th1 e promove a ativação de linfócitos pela sequestração destas células nos linfonodos. O IFN- $\gamma$  estimula a atividade microbicida contra amastigotas e promastigotas de *Leishmania* em monócitos humanos tanto pela via dependente de peróxido de hidrogênio (MURRAY e CARTELLI, 1983) como pela via dependente de óxido nítrico (FORGET *et al.*, 2006). IFN- $\gamma$  é capaz de induzir a produção de TNF- $\alpha$  e de IL-1 pelos monócitos em resposta à infecção por *Leishmania* e também é capaz de abolir a inibição de IL-1 induzida pela infecção (REINER *et al.*, 1990).

Interleucina 10 (IL-10) foi inicialmente caracterizada como citocina Th2, mas hoje se reconhece que é uma citocina pleiotrópica, secretada por diferentes tipos de células, inclusive macrófagos. IL-10 é um potente inibidor da resposta imune do hospedeiro, particularmente da resposta de macrófagos e de células dendríticas ativadas, e está envolvida no controle das reações da imunidade inata e da imunidade mediada por células. Esta citocina é produzida durante a fase aguda da LV, concomitante à produção de INF- $\gamma$  e de IL-6 (ANSARI *et al.*, 2006). A síntese de IL-10 contribui para a supressão da atividade microbicida de IFN- $\gamma$  que ocorre na infecção por *L. chagasi* (HOLADAY *et al.*, 1993) através da supressão de IL-12 e ainda exerce função inibitória sobre a morte de *Leishmania* spp nos macrófagos mediada por óxido nítrico. IL-10 está ainda associada ao desenvolvimento da leishmaniose dérmica pós-calazar em pacientes no Sudão (KHARAZMI *et al.*, 1999).

Interleucina 6 (IL-6): é uma citocina multifuncional que participa da imunidade inata e da imunidade adaptativa e exerce efeitos sobre diferentes alvos celulares. É sintetizada por células mononucleares, fibroblastos, e outras células em respostas à infecção e a outras citocinas, notadamente IL-1 e TNF- $\alpha$ . Na imunidade inata a IL-6 estimula a síntese de proteínas de fase rápida pelos hepatócitos, estimula a produção de neutrófilos pela medula óssea e age em concerto com os fatores de estimulação de colônias. As células T *naive* dependem de IL-6 para a sobrevivência no baço, linfonodos e durante a migração para a circulação sanguínea (TEAGUE *et al.*, 2000) e IL-6 é necessária para desencadear e sustentar ambas as respostas, TH1 e Th2 (SAMOILOVA *et al.*, 1998). Verificou-se que os níveis de IL-6 e de TNF- $\alpha$  estavam elevados durante a fase aguda e, por ocasião das reativações de LV em pacientes no Sudão, decresceram aos níveis de detecção após o tratamento, mas não estavam elevados em pacientes com leishmaniose dérmica pós-calazar. (VAN DER POLL *et al.*, 1995). A IL-6 pode estar relacionada à produção aumentada de proteínas de fase aguda, à hipergamaglobulinemia e à indução de febre em pacientes com LV.

#### **2.4. Interação *Leishmania*-hospedeiro**

Os neutrófilos são as primeiras células a migrar para o local da infecção após a inoculação de promastigotas de *Leishmania* pelos flebotomíneos, e desempenham papel crítico na resposta protetora precoce tanto por suas funções como células efetoras envolvidas na morte dos parasitos como por sua ação no desenvolvimento da resposta imune Th1 protetora (MCFARLANE *et al.*, 2008). As formas promastigotas de *Leishmania chagasi* fagocitadas convertem-se em amastigotas nos macrófagos da pele, e eventualmente se disseminam para os fagócitos mononucleares através do sistema retículoendotelial (AWASTHI *et al.*, 2004) e a variedade de manifestações clínicas decorrentes depende da habilidade que o parasito possui em evadir-se dos mecanismos de defesa através de complexa interação com o hospedeiro (SAHA *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2006). A opsonização de promastigotas pelos fagócitos mononucleares é inicialmente mediada pela via receptores de complemento tipo 3 (CR3), receptores para glicosilação de produtos finais, receptores para fibronectina e receptores da manose/frutose (AWASTHI *et al.*, 2004). Uma vez desencadeada a resposta imune do hospedeiro, complemento e anticorpos anti-*Leishmania* são depositados na superfície do parasito contribuindo para a adesão via receptores de complemento 1 e 3 (CR1 e CR3) assim como pelos receptores de fixação de complemento (Fc) (PEARSON e SOUSA, 1995). A ativação do complemento na superfície dos promastigotas de *Leishmania*

parece ser um importante fator na infectividade do parasito em mamíferos, favorecendo a sua adesão e a invasão de macrófagos via receptores de complemento (MINODIER *et al.*, 1999; ENGWERDA *et al.*, 2004). As formas promastigotas fagocitadas pelos macrófagos são internalizadas nos fagolisossomos (AWASTHI *et al.*, 2004) e a destruição dos microorganismos fagocitados é mediada por metabólitos tóxicos do oxigênio, principalmente óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e superóxido aniônico (AWASTHI *et al.*, 2004). Os promastigotas necessitam superar os dois primeiros mecanismos de defesa do hospedeiro: a lise pelo complemento e a destruição pelos fagócitos, de forma a sobreviver e garantir a conversão em formas amastigotas e a sua posterior replicação (WEIGAND *et al.*, 2004). Os mecanismos da modulação das funções dos macrófagos incluem a inibição da resposta oxidativa inicial, a neutralização dos metabólitos oxidativos, a inativação das enzimas lisossomais, a manutenção de um pH constante no interior do fagolisossomo, a repressão de produção de citocinas envolvidas na resposta inflamatória, a inibição da capacidade do hospedeiro em apresentar os antígenos do parasito aos outros componentes do sistema imune e ainda a infestação dos macrófagos que têm atividade anti-*Leishmania* reduzida (BERTHOLET *et al.*, 2003; OLIVIER *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2005). Em adição a estas funções inibitórias, a *Leishmania* promove a produção de várias moléculas imunossupressoras como metabólitos do ácido aracdônico, e as citocinas fator transformador de crescimento-beta (TGF- $\beta$ ) e IL-10 e age sobre mecanismos que alteram diversas vias de sinalização celular do hospedeiro (OLIVIER *et al.*, 2005). Na fase inicial da infecção por *Leishmania* a enzima óxido nítrico sintase tipo 2 (NOS2) exerce atividade antimicrobiana, controla a função de células natural killer e a expressão de citocinas como IFN- $\gamma$  ou TGF- $\beta$  (BOGDAN *et al.*, 2000).

A imunidade contra *Leishmania* spp. requer a contínua presença do parasito e a virulência do parasito parece estar intimamente relacionada aos constituintes da membrana externa dos promastigotas, densa camada composta por moléculas ancoradas por glicosil-fofatidil-inositol (GPI). Estas moléculas incluem proteínas como a protease de superfície gp63 e os proteofosfoglicanos, dos quais o mais abundante é o lipofosfoglicano (LPG). LPG está implicado em vários estágios necessários ao estabelecimento da infecção em macrófagos e à sobrevivência do parasito no inseto vetor. Cepas mutantes de *L. major* que não possuem LPG e outros fosfoglicanos têm a capacidade de persistir indefinidamente em animais infectados sem causar doença (UZONNA *et al.*, 2004). Por outro lado a gp63 auxilia a entrada e a sobrevivência do parasito na célula hospedeira (AWASTHI *et al.*, 2004).

A resolução da infecção por *Leishmania* em pessoas com doença auto-limitada depende

da produção de IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-12 pelos linfócitos T CD4 do tipo Th1 (CARVALHO *et al.*, 1992). Supõe-se, por outro lado que a resposta Th2, que envolve a produção de citocinas de susceptibilidade como IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$ , na ausência de IL-12, esteja exacerbada nos casos de doença progressiva (HEINZEL *et al.*, 1989; GAMA *et al.*, 2004). A resposta significativa de IFN- $\gamma$  após a soroconversão está associada à maior chance de que os indivíduos permaneçam assintomáticos ou evoluam com auto-resolução da infecção subclínica (CARVALHO *et al.*, 1992). Níveis mais elevados de IL-10 e de TNF- $\alpha$  foram observados em pacientes com doença aguda em comparação com pacientes oligossintomáticos (GAMA *et al.*, 2004).

Quando a resposta imune mediada por células Th1 está reprimida, as células sanguíneas mononucleares deixam de produzir IFN- $\gamma$  e IL-2 e níveis elevados de IL-4 podem ser detectados. A adição de anticorpos anti-IL-10 restaura a produção de IFN- $\gamma$  e IL-2, indicando o efeito supressor da IL-10 sobre a resposta de células T em pessoas com doença ativa. Da mesma forma a adição de anti-IL-2 também tem efeito benéfico em infecções por *L.major*, sugerindo que IL-2 seja outro fator de susceptibilidade a *Leishmania*. A resposta TH1 não está deprimida na LV, mas deve estar compensada pela ausência de resposta aos estímulos TH1 ou pelo incremento de citocinas antagonistas (ANSARI *et al.*, 2006). Pessoas com infecção assintomática ou que foram submetidas a quimioterapia específica eficaz desenvolvem respostas protetoras do tipo Th-1 baseada na produção de IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-12 (ROBERTS, 2005) e na maior parte dos casos o teste cutâneo à leishmanina se torna positivo; contudo, a doença pode acontecer tempos mais tarde em situações de imunodeficiência (PEARSON e SOUSA, 1995). Adicionalmente, a IL-10 e TGF- $\beta$  previnem a expansão de células Th1 e inibem a conseqüente ativação de macrófagos pelo IFN- $\gamma$  (RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998). Foi documentado que TGF- $\beta$  é produzido *in vivo* e *in vitro* durante a infecção por *Leishmania*, e que tem importância na progressão da doença em roedores (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992). Esta citocina também está elevada na medula óssea de pacientes com LV (GANTT *et al.*, 2003) e nos granulomas hepáticos de camundongos suscetíveis. Foi sugerido que TGF- $\beta$  secretado localmente inibe a resposta Th1 na LV murina (WILSON *et al.*, 1998).

As citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$  são fundamentais no desfecho da doença e os altos níveis de IFN- $\gamma$  e de IL-10 durante o período de atividade da LV continuam sendo um desafio para a compreensão da patogênese da doença. Tem sido sugerido que a proliferação de linfócitos e a ativação de macrófagos mediada por IFN- $\gamma$  podem ser reguladas pela IL-10 durante a doença ativa. É possível que IL-10, com sua ação supressora sobre a função microbicida dos

macrófagos, contribua para a patogênese da LV através da inibição da ativação e do bloqueio da atividade leishmanicida dos macrófagos do hospedeiro, o que favorece a instalação e progressão da doença. (GHALIB *et al.*, 1993; KARP *et al.*, 1993; CARVALHO *et al.*, 1994; RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998; BHATTACHARYYA *et al.*, 2001; CALDAS *et al.*, 2005; PERUHYPE-MAGALHAES *et al.*, 2006). Indivíduos com LV apresentam níveis mais elevados de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-6 que os controles, estes níveis declinam após o tratamento e associam-se à má resposta terapêutica. Este fato pode ser atribuído à regulação negativa do receptor de IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ R1, um possível mecanismo pelo qual as drogas anti-*Leishmania* atuam (DASGUPTA *et al.*, 2003). Admite-se que tanto a citocina TNF- $\alpha$  como IL-6 aumenta a expressão do IFN- $\gamma$ R1 favorecendo a resolução da LV (SANCEAU *et al.*, 1992). Linfócitos CD4 do tipo Th2 que produzem IL-4 e IL-5, mas não produzem IFN- $\gamma$  ou IL-2 foram apontados como responsáveis pela progressão da doença. A infecção dos macrófagos também inibe as respostas dos antígenos do complexo maior de histocompatibilidade das classes Th1 e Th2 e estimula a secreção de prostaglandinas imunossupressoras pelos macrófagos (ANSARI *et al.*, 2006). Os níveis de IL-10 e IFN- $\gamma$  são restaurados após o tratamento, mas os níveis de IL-6 tendem a permanecer elevados (ANSARI *et al.*, 2006).

Em contraste com a idéia inicial de que as funções antagônicas de IFN- $\gamma$  e IL-4 determinariam o desfecho final de infecção ou cura (ZWINGENBERGER *et al.*, 1990; KHARAZMI *et al.*, 1999), estudos mais recentes enfatizam a importância do balanço entre as duas citocinas reguladoras IL-12 e IL-10, críticas para a modulação imune durante a infecção e durante a quimioterapia (BACELLAR *et al.*, 2000).

Estudo realizado com pacientes com LV no Sudão revelou que a IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-2 são produzidas nos linfonodos durante a fase aguda da doença, mas apenas IFN- $\gamma$  e IL-2 continuam sendo produzidas após o tratamento (GHALIB *et al.*, 1993).

Em estudo realizado em Bangladesh, os níveis séricos de IL-10, IL-12 e CXCL-8 estavam mais elevados em pacientes com infecção por *L.donovani* em comparação aos pacientes não infectados e os pacientes com doença ativa apresentaram os mais altos níveis de CXCL-8 e de IL-10. Por outro lado, os pacientes assintomáticos e os pacientes não infectados apresentaram níveis mais elevados de IL-12 (KURKJIAN *et al.*, 2006).

As células dendríticas são consideradas sentinelas do sistema imune, agem como potentes células apresentadoras de antígenos, podem induzir a ativação de células T CD4+ e são fonte de diferentes citocinas como IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$  (AWASTHI *et al.*, 2004). As células dendríticas ativam células T por reconhecimento direto da *Leishmania* e são

consideradas um elo importante entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa, capazes de regular a imunidade nos estágios finais da doença.

## **2.5. Imunopatogenia da leishmaniose visceral**

Existe um ritmo diferenciado de parasitismo nos órgãos infectados em um mesmo indivíduo infectado por *Leishmania* (SQUIRES *et al.*, 1990). Os parasitos se multiplicam rapidamente no fígado nas primeiras semanas, enquanto o crescimento no baço é lento neste período. No entanto, a multiplicação dos parasitos no interior dos granulomas hepáticos é auto-limitada, enquanto a resposta esplênica após a resolução hepática é mantida e progressiva, sem formação de granulomas, com destruição de folículos de células dendríticas e eventual perda dos centros germinativos (ENGWERDA *et al.*, 2004; STANLEY e ENGWERDA, 2007). O progressivo acometimento do baço é associado a altos níveis de TNF que promove a destruição da zona marginal de macrófagos e das células do estroma esplênico, enquanto IL-10 associa-se à deficiente migração de células dendríticas (VERESS *et al.*, 1977; KARP *et al.*, 1993; MALLA e MAHAJAN, 2006; STANLEY e ENGWERDA, 2007).

O baço aumenta em volume à medida que os folículos linfóides esplênicos são substituídos por células mononucleares parasitadas. No fígado há marcada hiperplasia das células de Kupffer. Fagócitos mononucleares infectados são ainda encontrados na medula óssea, linfonodos, pele, intestino delgado e outros órgãos (WILSON *et al.*, 2005). No interior das células os amastigotas se replicam por divisão binária, eventualmente rompendo a célula hospedeira e disseminando-se para outras células.

## **2.6. Manifestações hematológicas e coagulação na leishmaniose visceral**

As manifestações hematológicas são comuns na LV e, junto às infecções bacterianas, constituem os mais importantes fatores de risco para a morte (MARTINS *et al.*, 1965; PASTORINO *et al.*, 2002; ABDELMOULA *et al.*, 2003; WERNECK *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2006). As anormalidades mais frequentemente relatadas incluem anemia, leucopenia, plaquetopenia, síndrome hemolítica e alterações do sistema de coagulação sanguínea (AL-JURAYYAN *et al.*, 1995; SINGH *et al.*, 1999; KOTWAL *et al.*, 2000; MISHRA *et al.*, 2004). É provável que tenham etiologia multifatorial, mas como as causas não são claramente entendidas, a abordagem terapêutica preconizada para os pacientes que

apresentam sangramentos em decorrência da LV é empírica, inespecífica e pouco eficaz em grande proporção de casos.

A incidência das manifestações hemorrágicas varia em estudos realizados em diversas regiões: 7,1% na Índia (THAKUR, 1984), 8% na Albânia (LITA *et al.*, 2002) e 15% no Nepal (SINGH *et al.*, 1999), 36% em crianças no Paquistão (RATHORE *et al.*, 1996) e 51% no Sudão, em uma população de refugiados, tendo a epistaxe como única apresentação, neste país (ZIJLSTRA *et al.*, 1991). As descrições de pacientes com LV no Brasil também mostram grande variabilidade na incidência de hemorragias: 11,4% no Mato Grosso do Sul, (OLIVEIRA *et al.*, 2006), 28,2% em crianças com procedentes de vários estados do Brasil e tratadas em São Paulo (PASTORINO *et al.*, 2002), 11,4% em Pernambuco (QUEIROZ *et al.*, 2004), 9 e 16% no Ceará (REY *et al.*, 2005; CAVALCANTE, 2007), 10,2% em Minas Gerais (SILVA *et al.*, 2001), e 20,7% em uma população indígena no estado de Roraima (GUERRA *et al.*, 2004). Em Alagoas, em uma descrição de 530 pacientes, não há referência a sangramentos (PEDROSA e DA ROCHA, 2004) e outros estudos internacionais, apesar de relatarem trombocitopenia na maior parte dos pacientes, não fazem referência a sangramentos (CAMPOS-JR., 1995; ABDELMOULA *et al.*, 2003; HARMS *et al.*, 2003; TANIR *et al.*, 2006).

Diversos mecanismos patogênicos têm sido sugeridos para explicar os sangramentos em pacientes com LV, mas restam inúmeras indagações e incertezas sobre os reais condicionantes dos distúrbios da coagulação sanguínea que se apresentam na LV. A plaquetopenia observada na maior parte destas pessoas pode ser decorrente de hiperesplenismo ou disfunção da medula óssea (KOTWAL *et al.*, 2000), mas não existe evidência de que estes distúrbios da homeostasia possam resultar de transtornos da mielopoiese (PIPPARD *et al.*, 1986; POLLACK *et al.*, 1988). De todo modo, a plaquetopenia explica apenas uma fração dos distúrbios da homeostasia e há grande controvérsia com respeito ao limite mínimo do número de plaquetas necessário à hemostase. Foi observado que pacientes com menos de 10.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> podem ter hemostase perfeita e que o maior risco para sangramento nestes pacientes ocorre quando outros fatores, como anormalidades do sistema fibrinolítico, associam-se à trombocitopenia (GEORGE, 2004). Ademais, a contagem das plaquetas no sangue periférico é um índice imperfeito do número total de plaquetas que o indivíduo possui, pois pode estar subestimada por não avaliar o número de plaquetas seqüestradas em sítios de sangramento e no baço ou superestimada na presença de fragmentação de hemácias decorrente de doenças sistêmicas como é descrito na leucemia (VAN DER MEER *et al.*, 2003).

As alterações da coagulação podem ainda estar relacionadas à deficiente produção hepática de fatores de coagulação, mas insuficiência hepática ou hepatite fulminante são eventos raros em pacientes com LV que apresentam sangramento (SINGH *et al.*, 1995; BARANWAL *et al.*, 2007). As alterações histopatológicas do fígado na LV não têm um padrão uniforme, e geralmente a repercussão clínica é discreta. Os padrões mais frequentemente descritos são a hipertrofia e hiperplasia do sistema retículo-endotelial, às vezes com intenso parasitismo das células de Kupffer, infiltrado portal por macrófagos, linfócitos e células plasmáticas e discretas alterações dos hepatócitos (DUARTE e CORBETT, 1987; KHALDI *et al.*, 1990; EL HAG *et al.*, 1994). Estudos da função hepática envolvendo amostras suficientes de pacientes são necessários para que se conheça melhor a importância dessas alterações na gênese dos sangramentos.

Hemofagocitose (GAGNAIRE *et al.*, 2000) e diseritropoiese (WICKRAMASINGHE *et al.*, 1987) têm sido descritas com mais raridade, uma vez que o exame histológico da medula óssea não faz parte da rotina diagnóstica de muitos centros nas áreas de maior endemicidade. Como estas manifestações, apesar de sinalizar para maior gravidade da doença, podem se reverter após o tratamento específico da leishmaniose, a sua incidência pode ser subestimada.

É possível, enfim, que a coagulopatia na LV tenha mecanismos patogênicos semelhantes aos mecanismos envolvidos na coagulação intravascular disseminada (CID) observada em pacientes com sepse bacteriana. A CID tem sido descrita em casos isolados ou pequenas séries de casos associada à LV e tem sido geralmente percebida como uma rara complicação da LV (BLOUNT *et al.*, 1980; CHALIASOS *et al.*, 1996; MISHRA *et al.*, 2004). Contudo, um estudo dos marcadores da CID envolvendo 45 crianças com LV na Geórgia concluiu que 43 (95,6%) delas apresentavam níveis elevados de dímero D no sangue e que 36 (80%) apresentavam complexos solúveis de monômeros de fibrina detectáveis, indicando que a ativação da coagulação sanguínea estava presente na maioria destes pacientes. Estes produtos associaram-se significativamente com a gravidade da doença, com a ocorrência de sangramentos e com o número de plaquetas no sangue periférico (LOMTADZE *et al.*, 2005).

## **2.7. Coagulação intravascular disseminada**

A CID é caracterizada por hiperativação do sistema de coagulação e da fibrinólise que resulta em formação de trombina e plasmina. A trombina degrada o fibrinogênio e forma monômeros de fibrina que rapidamente se polimerizam para formar o coágulo. A atividade

fibrinolítica está deprimida e a deposição de fibrina na microcirculação leva à trombose microvascular em órgãos alvo. A conseqüente redução no número de plaquetas, o consumo de proteínas da coagulação e a liberação de peptídeos e de complexos inibidores de enzimas levam ao sangramento; por isso, tanto o sangramento como a coagulopatia podem ocorrer simultaneamente. (HORAN e FRANCIS, 2001; TOH, 2001; DEMPFLER, 2002; HOOTS, 2002). Tanto a ativação da coagulação como a inibição da fibrinólise são reguladas pelas citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6. Estas citocinas têm papel fundamental na expressão do FT nos monócitos e nas células endoteliais e contribuem significativamente para o equilíbrio hemostático em situações fisiológicas ou patológicas (GRIGNANI e MAIOLO, 2000).

A ativação do sistema de coagulação pode resultar em diferentes condições clínicas descritas como CID aberta e CID não aberta. Após um estímulo inflamatório, a hemostase é temporariamente perdida, as células retículo-endoteliais são ativadas e o endotélio vascular é alterado e a hemostase é refeita. No entanto, em algumas situações extremas, as células retículo-endoteliais e o endotélio não podem restabelecer o equilíbrio e, ao invés disto, podem amplificar sua própria disfunção. A competição entre a deposição de fibrina e a sua remoção pela fibrinólise promove dano à microvasculatura e este estado de total perda dos processos regulatórios é chamado CID aberta. Quando certo grau de equilíbrio ainda existe entre coagulação e fibrinólise, diz-se que a CID é não aberta. A progressão de um estado de CID não aberta para CID aberta se faz pela amplificação das vias inflamatórias em resposta a estímulos diversos, envolvendo a atividade inflamatória sistêmica. Contudo, os limites que separam estas duas condições são imprecisos (HOOTS, 2002).

O conhecimento do papel da inflamação na ativação do sistema de coagulação e na CID vem de estudos sobre sepse, doenças neoplásicas e traumas. Nestas situações a resposta inflamatória induz à liberação maciça de mediadores pró-inflamatórios como fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) e proteína *high-mobility group box-1* (HMGB1), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e CXCL-8 (BOCHUD e CALANDRA, 2003; WEIGAND *et al.*, 2004). Esta resposta inflamatória exagerada provoca danos tissulares, alterações hemodinâmicas, falência de múltiplos órgãos e morte.

A fisiopatologia da CID na sepse envolve uma cascata de reações onde o TNF- $\alpha$  parece ser o mais potente mediador agindo sinergicamente com outros produtos ativos liberados pelas células do hospedeiro. O estímulo pró-coagulante do TNF- $\alpha$  sobre o mecanismo de hemostasia foi há muito descrito, sugerindo que esta citocina possa ser um importante mediador de certos estados de hipercoagulabilidade humana (BAUER *et al.*, 1989). Assim, a

identificação de TNF- $\alpha$  como um importante mediador do choque séptico sugere que a síndrome séptica é um exemplo de resposta exagerada do sistema imune ao patógeno invasor ou ao estímulo antigênico. A ativação do sistema de coagulação com a liberação de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e vários fatores de estimulação de colônias celulares são produzidas minutos ou horas após o contato do lipopolissacarídeo (LPS) da membrana bacteriana com as células de defesa como os macrófagos e monócitos. No entanto, as citocinas podem ser liberadas em infecções parasitárias ou em infecções por bactérias gram-positivas, e não são, portanto, específicas das infecções causadas por bactérias gram-negativas (BONE *et al.*, 1992).

O endotélio exerce papel central na patogênese da sepse, não só porque é capaz de secretar citocinas e influenciar a cascata inflamatória, mas porque está em contato com grandes quantidades de mediadores inflamatórios. Assim, é provável que a patogênese da sepse seja conseqüente à disfunção do endotélio (HACK e ZEERLEDER, 2001) e de seus efeitos procoagulantes, vasoconstritores e proinflamatórios (CINES *et al.*, 1998). As células endoteliais vasculares respondem às citocinas expressas e liberadas pelos leucócitos ativados, mas elas próprias também podem liberar citocinas, ampliando assim a resposta de coagulação. Dessa forma, as células endoteliais expressam moléculas de adesão e fatores de crescimento que podem, não só promover a resposta inflamatória como também afetar a resposta de coagulação. As células endoteliais podem ainda interferir diretamente na iniciação e na regulação da deposição e remoção de fibrina durante a infecção grave. (BICK, 1996; HOOTS, 2002). A remoção de fibrina fica diminuída pela supressão do sistema fibrinolítico, quando o sistema de coagulação está ativado, contribuindo para a deposição de fibrina na microvasculatura (HORAN e FRANCIS, 2001; DEMPFLER, 2002).

O sistema de fase de contato (via intrínseca), apesar de também estar ativado, não contribui para a formação exagerada de fibrina, mas sim a expressão do fator tecidual (FT) nos monócitos (ZEERLEDER *et al.*, 2005). A ativação da coagulação na sepse se faz, assim, à custa de trombina mediada pelo fator de crescimento tecidual (TF) e simultaneamente pela depressão de mecanismos inibitórios como os sistemas de proteína C e de proteína S que aumentam a vulnerabilidade do organismo às reações inflamatórias. A inibição da trombólise endógena se deve principalmente aos altos níveis de inibidor do ativador de plasminogênio (PAI) (LEVI *et al.*, 2003). Em todos os níveis do sistema de coagulação ativada, as vias naturais de anticoagulantes estão prejudicadas, e como conseqüência, são incapazes de conter a formação progressiva de trombina.

A capacidade anticoagulante está gravemente reduzida durante os estados de CID e a fibrinólise está inibida em oposição à ativação maciça da coagulação levando à formação

exagerada de fibrina e trombose microvascular que pode causar danos isquêmicos aos órgãos. Este estado de comprometimento clínico sistêmico é conhecido como falência múltipla de órgãos (multiple organ dysfunction syndrome- MODS). Pensava-se inicialmente que a ativação sistêmica se desse como resultado direto da ativação do sistema de contato pelos microorganismos ou endotoxinas. No entanto, a partir dos anos 1990 ficou claro que este desarranjo entre coagulação e fibrinólise é mediado por diferentes citocinas próinflamatórias que atuam como mediadoras da ativação da coagulação e subsequentemente da deposição de fibrina (GRIGNANI e MAIOLO, 2000; BICK, 2003; LEVI *et al.*, 2003).

O fator tecidual (FT) é uma proteína expressa na superfície de células que normalmente não estão em contato com o plasma, como fibroblastos e macrófagos e é o principal iniciador da formação de trombina mediada por inflamação. Forma solúvel de FT pode ser detectada em altos níveis no plasma de indivíduos com CID. As diversas citocinas próinflamatórias, a proteína C reativa e os produtos de glicolização avançada exercem ação sinérgica ao induzir a formação de FT. As células endoteliais também podem expressar FT quando estimuladas. O FT também pode ser encontrado na superfície de células polimorfonucleares no sangue, mas não é provável que estas células sejam capazes de secretar o FT (LEVI, TEN CATE *et al.*, 2002).

Quando o plasma é exposto ao FT expresso na superfície de células, a coagulação se inicia fora dos vasos sanguíneos lesados. O FT interage com o Fator VII tanto na forma de zimogênio como na forma ativada (Fator VIIa). O complexo FT-Fator VIIa cataliza a conversão de fatores IX e X em IXa e Xa. Os fatores IXa e Xa exacerbam a ativação de fatores X e protrombina, promovendo a conversão desta em trombina. As pequenas quantidades de trombina formadas ativam o Fator V e o Fator VIII. O Fator Va aumenta a capacidade do Fator Xa ativar a protrombina. A produção de trombina pela via FT-Fator VIIa é rapidamente interrompida pela via inibidora do fator tecidual (*tissue factor pathway inhibitor- TFPI*). No entanto, o complexo FT-Fator VIIa também ativa o Fator IX que junto com o Fator VIII é também capaz de ativar o Fator X exacerbando a formação de trombina. A trombina promove a quebra do fibrinogênio em monômeros de fibrina (MF) e ativa o Fator XIII que se liga aos MF para formar o coágulo. Em algumas condições a trombina formada pela via FT-Fator VIIa amplificada pelo Fator IX e pelo Fator VIII ainda é insuficiente para se sobrepor à fibrinólise e então uma via alternativa ativa Fator XI em Fator XIa que adicionalmente ativa Fator X e o Fator Xa induz à formação de mais trombina. O excesso de trombina formada por esta via ativa o inibidor de fibrinólise ativado por trombina (*thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor – TAFI*) que inibe a ligação do plasminogênio à fibrina com

conseqüente inibição da fibrinólise (ZEERLEDER *et al.*, 2005).

Os mecanismos anticoagulantes deprimem o sistema de coagulação através da inativação da trombina pela antitrombina, com formação de complexos trombina-antitrombina. Além disto, a trombosmodulina (TM) expressa nas células endoteliais neutraliza a ação procoagulante da trombina. O complexo trombina-TM ativa a proteína C (PC) que, potencializada pela proteína S, aumenta a fibrinólise. A ativação do sistema fibrinolítico induz à formação de plasmina que degrada a fibrina (ZEERLEDER *et al.*, 2005).

A descompensação entre os sistemas de coagulação e anticoagulação resulta em obstrução difusa da rede microvascular e disfunção progressiva dos órgãos, levando à insuficiência renal, SARA, hipotensão e falência circulatória (BICK, 2003).

A interação entre inflamação e coagulação na LV é pouco estudada e muito do conhecimento que se tem sobre a CID vem de estudos realizados em pacientes com sepse bacteriana. O termo sepse se aplica à resposta inflamatória sistêmica decorrente de infecção (BONE *et al.*, 1992). Embora as infecções por bactérias gram-negativas fossem a principal causa de CID associada a sepse, a importância das bactérias gram-positivas aumentou nas três últimas décadas e hoje respondem por metade dos casos. Diversas outras condições são associadas à CID, como trauma, neoplasias, doenças obstétricas, hepáticas, autoimunes, vasculares e outras infecções graves incluindo infecções virais, fúngicas e parasitárias (BICK, 2003). Cita-se como exemplos as descrições de CID em pacientes com dengue (KRISHNAMURTI *et al.*, 2001), com malária (FRANCISCHETTI *et al.*, 2008) e com febre hemorrágica de Crimeia-Congo (ERGONUL *et al.*, 2006).

Este trabalho objetivou o estudo das apresentações clínicas da LV, dos distúrbios da coagulação, da resposta inflamatória sistêmica e dos fatores associados à morte. Partiu da hipótese de que os pacientes com LV apresentam ativação da coagulação mediada pela resposta inflamatória e que podem evoluir com CID. Traz, como proposta, um sistema de escores para predição de morte baseado em informações facilmente acessíveis à admissão do paciente e que pode ser útil para orientar as decisões médicas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral:**

Analisar os fatores clínicos e laboratoriais que se associam aos distúrbios da coagulação, à resposta inflamatória sistêmica e à morte em indivíduos com LV.

#### **3.2. Objetivos específicos:**

1. Analisar as características clínicas dos pacientes com LV.
2. Analisar os fatores de risco para a morte nestes pacientes.
3. Comparar as características clínicas e os fatores de risco para a morte entre crianças com menos de dois anos de idade e outras idades.
4. Avaliar o estado nutricional de pacientes com LV
5. Comparar as características clínicas de indivíduos com LV que apresentam e que não apresentam sangramentos.
6. Caracterizar laboratorialmente os distúrbios da coagulação e avaliar a presença de coagulação intravascular disseminada em indivíduos com LV.
7. Avaliar a resposta imune celular em indivíduos com LV com e sem sangramento.
8. Construir modelo de prognóstico, baseado em um sistema de escores clínicos e laboratoriais, para avaliar o risco de morte em pacientes com LV.
9. Identificar possíveis alvos moleculares para tratamento e prevenção da morte em pacientes com LV.

## **4 PACIENTES E MÉTODOS**

### **4.1. Área geográfica do estudo**

O estudo foi conduzido em Teresina, capital do Estado do Piauí, localizada na Região Nordeste do Brasil. A cidade está localizada a 339 Km do litoral, 72m acima do nível do mar, a 05° 05' de latitude sul e 42° 48' longitude oeste. O clima é tropical com temperatura média anual de 27° C (variação de 22 a 39° C). A população estimada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística para o ano 2008 foi 793.915 habitantes (BRASIL, 2008). Teresina está conurbada com a cidade maranhense Timon, separadas apenas pelo Rio Parnaíba. Teresina está situada em importante entroncamento rodoviário regional e nacional, é centro político, de comércio e de serviços para uma grande área de influência nas Regiões Nordeste e Norte, atua como receptora de fluxos populacionais e representa importante referência em saúde na região (PIAUI, 1994).

Raros e esporádicos casos de LV ocorriam em Teresina até que a primeira epidemia urbana do Brasil foi registrada entre 1981 e 1986 com aproximadamente 1000 casos detectados (COSTA *et al.*, 1990). Os níveis epidêmicos têm oscilado desde então, com numerosos casos nos períodos inter-epidêmicos. A taxa de letalidade é crescente desde o ano 2002 oscilando atualmente entre sete e 9 %, com acometimento de grande proporção de crianças menores de cinco anos de idade, provenientes da população local, de outras localidades do Piauí e de outros estados, principalmente do Maranhão (WERNECK *et al.*, 2003; BRASIL, 2007)

### **4.2. Local da pesquisa**

O trabalho foi realizado no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella (IDTNP), hospital geral da Secretaria Estadual da Saúde do Piauí conveniado com a Universidade Federal do Piauí. O IDTNP é referência em doenças infecciosas e parasitárias para o Piauí e para estados vizinhos, tem capacidade de 137 leitos, 50 deles destinados à pediatria. Dispõe de serviço de pronto-atendimento para doenças infecciosas, unidade de terapia intensiva e serviço de ambulatório especializado em infectologia. Possui boa logística para captação de pacientes e infra-estrutura para o diagnóstico e o tratamento das doenças mais prevalentes. Possui um laboratório de análises clínicas com serviços de microbiologia, micologia e

parasitologia e um laboratório de pesquisas em leishmanioses capacitado a realizar técnicas de entomologia, parasitologia, sorologia e biologia molecular.

Aproximadamente 400 pacientes com LV são admitidos anualmente no IDTNP, o que representa 95% dos casos notificados no Estado. Destes pacientes, 50% em média, são provenientes de outros estados da federação como Maranhão, Pará, Tocantins, Ceará. Os pacientes procedentes do Piauí têm residência nos diversos municípios e apenas uma pequena parcela provém de Teresina. Um bloco de enfermarias foi adaptado para receber pacientes com LV, de forma a padronizar condutas e viabilizar projetos de pesquisa. Todos os médicos assistentes possuem experiência em diagnosticar e tratar pacientes com LV.

### **4.3. Considerações éticas**

O estudo foi conduzido em conformidade com os preceitos fundamentais da Resolução do Conselho Nacional de Saúde-CNS 196/96 que trata das Diretrizes e Normas de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (BRASIL, 1996), da Resolução do Conselho Nacional de Saúde-CNS 347/05 que trata da Análise Ética de Projetos de Pesquisa que Envolve Armazenamento de Materiais ou Uso de Materiais Armazenados em Pesquisas Anteriores (BRASIL, 2005a), da Declaração de Helsinque (WHO, 1996), do Informe Belmont (NATIONAL, 1988), das Recomendações Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Sujeitos Humanos (WORLD, 1993) e das recomendações para o tratamento da LV no Brasil (BRASIL, 2003; 2005b). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí em vinculação com a Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os pacientes incluídos no estudo, ou seus responsáveis, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1)

Os riscos adicionais pela participação dos voluntários neste estudo foram considerados aceitáveis, uma vez que as intervenções necessárias (radiografia do tórax, coleta de sangue periférico, medula óssea e urina) fazem parte da rotina de investigação diagnóstica do paciente com hipótese diagnóstica de LV no IDTNP. O volume adicional de sangue periférico necessário para exames complementares à pesquisa foi de 3 mL. Por outro lado, não houve modificação nas recomendações terapêuticas ou interferência sobre as decisões médicas com a finalidade desta pesquisa, uma vez que todas as etapas do estudo foram observacionais. Os sujeitos do estudo não tiveram benefícios diretos pela sua participação nesta pesquisa, entretanto eles podem ter sido beneficiados indiretamente através da atenção durante o período de hospitalização, como a rapidez do diagnóstico e da detecção de complicações.

#### **4.4. Delineamento do estudo**

##### 4.4.1. Desenho do estudo

Foi conduzido um estudo de coorte prospectivo, observacional e analítico, baseado em hospital, com dois estudos caso-coorte. Adquiriu característica de estudo transversal quando não se podia distinguir a seqüência temporal entre as variáveis. A entrada dos pacientes foi feita de forma não probabilística e consecutiva.

##### 4.4.2. População de estudo

Uma população e três sub-populações de estudo foram assim constituídas:

1. Estudo clínico geral e estudo de modelo de prognóstico: pacientes portadores de LV, com informações clínicas e laboratoriais suficientes foram incluídos entre setembro de 2005 e agosto de 2008.
2. Estudo clínico de lactentes: população de crianças até dois anos de idade contida na coorte do estudo clínico.
3. Estudo caso-coorte para avaliação da coagulação sanguínea: população de pacientes selecionados aleatoriamente a partir da população do estudo clínico
4. Estudo caso-coorte da resposta inflamatória: população de pacientes selecionados aleatoriamente a partir da população do estudo para avaliação da coagulação sanguínea.

##### 4.4.2.1. População do estudo clínico geral

###### 4.4.2.1.1. Critérios de inclusão

A coorte do estudo clínico foi composta por pacientes de ambos os sexos e de todas as idades, sintomáticos, não tratados e sem história prévia de LV, admitidos no IDTNP de agosto de 2005 a setembro de 2008 com hipótese diagnóstica de LV e submetidos a punção de medula óssea para pesquisa de amastigotas. Pacientes atendidos em nível ambulatorial foram considerados elegíveis para o estudo na possibilidade de acompanhamento até o final do tratamento. A punção de medula óssea para a pesquisa de formas amastigotas não foi solicitada com a finalidade exclusiva de pesquisa e nos casos em que o diagnóstico foi realizado sem a necessidade de confirmação parasitológica no IDTNP, os pacientes foram

considerados inelegíveis.

#### *4.4.2.1.2. Critérios de exclusão*

Os pacientes sem confirmação laboratorial de LV e os pacientes com confirmação sorológica, mas sem confirmação parasitológica, que tenham recebido diagnóstico substitutivo de outra doença com manifestações clínicas semelhantes foram excluídos do estudo. Diagnósticos por reação em cadeia de polimerase ou por teste imunocromatográfico não foram considerados para a finalidade deste estudo por não estarem autorizados para o diagnóstico da LV, na época.

#### *4.4.2.1.3. Definições*

Foi considerado sintomático o paciente que apresentasse febre, esplenomegalia, emagrecimento ou palidez.

A duração da doença foi o intervalo de tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico. Quando a data do início dos sintomas não podia ser determinada com precisão, a média entre as duas datas mais extremas informadas foi aceita como a data do início dos sintomas.

A presença de sangramento foi averiguada pela anamnese e exame físico. Informações verbais sobre hemorragia digestiva, epistaxe ou hemoptise foram consideradas evidências suficientes da presença de sangramento. Contudo, as informações sobre petéquias, equimoses, sangramentos nos locais de punção venosa foram confirmadas durante o exame físico diário. Não se considerou a informação verbal de sangramento urinário pela possibilidade de confusão com colúria ou urina concentrada. Considerou-se sangramento urinário a presença de mais de 15 hemácias por campo na análise do sedimento urinário. A hematúria microscópica com menos de 15 hemácias por campo e o sangramento intestinal oculto não foram aceitos para a definição do sangramento pela possibilidade de confusão com infecção do trato urinário, nefrite intersticial, enterites ou intolerâncias alimentares.

Pneumonia foi definida pela presença de febre ou tosse associadas a dispneia, estertores pulmonares ou tiragens confirmada por radiografia simples ou por exame tomográfico do tórax. Opacidades alveolares ou intersticiais foram consideradas imagens sugestivas de pneumonia. Os pequenos derrames pleurais, granulomas ou estrias fibróticas não associados a opacidades foram desconsiderados.

A leucopenia foi definida por leucócitos abaixo de  $4.500/\text{mm}^3$  e a plaquetopenia, por contagem de plaquetas abaixo de  $150.000/\text{mm}^3$ . Já a anemia foi definida como hemoglobina abaixo de 11 g/dL em crianças com menos de cinco anos de idade; abaixo de 11,0 g/dL, em crianças entre cinco e dez anos de idade; abaixo de 12 g/dL, em mulheres acima de dez anos de idade; e abaixo de 13,0 g/dL, em homens acima de dez anos de idade (NICHOLSON e PESCE, 1996; BEUTLER e WAALLEN, 2006).

Considerou-se insuficiência renal a taxa de filtração glomerular abaixo de  $60 \text{ mL}/\text{min}/\text{m}^2$ , calculada pelo método de Cockcroft-Gault para adultos e crianças com mais de 12 anos de idade (GOLDMAN e AUSIELLO, 2008) e pelo método de Schwartz para crianças com menos de 12 anos de idade (Hogg, Furth *et al.*, 2003)

Foram consideradas evidências de infecção bacteriana as culturas e bacterioscopias positivas para germes não colonizadores habituais, a presença de mais de 10 piócitos/campo no exame do sedimento urinário, a presença de impetigo, celulite ou imagens radiológicas ou tomográficas compatíveis com infecção. Infecções bacterianas com aparecimento após o terceiro dia da internação foram consideradas infecções hospitalares.

O conceito de Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) foi adaptado para o paciente com LV, visto que sinais definidores desta síndrome como a presença de febre, taquicardia, leucopenia, e plaquetopenia são frequentemente encontrados em pacientes com LV. De forma diferente, em pacientes com LV, a contagem de leucócitos e de plaquetas no sangue periférico estão, quase sempre, abaixo dos níveis considerados normais, mesmo na ausência de infecção bacteriana associada. Sinais definidores mais sensíveis como o débito urinário, a variação da pressão arterial e da concentração dos gases arteriais não estavam disponíveis para muitos pacientes e por isto não foram consideradas condições essenciais para a definição de sepse no paciente com LV. Assim, foi considerada SRIS a presença de pelo menos um dos sinais a seguir: sinais de hiperventilação (frequência respiratória elevada para a idade ou  $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$ ), sinais de hipoperfusão tecidual ( $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 < 300$ ), saturação venosa de oxigênio  $< 70\%$ , cianose ou disfunção orgânica caracterizada por acidose láctica, oligúria, alteração do nível de consciência. Não se tentou diferenciar sepse e sepse grave. A presença destes marcos sem a evidência de infecção bacteriana foi denominada sepse não bacteriana e a presença destes marcos com a evidência de infecção bacteriana foi denominada sepse bacteriana. (RIEDEMANN *et al.*, 2003).

Considerou-se evidência laboratorial de LV a reação de imunofluorescência indireta com diluições iguais ou superiores a 1/80, a visualização direta de formas amastigotas ou a identificação de formas promastigotas em meio de cultura (BRASIL, 2003).

#### 4.4.2.2. População do estudo clínico de lactentes

O subgrupo da coorte do estudo clínico geral composto pelas crianças até dois anos de idade formou a população do estudo clínico dos lactentes.

#### 4.4.2.3. População do estudo para a avaliação da coagulação sanguínea

O estudo caso-coorte para avaliação da coagulação sanguínea foi retirado, por aleatorização, da coorte de pacientes com LV. Foram excluídos desta análise os pacientes com história de dengue nos últimos 30 dias, história de uso de ácido acetil-salicílico ou outras drogas anticoagulantes nos últimos 10 dias, e qualquer patologia anterior ao diagnóstico da LV, como doenças hematopoiéticas ou neoplásicas. Também não foram incluídos no estudo caso-coorte os pacientes que tivessem recebido antibióticos, drogas anti-*Leishmania* ou hemoderivados antes da coleta da amostra de sangue para os exames laboratoriais. Os pacientes com HIV/AIDS foram incluídos.

Foram considerados casos os pacientes incluídos na coorte e que apresentaram sangramento de qualquer intensidade em pelo menos um sítio no período da doença anterior à admissão e durante a hospitalização.

Foram considerados controles os pacientes incluídos na coorte e que não apresentaram qualquer sangramento até à alta hospitalar.

Previu-se que o paciente incluído no grupo controle que evoluísse com sangramentos posteriores seria transferido para o grupo de casos, contudo este fato não ocorreu na amostra selecionada.

#### 4.4.2.4. População do estudo para a avaliação da resposta inflamatória

Os pacientes para o estudo da resposta inflamatória foram selecionados por aleatorização sem restrições a partir da população do estudo para avaliação da coagulação sanguínea. Esta aleatorização foi realizada em um só tempo, sem divisão por grupos de casos e controles

### 4.4.3. Mensuração da exposição

#### 4.4.3.1. Pacientes

Cada paciente incluído no estudo foi submetido à anamnese e ao exame físico por médico envolvido na pesquisa, de acordo com questionário estruturado (Anexo 2) nas primeiras 48 horas da internação, independente de confirmação prévia da doença. Os pacientes foram examinados pelo menos uma vez ao dia pelo médico assistente e as anotações contidas nos prontuários foram aceitas como informações sobre a evolução. A pressão arterial e as frequências cardíaca e respiratória foram aferidas uma vez ao dia, e a temperatura axilar foi aferida quatro vezes ao dia em horários predeterminados e em outros horários se houvesse percepção de febre ou de hipotermia.

Peso e estatura foram aferidos no momento da admissão hospitalar. O peso foi medido em balança pediátrica ou balança-plataforma, quando indicadas. A medição do comprimento das crianças de zero a 24 meses foi realizada com o bebê em decúbito dorsal sobre superfície plana e com o auxílio de régua antropométrica. Já a medição da altura de crianças com mais de dois anos de idade foi feita com o paciente em decúbito supino em balança plataforma com antropômetro. Em poucos casos, quando o paciente não podia assumir o decúbito supino, os dados informados com segurança pelo paciente ou por seus acompanhantes foram aceitos. Quando havia informações sobre o peso anterior à doença, o percentual de peso corporal perdido foi calculado.

O baço foi medido em sua maior extensão a partir do bordo costal esquerdo na linha mamilar esquerda, em direção à ponta esplênica. O fígado foi medido a partir do bordo costal direito, na linha mamilar direita, no sentido crânio-caudal. Como a extensão e o volume de um órgão apresentam relação direta com o peso e com a estatura do indivíduo, as dimensões do baço e do fígado foram corrigidas pela sua proporcionalidade com a superfície corpórea, de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{Baço}_{\text{corrigido}} = \text{extensão do baço (cm)} / \text{superfície corporal (m}^2\text{)}$$

$$\text{Fígado}_{\text{corrigido}} = \text{extensão do fígado (cm)} / \text{superfície corporal (m}^2\text{)}$$

A superfície corporal foi calculada pela fórmula de Dubois & Dubois, onde:

$$\text{Superfície corporal} = [(\text{peso} \cdot 4) + 7] / (\text{peso} + 90) \text{ (WANG } et al., 1992)$$

#### 4.4.3.2. Procedimentos

O hemograma foi solicitado no momento da admissão e amostras de sangue e de medula

óssea para a complementação da investigação laboratorial foram providenciadas após o resultado do hemograma, geralmente nas primeiras 48 horas da internação. As amostras de sangue foram colhidas por punção de veia periférica em frascos estéreis e secos ou contendo anticoagulantes (ácido etilenodiaminotetracético-EDTA e citrato de sódio de sódio 3,2%). O soro foi obtido após a coagulação do sangue à temperatura ambiente e centrifugação a 3000 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos após 30 minutos da coleta. O plasma foi separado por centrifugação imediata do sangue citratado a 3.000 rotações rpm, por 15 minutos. Todo o material foi armazenado em alíquotas a -70°C até à sua utilização. AS amostras de plasma foram armazenadas por período máximo de seis meses e as amostras de soro por período máximo de 12 meses, até à realização dos testes.

A punção aspirativa de medula óssea para a pesquisa direta e para cultura de *Leishmania* e o teste sorológico foram realizados após o resultado do hemograma, geralmente nas primeiras 48 horas da internação.

#### 4.4.3.3. Exames hematológicos, bioquímicos, imunológicos e parasitológicos

##### 4.4.3.3.1. Exames complementares gerais

Os exames laboratoriais foram solicitados segundo o protocolo proposto no Instituto para o atendimento ao paciente com LV que incluía hemograma, (fluxocitometria a laser com revisão dos esfregaços corados), velocidade de hemossedimentação (Westergreen), dosagem de aminotransferases (método automação Technicon), bilirrubinas (método colorimétrico), creatinina (Reação de Jaffé), uréia (urase Berthelot), fosfatase alcalina (Bowers & Mc Comb), albumina e globulina (verde bromocresol), exame sumário de urina (Uri-test 11 e revisão óptica).

##### 4.4.3.3.2. Exames complementares específicos

A reação de imunofluorescência indireta para *Leishmania* foi realizada com o kit IFI-Leishmnirose Humana–Bio-Manguinhos. A evidência parasitológica da LV baseou-se na visualização de formas amastigotas no esfregaço de medula óssea ou na detecção de formas promastigotas por cultivo de medula óssea, sangue ou produtos de biópsias de linfonodos ou intestino em meio de cultura bifásico de Novy-MacNeal-Nicole –NNN. Os esfregaços corados com corante de Giemsa foram examinados sob óleo de imersão, em microscópio

ótico, com objetiva de 100x e lente ocular de 8x. Se nenhuma forma não-flagelada (amastigota) fosse encontrada, o observador continuava o exame por, no mínimo 30 minutos, o que corresponde a aproximadamente 1800 campos observados (SILVA *et al.*, 2005). A revisão da lâmina era ainda solicitada quando a hipótese diagnóstica persistia depois que o esfregaço havia sido declarado negativo. A detecção de formas promastigotas foi realizada no sobrenadante do meio de cultura após 2,3, 7, 14, 21 e 28 dias da semeadura. As culturas foram declaradas negativas se formas promastigotas não fossem identificadas após este período.

#### 4.4.3.3.3. *Exames microbiológicos*

Hemocultura (Hemocult, Laborclin Ltda), urocultura (Cromoclin S Urina, Laborclin Ltda) ou culturas de secreções foram solicitadas antes do início da administração de antibióticos ou na suspeita de infecção bacteriana após a avaliação clínica ou laboratorial por indicação do médico assistente.

#### 4.4.3.3.4. *Exames de imagem*

A radiografia simples do tórax foi realizada nas primeiras 48 horas após a admissão ou quando havia sintomas respiratórios sugestivos de processo inflamatório pulmonar e foi analisada por médico radiologista.

#### 4.4.3.3.5. *Triagem do vírus da imunodeficiência adquirida*

A triagem para o vírus da imunodeficiência humana-HIV foi solicitada para todos os pacientes após orientação pré-teste e obtenção do consentimento verbal e seguiu as diretrizes propostas pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 1999).

#### 4.4.3.3.6. *Exames complementares da coagulação sanguínea*

Para cada um dos pacientes incluídos no estudo caso-coorte para avaliação da coagulação sanguínea foram realizados, em adição aos exames já citados, dosagem do tempo de coagulação (método Lee-White), tempo de sangramento (método Duke), tempo de protrombina e atividade enzimática (método Quick), tempo de tromboplastina parcial ativado (método Quick). fibrinopeptídeo A (Imunclone FPA ELISA, American Diagnostica Inc, CT,

EUA), produtos de degradação de fibrinogênio (ActiScreen™ XL-FDP, American Diagnostica Inc, CT, EUA), dímero D (Imunoclone D-Dimer ELISA, American Diagnostica Inc, CT, EUA) e fibrinogênio (Human Fibrinogen ELISA Quantitation Kit – Gen Way Biotech Inc., San Diego, CA, EUA).

#### 4.4.3.3.7. Exames complementares da resposta inflamatória

Para o grupo de pacientes do estudo da resposta inflamatória foram realizados, em adição aos exames citados anteriormente, a dosagem de proteína C reativa ultrasensível (PCR<sub>ultra</sub>, nefelometria), e de marcadores de resposta imune inata que incluíram IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12p70, CXCL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  (Cytometric Bead Array Human Inflammatory Cytokines Kit Assay – BD Biosciences, MD, EUA e Cytometric Bead Array Human IFN- $\gamma$  Flex Set– BD Biosciences, MD, EUA). Foi escolhido um conjunto de citocinas próinflamatórias e anti-inflamatórias baseado no conhecimento existente sobre a resposta mista Th1/Th2.

O BD™ *Cytometric Bead Array* (CBA) usa a sensibilidade da detecção amplificada de fluorescência pela citometria de fluxo para medir múltiplas substâncias solúveis em base imunodiagnóstica. Cada esfera no kit BD CBA provê a captura de uma proteína específica e funciona de forma análoga à técnica ELISA individual. O kit *BD CBA Human Inflammatory Cytokines Kit* permite determinar os níveis das proteínas Inteleucina-8 (IL-8), Inteleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Inteleucina-6 (IL-6), Inteleucina-10 (IL-10), Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), e Inteleucina-12p70 (IL-12p70) em uma única amostra. O kit *Human IFN- $\gamma$  Flex Set* permite determinar os níveis da proteína Interferon- $\gamma$ . A variação na quantificação de citocinas pode ser significativa e os níveis mínimos de algumas citocinas são significativamente mais elevados pela técnica *Cytometric Bead Array* – CBA em comparação ao *Enzyme linked immuno sorbent assay* –ELISA. Contudo, a correlação entre os dois testes está acima de 0,85 e a correlação intra-testes e inter-testes é satisfatória, mesmo quando se compara diferentes produtos comerciais (KELLAR *et al.*, 2001; KHAN *et al.*, 2004; HEIJMANS-ANTONISSEN *et al.*, 2006).

Cada teste acima mencionado foi realizado de acordo com as recomendações dos fabricantes. Exames adicionais foram solicitados durante o acompanhamento de acordo com as necessidades individuais.

## 4.5. Cálculo amostral

### 4.5.1. Constituição da coorte do estudo clínico geral e do modelo de prognóstico

Entre setembro de 2005 e agosto de 2008 foram notificados 1192 pacientes com LV no IDTNP e 80 apresentaram desfecho letal. Destes, 224 (18,7%) pacientes foram considerados inelegíveis pelos critérios de inclusão propostos ou não consentiram em participar. Esta é a razão pela qual as relações dos pacientes notificados no Instituto e dos pacientes incluídos no trabalho são diferentes.

Neste mesmo período foram arrolados 1.398 pacientes no estudo, uma vez que a inclusão se fazia antes da confirmação diagnóstica. Destes, 430 foram excluídos por não terem o diagnóstico de LV confirmado, 44 foram excluídos por representarem reativações da LV e três foram excluídos por terem sido diagnosticados sorologicamente, mas apresentarem diagnóstico alternativo (um caso de AIDS, um caso de hepatite A e um caso de colecistite calculosa). Foram ainda excluídos 38 pacientes por terem sido diagnosticados por testes diferentes daqueles previstos nos critérios de inclusão. A FIGURA 01A apresenta o diagrama da formação da coorte e das populações dos estudos caso-coorte.

Desta forma, a coorte final composta por 883 pacientes sintomáticos com LV foi utilizada para o estudo clínico e representou 74,1% dos pacientes admitidos no Instituto no mesmo período. Os 66 pacientes com desfecho letal na população do estudo representaram 82,5% dos óbitos identificados entre os pacientes notificados no Instituto e não houve diferença entre a representatividade de sobreviventes e não sobreviventes no estudo ( $p = 0,10$ ). As informações clínicas para o estudo de prognóstico da LV foram obtidas a partir das informações referentes aos 883 pacientes que participaram do estudo clínico geral.

### 4.5.2. Constituição da coorte do estudo de lactentes

Nesta coorte do estudo clínico geral foram incluídas as 314 crianças com idades até dois anos. Este grupo representou 35,6% da população do estudo e constituiu a população do estudo clínico de lactentes.

### 4.5.3. Constituição da população do estudo para avaliação da coagulação sanguínea

Até à época em que este trabalho foi concebido não se dispunha de publicações sobre a

incidência de CID na LV envolvendo número significativo de indivíduos. Os poucos trabalhos publicados eram relatos de casos isolados. Assim, o cálculo amostral foi realizado sob o pressuposto de que os distúrbios da hemostase associados à LV estavam condicionados à CID, mediados pela secreção de citocinas pelas células mononucleares como acontece na sepse bacteriana (Levi et al. 2002).

Para o cálculo da amostra necessária para o estudo assumiu-se que 80% dos pacientes com sangramento e que 50% dos pacientes sem sangramento apresentam alterações laboratoriais da coagulação sanguínea identificáveis pela presença de marcadores da CID. Desta forma foi estimado que uma amostra de 39 pacientes com sangramentos e 78 controles seria necessária para se detectar uma diferença de 30 % de anormalidades laboratoriais com um nível de significância estatística de 5% e um poder estatístico de 80% em testes bicaudais. Como a amostra de pacientes que atendia às exigências do grupo de casos na época incluía apenas 58 pacientes com sangramento, decidiu-se ampliar a amostra dos casos e incluí-los todos sem exceção. Os 127 controles foram obtidos aleatoriamente a partir da amostra dos pacientes que não haviam apresentado sangramento durante a doença. Esta população para o estudo caso-coorte foi selecionada em novembro de 2007.

#### 4.5.4. Constituição da população do estudo para avaliação da resposta inflamatória

Os primeiros resultados do estudo da coagulação já estavam disponíveis quando a população para o estudo da resposta inflamatória foi selecionada. Os marcadores de CID haviam se mostrado mais prevalentes do que foi inicialmente pressuposto, com 80 a 90% dos pacientes apresentando níveis elevados de produtos da degradação da fibrina (PDF) ou de dímero-D. O novo cálculo amostral para o estudo da resposta inflamatória foi realizado com a posse destes novos dados. Assumindo que 90% dos pacientes com sangramento e que 60% dos pacientes sem sangramento tivessem níveis elevados de citocinas e pudessem apresentar CID, foi estimado que uma amostra de 32 casos e 64 controles seria necessária para se detectar uma diferença de 30 % de anormalidades laboratoriais com um nível de significância estatística de 95% e um poder estatístico de 80%. Assim, um subgrupo da amostra incluída no estudo da coagulação foi aleatorizado para o estudo da atividade inflamatória e compreendeu 41 pacientes com sangramento e 93 pacientes sem sangramento, excedendo em 25% a amostra mínima calculada.

#### 4.6. Análise estatística

#### 4.6.1. Procedimentos gerais

Os dados coletados foram transportados para o programa Microsoft Windows Excell 2003<sup>®</sup>. A avaliação nutricional foi realizada pelo programa estatístico Epi Info<sup>®</sup> Versão 3.5.1 (*Division of Integrated Surveillance Systems and Services-DISSS, National Center for Public Health Informatics-NCPHI, Centers for Diseases Control and Prevention-CDC*) que utiliza os padrões do *National Center for Health Statistics* (NCHS). As demais análises foram realizadas pelo programa Stata/SE<sup>®</sup> 10.0 for Windows (*College Station, Texas, USA*).

A avaliação nutricional foi realizada segundo critérios propostos pelo CDC (1996). A análise dos pacientes com 20 anos de idade ou menos incluiu os cálculos dos índices do peso em relação à idade (peso para a idade), estatura em relação à idade (estatura para a idade) e peso em relação à estatura (peso para a estatura). Para avaliar os indivíduos com idade acima de dois anos foi utilizado o índice de massa corpórea (IMC) de forma que os pacientes com idades entre dois e vinte anos foram avaliados pelos quatro índices propostos. Assim foi possível comparar o estado nutricional de crianças acima de dois anos, adolescentes e adultos pelo IMC e o estado nutricional de lactentes, crianças e adolescentes pelos índices peso para a idade, peso para a altura e altura para a idade. Para fins de normalidade, considerou-se a dispersão de dois desvios-padrão a partir da média. Os resultados foram apresentados em percentis e escores Z de distribuição (Kuczmarski et al. 2000; CDC, 2000).

Os dados quantitativos foram apresentados em valores absolutos, proporções, médias, medianas, intervalos de confiança ou intervalos interquartis e a dispersão dos dados foi apresentada como desvios-padrão ou intervalos de valores mínimos e máximos. A relação entre variáveis foi medida pelo risco relativo (RR), razão de *odds* (RO), coeficiente de correlação ( $r$ ). As diferenças entre variáveis dicotômicas foram analisadas pelo teste do qui-quadrado ( $X^2$ ) ou teste exato de Fisher quando os dados eram esparsos. A análise de correlação de Spearman foi empregada para detectar concordância entre variáveis contínuas com dados esparsos e a análise de correlação de Pearson foi empregada para variáveis com distribuição normal. O teste  $t$  de Student foi usado para comparar diferenças entre médias de variáveis contínuas de amostras independentes com distribuição normal. Os testes de Wilcoxon e Kruskal-Wallis foram usados para comparar diferenças entre médias de variáveis com distribuições não-paramétricas.

A análise de variância única (ANOVA) foi usada para testar diferenças nas médias de variáveis dependentes com distribuição normal em relação a variáveis independentes

categóricas com duas ou mais categorias.

A normalidade de distribuição de variáveis numéricas foi visualizada em gráficos de dispersão e avaliada pelas medidas de Kurtosis e Skewness e a transformação logarítmica foi efetuada quando indicada.

Em todas as análises foram considerados os testes bi-caudais e um nível de significância estatística  $\alpha$  de 0,05. O método de ajustamento de Bonferroni foi utilizado em procedimentos de múltiplas comparações pelo procedimento de Dunn. Neste caso, os valores  $p$  apresentados referem-se às variáveis que mantiveram a significância estatística após o ajuste.

#### 4.6.2. Estudo de prognóstico da LV

##### 4.6.2.1. Manipulação das variáveis

As variáveis associadas ao óbito na análise univariada foram introduzidas no modelo de regressão logística: idade, coinfeção pelo HIV, adinamia ou sonolência, vômitos, inapetência, diarreia, constipação, dor abdominal, tosse, dispneia, edema, sangramentos, infecções bacterianas, plaquetas, leucócitos, neutrófilos, hemoglobina, AST e ALT. Como as informações sobre a intensidade da febre foram obtidas durante todo o período de internação do paciente, esta variável não foi introduzida no modelo.

As variáveis contínuas foram transformadas em variáveis categóricas de acordo com a variação da letalidade associada a cada uma. Para se encontrar os melhores pontos de corte, foram realizadas análises preliminares com pequenos intervalos e a associação com a morte foi avaliada pelo teste qui-quadrado. Os intervalos estatisticamente semelhantes foram agrupados e novamente analisados.

A variável referente à idade foi categorizada em quatro grupos: pacientes com menos de um ano, de um a 20 anos, de 20 a 40 anos, e com mais de 40 anos. A variável referente à presença de sangramentos foi categorizada em três grupos: pacientes apresentando sangramentos em um único sítio, pacientes com sangramento em dois ou três sítios e pacientes com sangramentos em quatro sítios ou mais. Petéquias e equimoses, apesar de constituírem um único sítio de sangramento, foram consideradas separadamente, visto que a fisiopatogenia parece ser diferente. A variável referente ao número de plaquetas foi dividida em dois grupos com ponto de corte de 50.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>. A variável referente à concentração de hemoglobina foi categorizada com ponto de corte de 7mg/dL. Os níveis de AST e ALT foram divididos com ponto de corte de 60 UK. O número de neutrófilos foi

categorizado em três grupos com pontos de corte de 500 e de 2500 células/ mm<sup>3</sup>. O número de linfócitos também foi categorizado em três grupos com pontos de corte de 1000 e de 3500 células/ mm<sup>3</sup>.

#### 4.6.2.2. Procedimentos da modelagem do estudo de prognóstico

A análise foi realizada em três etapas. Na primeira etapa foi realizada a análise univariada para a identificação dos preditores independentes de morte por LV usando o teste  $X^2$  para a análise de proporções e o teste *t de Student* e Kruskal-Wallis para comparação de médias. A associação foi quantificada pelo RR com intervalo de confiança de 95% de probabilidade (IC95%). As categorias de referência foram aquelas em que os pacientes tiveram a menor letalidade. Na segunda etapa todas as variáveis dicotômicas que obtiveram significância estatística estabelecida ( $p < 0,20$ ) na análise univariada, assim como as variáveis contínuas convertidas em variáveis dicotômicas, sem problemas de colinearidade foram introduzidas na análise multivariada usando o modelo de regressão logística. As variáveis foram introduzidas na análise multivariada por procedimento de eliminação retrógrada. Na terceira etapa as variáveis que apresentaram significância estatística na análise multivariada ( $p < 0,05$ ) foram introduzidas no modelo final com o peso correspondente à razão entre o módulo do menor coeficiente encontrado na regressão logística e o coeficiente da variável analisada, arredondado para o número inteiro mais próximo (Barquet, Domingo *et al.*, 1997). Finalmente o escore de predição para cada paciente foi calculado pela soma dos pontos obtidos. A significância estatística do modelo foi avaliada pela comparação entre o desfecho real apresentado pelo paciente e o desfecho obtido no modelo de predição baseado no sistema de escores de cada paciente pelo teste qui-quadrado de Pearson (HOSMER e LEMESHOW, 1989).

Por fim, o sistema foi remodelado de forma a torná-lo prático pelo agrupamento das probabilidades obtidas. A terceira etapa foi repetida para cada novo modelo e a sensibilidade, a especificidade, os valores de predição negativo e positivo e a acurácia foram comparados com a análise do modelo inicial. A curva ROC (*receiver operating characteristic*) foi analisada pela área abaixo da curva (*área under the ROC curve* – AUROC) e o índice de Youden (*J*) (RUOPP *et al.*, 2008) foi empregado para estabelecer os melhores pontos de corte.

## 5 RESULTADOS

Foram arrolados 1398 pacientes durante o período de estudo. Destes, 515 foram excluídos (430 por não atenderem às especificações de confirmação de caso, 44 por tratar-se de reativações de LV, e 38 por terem sido diagnosticados por PCR ou por teste imunocromatográfico, não previstos no protocolo). Assim a coorte compreendeu 883 pacientes com LV. Foram selecionados por aleatorização 58 casos e 127 controles para o estudo da coagulação sanguínea e desta amostra foram selecionados por aleatorização 41 casos e 93 controles para o estudo da inflamação. O estudo clínico de lactentes envolveu todas as crianças com menos de dois anos de idade, totalizando 314 indivíduos. Todos os pacientes foram considerados no estudo de escores de prognóstico. O diagrama da constituição destas populações encontra-se representado na FIGURA 01A. As características gerais da coorte do estudo clínico, da população para o estudo da coagulação sanguínea e da população para o estudo das citocinas séricas a partir da população do estudo da coagulação estão apresentadas na TABELA 01A. Observou-se homogeneidade nestas três populações com respeito à letalidade, à distribuição de idade e de sexo, a também com respeito à presença de sangramento e de infecção bacteriana. O número de pacientes com informação sobre a sorologia anti-HIV foi maior nos grupos dos estudos sobre a coagulação e sobre a resposta inflamatória em comparação à coorte do estudo clínico.

## **5.1 Estudo Clínico Geral**

### **5.1.1 Características clínicas gerais dos pacientes**

Foram obtidas informações clínicas e laboratoriais referentes a 883 pacientes com diagnóstico confirmado de LV no período compreendido entre setembro de 2005 e agosto de 2008. Houve nítido predomínio da procedência urbana, de onde vieram 655 (74,2%) pacientes. Destes, 382 (58,5%) eram procedentes de cidades com mais de 100 mil habitantes, 186 (28,5%) vinham de cidades com população entre 20 e 100mil habitantes e 85 (13,0%) vinham de cidades menores. Entre os 143 lactentes com menos de um ano de idade, 118 (88,1%) eram procedentes das cidades, enquanto 62 (65,3%) dos 95 pacientes com mais de 40 anos de idade tinham procedência urbana ( $p < 0,001$ ) (TABELA 01A).

A incidência da LV foi inversa à idade do paciente, representando uma pirâmide populacional de bases muito largadas. As crianças com idades abaixo de cinco anos representaram 52,4% do total dos pacientes e as crianças com menos de dois anos

representaram 35,6% de todos os pacientes e 34,8% dos óbitos. Não houve diferença da incidência da doença entre os sexos durante a infância, mas pacientes do sexo masculino foram mais acometidos a partir da adolescência (FIGURA 02A), com predominância estatisticamente significativa a partir de 20 anos de idade (RR = 4,0;  $p < 0,001$ ).

A média de tempo decorrido entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi de 61,1 dias e a porcentagem média de massa corpórea perdida neste período foi de 8,6%. O tempo médio de hospitalização foi de 16 dias. Os pacientes com idades abaixo de cinco anos tiveram menos tempo de sintomatologia; os pacientes abaixo de 20 anos de idade, tiveram menor perda de massa corporal durante a doença que os pacientes das faixas etárias menores e maiores e necessitaram de período de hospitalização mais breve que os pacientes com idades maiores. (TABELA 02A).

Houve 66 óbitos entre os pacientes estudados, que correspondeu ao coeficiente de letalidade de 7,5%. A distribuição da letalidade em relação à idade apresentou forma de U, com coeficientes menores entre um e 30 anos de idade (FIGURA 03A). A letalidade foi significativamente mais elevada em crianças com menos de um ano de idade (RR = 3,1;  $p = 0,002$ ) e em pacientes com idades acima de 30 anos (RR = 5,5;  $p < 0,001$ ) e foi máxima em indivíduos mais de 50 anos de idade (RR = 13,3;  $p < 0,001$ ). Não houve, contudo, diferença da letalidade entre pacientes de ambos os sexos ( $p = 0,53$ ). Duas crianças apresentaram cura espontânea.

### 5.1.2 Avaliação nutricional

Houve relato de emagrecimento durante o período da doença em 639 (72,4%) pacientes, mas 97 pacientes não souberam quantificar esta perda, de forma que havia informação sobre a intensidade da perda ponderal em 542 (61,3) pacientes. O percentual médio de perda ponderal foi de 8,9% da massa corporal. Esta perda foi significativamente mais acentuada entre os pacientes com desfecho letal que nos sobreviventes ( $p < 0,001$ ). Houve correlação positiva entre a intensidade da perda ponderal e a idade do paciente ( $r = 0,19$ ;  $p < 0,001$ ) e o tempo de duração da doença ( $r = 0,30$ ;  $p < 0,001$ ).

A TABELA 03A apresenta a distribuição de percentis da avaliação antropométrica em pacientes com menos de 20 anos de idade. Observa-se que houve comprometimento do estado nutricional de acordo com todos os índices de classificação. O índice peso para a idade foi o mais sensível, e classificou 29,1% dos pacientes como desnutridos. O índice altura para a idade foi o que mostrou maiores diferenças entre as idades, e evidenciou maior deficiência da

altura esperada para a idade em crianças acima de cinco anos e em adolescentes quando comparados aos lactentes ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença de estado nutricional entre lactentes, crianças e adolescentes quando o índice escolhido foi o peso para a altura.

A relação peso para a idade apresentou a melhor correlação com o IMC nas faixas de idades de dois a cinco anos ( $r = 0,62$ ;  $p < 0,001$ ) e em pacientes de cinco a 20 anos ( $r = 0,67$ ;  $p < 0,001$ ). A prevalência de desnutrição definida pelo IMC foi homogênea entre pacientes de diversas idades ( $p = 0,95$ ) (TABELA 04A).

Todos os parâmetros nutricionais – peso para a idade, peso para a altura, altura para a idade e IMC apresentaram a curva de distribuição desviada para a esquerda, e o índice peso para a idade foi o que apresentou maior desvio ( $p < 0,001$ ). A FIGURA 04A apresenta a distribuição de escores  $z$  para a população estudada. Observa-se que 50% ou mais dos pacientes apresentaram escores  $z$  abaixo de zero e que os valores extremos concentravam-se principalmente na direção negativa.

As curvas de distribuição dos índices antropométricos peso para a idade e IMC, separadas por sexo, estão apresentadas nas FIGURAS 05A a 10A, onde se pode visualizar o grande número de pacientes que se encontra abaixo dos percentis inferiores de normalidade.

O estado nutricional avaliado pelos índices peso para a idade, peso para a altura e IMC correlacionou-se com a duração da doença. Não houve correlação quando o índice altura para a idade foi analisado em relação à duração da doença. O tempo de duração dos sintomas foi mais prolongado entre os pacientes que apresentavam menores percentis de peso para a idade ( $r = -0,12$ ;  $p < 0,01$ ) e de peso para a altura ( $r = -0,11$ ;  $p = 0,001$ ). Houve ainda correlação positiva entre o tempo de doença e o IMC ( $r = 0,11$ ;  $p = 0,005$ ). Houve associação entre o relato de emagrecimento recente e a morte ( $RR = 2,1$ ;  $p = 0,02$ ), mas não se observou relação entre o estado nutricional, a morte ou os eventos que mais frequentemente se associaram ao óbito, como os sangramentos e as infecções bacterianas.

Foi observado que os pacientes mais desnutridos apresentavam maiores extensões do fígado ( $r = -0,11$ ;  $p = 0,001$ ) e do baço ( $r = -0,07$ ;  $p = 0,03$ ) em relação à superfície corporal (item 4.4.3.1, página 58). Os pacientes com maior duração de doença apresentavam menor esplenomegalia ( $r = -0,16$ ;  $p < 0,001$ ) e menor hepatomegalia ( $r = -0,12$ ;  $p < 0,001$ ) proporcionais à superfície corporal. Contudo, avaliando-se apenas a extensão do baço e do fígado sem corrigi-las em função da superfície corporal, observou-se relação direta destas e do tempo da doença ( $r = 0,09$ ;  $p = 0,02$  e  $r = 0,08$ ;  $p = 0,02$ ).

### 5.1.3 Infecção pelo HIV e AIDS

A triagem sorológica para o HIV foi solicitada por ocasião da admissão após orientação pré-teste hospitalar, mas apesar disto, a informação só foi obtida para 652 (73,8%) pacientes. Não se procedeu à busca ativa dos resultados após a alta hospitalar por medida de proteção à autonomia do paciente. Foram identificados 71 pacientes com a infecção pelo HIV. Destes, 54 (76,1%) eram do sexo masculino, 49 (69,0%) tinham idades entre 20 e 40 anos, 20 (28,2%) tinham mais de 40 anos. Duas crianças desta população tinham 9 e 11 anos, apresentavam alta carga viral e proporção de linfócitos CD4+ em relação aos linfócitos CD8+ abaixo de 15%. Uma estava em uso de antirretrovirais há três anos e a outra foi identificada no período de estado da LV, em grave estado de imunodeficiência.

Os pacientes co-infectados pelo HIV e *Leishmania* representaram 31,8% dos pacientes com LV acima de 20 anos de idade. A apresentação da LV foi atípica em muitos casos: foi observado que 27 (73,0%) destes pacientes não apresentavam febre e 22 (46,8%) não apresentavam esplenomegalia. O tempo decorrido entre a admissão e a confirmação do diagnóstico de LV foi superior nos pacientes com infecção pelo HIV ( $p = 0,03$ ), assim como o tempo de hospitalização ( $p < 0,001$ ). Em 24 (33,8%) pacientes não havia outros sinais de imunodeficiência associados. A incidência de manifestações hemorrágicas e de infecções bacterianas (excluídas as micobactérias) entre os pacientes co-infectados foi de 8,8% e de 21,1% respectivamente e não diferiu da população sem infecção pelo HIV. Outras infecções oportunistas como pneumocistose, criptosporidiose, histoplasmose, abscesso hepático e tuberculose foram diagnosticadas em 16 pacientes em concomitância à LV. A letalidade foi significativamente mais elevada neste grupo em relação à letalidade da população geral, com 18 (27,7%) óbitos registrados. (RR = 4,3;  $p < 0,001$ ).

#### 5.1.4 Sinais, sintomas e síndromes clínicas

A maioria dos pacientes incluídos nesta coorte apresentava quadro clínico característico de LV. A doença manifestou-se com febre em 803 (95,8%) pacientes, esplenomegalia em 836 (94,7%), palidez cutânea e mucosa em 826 (93,7) e com estes três sinais concomitantes em 756 (85,6) pacientes. Outros sinais e sintomas freqüentes foram astenia (93,7%), aumento do volume abdominal (76,2%), emagrecimento (72,4%), hepatomegalia (71,9%), inapetência (70,0%), irritabilidade (45,3%), vômitos (34,5%), diarreia (30,9%), calafrios (21,1%).

Linfonodomegalias foram identificadas em 204 (23,1%) pacientes. Em 187 destes havia acometimento de uma ou duas cadeias e em 17 pacientes havia acometimento de três ou mais cadeias. Os linfonodos em sua maioria eram pequenos, móveis, indolores, sem características

exsudativas, mas em 17 pacientes havia linfonodos com mais de 1 cm de diâmetro, com as mesmas características. Em dois pacientes houve laudo tomográfico de linfonomegalia retroperitoneal. Os pacientes com infecção pelo HIV apresentaram maior prevalência de linfonomegalias ( $p = 0,004$ ) e em dois deles, internados para investigação de febre de etiologia obscura, o diagnóstico de LV foi realizado pelo encontro de formas amastigotas nos linfonodos cervicais.

Houve grande variabilidade da apresentação clínica e a identificação dos fatores de gravidade da doença foi averiguada pela associação dos sinais, sintomas ou síndromes com o desfecho letal. A TABELA 05A apresenta os resultados da análise univariada para a identificação dos fatores de risco para o óbito. A letalidade foi mais alta em crianças com idade abaixo de um ano em comparação com crianças entre um e cinco anos ( $RR = 5,4$ ;  $p = 0,008$ ), não apresentou diferença significativa entre a letalidade entre os pacientes entre cinco e 20 anos, e voltou a se elevar em indivíduos com mais de 40 anos ( $RR = 11,2$ ;  $p < 0,001$ ). A partir dos 20 anos até às idades mais extremas a letalidade correlacionou-se positivamente com a idade ( $r = 0,13$ ;  $p = 0,03$ ).

O risco de morte foi maior entre os pacientes que apresentavam hepatomegalia ( $RR = 1,8$ ;  $IC95\% 1,0-3,2$ ) em comparação aos pacientes com dimensões normais do fígado, mas foi muito menor entre os pacientes que apresentavam esplenomegalia ( $RR = 0,01$ ;  $IC95\% 0,0-0,01$ ) em comparação àqueles que não apresentavam aumento do baço.

Houve correlação positiva entre edema e hepatomegalia ( $r = 0,15$ ;  $p < 0,001$ ), entre edema e esplenomegalia ( $r = 0,07$ ;  $p = 0,04$ ), entre edema e óbito ( $r = 0,27$ ;  $p < 0,001$ ) e entre edema e presença de sangramento ( $r = 0,32$ ;  $p < 0,001$ ).

Para investigar se a intensidade da febre estaria relacionada ao desfecho da doença, a maior e a menor temperatura axilar aferida durante a internação hospitalar foram analisadas. Hipotermia (temperatura axilar abaixo de  $36,0^{\circ}C$ ) foi relatada em apenas oito pacientes, dois dos quais com desfecho letal ( $p = 0,04$ ). Estes pacientes foram retirados da análise da hipertermia. Encontrou-se que os pacientes com temperatura máxima acima de  $39^{\circ}C$  tiveram menor letalidade ( $p < 0,001$ ) e menor incidência de sangramentos ( $p = 0,04$ ). Não foi encontrada associação da febre com os níveis de IL- $1\beta$  e TNF- $\alpha$ , que mais frequentemente induzem à febre. Houve, contudo associação entre a temperatura e os níveis séricos de CXCL-8 ( $r = -0,18$ ;  $p = 0,04$ ).

Sangramentos estiveram presentes em 227 (25,7%) pacientes e contribuíram significativamente para a morte ( $RR = 4,5$   $IC95\% 2,8-7,2$ ). As formas de apresentação destas discrasias foram epistaxe, equimoses, petéquias, sangramentos digestivos, gengivorragia e

sangramentos traumáticos ou associados aos procedimentos médico-cirúrgicos (TABELA 05A). Em 118 (52,0%) destes indivíduos o sangramento foi identificado em apenas um sítio, em 48 (21,1%) em dois sítios, em 29 (12,7%) em três sítios, em 15 (6,6%) em quatro sítios e em 17 (7,5%) em cinco sítios ou mais. O risco de morte aumentou em proporcionalidade ao número de sítios de sangramento identificados. O RR foi 3,7 (IC: 1,8-7,4;  $p < 0,001$ ) quando havia apenas um sítio de sangramento e 58,1 (IC: 17,1-261,6;  $p < 0,001$ ) quando havia cinco sítios de sangramento ou mais. A incidência de sangramentos foi homogênea nas diversas faixas de idade quando a população total foi analisada, mas foi significativamente mais elevada nas crianças com menos de dois anos de idade que não sobreviveram em relação aos demais pacientes não sobreviventes (RR = 5,2;  $p = 0,02$ ) (TABELA 13A). As crianças com idades entre um e cinco anos tiveram apenas a metade do risco de desenvolver sangramentos clinicamente identificados (RR = 0,5;  $p = 0,05$ ). Houve forte correlação mútua entre os diversos tipos de sangramento e não foi possível identificar fatores causais específicos a cada forma de discrasia.

As infecções bacterianas foram documentadas em 147 (16,6%) pacientes e estiveram significativamente associadas à letalidade (RR = 2,3; IC95% 1,4-3,8) (TABELA 05A). Sepses foi diagnosticada em 59 (40,1%) pacientes, infecção da pele ou do tecido celular subcutâneo em 33 (22,4%), pneumonia em 32 (21,8%), infecção do trato urinário em 29 (19,7%). Infecções mistas foram identificadas em 37 (25,2%) dos pacientes com infecção bacteriana. Em 54 (36,7) pacientes houve crescimento de bactéria não colonizadora habitual nas secreções, sangue ou urina, sem a identificação do foco infeccioso. Duas crianças apresentaram proctite por pseudomonas sem os clássicos sinais de febre e esplenomegalia. Houve relato de sangramento e infecção bacteriana concomitantes em 46 (5,2%) pacientes ( $p = 0,09$ ).

As infecções hospitalares, definidas pelo início das manifestações clínicas após três dias da admissão, ocorreram em 37 (4,2%) pacientes e, destas, 25 (67,6%) foram infecções da pele ou do tecido celular subcutâneo. Como as informações foram colhidas apenas durante o período de hospitalização, não se pode excluir a possibilidade de ocorrência de infecção hospitalar após a alta.

Outros sinais e sintomas associados ao óbito incluíram vômitos, diarreia, dispneia, edema, icterícia, adinamia, sonolência, inapetência e tosse.

Os distúrbios da coagulação sanguínea e as infecções bacterianas estiveram presentes em 49 (74,2%) dos 66 pacientes com êxito letal. Algumas variáveis estiveram simultaneamente associadas ao risco dos pacientes apresentarem sangramento e infecção bacteriana (vômitos,

diarreia, dispneia, tosse, estertores pulmonares, icterícia, edema, temperatura axilar baixo de 39°C, sepse, pneumonia, HIV/AIDS, plaquetas abaixo de 50000/mm<sup>3</sup>, aminotransferases e insuficiência renal) (TABELA 06A). Dentre os 226 pacientes que apresentaram sangramento, 48 (21,2%) apresentaram número normal de plaquetas no sangue periférico.

As análises estratificadas pela presença de sangramento, pela presença de infecção bacteriana ou pela presença concomitante de infecção bacteriana e sangramento mostraram constância da força da associação, sem diferença estatística entre os riscos relativos comuns. Devido à importância destas manifestações, os fatores associados ao risco do paciente apresentar sangramentos ou infecções bacterianas foram detalhados no estudo caso-coorte da coagulação sanguínea.

A radiografia do tórax foi realizada em 860 (97,4%) pacientes. O laudo emitido pelo médico radiologista foi de normalidade em 788 (91,6%) destes. A síndrome clínica de pneumonia, caracterizada por febre e tosse associada a dispneia, tiragens ou estertores pulmonares, estava presente em 128 pacientes, 126 dos quais foram submetidos a radiografia do tórax. Foram observadas condensações ou opacidades pulmonares em 18 (14,3%) dos pacientes sintomáticos respiratórios e infiltrados intersticiais em oito (6,3%). Por outro lado, houve alterações radiológicas em 46 pacientes sem manifestações respiratórias. Do total de pacientes radiografados, que incluiu os sintomáticos e os assintomáticos, 51(5,9%) apresentaram opacidades alveolares e 24 (2,8%) apresentaram opacidades intersticiais. Houve cinco óbitos (9,8%) entre os pacientes com opacidades alveolares e 10 óbitos (38,1%) entre os pacientes com infiltrados intersticiais. O risco de pacientes com opacidades do tipo alveolar evoluírem para o óbito em relação aos pacientes com radiografias normais foi de 1,57, mas sem significância estatística, ao passo que o risco relativo de pacientes com opacidades do tipo intersticial evoluírem para a morte foi de 8,9 ( $p \leq 0,001$ ). Oito dos pacientes que apresentaram opacidade intersticial tinham infecção pelo HIV ( $p < 0,001$ ) e seis deles evoluíram para o óbito. Opacidades intersticiais estiveram ainda associados à desnutrição ( $p < 0,001$ ), à tosse ( $p = 0,04$ ), à dispneia ( $p < 0,001$ ), à cianose ( $p < 0,001$ ), e estertores pulmonares ( $p < 0,001$ ). Quando esta associação foi controlada pela presença de infecção pelo HIV, o risco de pacientes com opacidade intersticial evoluírem para a morte foi de 5,2 (IC 95% 1,7-16,2) em relação aos pacientes com radiografias normais ( $p < 0,001$ ). Hemoculturas para bactérias foram realizadas em 34 (45,3%) dos pacientes que apresentaram alterações radiológicas pulmonares e foram positivas em 6/20 (30,0%) pacientes que apresentaram opacidade pulmonar alveolar, mas em nenhum de 14 pacientes com opacidade intersticial.

Não se observou associação entre a presença de hepatomegalia ou de esplenomegalia

com a morte, visto que estavam presentes na maior parte dos pacientes (94,7% e 71,9%). Contudo, como havia grande diversidade na magnitude do crescimento destes órgãos, decidiu-se investigar a associação entre a gravidade da doença e a extensão do baço e do fígado.

Foi observado que os pacientes tinham médias comparáveis da extensão do baço e do fígado, independentes da estatura, do peso ou da idade do paciente, significando que quanto menor fosse a massa corporal do paciente, maiores proporcionalmente seriam estes órgãos.

Quando as variáveis correspondentes à extensão do baço e do fígado corrigidas pela superfície corporal foram analisadas, encontrou-se forte correlação negativa com a idade, com o peso e com a estatura do indivíduo (TABELA 07A). Assim, as análises que se referem à extensão do baço e fígado a seguir, referem-se à extensão do órgão corrigida pela superfície corporal.

A extensão do baço correlacionou-se negativamente com o tempo da doença ( $r = -0,15$ ;  $p < 0,001$ ), número de plaquetas ( $r = -0,55$ ;  $p < 0,001$ ) número de neutrófilos ( $r = -0,15$ ;  $p < 0,001$ ), nível de hemoglobina ( $r = -0,20$ ;  $p < 0,001$ ), globulina sérica ( $r = -0,11$ ;  $p = 0,001$ ) e com a presença de epistaxe ( $r = -0,12$ ;  $p < 0,001$ ). Houve correlação positiva da extensão do baço com número de leucócitos ( $r = 0,22$ ;  $p < 0,001$ ) e de linfócitos ( $r = 0,47$ ;  $p < 0,001$ ), com a enzima hepáticas AST ( $r = 0,12$ ;  $p < 0,001$ ), mas não com a ALT ( $r = 0,06$ ;  $p = 0,08$ ) e com a ocorrência de edema ( $r = 0,22$ ;  $p < 0,001$ ), infecção bacteriana ( $r = 0,10$ ;  $p = 0,002$ ) e insuficiência renal ( $r = 0,21$ ;  $p < 0,001$ ). A extensão do fígado correlacionou-se positivamente com a ocorrência de sangramento digestivo ( $r = 0,06$ ;  $p = 0,05$ ), de infecção bacteriana ( $r = 0,09$ ;  $p = 0,009$ ) e negativamente com os níveis de globulina ( $r = -0,11$ ;  $p = 0,002$ ). (TABELA 08A).

#### 5.1.5 Alterações laboratoriais

As alterações laboratoriais foram relevantes na maioria dos pacientes (TABELA 09A). O hemograma foi característico de LV na maior parte dos pacientes: 787 (89,1%) apresentavam níveis de hemoglobina inferiores a 10mg/dL, 742 (84,1%) apresentavam menos de 5000 leucócitos por mm, 632 (71,4%) apresentavam menos de 150 mil plaquetas por mm<sup>3</sup>.

Anemia (hemoglobina abaixo de 12 mg/dL), leucopenia (leucócitos abaixo de 5000/mm<sup>3</sup>) ou plaquetopenia (plaquetas abaixo de 150.000/mm<sup>3</sup>) estiveram presentes em 878 (99,4%) dos pacientes. O número de neutrófilos estava abaixo de 500/mm<sup>3</sup> em 143 (16,2%) pacientes, a hemoglobina estava abaixo de 7 mg/dL em 244 (27,6%) e as plaquetas abaixo de 50.000/mm<sup>3</sup> em 73 (8,3%) pacientes.

A taxa de filtração glomerular estava abaixo de 60 mL/min/m<sup>2</sup> em 288 (33,7) de 853 pacientes. Destes, 43 evoluíram para o óbito e 16 evoluíram com recuperação da função renal. Dez pacientes com função renal normal à admissão evoluíram com insuficiência renal, sendo oito associados ao uso de desoxicolato de anfotericina B. Hematúria foi observada em 21/837(2,5%) pacientes, esteve correlacionada ao óbito ( $r = 0,08$ ;  $p = 0,02$ ) e em apenas dois casos havia infecção do trato urinário. A proteinúria foi mais freqüente que a hematúria, e foi referida em 276/834 (33,1%) pacientes, esteve associada à insuficiência renal ( $r = 0,15$ ;  $p < 0,001$ ), mas não se relacionou ao edema, a infecções bacterianas ou aos sangramentos.

Alterações hepáticas foram freqüentes fatores de risco para a morte. Icterícia foi relatada em 139 (15,7%) dos pacientes, mas a elevação das aminotransferases e das bilirrubinas hepáticas para níveis 50% acima dos limites máximos ocorreu em 29,5% de 774 pacientes. A fosfatase alcalina estava acima dos valores normais para a idade em 150 (22,3%) e também associou-se ao óbito.

Os níveis séricos de albumina estiveram negativamente relacionados ao óbito ( $r = -0,07$ ;  $p = 0,04$ ), à presença de edema ( $r = -0,12$ ;  $p < 0,001$ ) e aos níveis de aminotransferases hepáticas ( $r = -0,08$ ;  $p = 0,03$ ). Houve correlação positiva entre os níveis de globulina e o número de plaquetas ( $r = 0,13$ ;  $p < 0,001$ ). De 35 pacientes que apresentavam níveis de albumina sérica abaixo de 2mg/dL, 19 (54,3%) apresentavam edema. Por outro lado, de 201 pacientes que apresentavam edema, apenas 19 (9,4%) apresentavam níveis de albumina abaixo de 2mg/dL. Porém, de 210 pacientes que apresentavam edema, apenas 25 (11,9) apresentavam níveis de albumina abaixo de 2mg/dL. Se o ponto de corte para esta análise for elevado para 3 mg/dL, encontra-se que apenas 87 (41,4%) dos pacientes edemaciados tinham níveis de albumina abaixo deste limite e que 123 (58,6%) pacientes com edema, na verdade, não apresentavam hipoalbuminemia como explicação.

A TABELA 10A apresenta os eventos que antecederam o óbito. Dos 66 pacientes com desfecho letal, 52 (78,8%) apresentaram sinais de choque nas últimas horas antes do óbito, 40 (60,1) apresentaram sangramentos graves como epistaxe volumosa, sangramento digestivo, hematomas, equimoses. Convulsões foram relatadas em 12 (18,2%) pacientes, sepse não bacteriana em 18 (24,2%), sepse em 14 (21,2%), falência respiratória em 10 (15,2%), insuficiência renal em 10 (15,2%). Houve ainda quatro óbitos em decorrência de pancreatite associada aos antimoniais pentavalentes e um caso de morte por insuficiência cardíaca congestiva em um paciente com disfunção cardíaca anterior à LV.

## 5.2 Estudo Clínico de Lactentes

### 5.2.1 Sinais, sintomas e síndromes clínicas

Pela importância da LV em crianças, decidiu-se investigar as apresentações clínicas e laboratoriais específicas dos lactentes e identificar possíveis fatores de risco para a morte. Este estudo envolveu 314 crianças com menos de dois anos de idade na coorte geral e representou 35,6% do total de pacientes. Houve 23 óbitos neste grupo o que correspondeu a 34,8% da letalidade geral. As crianças de 6 a 18 meses de idade foram mais acometidas em relação às crianças no primeiro semestre de vida e àquelas acima de 18 meses de idade. A incidência foi significativamente menor em crianças abaixo de 6 meses de idade e acima de 18 meses de idade (FIGURA 11A).

A TABELA 11A apresenta as características gerais das crianças com LV abaixo de cinco anos de idade. Não houve diferença na distribuição entre os sexos neste grupo de pacientes. A maioria das crianças (76,7%) provinha de regiões urbanas e houve relação inversa da procedência urbana com a idade, com maior proporção de crianças menores de dois anos de idade provenientes de regiões urbanas e de cidades com mais de 100.000 habitantes ( $p = 0,001$ ). A duração da doença foi significativamente menor nas crianças menores ( $p < 0,001$ ). A letalidade foi significativamente mais elevada em crianças abaixo de um ano de idade que em crianças maiores e adolescentes, e só foi superada pela letalidade verificada em pessoas com mais de 50 anos de idade ( $p = 0,02$ ).

### 5.2.2 Características clínicas dos lactentes

Quando comparadas aos demais pacientes, as crianças com menos de dois anos estiveram em maior risco de apresentar vômitos (RR = 1,7; IC 95% 1,2-2,2), diarreia (RR = 1,6; IC 95% 1,2-2,2), edema (RR = 1,4; IC 95% 1,0-1,9), dispneia (RR = 1,8; IC 95% 1,2-2,6), estertores pulmonares (RR = 1,6; IC 95% 1,0-2,7), sonolência (RR = 1,5; IC 95% 1,1-2,0), tosse (RR = 2,3; IC 95% 1,7-3,1). O risco de infecções bacterianas também foi maior neste grupo de lactentes (RR = 1,9; IC 95% 1,3-2,8), o que incluiu sepse, infecção do trato urinário e infecção da pele e dos anexos. O risco de pneumonia intersticial, mesmo quando controlado para a presença de infecção pelo HIV, foi mais reduzido entre os lactentes (RR = 0,2; IC 95% 0,0-0,8). Petéquias (RR = 2,4; IC 95% 1,2-4,6) e equimoses (RR = 2,3; IC 95% 1,4-3,8) foram mais frequentes nos lactentes, mas a epistaxe prevaleceu entre os pacientes acima de dois anos de idade. Os lactentes tiveram ainda risco menor de apresentar icterícia

(RR = 0,6; IC 95% 0,4-0,9), epistaxe (RR = 0,4; IC 95% 0,2-0,6) e pneumonia intersticial (RR = 0,2; IC 95% 0,0-0,8). Não houve diferença do risco de desenvolver pneumonia intersticial entre os lactentes e os demais pacientes quando a análise foi estratificada para a presença de infecção pelo HIV. (TABELA 12A). Mas, apesar de menos frequentes, a icterícia e a epistaxe foram mais fortemente associadas ao óbito entre os lactentes que entre os adultos, como foi demonstrado pelo teste de homogeneidade entre os riscos relativos (TABELA 13A). As crianças apresentaram maiores extensões do baço e do fígado (TABELA 8A).

A TABELA 14A apresenta as características clínicas da LV em crianças abaixo de dois anos de idade em relação à sobrevivência. Os distúrbios da coagulação foram relatados em 79 crianças e as infecções bacterianas em 71. As variáveis que se associaram à morte de crianças com menos de dois anos de idade associadas à morte foram basicamente as mesmas que se associaram à morte de indivíduos com mais de dois anos de idade. Contudo, o risco de morte associada a edema, sonolência e icterícia foi maior entre as crianças com menos de dois anos de idade, e o risco de morte associada a sepse e insuficiência renal foi maior entre os adultos. Os sinais clínicos mais associados à morte neste grupo foram a dispneia (RR = 7,8; IC 95% 3,4-18,3), o edema (RR = 12,4; IC 95% 4,3-35,4), a icterícia (RR = 8,4; IC 95% 4,0-17,7). Vinte e três crianças apresentaram os dois eventos concomitantes. A maioria das mortes foi associada a sangramentos (18/23) (RR= 10,7; IC 95% 4,1-27,9) ou a infecções bacterianas (10/23) (RR = 2,6; IC 95% 1,2-5,7) e em oito crianças a morte estava associada às duas complicações simultaneamente (TABELA 13A). Pela análise multivariada, encontrou-se que sangramentos (equimoses, epistaxe, gengivorragias, sangramento digestivo), infecções bacterianas (sepse e infecção da pele e do tecido celular subcutâneo) e elevação das aminotransferases estavam associados à morte.

### 5.2.3 Características laboratoriais dos lactentes

A plaquetopenia foi, dentre as alterações laboratoriais, a que esteve mais fortemente associada ao óbito (RR = 6,1; IC 95%: 3,8-9,8). A leucopenia (RR = 1,9; IC 95%: 1,0-3,5) esteve negativamente correlacionada à morte, mas a neutropenia não apresentou associação significativa com o desfecho letal quando analisada em diversos pontos de corte. A anemia não se associou à morte (RR = 1,4; IC 95%: 0,9-2,3). Leucócitos, linfócitos, neutrófilos, hemoglobina e plaquetas estiveram positivamente correlacionados entre si e 69 (22,0%) das crianças com menos de 24 meses de idade apresentaram leucócitos  $< 5000/\text{mm}^3$ , hemoglobina  $< 7\text{mg/dL}$  e plaquetas  $< 150.000/\text{mm}^3$ . As alterações laboratoriais relacionadas à função renal

( $r = 0,20$ ;  $p < 0,001$ ) e às aminotransferases hepáticas ( $r = 0,16$ ;  $p < 0,001$ ) também associaram-se ao óbito. (TABELA 15A).

Os sintomas respiratórios foram mais freqüentes entre os lactentes que após os dois anos de idade (TABELA 12A). Dentre as 314 crianças do estudo, 112 (35,7%) apresentaram tosse associada a dispneia, estertores ou tiragens. Destas, 110 foram submetidas a exame radiográfico do tórax. Contudo, imagens compatíveis com pneumonia foram encontradas em apenas 18 (16,4%) das crianças avaliadas. Destas crianças com diagnóstico de pneumonia, 17 sobreviveram. Não houve associação entre o diagnóstico de pneumonia e o óbito. A única criança com pneumonia que apresentou desfecho letal apresentava também sangramentos abundantes e evoluiu com falência de múltiplos órgãos. O risco de lactentes apresentarem pneumonia intersticial foi semelhante ao risco dos indivíduos além desta idade (TABELA 13A).

### **5.3 Modelo de Prognóstico e Sistema de Escores**

A população de estudo, os procedimentos da manipulação das variáveis e da modelagem do estudo de prognóstico estão descritos na seção Pacientes e Métodos (seção 4.6.2). O modelo foi construído em várias etapas, com a introdução de variáveis de informação clínica e laboratorial. Após cada etapa os modelos eram comparados estatisticamente.

O modelo de prognóstico da LV baseado em escores clínicos foi obtido com as informações da coorte composta por 883 pacientes do estudo clínico geral e o modelo de prognóstico baseado em escores clínicos e laboratoriais foi obtido com as informações de 825 pacientes, visto que não havia informações suficientes sobre os testes laboratoriais referentes a 58 pacientes.

A análise univariada identificou as seguintes variáveis em associação ao óbito: idade menor que um ano e idade acima de 40 anos; vômitos, diarreia, dispneia, edema, icterícia, adinamia, sonolência, inapetência, tosse, estertores pulmonares, qualquer sangramento, infecções bacterianas, infecção pelo HIV ou AIDS, hepatomegalia, maior temperatura abaixo de 39°C. Estas variáveis foram introduzidas no modelo de regressão logística e o melhor conjunto de variáveis preditoras de morte na análise multivariada incluiu a idade, a coinfeção pelo HIV, a presença de sangramentos, edema, vômitos, icterícia, dispneia e infecções bacterianas. O grupo de pacientes com idade acima de 40 anos apresentou risco aumentado de morte e o grupo de pacientes com idades entre um e 20 anos apresentou risco diminuído comparados a pacientes com idades abaixo de um ano e idades entre 20 e 40 anos.

As variáveis correspondentes aos exames laboratoriais que contribuíram para o modelo na análise univariada foram: número de leucócitos e de plaquetas, níveis de AST ou de ALT e taxa de filtração glomerular ou níveis séricos de creatinina e todas permaneceram no modelo após a análise multivariada. A TABELA 16A apresenta os resultados destas análises.

O primeiro modelo foi construído com as variáveis clínicas significantes, como proposta para a avaliação do paciente imediatamente após à admissão, antes que os exames laboratoriais estivessem disponibilizados. Todos os 883 pacientes da coorte geral foram incluídos nesta análise. O peso que cada variável recebeu foi atribuído de acordo com o coeficiente obtido no modelo pela análise de regressão logística. A variável referente à presença de sangramentos recebeu três pontos quando havia três ou mais sítios de sangramento, dois pontos quando havia em dois sítios e um ponto se apenas um sítio de sangramento estava presente. A variável referente à idade acima de 40 anos recebeu cinco pontos, idade entre um e 20 anos representou risco protetor e subtraiu um ponto. As idades abaixo de um ano e entre 20 e 40 anos foram consideradas os valores basais do modelo com zero ponto e foram excluídas pela análise multivariada. Para eliminar o valor negativo da variável referente à idade entre um e 20 anos, todas as variáveis referentes à idade foram corrigidas pela soma de um ponto. Ao final, então, as variáveis referentes às faixas de idade entre 20 e 40 anos e abaixo de um ano receberam um ponto; a faixa de idade de um a 20 anos saiu do modelo por totalizar zero ponto e idade acima de 40 anos totalizou dois pontos. A variável referente à infecção pelo HIV recebeu três pontos e as demais variáveis, edema, vômitos, icterícia, infecção bacteriana e dispneia receberam um ponto. (TABELA 17A).

Este modelo de predição de morte baseado em informações clínicas teve pontuação máxima de 13 pontos e a maior pontuação observada na população estudada foi 10 pontos. A sensibilidade<sup>1</sup> variou de zero a um, a especificidade<sup>2</sup> variou de 0,20 a 1,00. O valor preditivo do teste positivo (VPP)<sup>3</sup> variou de 0,005 a 0,935 e o valor preditivo do teste negativo (VPN)<sup>4</sup> variou de zero a 0,068. (TABELA 18A). Este modelo gerou uma curva ROC com área abaixo da curva de 0,89 (IC95% 0,83-0,92), com adequação satisfatória (Pearson= 11,3;  $p = 0,51$ ). O escore três correspondeu ao ponto onde a soma da sensibilidade e da especificidade foram máximas ( $J = 0,81$ ). Neste ponto a probabilidade do indivíduo sobreviver foi 0,98 e a

<sup>1</sup> Sensibilidade é aqui interpretada como a proporção de indivíduos que evoluíram para morte e que apresentaram pontuação de escore igual ou inferior a determinado ponto de corte.

<sup>2</sup> Especificidade é a proporção de indivíduos que sobreviveram à LV e que apresentaram pontuação de escore igual ou inferior a determinado ponto de corte.

<sup>3</sup> Valor preditivo do teste positivo ou probabilidade pós-teste positivo é a proporção de indivíduos apresentando pontuação de escore igual ou inferior a determinado ponto de corte que evoluíram para a morte.

<sup>4</sup> Valor preditivo do teste negativo ou probabilidade pós-teste negativo é a proporção de indivíduos apresentando pontuação de escore igual ou inferior a determinado ponto de corte que sobreviveram.

probabilidade de morrer foi 0,05. Este modelo gerou uma área abaixo da curva ROC de 0,89 (IC95% 0,85-0,92). O desempenho deste sistema está apresentado na TABELA 18A.

Como é desejável que este instrumento seja de fácil interpretação pelo médico assistente, as probabilidades de morte foram reagrupadas para gerar um modelo mais simples e com melhor aplicabilidade clínica. Assim, um novo sistema foi derivado deste sistema inicial pelo agrupamento dos escores por faixa de probabilidade de morte. Desta forma os cinco novos escores agruparam as probabilidades de morte menores de 0,05, de 0,06 a 0,15, de 0,16 a 0,30, de 0,31 a 0,75 e acima de 0,75. As variações da sensibilidade e da especificidade obviamente não diferiram do modelo inicial. O VPP variou de 0,03 a 0,96 e o VPN variou de 0,01 a 0,07. O escore dois correspondeu ao ponto onde a soma da sensibilidade e da especificidade foi máxima ( $J = 0,83$ ). Neste ponto a probabilidade do indivíduo sobreviver foi 0,97 e a probabilidade de morrer foi 0,13. Este modelo gerou uma área abaixo da curva ROC de 0,88 (IC95% 0,83-0,92), e desempenho avaliado pela diferença entre as frequências dos eventos observados e dos eventos esperados foi satisfatório (Pearson= 3,0;  $p = 0,39$ ). Os resultados deste sistema estão apresentados na TABELA 19A.

Para melhorar a adequação do modelo, os mesmos passos desta modelagem foram conduzidos com a adição das informações de exames de complementares facilmente acessíveis e que, na análise univariada, haviam se mostrado significantes, a saber: número de leucócitos, número de plaquetas e enzimas hepáticas. A função renal definida como taxa de filtração glomerular igual a 60 ml/dia/m<sup>2</sup> ou como creatinina sérica acima de 1,5mg/dL apresentou resultados equiparáveis na análise univariada e no modelo de regressão logística. Já que a creatinina é um exame direto, facilmente interpretado pelo médico, o modelo de prognóstico utilizou este parâmetro laboratorial em substituição à taxa de filtração glomerular, a qual exige a aplicação de fórmulas ou exames mais complexos. Nesta etapa foram excluídos 58 pacientes de quem não se dispunha de informações laboratoriais suficientes, de forma que 825 indivíduos (817 sobreviventes e 60 não sobreviventes) contribuíram para a modelo de prognóstico com dados clínicos e laboratoriais.

A análise de regressão seguiu os mesmos passos já descritos. O peso de cada variável foi novamente obtido pela razão entre o módulo do menor coeficiente encontrado na regressão logística e o coeficiente da variável analisada e foi arredondado para o número inteiro mais próximo. As variáveis referentes aos sinais e sintomas permaneceram inalteradas no modelo, sem modificações de seus coeficientes e pesos. As variáveis contínuas referentes aos exames laboratoriais foram transformadas em variáveis *dummy* assumindo-se os seguintes valores como pontos de corte: 1500 leucócitos/mm<sup>3</sup> (peso = 1), 50.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> (peso = 2),

AST ou ALT igual a 100 UK/L (peso = 2) e creatinina sérica acima de 1,5 mg/dL (peso = 5). Os escores deste novo modelo de predição de morte variaram de um a 22 pontos e a maior pontuação observada na população estudada foi 18 pontos. A sensibilidade deste novo modelo variou de zero a um e a especificidade variou de 0,13 a um. O VPN variou de 0,004 a 0,985 e o VPV variou de zero a 0,077 (TABELA 20A). O escore cinco correspondeu ao ponto onde a soma da sensibilidade e da especificidade foi máxima ( $J = 0,85$ ). Neste ponto a probabilidade do indivíduo sobreviver foi 0,99 e a probabilidade de morrer foi 0,05. Este modelo gerou uma área abaixo da curva ROC de 0,93 (IC95% 0,90- 0,95), teve adequação satisfatória (Pearson=22,9;  $p=0,24$ ) e apresentou melhor desempenho quando comparado ao modelo que incluiu apenas as variáveis clínicas ( $p < 0,001$ ). Estes resultados são apresentados na TABELA 20A.

Este modelo também foi simplificado pelo agrupamento das probabilidades em intervalos para gerar um modelo mais simples, com cinco escores. Os cinco novos escores agruparam as probabilidades de morte menores de 0,05, de 0,06 a 0,15, de 0,16 a 0,30, de 0,31 a 0,75 e acima de 0,75. Neste modelo simplificado e com as informações laboratoriais adicionadas, o escore dois correspondeu ao ponto onde a soma da sensibilidade e da especificidade foi máxima ( $J = 0,83$ ). Neste ponto a probabilidade do indivíduo sobreviver foi 0,97 e a probabilidade de morrer foi 0,07. Este modelo gerou uma área abaixo da curva ROC de 0,88 (95% IC 0,83-0,92), e apresentou desempenho adequado em relação à diferença entre os eventos observados e os eventos esperados (Pearson=2,4;  $p = 0,49$ ). Os resultados deste sistema estão apresentados na TABELA 21A.

Por fim, apresenta-se as figuras 13A a 17A para apresentar os resultados desta análise de forma gráfica. As FIGURAS 13A e 14A mostram as curvas de sensibilidade e de especificidade do modelo que incorporou apenas as informações clínicas e do modelo que incorporou as informações clínicas e laboratoriais. A FIGURA 15A mostra a comparação entre as duas curvas ROC geradas pelo modelo de escores utilizando as variáveis clínicas ou as variáveis clínicas acrescidas das laboratoriais. A área abaixo da curva ROC foi maior quando se acrescentou as informações laboratoriais em relação à curva composta apenas por informações clínicas ( $p < 0,001$ ). A FIGURA 16A mostra a comparação das duas curvas ROC geradas pelo modelo de escores de variáveis clínicas ou de variáveis clínicas e laboratoriais com os intervalos de probabilidades agrupados para gerar um modelo de cinco pontos. Mais uma vez pode-se observar que as informações dos exames laboratoriais contribuíram significativamente para o sistema ( $p < 0,001$ ). A FIGURA 17A apresenta a comparação das curvas ROC do modelo gerado pelas variáveis referentes aos eventos clínicos e laboratoriais

presentes à admissão no modelo com 22 pontos e no modelo com valores de probabilidades reagrupados para gerar uma escala de cinco pontos. Por fim, a FIGURA 18A apresenta a probabilidade de morte<sup>5</sup> e de sobrevivência<sup>6</sup> de acordo com os pontos de escore alcançados. Vê-se que a probabilidade do paciente sobreviver mantém-se relativamente estável até alcançar cinco ou seis pontos e a partir de então esta probabilidade aumenta esponencialmente. Segundo este modelo, a probabilidade de um paciente qualquer com escore  $\leq 18$  sobreviver é 0,99 e a probabilidade de um paciente qualquer com escore  $\leq 18$  não sobreviver é 0,92 (equivalente a 1-letalidade observada). Se tomarmos o ponto cinco, que foi o que maximizou a sensibilidade e a especificidade do sistema, teremos que a probabilidade de um paciente qualquer sobreviver é 0,99 e a probabilidade de um paciente não sobreviver é 0,05.

Em resumo, o modelo de prognóstico usando apenas as variáveis clínicas gerou uma curva ROC significativa, com adequação satisfatória. O mesmo modelo simplificado em cinco escores também apresentou adequação suficiente. O modelo que incluiu variáveis clínicas e laboratoriais composto por 22 pontos de escores foi o que apresentou melhor adequação, mas este modelo, quando simplificado para cinco escores apresentou significância limítrofe ( $p = 0,07$ ). O desempenho do modelo contendo variáveis clínicas e laboratoriais, avaliado pela medição da área abaixo da curva, foi estatisticamente superior ao desempenho do modelo composto apenas por variáveis clínicas ( $p < 0,001$ ).

#### 5.4 Estudo da Coagulação Sanguínea

A população do estudo caso-coorte foi constituída com o objetivo de estudar aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos distúrbios da coagulação na LV. Foram aleatorizados 185 pacientes para o estudo das alterações da coagulação sanguínea. Dentre estes pacientes, 110 (59,5) não apresentaram sangramento ou infecção bacteriana, 47 (25,4) apresentaram sangramento e não infecção bacteriana, 17 (9,2) apresentaram infecção bacteriana e não sangramento e 10 (5,4) apresentaram sangramento e infecção bacteriana.

Entre estes 185 pacientes foram observados 15 óbitos, nove dos quais foram associados a sangramentos, três associados à infecção bacteriana e sangramentos, um associado à infecção

---

<sup>5</sup> Probabilidade de morte refere-se à proporção dos indivíduos que apresentaram pontuação de escore igual ou inferior a determinado ponto de corte que não sobreviveram, equivale à probabilidade pós-teste positivo, ou valor preditivo do teste positivo.

<sup>6</sup> Probabilidade de sobrevivência refere-se à proporção dos indivíduos que apresentaram pontuação de escore igual ou inferior a determinado ponto de corte que sobreviveram. É o complemento do valor preditivo do teste negativo (1-Probabilidade pós-teste negativo)

bacteriana, um associado à toxicidade pelo antimoniato de glucamina e um óbito relacionado à AIDS. A letalidade foi maior entre os pacientes que apresentaram sangramentos e crianças com menos de um ano de idade. Não houve diferença de letalidade com relação ao sexo ou à presença de AIDS neste grupo (TABELA 22A)

#### 5.4.1 Avaliação global da coagulação

A média do TS foi 106 segundos com desvio padrão de 50 segundos. A média do TC foi de cinco minutos e 51 segundos com desvio padrão de um minuto e 47 segundos e a correlação com os sangramentos foi fraca, mas significativa ( $r = 0,08$ ;  $p = 0,01$ ). Dentre 58 pacientes com sangramento, apenas 6 (10,3) apresentaram TS e TC prolongados. A média do TAP foi 64,8% ( $\sigma = 32,8$ ) e a média do TPP foi 77,6 segundos ( $\sigma = 25,1$ ). Não houve associação estatisticamente significativa entre os valores de TS, TAP e TPP com a presença de sangramento ou com o número de plaquetas circulantes. O número médio de plaquetas no sangue periférico foi  $119.700/\text{mm}^3$  ( $\sigma = 78,4$ ) nos pacientes sem sangramento e  $97.800/\text{mm}^3$  ( $\sigma = 75,1$ ) nos pacientes com sangramento ( $p < 0,001$ ).

Os marcadores da ativação da coagulação intravascular foram testados para melhor caracterização destes fenômenos hemorrágicos e incluíram dímero D, fibrinopeptídeo A, fibrinogênio e quantificação de PDF, e os resultados estão resumidos na TABELA 23A.

#### 5.4.2 Dímero D

Os níveis plasmáticos de dímero D encontraram-se elevados (acima de 500ng/mL) em 183 (98,9%) pacientes e níveis muito elevados (acima de 1000ng/mL) foram encontrados em 163 (88,1%) pacientes. Estes níveis foram mais elevados em pacientes com sangramento ( $p = 0,04$ ) e foram máximos em pacientes apresentando sangramento e infecção bacteriana ( $p < 0,001$ ) (FIGURA 12A). Os níveis de dímero D correlacionaram-se negativamente com a intensidade da febre ( $r = -0,19$ ;  $p = 0,008$ ) e com o tempo de duração da doença ( $r = -0,24$ ;  $p = 0,001$ ). Houve correlação entre os níveis de dímero D e a PCR ultra ( $r = 0,43$ ;  $p < 0,001$ ).

#### 5.4.3 Fibrinopeptídeo A

Os valores de FPA foram transformados em logaritmos antes da análise. Os níveis de de

FPA estavam elevados em 62,6% dos pacientes. Os logaritmos dos níveis de FPA correlacionaram-se negativamente com o tempo de duração da doença ( $r = 0,22$ ;  $p = 0,003$ ) e com os níveis de PCR<sub>ultra</sub> ( $r=0,35$ ;  $p=0,009$ ). Os níveis de FPA se correlacionaram com os níveis de IL-12 ( $p=0,03$ ), e foram mais baixos nos pacientes que apresentaram sangramento ( $p = 0,03$ ) e não houve associação entre os níveis de FPA e a ocorrência infecções bacterianas ( $p = 0,11$ ).

#### 5.4.4 Fibrinogênio

A dosagem do fibrinogênio plasmático foi realizada em apenas 157 dos 185 pacientes aleatorizados para o estudo caso-coorte. Os níveis estavam elevados em 139 (88,5%) pacientes e foram muito variáveis entre os grupos de pacientes com sangramento ou com infecção bacteriana. Não houve diferença estatística entre os níveis séricos de fibrinogênio entre os pacientes que apresentaram sangramento ( $727,0 \pm 310,1$  ng/mL) e entre aqueles que não apresentaram evidência clínica de distúrbio da coagulação ( $696,4 \pm 52,9$  ng/mL). Não se verificou associação entre os níveis de fibrinogênio e a presença de infecção bacteriana, mas quando o grupo apresentando distúrbios da coagulação foi controlado pela presença de infecção bacteriana, os níveis de fibrinogênio foram mais baixos nos pacientes que apresentavam sangramento e infecção bacteriana concomitantes ( $p = 0,09$  no teste bicaudal e  $p = 0,05$  no teste unicaudal). Os níveis de fibrinogênio correlacionaram-se positivamente com a PCR<sub>ultra</sub> ( $r=0,40$ ;  $p=0,01$ ), com os níveis de IFN- $\gamma$  ( $p = 0,03$ ) e com os níveis de CXCL-8 ( $p = 0,007$ ).

#### 5.4.5 Produto de degradação da fibrina

Níveis elevados de PDF, evidenciados pela reação de aglutinação em látex que corresponde a concentrações de PDF acima de 200ng/mL, foram observados em 121 (65,8%) pacientes. A positividade do teste foi observada em 46 (79,4%) pacientes com sangramento e em 75 (59,5%) pacientes sem sangramento ( $p = 0,008$ ) (TABELA 24A). O teste apresentou sensibilidade de 86% e especificidade de 81% em detectar pacientes com sangramento. O valor preditivo positivo do teste foi alto entre os pacientes com sangramento (97,5), mas o valor preditivo negativo foi de apenas 40,5. A positividade do teste correlacionou-se negativamente com o tempo de duração da doença ( $r = -0,26$ ;  $p < 0,001$ ) e com a intensidade da febre ( $r = -0,18$ ;  $p = 0,01$ ).

## 5.5 Atividade Inflamatória na Leishmaniose Visceral

A atividade inflamatória na LV foi avaliada em uma população composta por 124 pacientes selecionados por aleatorização sucessiva a partir do estudo caso-coorte que avaliou a coagulação sanguínea. Não houve diferença das características basais dos pacientes da amostra global, dos pacientes do estudo para a avaliação da coagulação e dos pacientes do estudo para a avaliação da atividade inflamatória. (TABELA 01A, sessão 4.1.1). Foram dosadas as seguintes citocinas/quimiocina séricas: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, CXCL-8, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Informações adicionais sobre a resposta inflamatória foram obtidas pela dosagem da proteína C reativa ultrasensível (PCR<sub>ultra</sub>) e velocidade de hemossedimentação (VHS).

A resposta inflamatória foi analisada em grupos de pacientes estratificados pela presença de sangramentos e de infecções bacterianas.

A velocidade de hemossedimentação na primeira e na segunda horas estava elevada em todos os pacientes. A média da VHS na primeira hora foi 63,8mm e na segunda hora foi 83,2mm. A VHS esteve negativamente correlacionada ao desfecho letal ( $r = -0,09$ ;  $p = 0,01$ ), com a extensão do baço ( $r = -0,09$ ;  $p = 0,01$ ) e com a extensão do fígado ( $r = -0,10$ ;  $p = 0,005$ ). Houve correlação positiva da VHS com os níveis de FPA ( $r = 0,15$ ;  $p = 0,05$ ) e correlação negativa com os níveis de dímero D ( $r = -0,17$ ;  $p = 0,02$ ) e com os PDF ( $r = -0,16$ ;  $p = 0,04$ ).

Houve ainda correlação significativa entre os níveis de PCR<sub>ultra</sub> e os níveis de IL-1 $\beta$  ( $r = 0,17$ ;  $p = 0,05$ ), IL-6 ( $r = 0,33$ ;  $p < 0,001$ ), IFN- $\gamma$  ( $r = 0,21$ ;  $p = 0,02$ ), mas não houve correlação da VHS com os níveis da PCR<sub>ultra</sub> ou das citocinas.

Os níveis séricos da PCR<sub>ultra</sub> estavam acima de 8 mg/L, valores considerados positivos para testes da fase aguda das doenças inflamatórias, em 113 (91,1%) dos 124 pacientes. Em 85 (68,6%) pacientes os níveis de PCR<sub>ultra</sub> estavam acima de 30 mg/L. A PCR<sub>ultra</sub> correlacionou-se positivamente com a presença de sangramento digestivo ( $r = 0,24$ ;  $p = 0,008$ ) e com a presença de esplenomegalia ( $r = 0,18$ ;  $p = 0,04$ ) e correlacionou-se negativamente com a presença hepatomegalia ( $r = -0,24$ ;  $p = 0,008$ ) e com a extensão do fígado ( $r = -0,18$ ;  $p = 0,04$ ).

Os pacientes que apresentaram imagens radiológicas compatíveis com pneumonia tiveram níveis significativamente mais baixos de PCR<sub>ultra</sub> ( $\mu = 7,6$  mg/L) em comparação àqueles que apresentaram radiografia do tórax normal ( $\mu = 60,3$  mg/L,  $p = 0,02$ ). Não houve diferença entre os níveis das diversas citocinas e a presença de pneumonia.

Os pacientes com proteinúria apresentavam níveis mais elevados de IL-6 ( $r = 0,21$ ;  $p = 0,02$ ), IL-10 ( $r = 0,18$ ;  $p = 0,04$ ) e IFN- $\gamma$  ( $r = 0,2$ ;  $p = 0,01$ ), mas não foi encontrada associação entre os níveis de citocinas e a taxa de filtração glomerular, os níveis de uréia e de creatinina séricas. A taxa de filtração glomerular correlacionou-se negativamente com a VHS ( $r = -0,09$ ;  $p = 0,04$ )

Os níveis de PCR<sub>ultra</sub> também estiveram positivamente correlacionados aos marcadores laboratoriais de CID, como dímero D ( $r = 0,42$ ;  $p < 0,0001$ ), PDF ( $r = 0,49$ ;  $p < 0,0001$ ), FPA ( $r = 0,25$ ;  $p = 0,009$ ), plaquetas ( $r = -0,25$ ;  $p = 0,005$ ) e fibrinogênio ( $r = 0,40$ ;  $p < 0,01$ ).

Foi observado que a intensidade da maior temperatura corporal aferida durante a internação estava negativamente associada ao risco sangramento e de morte. (TABELA 5A e 6A). Este achado inesperado foi então analisado com respeito à resposta inflamatória. Não houve significância estatística entre os níveis de citocinas e a intensidade da febre. Contudo, a média dos níveis de PCR<sub>ultra</sub> foi 65,1 mg/L ( $\sigma = 34,9$ ) nos pacientes com temperaturas abaixo de 39°C e foi 43,0 mg/L ( $\sigma = 36,31$ ) nos pacientes com temperaturas acima de 39°C, com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). O índice de correlação entre a temperatura corporal e os níveis de PCR<sub>ultra</sub> foi -0,30 ( $p < 0,001$ ).

### 5.5.1 Citocinas e óbito

Níveis significativamente mais elevados de IL-6, IL-8 e IFN- $\gamma$  foram encontrados entre os pacientes que evoluíram para o óbito em comparação com os sobreviventes ( $p = 0,03$ ,  $p = 0,05$  e  $p = 0,03$ ) (TABELA 26A).

Níveis significativamente mais elevados de IL-1 $\beta$  ( $p = 0,01$ ), IL-12 ( $p = 0,03$ ) e TNF- $\alpha$  ( $p = 0,008$ ) foram encontrados em pacientes com menos de 20 anos de idade e desnutridos (peso para a idade  $< 3\%$ ). Em indivíduos acima de 20 anos de idade com o IMC abaixo do percentil 3% observaram-se níveis mais elevados de IL-1 $\beta$  ( $p = 0,03$ ), IL-10 ( $p = 0,04$ ), IL-12 ( $p = 0,03$ ) e TNF- $\alpha$  ( $p = 0,008$ ). Níveis mais elevados de IL-1 $\beta$  ( $p = 0,02$ ), IL-12 ( $p = 0,04$ ) e de TNF- $\alpha$  ( $p = 0,04$ ) também foram encontrados nos pacientes que relataram emagrecimento, independente da avaliação nutricional.

As TABELAS 27A a 34A apresentam as médias e desvios-padrão dos níveis de citocinas em grupos de pacientes que apresentaram vômitos, diarreia, edema, dispneia, icterícia, infecção pelo HIV ou AIDS, infecções bacterianas e sangramentos, fatores estatisticamente associados ao óbito. Pacientes com vômitos apresentaram níveis elevados de

IL-6 ( $p = 0,02$ ). Pacientes com edema apresentaram níveis elevados de IL-6 ( $p = 0,0001$ ) e de CXCL-8 ( $p = 0,0001$ ); pacientes com icterícia apresentaram níveis elevados de CXCL-8 ( $p = 0,05$ ), IL-1 $\beta$  ( $p = 0,03$ ) e TNF- $\alpha$  ( $p = 0,03$ ). Níveis mais elevados de CXCL-8 foram encontrados em pacientes que apresentaram febre abaixo de 39°C ( $p = 0,04$ ).

Não houve diferença entre os níveis das diversas citocinas em pacientes que apresentaram diarreia ou dispneia. Os níveis de IL-10 e IFN- $\gamma$  estiveram mais elevados em pacientes com infecção pelo HIV.

#### 5.5.2 Níveis séricos de citocinas, manifestações hemorrágicas e infecções bacterianas.

Não foi encontrada associação entre os níveis de citocinas e a presença de infecções bacterianas quando analisadas conjuntamente (TABELA 33A), mas os pacientes com sepse apresentaram níveis mais elevados de IFN- $\gamma$ . Os pacientes com sangramentos apresentaram níveis mais elevados de IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, IL-10, IFN- $\gamma$  (TABELA 34A). A análise das concentrações plasmáticas das citocinas em grupos de pacientes com LV estratificados pela presença de infecções bacterianas e de sangramentos revelou que: IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, IL-10 e IFN- $\gamma$  estavam elevadas em pacientes com sangramento e sem infecção bacteriana ( $p = 0,03$ ); IL-6, IL-8, CXCL-8 e IFN- $\gamma$  estavam elevadas em pacientes com sangramento e com infecção bacteriana. (TABELA 35A). Houve nítida correlação entre os níveis séricos de IL-6 e dímero D ( $r = 0,34$ ;  $p < 0,001$ ), IL-6 e PDF ( $r = 0,29$ ;  $p = 0,01$ ), IFN- $\gamma$  e dímero D ( $r = 0,42$ ;  $p < 0,001$ ), IFN- $\gamma$  e PDF ( $r = 0,37$ ;  $p < 0,001$ ), IFN- $\gamma$  e fibrinogênio ( $r = 0,34$ ;  $p = 0,03$ ). Houve também correlação entre os níveis de IL-6 e PCR<sub>ultra</sub> ( $r = 0,34$ ;  $p < 0,001$ ) e de IFN- $\gamma$  e PCR<sub>ultra</sub> ( $r = 0,21$ ;  $p < 0,02$ ).

A presença de esplenomegalia ou de hepatomegalia não se associou aos níveis das citocinas. Contudo, quando a extensão destes órgãos foi corrigida pela superfície corporal do paciente, encontrou-se associação entre os níveis de CXCL-8 e de IL-10 com a extensão do fígado (TABELA 36A). Níveis mais elevados de IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-, IL-10 e IFN- $\gamma$  foram observados em pacientes que apresentavam elevação das aminotransferases.

Os linfócitos, os neutrófilos, a hemoglobina e as plaquetas estavam negativamente correlacionados aos níveis de citocinas. O número de leucócitos totais correlacionou-se negativamente com os níveis de IL-10 ( $r = -0,19$ ;  $p = 0,03$ ). O número de neutrófilos correlacionou-se à IL-1 $\beta$ , IL-10 e ao TNF- $\alpha$  (TABELA 37A) e o número de linfócitos correlacionou-se aos níveis de IL-1 $\beta$ , CXCL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  (TABELA 38A). A

concentração de hemoglobina correlacionou-se aos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . (TABELA 39A) e o número de plaquetas estava correlacionada aos níveis elevados de IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8 e IFN- $\gamma$ . (TABELA 40A). Quando os linfócitos foram divididos com ponto de corte de 2000 células, verificou-se que as correlações com IL-1 $\beta$ , IL-12 e TNF- $\alpha$  eram positivas até 2000 linfócitos e que após esse limite as correlações com IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  eram negativas.

### 5.5.3 Citocinas e idade

Para avaliar a importância da idade na resposta inflamatória em pacientes com LV foi conduzida a análise das diferenças entre a expressão de citocinas plasmáticas em crianças menores de dois anos de idade e pacientes com mais de dois anos de idade. (TABELA 41A). Observou-se que os lactentes apresentavam níveis significativamente mais elevados de IL-6, IL-8 e IFN- $\gamma$ .

As crianças com menos de dois anos de idade apresentavam níveis mais elevados de IL-6 ( $p = 0,01$ ), de CXCL-8 ( $p = 0,04$ ), de IFN- $\gamma$  ( $p = 0,05$ ), de PCR<sub>ultra</sub>, ( $p = 0,02$ ) e VHS mais elevada na primeira ( $p < 0,001$ ) e na segunda horas ( $p < 0,001$ ) em comparação aos pacientes com idades acima de dois anos.

Para resumir as relações da resposta inflamatória com os vários desfechos clínicos e laboratoriais, a TABELA 42A apresenta a matriz das associações dos sinais, sintomas, síndromes e exames laboratoriais com os níveis séricos das citocinas e a TABELA 43A apresenta a correlação das citocinas com as células sanguíneas. A TABELA 44 A apresenta as matrizes das correlações mútuas das citocinas, a TABELA 45A apresenta as correlações entre os níveis de citocinas plasmáticas e os marcadores de CID (dímero D, FPA e PDF), fibrinogênio e PCR<sub>ultra</sub>. A TABELA 46A apresenta a correlação entre os níveis das citocinas plasmáticas e as diversas formas de apresentação dos sangramentos.

## 6 DISCUSSÃO

Este trabalho foi prospectivo em sua natureza, com a inclusão dos pacientes no momento do diagnóstico e acompanhamento até à alta hospitalar. Apresentou características de coorte

aberta para relações causais das variáveis de exposição (da anamnese, do exame físico e dos exames laboratoriais) com o desfecho final (morte ou melhora clínica) e para as variáveis que surgiram após a admissão. Apresentou, contudo, característica de estudo transversal em relação aos exames laboratoriais, já que as informações clínicas e as amostras biológicas para os testes foram obtidas em momentos muito próximos, e não houve informações laboratoriais sobre os períodos antes ou depois da doença. É possível, por exemplo, fazer associação causal entre a plaquetopenia (identificada à admissão) e o sangramento que aconteceu dias após, mas não é possível fazer inferência causal entre plaquetopenia e sangramento se as duas variáveis estavam presentes à admissão. A plaquetopenia poderia, neste caso, ser tanto a causa quanto a consequência do sangramento. Portanto, as discussões sobre causalidade se restringiram àquelas situações em que as variáveis de exposição e de desfecho estavam temporalmente bem definidas. Nas demais situações somente foi possível avaliar as associações entre as variáveis sem fazer inferência à causalidade.

Este estudo teve seu início após a publicação das recomendações nacionais para o tratamento do paciente com LV grave (BRASIL, 2005b). Estas diretrizes prevêm a administração de antibióticos de forma extensiva, em situações de infecção bacteriana confirmada ou suspeita e também para pacientes com alto risco, como nos casos de neutropenia extrema. Como resultado, a verdadeira importância das infecções bacterianas para a morte em pacientes com LV pode ter sido subestimada. É possível que a incidência destas complicações esteja ainda mais subestimada porque as definições de diversas síndromes infecciosas não se aplicam aos pacientes com LV, uma vez que vários sinais das infecções bacterianas como febre, anemia, plaquetopenia, taquicardia e adinamia já fazem parte do quadro clínico da LV. Por isto não foi possível usar as definições de caso para algumas situações infecciosas. Por exemplo, de acordo com o *American College of Chest Physicians* (BONE *et al.*, 1992), considera-se sepse a associação de febre acima de 38°C e taquicardia, taquipneia ou alteração dos leucócitos. Se esta definição fosse usada para classificar os pacientes com LV deste estudo, 863 (97,7%) deles seriam considerados sépticos. Da mesma forma os critérios para definição de pneumonia não se aplicam aos pacientes com LV que apresentam febre e tosse como manifestações da leishmaniose. O diagnóstico de infecção urinária pode ainda ser confundido pela presença de nefrite intersticial e glomerulonefrite. Assim, os critérios para a definição de pneumonia, sepse e infecção urinária foram adaptados para o paciente com LV (ver *Definições*, pág 50) para aumentar a especificidade do diagnóstico. Com isto, as formas mais leves de pneumonia, a sepse sem disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão e a infecção urinária sem identificação

bacteriana podem não ter sido detectadas. Acrescente-se que as culturas de sangue, urina ou secreções não foram viabilizadas algumas vezes antes da prescrição de antibióticos. Não raro, o diagnóstico da infecção bacteriana neste estudo divergiu da opinião do médico assistente. Contudo, como a classificação dos pacientes se deu de forma não diferencial, essa limitação não invalida os resultados dos estudos caso-coorte para avaliação da coagulação e da resposta inflamatória.

Durante o período do estudo aconteceram epidemias anuais de dengue no estado. Não foram identificados, à anamnese, pessoas com história recente desta doença, mas não foi realizada triagem sorológica rotineira para a identificação de infecção pregressa ou concomitante pelo vírus da dengue. É possível, que alguns indivíduos com as duas doenças, tenham sido incluídos. Parece, contudo, pouco provável, uma vez que as características clínicas de dengue, como cefaléia, dores musculares ou dor retro-orbitária, não são percebidos em pacientes com LV. A identificação de infecção pregressa pelo vírus da dengue e o estudo de possível modificação na apresentação da LV é uma proposta interessante.

A generalização dos resultados apresenta limitações. O estudo foi realizado em um único serviço de saúde e não contempla as possíveis diferenças regionais da apresentação da LV causada por *L. chagasi*. Contudo, como o IDTNP notifica aproximadamente 95% dos casos de LV do Piauí e 81,2% dos pacientes diagnosticados no período foram arrolados para o estudo, a generalização dos dados para situações epidemiológicas semelhantes a Teresina pode ser considerada satisfatória.

O desfecho clínico da infecção por *Leishmania* depende de diversos fatores como a espécie do parasito, os produtos derivados da resposta à picada pelos flebotomíneos, fatores genéticos e ambientais e pela resposta imune do hospedeiro. Este estudo traz importantes informações sobre os fatores associados à gravidade da LV que poderão ser de utilidade na definição de recomendações para o tratamento do paciente com LV e suscitam novas importantes perguntas de pesquisa.

A distribuição das idades dos pacientes é semelhante às publicações anteriores (JERONIMO *et al.*, 1994; GUERRA *et al.*, 2004; PEDROSA e DA ROCHA, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006), onde a maioria dos pacientes tem idade inferior a dez anos. O efeito da idade na susceptibilidade às infecções é citado frequentemente na literatura, mas poucos trabalhos avaliaram os mecanismos que condicionam estas diferenças. Dois estudos usando modelos matemáticos mostraram associação da idade na taxa de infecção por *Leishmania* e sugeriram que a susceptibilidade à infecção declina com a idade (DYE e WILLIAMS, 1993) e que, mesmo em pessoas sem imunidade celular prévia para *Leishmania*, o risco de

oroconversão decai com o avanço da idade (DAVIES e MAZLOUMI GAUGANI, 1999). Além disto, as crianças estão muito expostas às picadas de flebotômíneos, (COSTA *et al.*, 1990; CALDAS *et al.*, 2002) e, em regiões de alta endemicidade, é provável que sejam expostas à *Leishmania* em idades muito precoces, o que aumenta a chance da doença nesta fase da vida.

A relativa proteção de lactentes nos primeiros seis meses de vida em desenvolver LV aponta para um possível efeito protetor conferido por anticorpos maternos adquiridos pela via transplacentária ou pelo leite materno. O tempo prolongado de aleitamento materno esteve associado à infecção assintomática em um estudo (MACIEL *et al.*, 2008). Também já foi observado que ratos recém-nascidos que recebiam injeções de anticorpos idiotípicos monoclonais contra *L. mexicana* tornavam-se mais resistentes ao desafio posterior. Esta resistência estava associada à maior atividade leishmanicida pelos macrófagos no baço destes animais e foi hipotetizado que estes anticorpos administrados em uma fase precoce da vida poderiam modificar o desenvolvimento de linhagens de células T capazes de produzir as citocinas de interesse (GORCZYNSKI, 1988). Contudo, o papel dos anticorpos adquiridos por via transplacentária ou pelo leite materno na proteção da criança contra a LV continua incerto, e é bem aceito que a imunidade mediada por células e não a imunidade mediada por anticorpos é responsável pela resistência à infecção. Por outro lado, como o período de incubação da doença pode ser longo, com variação de três a oito meses (JERONIMO *et al.*, 2005), as crianças infectadas nos primeiros meses de doença poderiam apresentar os primeiros sintomas da doença somente meses mais tarde, e esta seria a razão da aparente proteção destes lactentes à LV.

Mas, se alguma proteção existe contra a doença nos primeiros meses de vida, as crianças tornam-se muito vulneráveis a partir do primeiro ano de idade. É possível que fatores relacionados ao metabolismo infantil estejam envolvidos nesta susceptibilidade. A arginina, um aminoácido essencial para o parasito, mas não para o hospedeiro tem sido foco de atenção nos estudos de metabolismo de *Leishmania*. A L-arginina é o substrato comum das reações das enzimas óxido nítrico sintase (NOS2) e arginase 1 (Arg1). Os macrófagos dependem do balanço destas duas enzimas para promover a morte ou o crescimento dos parasitos no meio intracelular, de forma que o mecanismo pelo qual estes organismos regulam a concentração celular de arginina é crítico para a sua sobrevivência e virulência. A enzima NOS2 é induzida pela resposta Th1 mediada pela IFN- $\gamma$  enquanto a Arg1 é mediada pela IL-4, e portanto, pela resposta Th2. Quando prevalece a resposta Th1, a ativação de macrófagos induz à expressão de NOS2, que oxida a L-arginina em óxido nítrico, que é o metabólito responsável pela morte

dos parasitos. A resposta Th2, por outro lado, induz à produção de Arg1, que por sua vez promove a degradação da arginina com produção de ornitina e uréia, que são poliaminas necessárias ao crescimento da *Leishmania* (WANASEN e SOONG, 2008). O papel da idade no metabolismo da L-arginina foi avaliado em animais de laboratório. Foi demonstrado que a baixa idade aumenta a capacidade de macrófagos expressarem arginase e modular o metabolismo da L-arginina. A maior capacidade que crianças pequenas têm de secretar esta enzima resulta em um meio celular mais propício ao crescimento de *Leishmania* com maior incidência e gravidade da doença (MULLER *et al.*, 2008). Outras vias metabólicas provavelmente interferem na multiplicação e na sobrevivência de parasitos e a ação de múltiplos fatores deve determinar as diferenças de apresentação em crianças e adultos. A distribuição bimodal da letalidade da LV, com um pico na infância e outro em adultos sugere que fatores diferentes possam estar envolvidos na aquisição da infecção e nas complicações da doença em diferentes idades. O declínio da função dos linfócitos T-CD4+ tem sido associado à reduzida eficácia vacinal em pessoas idosas, sugerindo que a imunidade declina com o envelhecimento (HAYNES e SWAIN, 2006). Esta pode ser também a causa da relação entre a progressão da idade e o aumento da incidência e da letalidade por LV.

O tempo de duração da doença foi menor entre as crianças, especialmente entre os lactentes e esteve inversamente associado à intensidade de manifestações clínicas como a extensão do baço, a extensão do fígado e o estado de desnutrição. Contudo, houve correlação direta entre o tempo de duração dos sintomas, o óbito, a perda ponderal durante a doença e a ocorrência de sangramentos. Estes achados levantam a hipótese de que os fatores que condicionam a esplenomegalia, a hepatomegalia e a desnutrição são diferentes dos fatores que condicionam sangramento e óbito e sugerem que fatores independentes da precocidade do diagnóstico da LV condicionam estes desfechos. Pessoas com doença agressiva, traduzida por curto período de sintomatologia, teriam maior atividade inflamatória, hepatomegalia e esplenomegalia mais intensas e perda ponderal mais rápida. As pessoas com tempo de doença mais prolongado representariam os sobreviventes desta fase, que teriam superado o período de inflamação hepática com suas repercussões, e estariam em fase de descompensação da homeostase mediada pela resposta esplênica, com aparecimento de sangramentos e falência de órgãos que ao final resultam em morte.

Muita discussão existe sobre o papel da desnutrição como fator de risco para a aquisição da LV. Alguns estudos concluíram que a desnutrição aumenta a susceptibilidade à infecção por cepas de *Leishmania* (BADARÓ *et al.*, 1986; CERF *et al.*, 1987; DYE e WILLIAMS, 1993; ANSTEAD *et al.*, 2001; CALDAS *et al.*, 2002) enquanto outros não identificam risco

adicional de infecção em estados de carência nutricional (CALDAS *et al.*, 2002). A discussão é ainda mais polêmica quando se avalia o prognóstico das pessoas que evoluíram para as formas sintomáticas em relação ao estado nutricional. Os estudos publicados, ou não identificam a desnutrição como fator de risco para o desfecho desfavorável (CUNHA *et al.*, 1995; PASTORINO *et al.*, 2002) ou não apresentam clara seqüência temporal (SEAMAN *et al.*, 1996; COLLINS, 2004; QUEIROZ *et al.*, 2004; CAVALCANTE, 2007).

Foi encontrado que tanto os pacientes desnutridos como aqueles que referiram emagrecimento, mas que não apresentavam desnutrição tinham níveis elevados de citocinas IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$ . Estas citocinas estão associadas às respostas catabólicas observadas durante processos infecciosos (PEARSON *et al.*, 1992) e este achado constitui evidência de que a desnutrição seja conseqüente ao catabolismo infeccioso originado pela *Leishmania*.

De fato, o índice nutricional mais comprometido foi o peso em relação à idade, que reflete comprometimento agudo (WATERLOW, 1972; KELLER, 1991), sugerindo que a deterioração da nutrição seja conseqüente à LV. Houve ainda correlação do tempo de progressão da LV com os índices peso para a altura e IMC, que são bons avaliadores das alterações agudas do estado nutricional. Contudo, não se observou a mesma correlação com o índice altura para idade, que avalia estado de desnutrição prolongada. Assim, a deterioração nutricional poderia ter tido início logo após a infecção inicial, antes mesmo das clássicas manifestações clínicas da LV, agravando-se posteriormente com a progressão da doença. As pessoas com doença rapidamente progressiva perceberam melhor a perda de massa corpórea e tiveram maior risco de apresentar sangramentos e de morrer. Quando o ritmo de agravamento da doença foi mais lento, não houve percepção do emagrecimento, o que, contudo, aconteceu de forma significativa e as levou aos estados de desnutrição que foram quantificados pela antropometria. Os dados apontam, desta forma, para duas situações diferentes: um grupo de pacientes agudamente desnutridos, que perdeu peso provavelmente após a infecção pela *Leishmania*, com níveis de IL-1 $\beta$ , IL-12 e de TNF- $\alpha$  mais elevados e com maior risco de morte; outro grupo de pacientes, também desnutridos, mas que não percebeu perda ponderal rápida, não apresentou diferenças nos níveis de citocinas, e não teve risco adicional de evoluir para a morte. Sugere-se que a desnutrição possa estar associada aos efeitos catabólicos da LV no primeiro grupo, mas que teria gênese diversa no grupo não inflamado, e poderia, por exemplo, corresponder aos pacientes com desnutrição anterior à doença, devido a ingestão inadequada de nutrientes.

Assim parece aceitável a hipótese de que a desnutrição seja conseqüência da síndrome consumptiva da LV, e não um fator determinante do risco de adquirir a infecção ou de

progredir para situações de gravidade. A relação inversa entre o estado nutricional e a extensão do baço e do fígado reforça novamente a hipótese de que a doença mais rapidamente progressiva estaria associada a maior atividade inflamatória e resultaria em hepatoesplenomegalia mais expressiva, antes da deterioração do estado nutricional.

Existe evidência considerável de que exista uma relação sinérgica entre desnutrição protéico-calórica e infecções, tanto pelas repercussões na resposta imune adquirida dependente de linfócitos (SAVINO *et al.*, 2007), como na resposta imune inata dependente de macrófagos e granulócitos (SCRIMSHAW, 2003). Foi demonstrado que crianças desnutridas não possuem frações adequadas de células de memória para responder aos antígenos externos quando comparadas às crianças bem nutridas (NAJERA *et al.*, 2001) e que a desnutrição altera a capacidade de células CD4+ e CD8+ produzirem citocinas em resposta ao estímulo infeccioso com aumento na produção de IL-4 e de IL-10 e diminuição na produção IL-2 e IFN- $\gamma$  (RODRIGUEZ *et al.*, 2005).

Por outro lado, a desnutrição não se mostrou associada à morte ou aos eventos que mais frequentemente desencadearam o óbito, como as infecções bacterianas e os sangramentos, reforçando relatos anteriores (CALDAS *et al.*, 2002), o que pode estar associado ao controle sobre a replicação dos parasitos conferido pela resposta Th1 dos pacientes desnutridos.

Apesar de reconhecido predomínio da LV em homens pós-pubertais (COSTA *et al.*, 1990; MARZOCHI *et al.*, 1994; GOUVEA *et al.*, 2007), não houve diferença do risco de morte por sexo neste estudo. A maior predisposição dos indivíduos do sexo masculino em desenvolver leishmanioses tem sido atribuída à maior exposição de superfície corporal às picadas de inseto, maior tempo de atividades fora do domicílio (COSTA *et al.*, 1990; CALDAS *et al.*, 2002). No entanto algumas evidências apontam para maior susceptibilidade biológica dos indivíduos do sexo masculino à infecção por *Leishmania*. Estudos em animais de laboratório mostraram que os machos têm maior predisposição em desenvolver a doença, o que tem sido atribuído a diferenças hormonais (PUNG *et al.*, 1985; OSORIO *et al.*, 2008; SNIDER *et al.*, 2009) ou a diferenças na resposta inflamatória. Foi observado que a gravidade da doença em ratos machos infectados por *L. panamensis* e *L. guyanensis* associou-se significativamente à maior expressão de IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  (TRAVI *et al.*, 2002) ou às diferenças na expressão de IFN- $\gamma$  e de TNF- $\alpha$  (SATOSKAR e ALEXANDER, 1995). Uma recente revisão da literatura científica em modelos experimentais informa que hormônios como estradiol, testosterona e progesterona modulam a resposta imune, o que resulta em diferentes desfechos clínicos de acordo com o sexo e a prenhez (SNIDER *et al.*, 2009). É

possível que a diferença das diversas apresentações clínicas entre homens e mulheres seja uma mistura destes fatores ambientais e biológicos.

A maior representatividade de crianças procedentes de regiões urbanas em relação aos adolescentes e adultos sugere que o acesso de crianças pequenas ao serviço de saúde pode ser mais difícil para crianças pequenas em área rurais e, se isto for verdadeiro, muitas crianças com LV podem não ter sido identificadas. Se isto for verdade, grande número de óbitos não notificados poderia estar ocorrendo nas regiões rurais. Por outro lado, esta distribuição de idade pode estar de fato associada à grande força de transmissão da LV nas cidades, com a infecção acontecendo nos primeiros anos de vida (COSTA *et al.*, 1990). De fato, a pirâmide populacional de bases alargadas aponta para esta transmissão elevada nos primeiros anos de vida, com possível proteção imune nos anos posteriores.

As manifestações clínicas gerais apresentadas pelos pacientes que participaram deste estudo estão em consonância com publicações anteriores no Brasil (JERONIMO *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2006; CAVALCANTE, 2007).

A linfonodomegalia é achado constante na LV do velho mundo (ZIJLSTRA *et al.*, 1991; RATHORE *et al.*, 1996; BABIKER *et al.*, 2007). No Brasil, alguns autores relataram altas prevalências (PRATA, 1957; ALENCAR, 1959; PASTORINO *et al.*, 2002; DAHER *et al.*, 2008), enquanto outros não referiram aumento dos linfonodos (SILVA *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2001; PASTORINO *et al.*, 2002; GUERRA *et al.*, 2004; QUEIROZ *et al.*, 2004; CAVALCANTE, 2007). A prevalência de linfonodomegalia na população estudada foi intermediária às prevalências encontradas na literatura. Embora o aspecto dos linfonodos tenha sido inespecífico, a maior prevalência em pacientes com HIV e o achado de formas amastigotas em dois destes pacientes sugerem que o envolvimento do tecido retículo-endotelial possa ser mais generalizado ou mais intenso neste grupo.

A identificação de temperaturas corporais normais ou baixas como fator de risco para a morte já foi relatada na Tunísia (ABDELMOULA *et al.*, 2003). A associação entre o óbito e a hipotermia tem claro correlato clínico com o quadro clínico de choque hipovolêmico ou séptico. Provavelmente esta associação está subestimada neste estudo, uma vez que a temperatura corporal não foi aferida em diversas situações de interesse, como no momento da transferência para UTI ou no momento do óbito. Mas, a proteção conferida pela temperatura corporal elevada, em pacientes que não apresentaram hipotermia, não tem uma explicação tão direta. É bem aceito que o aumento da temperatura corporal que ocorre durante infecções bacterianas é essencial para a defesa antimicrobiana do hospedeiro (JIANG *et al.*, 2000). Então, também é possível que as temperaturas corporais mais elevadas exerçam efeito

negativo sobre a capacidade de sobrevivência da *Leishmania*. De fato, recentemente foi observado que a temperatura tem efeito potencial na indução de apoptose em *Leishmania donovani* (SHAHA, 2006). Outra possibilidade seria a de que a febre, por si, ativaria a defesa do hospedeiro, e esta, em última análise, reduziria a carga infectante (JIANG *et al.*, 2000). As quimiocinas são produzidas em resposta à ação das citocinas IL-1 e TNF- $\alpha$ , que estão associadas à infecção (ABBAS *et al.*, 2007). Desta forma, a associação entre a temperatura e os níveis séricos de CXCL-8 pode estar refletindo indiretamente a ação de IL-1 e de TNF- $\alpha$ , duas citocinas de efeito pirogênico.

A infecção pelo HIV contribuiu significativamente para a morte entre os adultos e apresentou as características descritas na literatura. Formas atípicas, sem febre ou sem esplenomegalia foram mais comuns que entre os pacientes sem a coinfeção. Além disto, muitas das alterações laboratoriais são comuns às duas doenças (RUSSO *et al.*, 2003; SINHA *et al.*, 2005; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006). Tanto o HIV quanto a *Leishmania* infecta macrófagos, ali se multiplicam e podem causar alterações semelhantes do sistema imune (WOLDAY *et al.*, 1999; CRUZ *et al.*, 2006). Estas dificuldades no diagnóstico da LV em pacientes com infecção pelo HIV colaboram para o retardo do diagnóstico e do início da terapia. Por isso, sugere-se que a triagem sorológica para o HIV deve ser oferecida a todo paciente com LV, e o diagnóstico de LV deve ser considerado em pacientes com HIV por ocasião da investigação de quadros mal definidos como febre, emagrecimento, esplenomegalia ou palidez. A pesquisa de infecção pelo HIV fazia parte da rotina de exames solicitados por ocasião da suspeita diagnóstica de LV e 24 (33,8%) pacientes aqui identificados não apresentavam outros sinais de imunodeficiência. As complicações bacterianas foram mais frequentes nestes pacientes

Nesta casuística, a incidência de infecções bacterianas tanto à admissão quanto durante o período de hospitalização foi relativamente baixa. A administração de antibióticos de forma ampla e precoce provavelmente interferiu na apresentação das infecções adquiridas na comunidade, antes da admissão e na aquisição de infecções hospitalares. Ademais, as definições dos quadros infecciosos no protocolo deste estudo objetivaram maior especificidade em detrimento da sensibilidade e erros de classificação provavelmente ocorreram com subestimativa do número real.

O diagnóstico de pneumonia em pacientes com LV foi controverso devido à superposição de sintomas respiratórios nas duas doenças, o que torna difícil atribuir os componentes clínicos e laboratoriais a cada doença separadamente. Os sintomas respiratórios são frequentemente referidos em pacientes com LV (SILVA *et al.*, 2001) e muitas vezes são

atribuídos a infecções bacterianas da árvore respiratória (GUERREIRO *et al.*, 1985; ANDRADE *et al.*, 1990; GARCÉS *et al.*, 1990). A síndrome respiratória com tosse, dispneia e estertores pulmonares foi também muito frequente nestes pacientes e a conduta médica foi a prescrição imediata de antibióticos enquanto se aguardava o resultado da radiografia do tórax que confirmaria a hipótese de pneumonia. Contudo, somente uma minoria dos pacientes com esta queixa apresentou alterações radiográficas sugestivas de processos inflamatórios pulmonares que incluíram infiltrados com aspectos de envolvimento alveolar ou intersticial. Diversos pacientes com dispneia e sem sepse foram radiografados repetidamente sem que qualquer alteração tenha sido identificada. De grande curiosidade foi o fato de que os pacientes que apresentaram infiltrados inflamatórios do tipo alveolar não tenham tido maior risco de morrer, enquanto aqueles que tinham infiltrados inflamatórios do tipo intersticial tiveram risco de morte quase nove vezes superior em relação aos pacientes que tiveram radiografia do tórax normal. Isto sugere que os mecanismos patogênicos destas duas formas de acometimento pulmonar sejam diferentes. Os infiltrados alveolares estavam provavelmente relacionados à pneumonia bacteriana e que teve seu prognóstico melhorado pela introdução precoce de antibióticos. Os infiltrados intersticiais, não responsivos aos antibióticos, estariam relacionados a outros diagnósticos etiológicos. Dentre 21 pacientes com opacidade pulmonar intersticial, oito tinham infecção pelo HIV, o que sustenta a hipótese de pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*. Porém, a infecção pelo HIV explica apenas parcialmente o risco de morte em pacientes com pneumonia intersticial, pois os pacientes com pneumonia intersticial, sem infecção pelo HIV, tiveram ainda cinco vezes mais chance de morrer que os pacientes com radiografia normal. A pneumonite intersticial na LV foi descrita em modelo animal (DUARTE e CORBETT, 1984). Em outro estudo *post mortem*, 76,8% dos pacientes com LV apresentavam opacidade pulmonar mononuclear e 53,8% apresentavam fibrose septal (DUARTE *et al.*, 1989). Mais recentemente a pneumonia intersticial foi associada à resposta imune TH2 (TUON *et al.*, 2009).

Existe alguma similaridade entre as manifestações destes pacientes com a LPA e sua forma mais grave, SARA. Esta síndrome caracteriza-se por início brusco, hipoxemia e infiltrados bilaterais na radiografia do tórax, sem sinais de insuficiência cardíaca. (FERRER *et al.*, 2008). O processo inflamatório na LPA/SARA envolve a produção de citocinas inflamatórias, ativação da coagulação e fibrinólise, tanto no espaço alveolar como no interstício pulmonar. Altos níveis de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 são detectadas nas fases iniciais da inflamação na SARA (HOOTS, 2002). Estas citocinas ativam a coagulação via FT e atenua a fibrinólise pela liberação de fatores inibidores do

plasminogênio. Este quadro pode se exacerbar se estes pacientes forem submetidos à ventilação mecânica. O dano às estruturas alveolares instala-se dentro de algumas horas a alguns dias (LUH e CHIANG, 2007) e as alterações pulmonares assemelham-se às alterações sistêmicas encontradas na sepse (SCHULTZ *et al.*, 2006). A LPA/SARA resulta da resposta do pulmão às agressões locais ou sistêmicas, ocasionando inflamação local e transtornos da coagulação. Várias condições, como pneumonias de diversas etiologias, aspiração, ventilação mecânica ou quase-afogamento, e ainda, mecanismos indiretos como trauma, queimadura, pancreatite, embolismo amniótico, podem ocasioná-la (LUH e CHIANG, 2007). Os pacientes deste estudo apresentaram doença pulmonar aguda, com opacidade intersticial bilateral, associada a tosse, dispneia, cianose, muitas vezes necessitando de ventilação mecânica e seguida de morte. Enquadram-se, portanto, nos critérios de definição de LPA/SARA, embora a síndrome não tenha sido descrita nestes termos em pacientes com LV.

Aproximadamente 10% dos pacientes com doenças pulmonares parenquimatosas difusas apresentam exames de imagem pulmonar (radiografia simples, tomografia e roentgenograma) normais (MARTINEZ, 2006). Muitos pacientes deste estudo apresentaram sintomas respiratórios moderados ou graves sem correspondência radiológica. De 66 pacientes com desfecho letal, 24 (36,4%) apresentavam dispneia ou cianose e tiveram radiografia do tórax normais. Destes, 16 apresentavam sangramentos associados. Em alguns casos a radiografia foi repetida de duas a cinco vezes, com resultados confirmatórios normais. Infelizmente não foi possível realizar outros exames de imagem, mas a alta associação de discrasias sanguíneas neste grupo de pacientes com SARA é compatível com a hipótese de SARA e coagulopatia pulmonar (SCHULTZ *et al.*, 2006). Em resumo, dos 66 óbitos observados, 34 (51,5%) apresentaram quadro compatível com SARA. Pneumonia intersticial foi demonstrada em 76,9% de 13 autópsias de indivíduos com LV (DUARTE *et al.*, 1989); portanto, conclui-se que a pneumonia intersticial aguda, associada à SARA, contribui significantemente para a morte em pacientes com LV.

A incidência da síndrome descrita como sepse pode estar subestimada neste estudo pelas exigências da definição impostas no protocolo. Os critérios amplamente aceitos para o diagnóstico (ROSA *et al.*, 2008) incluem a presença de febre, taquicardia, taquipneia e leucocitose ou leucopenia em pacientes com quadros infecciosos confirmados. Se estes critérios fossem utilizados na população estudada, 717 (81,2%) dos pacientes seriam classificados como sépticos, mas a sepse bacteriana seria confirmada em apenas 61 (8,5%) deste pacientes pré-classificados. Isto indica que a LV é, por definição, uma síndrome séptica, o que restringe a sua diferenciação apenas para os casos de sepse bacteriana e sepse grave

com a presença de disfunção de órgãos, hipoperfusão ou hipotensão. Esta conclusão nos remete, curiosamente, a uma das primeiras descrições da LV na Índia quando CHRISTOPHERS (1904) apud (PRATA, 1957) comparou a leishmaniose à “sepsis crônica”.

Os distúrbios da coagulação foram os eventos clínicos mais frequentemente associados à morte e foram relatados em 40 (60,1) pacientes nas horas que antecederam ao óbito e são provavelmente consequentes aos mesmos fenômenos inflamatórios que culminaram em sangramentos. Petéquias e equimoses foram mais frequentes em crianças, epistaxe e hematúria foram mais frequentes em adultos, mas não houve diferença na distribuição de idades dos pacientes que apresentaram sangramento digestivo ou de mucosas. A plaquetopenia explica apenas uma fração da questão concernente aos distúrbios da homeostasia. É importante notar que 21,2% dos pacientes que apresentaram algum tipo de sangramento não apresentavam plaquetopenia. Ademais, a contagem das plaquetas é um índice imperfeito do número total de plaquetas que o indivíduo possui, e a plaquetopenia periférica pode ser secundária ao seqüestro esplênico. A baixa adesividade plaquetária deve contribuir para elevar o risco de discrasias nestes pacientes.

Os testes da coagulabilidade sanguínea como TS, TC e retração do coágulo têm valor limitado em diagnosticar ou prever os distúrbios da hemostase em outras situações clínicas, à semelhança do que foi observado neste estudo, e valores normais de TP e TTP não excluem a ativação do sistema de hemostasia (TAYLOR *et al.*, 2001; TOH, 2001; LEVI, DE JONGE *et al.*, 2002). Sabe-se também que os testes rotineiramente usados para a triagem do risco de sangramento após o primeiro episódio de tromboembolismo não oferecem nenhum benefício (ECKMAN *et al.*, 2003)

O encontro de sinais de coagulação intravascular na quase totalidade dos pacientes mais uma vez evidencia a semelhança entre a LV e a sepsis e está de acordo com o que foi descrito recentemente na Geórgia (LOMTADZE *et al.*, 2005). Contudo, embora o valor preditivo negativo seja considerado alto, o valor preditivo positivo dos testes de coagulação é questionado. Níveis anormais de PDF e de plaquetas são encontrados em mais de 88% dos pacientes com CID, mas também são encontrados em mais de 50% dos pacientes sem CID (WADA, GABAZZA *et al.*, 2003), o que demonstra que estes dados são marcadores sensíveis, mas não são específicos.

A CID é caracterizada por ativação da hemostase e fibrinólise, resultando na formação de trombina e plasmina e os critérios para o diagnóstico fundamentam-se na doença de base, nas manifestações clínicas e nos testes globais da coagulação. Diversas publicações têm discutido a definição de CID, mas sempre existe um grande balanço entre a sensibilidade e a

especificidade na dependência dos testes ou dos pontos de corte que se adotam. As classificações da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostase (*International Society of Thrombosis and Hemostasis*, ISTH) e do Ministério Japonês de Saúde e Bem-estar (*Japanese Ministry of Health and Welfare*, JMHW) são duas das mais aceitas e, mesmo assim, a concordância entre elas é de apenas 67,4% (WADA, GABAZZA *et al.*, 2003).

Marcadores específicos da coagulação são úteis em diferenciar os diversos graus de inflamação e coagulação e incluem: (1) antitrombina e complexo trombina-antitrombina como indicadores de procoagulação; (2) Trombomodulina e selectina-E como indicadores de alteração endotelial e (3) produtos de degradação da fibrina e dímero-D como indicadores da fibrinólise. O protocolo inicial deste estudo previa a avaliação de marcadores da hipercoagulação e da hiperfibrinólise, que, por motivos operacionais, não pôde ser realizada. Assim, somente o componente fibrinolítico, através da dosagem de dímero D, FPA e PDF, foi analisado. A dosagem de marcadores dos anticoagulantes naturais como a proteína C ativada, a antitrombina, a dosagem de protrombina, ou o inibidor do fator tecidual teriam sido informações importantes sobre sua produção e consumo. Embora a dosagem de dímero D ofereça boa sensibilidade para a identificação de estados de CID, a sua especificidade é baixa, visto que diversas situações clínicas, como tromboembolismo e condições inflamatórias, podem acompanhar-se de fibrinólise. Na verdade, o diagnóstico de CID durante os estágios iniciais da disfunção é difícil e estudos prospectivos são necessários para a identificação de um conjunto de testes laboratoriais que ofereça sensibilidade e especificidade aceitáveis para a confirmação de CID e para o seu estabelecimento (TOH, 2001)

A CID poderia ser assim o fator determinante dos sangramentos observados nestes pacientes. Desta forma, a plaquetopenia e a anemia, que se mostraram fortemente associadas a sangramentos e morte, seriam também conseqüências da síndrome de CID.

A identificação de marcadores de CID em quase todos os pacientes com LV mais uma vez evidencia o caráter inflamatório da doença. Casos de CID associada à LV foram descritos (BLOUNT *et al.*, 1980; AL-JURAYYAN *et al.*, 1995; CHALIASOS *et al.*, 1996; MISHRA *et al.*, 2004) mas a síndrome tem sido considerada uma complicação rara da doença, embora um estudo realizado na Geórgia já tenha relatado alta prevalência de estados de coagulação disseminada na LV (LOMTADZE *et al.*, 2005). Este estudo que incluiu 45 crianças com LV demonstrou que 80 % delas apresentavam complexos solúveis de monômeros de fibrina circulantes e 95,6% apresentava concentração elevada de dímero-D no plasma. Além disto, os pacientes com formas mais graves da doença apresentavam níveis mais elevados de dímero-D. Este foi, pelo conhecimento que temos, o maior estudo sobre a coagulação intravascular na

LV.

Os elevados níveis de fibrinogênio e de FPA na maior parte dos pacientes e a correlação destas moléculas com a atividade inflamatória, mas não com os desfechos clínicos, nos leva a pensar que os níveis de fibrinogênio e de seus produtos de degradação estejam sendo compensados por produção hepática decorrente da atividade inflamatória. Um outro grande estudo avaliando 560 pacientes com CID encontrou que 47% deles tinham níveis de fibrinogênio acima de 200 mg/dL e que somente 24% tinham níveis abaixo de 100 ng/dL, sugerindo que os níveis de fibrinogênio realmente não são sensíveis marcadores para CID. Este mesmo estudo demonstrou que os níveis elevados de fibrinogênio se associaram a menor atividade fibrinolítica e maior falência de órgãos (WADA, MORI *et al.*, 2003), de forma que estes testes apresentam também baixa especificidade para detectar CID na sepse. Considerando a grande similaridade entre achados de laboratório nos pacientes com sepse e com LV no que diz respeito à CID, esta pode ter sido a razão dos níveis de fibrinogênio encontrados neste estudo. A atividade inflamatória mediada pela secreção hepática de substâncias inflamatórias pode levar a um estado de equilíbrio entre produção e consumo de fibrinogênio, de forma que a hipofibrinogenemia seria ocasional e mais associada a situações em que existe ativação adicional da coagulação, como por exemplo, em casos de infecção bacteriana (TAYLOR *et al.*, 2000; TOH, 2001). Neste estudo nós encontramos que os níveis elevados de fibrinogênio não se correlacionaram aos distúrbios da coagulação, mas que os pacientes sem sangramento apresentavam níveis mais elevados de FPA, o que pode estar relacionado à maior atividade fibrinolítica com conseqüente proteção da microvasculatura.

Estudos com pacientes com sepse bacteriana mostraram que os marcadores da coagulação intravascular são eficientes em diferenciar pacientes com CID aberta e pacientes sem CID, mas não diferenciam os estados chamados CID não aberta ou pré-CID, onde os indivíduos apresentam as alterações laboratoriais de coagulação intravascular, mas sem manifestações clínicas, que, por sua vez, poderão se exteriorizar nos dias seguintes, se o estado de saúde não melhorar (ASAKURA *et al.*, 2006). Foi também demonstrado que o sistema de coagulação e de plaquetas encontra-se ativado em pacientes com sepse não complicada, assim como em pacientes com sepse grave e com choque séptico (MAVROMMATIS *et al.*, 2000). Posteriormente foi observado que a fibrinólise também está ativada em todos os estágios da sepse, com gradiente que varia da ativação à exaustão da fibrinólise e dos inibidores da coagulação quando os estágios iniciais são comparados com a sepse grave e com o choque séptico, em pacientes com infecção por bactérias gram-negativas ou gram-positivas (MAVROMMATIS *et al.*, 2001). É bem possível que este estado de pré-

CID esteja presente na maioria dos pacientes com LV e que seja um dos determinantes dos sangramentos.

A trombocitopenia pode agravar o risco de sangramento, pois as plaquetas são parte da primeira linha de defesa do organismo contra sangramentos. Na SRIS e na sepse pode ocorrer ativação plaquetária intravascular disseminada que contribui para a falência microvascular e para a disfunção de órgãos. A baixa contagem de plaquetas é um preditor forte e independente do desfecho em pacientes graves e a sua simples identificação pode auxiliar a classificação do risco e guiar o tratamento (LEVI e LOWENBERG, 2008).

A anemia, presente em quase todos os pacientes, é independente da presença de sangramentos, pode ter comportamento análogo à anemia das doenças crônicas e das infecções por patógenos intracelulares e está relacionada à produção hepática de proteínas induzidas pela síntese de citocinas pró-inflamatórias, notadamente IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6 (FAQUIN *et al.*, 1992; STENVINKEL, 2001). A hepcidina que é importante regulador da absorção e da distribuição de ferro no organismo é uma destas proteínas. A hepcidina liga-se à ferroportina, a proteína transportadora de ferro. A redução de transportadores impede a absorção e a eliminação do ferro dos enterócitos, macrófagos e hepatócitos, induzindo à hipoferrinemia. Foi recentemente descrito que a citocina IL-6 era necessária e suficiente para induzir a secreção de hepcidina durante a inflamação e que esta citocina seria, desta forma, responsável pela hipoferrinemia dos estados de inflamação (NEMETH *et al.*, 2004). Esta pode ser também a patogênese da anemia da LV. Na presença de infecção pela *Leishmania*, pode-se pressupor que a hepcidina, a proteína reguladora do metabolismo do ferro, seria secretada e impediria a liberação de ferro dos enterócitos e dos macrófagos e hepatócitos, à semelhança do que acontece nas doenças crônicas. Como consequência, o quadro de anemia com baixa saturação de transferrina e hipoferrinemia seria instalado (NEMETH *et al.*, 2004; WEISS e GOODNOUGH, 2005).

Outra citocina pleiotrópica recentemente implicada na patogenia da sepse e da SRIS é a *High mobility group box 1* (HMGB1). Pacientes com sepse ou SRIS possuem níveis elevados desta proteína por um mecanismo dependente de TNF- $\alpha$ . A administração de HMGB1 a animais de laboratório provocou sintomas de sepse ou morte e a administração de anticorpos anti-HMGB1 reduziu a letalidade significativamente. A associação de HMGB1 com outras condições como artrite reumatoide, choque hemorrágico, lesão pulmonar aguda, isquemia cerebral e miocárdica, pancreatite aguda, mas nenhum trabalho foi realizado para avaliar a sua associação às leishmanioses (KORNBLIT *et al.*, 2008). Esta citocina, por ser um mediador tardio da inflamação, contrário ao que ocorre com outras citocinas como TNF- $\alpha$ , pode estar associada a fenômenos que acontecem em etapas avançadas das

doenças. Fica a hipótese de que os sangramentos da LV sejam associados a altos níveis de HMGB1.

O mecanismo fisiopatogênico do edema nos pacientes com LV não é bem entendido, mas tem sido interpretado como consequência da baixa pressão oncótica (ALENCAR, 1959), visto que a hipoalbuminemia pode atingir níveis comparáveis aos da síndrome nefrótica. Contudo, tem sido sugerido que a hipoalbuminemia desempenha papel secundário na formação do edema (STEYL e VAN ZYL-SMIT, 2009). De fato, no presente estudo, quase a metade dos pacientes com níveis muito baixos de albumina apresentam edema. Por outro lado, a maior parte dos pacientes com edema não apresentam níveis de albumina que justifiquem o extravasamento de líquido do espaço intravascular.

O acometimento renal encontrado nos pacientes deste estudo foi freqüente. A redução da taxa de filtração glomerular foi discreta na maior parte da vezes, mas foi grave em raros casos, irreversível e associada à morte. O acometimento renal tem sido frequentemente descrito em pacientes com LV, mas tende a ser leve, assintomático e reverter-se totalmente com a instituição da terapia (DUARTE *et al.*, 1983; DUTRA *et al.*, 1985). Todavia, glomerulonefrite (SALGADO-FILHO *et al.*, 2003) e nefrite intersticial grave associada a insuficiência renal foi descrita (CARAVACA *et al.*, 1991), até mesmo como a manifestação inicial da LV em um paciente co-infectado pelo HIV (CLEVENBERGH *et al.*, 2002). O acometimento renal neste estudo foi avaliado pelo cálculo da TFG, usando como variáveis o nível sérico de creatinina, a idade, o sexo e o peso. Como a creatinina sérica pode sofrer interferência pela massa muscular e a prevalência de desnutrição era alta, é possível que algum erro de classificação tenha ocorrido. Em pacientes com massa muscular reduzida a taxa de filtração glomerular calculada com base nestes parâmetros pode ser superestimada (DALEY *et al.*, 1994; ANDERS *et al.*, 2002). Assim, a incidência de insuficiência renal pode ser ainda mais elevada em pacientes com LV. Mas não há estudos sobre o cálculo da função renal durante o processo de desnutrição rápida como acontece na LV.

Neste trabalho a hematúria foi um evento raro e não associado ao edema, mas associado a outras formas de sangramento e à morte. Por outro lado, a proteinúria foi muito mais freqüente e esteve associada à insuficiência renal e à resposta inflamatória. Fica assim, a hipótese de que também o edema observado em pacientes com LV esteja relacionado à lesão glomerular renal mediada pela secreção de citocinas inflamatórias. Contrário a esta idéia foi o fato de não se ter encontrado associação entre a resposta inflamatória e a insuficiência renal, que todavia se mostrou um forte fator de risco para sangramentos e morte.

O acometimento hepático neste estudo foi freqüente e a icterícia foi um dos sinais mais fortemente associados à morte e aos sangramentos. A ativação inflamatória foi evidente,

com elevação da PCR<sub>ultra</sub> e da VHS. Alterações hepáticas encontradas, como icterícia, elevação das aminotransferases, prolongamento do TAP e hipoalbuminemia podem estar associadas à inflamação do fígado mediada pela resposta imune. Outras proteínas inflamatórias como a hepcidina, ferritina, HMGB, IL-17 devem também participar deste processo e necessitam ser investigadas.

As alterações hematológicas, os sinais mais bem reconhecidos da LV, estiveram associadas à atividade inflamatória. Os linfócitos, que são produzidos pelos órgãos linfóides primários ou secundários, estavam positivamente correlacionados à extensão do baço e do fígado e positivamente correlacionados aos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-12 e TNF- $\alpha$  até um limite de 2000 células/mm<sup>3</sup>. Após este limite, as correlações com IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  foram negativas. Pode-se supor que a proliferação de linfócitos seria mediada por estas citocinas inflamatórias até que uma linhagem de linfócitos emergisse induzindo a síntese de citocinas anti-inflamatórias. Ou, pode-se ainda supor que os níveis mais elevados de linfócitos estivessem associados a estimulação antigênica específica, como infecção viral que induziria a proliferação e ativação dos linfócitos nos órgãos linfóides secundários.

Os neutrófilos, a hemoglobina e as plaquetas, que são produzidos na medula óssea, estavam negativamente correlacionados à extensão do baço e do fígado e também negativamente correlacionados aos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, IL-10, IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$ . A correlação negativa da extensão do baço com os parâmetros hematimétricos reforça a hipótese de que a captação esplênica de glóbulos vermelhos, plaquetas e macrófagos opsonizados teria importante papel na definição da pancitopenia (WOODRUFF *et al.*, 1972) (POLLACK *et al.*, 1988). Altos níveis de ferritina já foram associados a inflamação crônica e hiperesplenismo (AL-JURAYYAN *et al.*, 1995). A descrição de um paciente esplenectomizado, com intenso parasitismo de fígado e medula óssea, mas que não apresentava anemia, leucopenia ou plaquetopenia e teve um desfecho letal (WOODRUFF *et al.*, 1972) reforça, mais uma vez, o papel do baço na gênese da pancitopenia.

Os fatores de risco para o óbito em lactentes foram, em geral, semelhantes aos fatores nas demais faixas etárias, mas cada fator foi mais freqüente nos lactentes. Contudo, uma vez presente, a força da associação dos fatores com o óbito foi comparável entre os grupos de idade. Icterícia foi menos freqüente entre os lactentes, contudo, quando presente, esteve fortemente associada ao óbito. Existem diferenças bioquímicas marcantes entre a atividade hepática em crianças e o padrão adulto se estabelece arpximadamente aos 12 anos de idade (PINEIRO-CARRERO e PINEIRO, 2004). Não existe, contudo, um padrão único de

desenvolvimento funcional do fígado. Algumas atividades enzimáticas são altas no feto e caem no período pós-natal enquanto outras continuam a se elevar durante o crescimento. A idade afeta a susceptibilidade do indivíduo a agentes hepatotóxicos e o risco de reações induzidas por diversas drogas é maior em adultos. A hepatotoxicidade ao acetaminofem, por exemplo, é mais elevada em adolescentes e adultos (PETERSON e RUMACK, 1981) e estas diferenças são atribuídas a diferenças bioquímicas da atividade enzimática hepática. (PINEIRO-CARRERO e PINEIRO, 2004). Algumas infecções de caráter leve nas crianças podem apresentar morbidade significativa a partir da adolescência, como a hepatite A. Esta infecção usualmente manifesta-se de forma leve e inaparente em crianças, mas a idade é considerada o mais importante determinante da gravidade da doença (BATTEGAY *et al.*, 2005). É possível que a menor incidência de icterícia em lactentes possa ter fundamentos semelhantes. Contudo, quando presente nos lactentes, a icterícia sinaliza a gravidade da doença. A maior inflamação destas crianças em relação às demais idades, conforme identificado pelos altos níveis de PCR<sub>ultra</sub> e pela VHS, pode ser uma chave desta diferença. A maior inflamação explicaria o excesso de sintomas como diarreia, vômitos, dispneia, edema, tosse, estertores. Também explicaria a maior ocorrência de sangramentos, de anemia, de plaquetopenia. Explica o excesso de insuficiência renal e de elevação de aminotransferases, a maior extensão do baço e do fígado, o que é uma evidência indireta da produção hepática de proteínas inflamatórias de fase rápida.

A associação de icterícia e distúrbios de coagulação sugere um mecanismo hepático comum, como distúrbios da coagulação decorrentes da baixa produção intestinal de vitamina K ou produção ineficiente de fatores da coagulação deste substrato. O fígado, entre outras funções, participa da síntese de substâncias sanguíneas utilizadas no processo de coagulação. A vitamina K é necessária aos processos metabólicos hepáticos, em particular, para a protrombina e fatores VII, IX e X. Estas alterações podem ter alterado a coagulação sanguínea nos pacientes deste estudo.

Os altos níveis de CXCL-8 encontrados neste grupo de crianças podem estar associados ao fato de estes lactentes terem apresentado risco duas vezes maior de apresentar neutropenia grave, o que justificaria o risco três vezes maior de infecção de pele, três vezes maior de sepse e quase três vezes maior de infecção do trato urinário.

Estas crianças, apesar de estarem mais inflamadas que os demais pacientes não apresentaram risco maior de pneumonia intersticial. Isto sugere que a causa desta entidade não deve estar relacionada à resposta inflamatória sistêmica, mas talvez a outra co-morbidade como infecções virais e fúngicas, já que a má resposta aos antibióticos torna a possibilidade

de pneumonia intersticial bacteriana menos provável.

A identificação dos pacientes com maior chance de evoluir desfavoravelmente é, de forma geral, de fundamental importância para a instituição de medidas profiláticas e terapêuticas e pode resultar em redução da morbidade e da letalidade da doença. Vários sistemas de escores de prognósticos como o SCORE, *Systematic Coronary Risk Evaluation* (CONROY *et al.*, 2003) para a avaliação do risco de doença coronariana e o APACHE, *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* para a previsão de falência múltipla de órgãos na sepse (KNAUS *et al.*, 1981) têm auxiliado a classificação da condição clínica e do prognóstico, orientando as decisões médicas.

No caso específico da LV, existem poucas publicações sobre o prognóstico e poucos estudos terapêuticos. As recomendações sobre a terapia anti-*Leishmania* e sobre a terapia de apoio para as complicações têm sido fundamentadas em estudos com limitado poder de generalização, seja pela metodologia empregada, seja pelas diferenças regionais da doença nas populações de estudo e populações alvo ou pela pequena amostra populacional.

O estudo de prognóstico baseado em sistema de escores partiu da necessidade real de classificar estes pacientes de acordo com a gravidade da doença, com a finalidade orientar medidas para o diagnóstico precoce e tratamento eficiente. O Ministério da Saúde difundiu, a partir de 2005, o Guia de Normas e Condutas para a Leishmaniose Visceral Grave (BRASIL, 2005b), baseado nas poucas evidências científicas publicadas. A partir de 2007, com a percepção de que os esforços com a implantação destas recomendações falharam em reduzir a letalidade da doença, o comitê foi novamente convidado a reformular as diretrizes. Persistia, contudo, a mesma dificuldade encontrada anteriormente pela escassez de publicações; de forma que, mais uma vez, muitas das recomendações basearam-se em evidências científicas fracas ou mesmo na opinião dos componentes do grupo. Esta última edição do manual, que ainda se encontra em fase de publicação, recomenda que sejam considerados graves os pacientes com LV que tiverem idade inferior a um ano ou superior a 40 anos, ou que apresentem: infecção bacteriana, recidiva ou reativação de LV, diarreia, vômitos, edema, febre há mais de 60 dias, icterícia, fenômenos hemorrágicos, toxemia, desnutrição grau III, co-morbidades, ou alterações laboratoriais (leucócitos  $< 1000/\text{mm}^3$  e  $> 7.000/\text{mm}^3$ , neutrófilos  $< 500/\text{mm}^3$ , plaquetas  $< 50\ 000/\text{mm}^3$ , hemoglobina  $< 7,0\ \text{g/dL}$ , creatinina sérica acima do valor de referência para idade, atividade de protrombina  $< 70\%$ , bilirrubina acima do valor de referência, enzimas hepáticas acima de cinco vezes o maior valor de referência, albumina abaixo de  $2,5\ \text{g/dL}$ ). São, portanto, recomendações muito abrangentes e com elevada sensibilidade com o objetivo de contemplar a maior parte dos pacientes graves. Estas

recomendações foram aplicadas aos 883 pacientes da coorte do estudo clínico deste trabalho com a finalidade de validá-las, com o surpreendente resultado de que 881 (99,9%) dos pacientes seriam classificados como graves. Então, decidiu-se conduzir o estudo de prognóstico que quantificasse o risco estatístico de morte de cada paciente e pudesse orientar as decisões sobre a necessidade de hospitalização, o momento de transferência para a unidade de terapia intensiva e também fundamentar a seleção de populações para estudos futuros. Este estudo reveste-se de importância devido ao razoável tamanho da amostra incluída, com rigorosos critérios de diagnóstico e informações detalhadas sobre as manifestações clínicas, as alterações laboratoriais e a evolução de cada paciente. O único desfecho avaliado no modelo foi a morte, mas teria sido interessante estudar outras variáveis de desfecho, como a quase-morte, que incluiria os pacientes que apresentaram quadros graves não letais. Contudo, exames laboratoriais essenciais para tal tipo de classificação, como gasometria arterial, nem sempre foram realizados. Por outro lado, não havia padronização para a transferência para unidade de terapia intensiva ou, quando indicada, a transferência nem sempre era efetuada, por motivos logísticos, de forma que o desfecho final destes pacientes esteve, muito provavelmente, associado às oportunidades de tratamento recebidas.

Uma limitação importante deste estudo ao avaliar o prognóstico da LV é a restrição geográfica das informações. Por isto, é fundamental que estudos de validação sejam conduzidos nas regiões alvo destas propostas, antes ou durante a implantação das recomendações clínicas. Os pacientes incluídos nesta análise provavelmente diferem de pacientes com LV tratados em outras instâncias e a validação externa dos resultados merece ser analisada com cautela. Havia recomendações bem definidas para o tratamento da LV e de complicações como infecções, anemia, trombocitopenia no IDTNP durante todo o período do estudo. Parece óbvio admitir, por exemplo, que pacientes com pneumonia bacteriana ou níveis muito baixos de hemoglobina apresentam risco aumentado de morte, contudo nem a pneumonia nem a anemia foram identificados com fatores independentes de risco para a morte, possivelmente porque medidas terapêuticas eficazes direcionadas a estes eventos foram implementadas.

O Índice de Youden é uma medida da efetividade de marcadores diagnósticos e tem o objetivo de auxiliar na seleção dos pontos de corte que otimizam a sensibilidade e a especificidade do teste. Contudo, a conclusão estatística deve ser submetida à consideração clínica. A decisão de quanto se pode sacrificar a sensibilidade do teste em detrimento da especificidade será uma delicada escolha e deverá passar pela revisão cuidadosa de médicos e epidemiologistas. O sistema de escores apenas quantifica o risco, mas a decisão sobre o risco

que se pode aceitar em cada situação dependerá deste acordo firmado entre especialistas. Assim, exemplificando, o paciente que somar cinco pontos de acordo com o modelo clínico e laboratorial, terá uma probabilidade de morrer de 5%, menor que a letalidade geral da doença. Este paciente possivelmente se beneficiaria do tratamento ambulatorial. Mas, se o somatório de pontos exceder a nove, a probabilidade de morte será superior a 33% e este paciente possivelmente necessitaria ser tratado em regime hospitalar, receber atenção diferenciada para a detecção precoce de complicações e para a instituição das medidas terapêuticas mais eficazes e rápidas. Contudo a decisão em casos menos extremos é muito mais sujeita a discussões. Restará ao comitê de especialistas a difícil decisão sobre os riscos e os benefícios da hospitalização, dos procedimentos invasivos e da introdução de terapias potencialmente tóxicas.

A resposta imune na LV humana ainda não está bem entendida, e provavelmente não segue o modelo animal polarizado de resposta Th1/Th2 com padrão IFN- $\gamma$ /IL-2 associado à resistência e IL-4/IL-10 associado à susceptibilidade à doença. É mais possível que um padrão misto de resposta Th1 e Th2 seja ativado na infecção por cepas viscerotrópicas de *Leishmania* (RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998; GAMA *et al.*, 2004) com variabilidade dependente do parasito (MATLASHEWSKI, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2006) ou do hospedeiro. Recentemente grande atenção tem se voltado para as características genéticas de indivíduos e de populações que possam predispor à aquisição da *Leishmania* ou ao desenvolvimento de formas graves da doença (KARPLUS *et al.*, 2002; ALONSO *et al.*, 2007; JERONIMO *et al.*, 2007), assim como para as características genéticas do parasito que possam se associar à susceptibilidade à infecção por *Leishmania* (ALAM, KUHLS *et al.*, 2009). Outros fatores podem interferir na resposta imune frente à infecção, como co-infecções como as helmintíases (BENTWICH *et al.*, 1995) ou comprometimento prévio do sistema imune. Neste estudo foi possível perceber esta enorme complexidade de achados imunológicos em uma população onde todos os pacientes apresentavam formas sintomáticas da infecção, mas com diferenças importantes que se refletiram na apresentação clínica e no desfecho final.

Diversos estudos têm demonstrado a atividade inflamatória na LV (VAN DER POLL *et al.*, 1995; WASUNNA *et al.*, 1995; CALDAS *et al.*, 2005; ANSARI *et al.*, 2006; PERUHYPE-MAGALHAES *et al.*, 2006) assim como as alterações da coagulação sanguínea (BLOUNT *et al.*, 1980; AL-JURAYYAN *et al.*, 1995; MISHRA *et al.*, 2004; LOMTADZE *et al.*, 2005), mas este estudo é, no conhecimento que temos, a primeira tentativa de investigar a associação entre a resposta inflamatória, as alterações da coagulação sanguínea e as demais manifestações clínicas desta doença.

O caráter transversal deste estudo no que se refere à mensuração dos parâmetros laboratoriais em relação aos sinais, sintomas e síndromes limita a inferência de causalidade. Ficou demonstrado que a coagulação intravascular e a inflamação foram fenômenos constantes na população investigada e a associação destes fenômenos com a ocorrência de sangramento ou outros sinais clínicos da inflamação foi consistente. Contudo, a força estatística não pode ser traduzida como causalidade, uma vez que fatores confundidores ou a causalidade reversa são outras possíveis explicações. De fato, sabe-se que a inflamação desencadeia a deposição de fibrina no leito microvascular em pacientes com sepse, mas a deposição de fibrina, em contrapartida, exacerba a reação inflamatória (LEVI *et al.*, 2004; SCHULTZ *et al.*, 2006). A implicação deste tipo de inferência é crucial. Se a resposta inflamatória for conseqüência da deposição de fibrina e não a causa desta, as medidas terapêuticas direcionadas ao controle da atividade inflamatória serão certamente ineficazes para o paciente com LV.

Entre os 883 pacientes analisados nesta coorte, apenas 18 apresentaram sangramento posterior à admissão num intervalo que variou de quatro a 17 dias. Infelizmente nenhum destes participou das populações dos estudos da resposta inflamatória e da coagulação sanguínea. Contudo, todos já apresentavam, no momento da admissão hospitalar, sinais de inflamação sistêmica evidenciados pela elevação da VHS e das enzimas hepáticas, e também pela pancitopenia, icterícia ou edema. Este fato pode constituir evidência de que a inflamação antecede a coagulação, uma vez que a ativação da coagulação poderia ter tido início dias antes da descompensação que culminou em sangramento.

As citocinas proinflamatórias, notadamente CXCL-8, e IL-6 estiveram associadas à morte e aos eventos associados à morte, mesmo entre os pacientes sobreviventes. Sugere-se, então, que sintomas associados à LV, como diarreia, vômitos, edema, icterícia e principalmente os distúrbios da coagulação, estejam vinculados à ativação inflamatória. Os níveis elevados de IL-1 e de IL-6 estão de acordo com a teoria de que a resposta inflamatória mediada por estas citocinas na LV poderia estimular a expressão de fator tecidual e originar os distúrbios da coagulação (GRIGNANI e MAIOLO, 2000; SCHULTZ *et al.*, 2006). Não é provável que a CXCL-8 cause dano tecidual direto em pacientes com LV porque esta quimiocina não exerce citotoxicidade direta. A quimiocina CXCL-8 esteve associada à anemia, leucopenia, plaquetopenia, elevação das enzimas hepáticas, sangramento, icterícia, edema. Também esteve associada à baixa idade e à extensão do baço. Esta quimiocina foi uma das primeiras citocinas associada à morte por sepse (FUJISHIMA, S. *et al.*, 1996). No entanto não houve correlação significativa de CXCL-8 e o óbito ou a presença de

sangramentos, mas a IL-6 e o IFN- $\gamma$  associaram-se significativamente a estas situações. Este achado está em concordância com publicações anteriores (KARP *et al.*, 1993; VAN DER POLL *et al.*, 1995; ANSARI *et al.*, 2006).

A associação da extensão do baço, mas não da extensão do fígado, com os níveis de TNF- $\alpha$ , está de acordo com a teoria baseada em estudos anátomo-patológicos de que a infecção hepática seria auto-limitada, mas que, após a resolução hepática, a reposta esplênica é progressiva, com grande destruição folicular de células dendríticas e eventual perda dos centros germinativos mediada pelos altos níveis de TNF- $\alpha$  (ENGWERDA *et al.*, 2004; WILSON *et al.*, 2005). O baço é um importante órgão linfóide secundário e o grande centro depurador de produtos de digestão celular. Por motivos óbvios, não se conhece a morfologia esplênica após a recuperação de um episódio de LV, mas é possível que a destruição seja permanente após a doença grave, resultando em asplenia funcional, o que predisporia estes indivíduos a reativações da LV, mediada por resposta mantida à custa de IL-10 e de infecções bacterianas posteriores.

O estudo da coinfeção *Leishmania*/HIV não foi objeto direto deste estudo, mas chamou a atenção o número de pacientes co-infectados, mesmo entre aqueles previamente assintomáticos, que desenvolveram outros sinais ou sintomas de imunodeficiência durante o tratamento da LV. Estes pacientes co-infectados apresentaram níveis significativamente mais elevados de IL-10 e de IFN- $\gamma$ , o que pode ser resultado do desequilíbrio entre as células Treg e as células T efectoras (NYLEN *et al.*, 2007). Níveis elevados de IL-10 parecem interferir na resposta de macrófagos e células T (GHALIB *et al.*, 1993) e é possível também que estados de imunossupressão induzidos pelos altos níveis de IL-10 estejam associados às reativações de LV nos pacientes com AIDS à semelhança da leishmaniose dérmica pós calazar na Índia (GASIM *et al.*, 1998). A manipulação da resposta imune ao parasito pode ser uma estratégia útil para melhorar os regimes de tratamento na LV. As citocinas proinflamatórias desempenham papel central e afetam diretamente as etapas da coagulação e da fibrinólise e, vice-versa, a ativação do sistema da coagulação afeta a resposta inflamatória. Estudos têm sugerido a IL-10 como possível alvo terapêutico (MALLA e MAHAJAN, 2006) por seu efeito regulador sobre as citocinas inflamatórias. Tem sido proposto que a ativação imune prolongada por infecções parasitárias pode interferir na progressão da infecção pelo HIV. (BENTWICH *et al.*, 1995). Os mecanismos imunopatogênicos pelos quais a *Leishmania* e o HIV interagem estimulam a replicação do HIV por células infectadas acelerando a progressão da imunodeficiência e, de forma reversa, modulam a replicação de *Leishmania* nos

macrófagos (WOLDAY *et al.*, 1999).

O tratamento da LV ainda é insatisfatório e, a despeito da disponibilidade de drogas anti-leishmania potentes, a letalidade é elevada. De posse do papel da citocinas proinflamatórias na patogênese da doença, agentes anti-citocinas podem se mostrar úteis para otimizar o tratamento. A avaliação de citocinas como marcador da resposta inflamatória pode também identificar os pacientes com maior chance de evoluir com disfunções de órgãos e de morrer. A neutralização de IL-10 pode representar uma arma para o controle da infecção ou para a prevenção de reativações ou a sua potencialização pode ter resultados benéficos na regulação de citocinas com o poder de ativar a resposta inflamatória. Células dendríticas, capazes de induzir imunidade contra infecções, são candidatos potenciais para a imunoterapia das leishmanioses pelo seu potencial em modular a expansão de células T CD4+ e determinar o desfecho da infecção. Alvos moleculares específicos, como a inibição da enzima arginase ou a ativação da enzima óxido-nítrico-sintase são promissores no tratamento e na prevenção da LV. Os resultados discutidos aqui apontam a CXCL-8 como outro alvo promissor para a terapia adjuvante dado à grande associação com a maior parte dos fatores de risco para o óbito como anemia, plaquetopenia, linfopenia, icterícia, sangramento e edema. Entre os agentes conhecidos pode-se citar a pentoxifilina, os inibidores da fosfodiesterase e a talidomida. Estudos futuros poderão identificar a combinação de drogas capazes de bloquear seletivamente a citocina CXCL-8 e proteger o sistema imune celular, à semelhança do que tem sido proposto para o tratamento da anemia associada à insuficiência renal (COOPER *et al.*, 2004). A administração de anticorpos anti-HMGB1 e drogas imunossupressoras em combinação com as drogas leishmanicidas são outras alternativas.

Este estudo oferece evidências de que a LV, assim como a sepse, quase invariavelmente leva a anormalidades da hemostasia, que variam desde alterações sutis dos testes laboratoriais até à CID grave, com obstrução da microcirculação e falência dos órgãos. Em adição, a ativação maciça e prolongada da coagulação leva à depleção das plaquetas e dos fatores da coagulação e pode causar sangramentos que muitas vezes ameaçam a vida do paciente. Resta ainda muito a se compreender sobre os mecanismos envolvidos nesta desregulação para que propostas terapêuticas como a administração de proteína C ativada sejam implementadas na LV.

A relevância das interfaces entre a inflamação e a coagulação está nos resultados promissores do tratamento da inflamação sistêmica com drogas moduladoras da coagulação e da inflamação. A análise dos parâmetros relacionados à resposta imune em pacientes com LV pode ajudar na identificação de padrões de reação à *Leishmania*, monitorar o estado funcional

do sistema imune e futuramente, orientar estratégias terapêuticas personalizadas.

Fica assim identificada uma grande variedade de sinais, sintomas e síndromes como fatores de risco de morte em pacientes com LV. As síndromes intestinais com diarreia e vômitos; a síndrome respiratória com tosse, dispneia e estertores pulmonares; a síndrome renal com edema, hematúria e retração da filtração glomerular; a síndrome hepática com hepatomegalia, hipoalbuminemia, elevação das aminotransferases, das bilirrubinas e da fosfatase alcalina; a síndrome hemática com anemia, leucopenia e plaquetopenia. Especula-se se haveria um denominador comum para esta diversidade de apresentação, possivelmente mediado pela resposta inflamatória sistêmica, esta por sua vez mediada pela resposta imune, ou vice-versa. A associação dos distúrbios da coagulação sanguínea com sinais caracteristicamente associados à atividade inflamatória como as síndromes acima enumeradas, constitui evidência de que a hemorragia na LV seja também consequência da inflamação. Os resultados dos testes da atividade inflamatória reforçam a hipótese. A maioria dos pacientes apresentava VHS muito elevada e altos níveis de PCR<sub>ultra</sub>. Os pacientes que apresentaram sangramento foram os pacientes com níveis mais elevados de PCR<sub>ultra</sub>. Os dados são consistentes com a hipótese de que a patogenia da LV esteja fundamentada na ativação inflamatória que resulta em lesão endotelial sistêmica, ativação da coagulação intravascular, hipoperfusão, hipoxemia e morte celular.

O marco deste estudo foi haver comparado pessoas sintomáticas e diversas formas de apresentação da LV. A maior parte dos estudos anteriores, especialmente os que trabalharam com a resposta imune, compararam indivíduos sadios ou infectados assintomáticos com indivíduos sintomáticos. Por outro lado, a caracterização da gravidade de uma doença é mais indefinida que a caracterização da infecção ou da doença, decorrendo disto o grande número de especulações possíveis. Muito ainda há para se compreender da patogenia da LV. Estudos prospectivos, incluindo a pesquisa de patógenos em fluido brônquico, poderão esclarecer a etiologia das manifestações respiratórias na LV, especialmente pneumonia intersticial. Estudos de avaliação da influência das diferenças genéticas do parasito e do hospedeiro na definição clínica da doença estão apenas se iniciando. A identificação de possíveis alvos moleculares terapêuticos poderá resultar em maior índice de cura e menores complicações. A compreensão da interação entre inflamação e imunidade na LV deverá contribuir para estratégias de sucesso.

## 7 CONCLUSÕES

As principais conclusões deste estudo são:

1. A LV tem características clínicas muito variáveis. Febre, anemia, hepatoesplenomegalia e pancitopenia são manifestações constantes na maioria dos pacientes. Estes dados são pouco específicos para a determinação da gravidade da doença. Sinais menos generalizados como vômitos, edema, icterícia, sangramentos, são mais úteis para identificação das formas mais graves da doença.

2. Sangramento e infecções bacterianas sobressaem-se como importantes fatores de risco para a morte. Outros fatores associados ao mau prognóstico são a presença de edema, icterícia, dispnéia, vômitos, infecção pelo HIV ou AIDS, leucopenia, plaquetopenia, insuficiência renal e elevação das aminotransferases.

3. Crianças com menos de dois anos e adultos com mais de 30 anos estão em maior risco de morte. Na idade adulta, o risco de morte aumenta proporcional à idade e é máximo em indivíduos com mais de 50 anos de idade. Crianças com menos de dois anos de idade apresentam maior incidência de sangramentos, de infecções bacterianas, mais vômitos, diarreia, dispnéia, e tosse. Crianças com menos de dois anos apresentam menos epistaxe e menos icterícia. Contudo, o risco de morte é maior entre as crianças com icterícia em comparação àquelas sem icterícia.

4. Grande proporção dos pacientes com LV apresenta déficit nutricional. A desnutrição instalada durante os sintomas da LV associa-se a maior letalidade da doença, em contraste com os pacientes que não perceberam emagrecimento durante a doença. A desnutrição associada à LV parece ser, mais possivelmente, a consequência do processo consumptivo da doença, do que um fator de risco para a sua aquisição.

5. Os distúrbios da coagulação associam-se às infecções bacterianas, à insuficiência renal, à plaquetopenia, à elevação das aminotransferases e a outros sinais e sintomas como vômitos, diarreia, dispnéia, tosse, edema, icterícia. Os marcadores laboratoriais de coagulação intravascular disseminada estão presentes em grande proporção dos pacientes com LV e correlacionam-se com a atividade inflamatória.

6. Os distúrbios da hemóstase, evidenciados por sangramentos nos pacientes com LV, associam-se à atividade inflamatória e à coagulação intravascular disseminada.

7. A LV associa-se à resposta inflamatória sistêmica, caracterizada por níveis

elevados de citocinas pró-inflamatórias e das proteínas da fase aguda da inflamação. As diferenças entre as manifestações clínicas da LV estão possivelmente associadas ao acometimento específico de órgãos, mediado pela atividade inflamatória.

8. É possível prever precocemente o prognóstico de pacientes com LV através de um sistema de escores clínicos, com base nos sinais e sintomas apresentados. O sistema de escores clínicos e laboratoriais pode ser útil na definição precoce de estratégias clínicas.

9. As citocinas pró-inflamatórias, notadamente IL-10 e CXCL-8 são possíveis alvos moleculares para a abordagem terapêutica coadjuvante da LV e merecem ser estudados.

10. A LV pode ser a primeira doença oportunista em pacientes com HIV ou AIDS, pode ter apresentação atípica e mais letal nestes pacientes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., *et al.* Cytokines. In: (Ed.). Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: W B Saunders, 2007. Cytokines, p.566
- ABDELMOULA, M.S., *et al.* La leishmaniose viscerale chez l'enfant: facteurs pronostiques. Tunis Med, v.81, n.8, Aug, p.535-9. 2003.
- AGARWAL, S., *et al.* Hemophagocytic syndrome associated with visceral leishmaniasis. Indian J Pediatr, v.73, n.5, May, p.445-6. 2006.
- AL-GHAZALY, J., *et al.* Pattern of haematological diseases diagnosed by bone marrow examination in Yemen: a developing country experience. Clin Lab Haematol, v.28, n.6, Dec, p.376-81. 2006.
- AL-JURAYYAN, N.A., *et al.* The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. J Trop Pediatr, v.41, n.3, Jun, p.143-8. 1995.
- ALAM, M.Z., *et al.* Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetic homogeneity of Leishmania donovani strains in the Indian subcontinent. Infect Genet Evol, v.9, n.1, Jan, p.24-31. 2009.
- \_\_\_\_\_. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. Trop Med Int Health, Feb 14. 2009.
- ALENCAR, J.E. Aspectos clínicos do calazar americano. Separata da Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais, v.1, n.11, p.19-44. 1959.
- \_\_\_\_\_. Leishmaniose visceral no Brasil. Revista Médica da Universidade Federal do Ceará, v.17/18, p.129-148. 1977.
- ALLAHVERDIYEV, A.M., *et al.* The value of a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood. Am J Trop Med Hyg, v.73, n.2, Aug, p.276-80. 2005.
- ALMEIDA SILVA, L., *et al.* Immunologic tests in patients after clinical cure of visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg, v.75, n.4, Oct, p.739-43. 2006.
- ALONSO, D.P., *et al.* Genotypes of the mannan-binding lectin gene and susceptibility to visceral leishmaniasis and clinical complications. J Infect Dis, v.195, n.8, Apr 15, p.1212-7. 2007.
- ALVAR, J., *et al.* The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. Clin Microbiol Rev, v.21, n.2, Apr, p.334-59, table of contents. 2008.
- ALVES, C.F., *et al.* Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi. Vet Immunol Immunopathol, v.128, n.4, Apr 15, p.349-58. 2009.

ANDERS, H.J., *et al.* Assessment of renal function in rheumatoid arthritis: validity of a new prediction method. *J Clin Rheumatol*, v.8, n.3, Jun, p.130-3. 2002.

ANDRADE, T.M., *et al.* Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, v.162, n.6, Dec, p.1354-9. 1990.

ANDRADE, Z. Pneumonite intersticial no calazar. *O Hospital*, v.55, p.71-83. 1959.

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

ANSTEAD, G.M., *et al.* Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun*, v.69, n.8, Aug, p.4709-18. 2001.

ASAKURA, H., *et al.* Evaluation of haemostatic molecular markers for diagnosis of disseminated intravascular coagulation in patients with infections. *Thromb Haemost*, v.95, n.2, Feb, p.282-7. 2006.

ASHKAN, M.M. e RAHIM, K.M. Visceral leishmaniasis in paediatrics: a study of 367 cases in southwest Iran. *Trop Doct*, v.38, n.3, Jul, p.186-8. 2008.

ASSIS, T.S.M.D., *et al.* Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v.17, n.2, abr-jun, p.107-116. 2008.

ATTARIAN, S., *et al.* [Guillain-Barre syndrome revealing visceral leishmaniasis in an immunocompetent woman]. *Rev Neurol (Paris)*, v.159, n.11, Nov, p.1046-8. 2003.

AWASTHI, A., *et al.* Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*, v.119, n.6, Jun, p.238-58. 2004.

BABIKER, Z.O., *et al.* Utility of lymph node aspiration in the diagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan. *Am J Trop Med Hyg*, v.76, n.4, Apr, p.689-93. 2007.

BACELLAR, O., *et al.* IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine*, v.12, n.8, Aug, p.1228-31. 2000.

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

\_\_\_\_\_. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis*, v.154, n.4, Oct, p.639-49. 1986.

BARANWAL, A.K., *et al.* Fulminant hepatic failure complicating visceral leishmaniasis in an apparently immunocompetent child. *Indian J Pediatr*, v.74, n.5, May, p.489-91. 2007.

BARATI, M., *et al.* Bacterial infections in children with visceral leishmaniasis: observations made in Kerman province, southern Iran, between 1997 and 2007. *Ann Trop Med Parasitol*, v.102, n.7, Oct, p.635-41. 2008.

BARRAL-NETTO, M., *et al.* Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science*, v.257, n.5069, Jul 24, p.545-8. 1992.

BASTIEN, P., *et al.* Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. *J Clin Microbiol*, v.46, n.6, Jun, p.1897-900. 2008.

BATTEGAY, M., *et al.* Hepatitis A virus. In: Mandell, *et al* (Ed.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, New York, Edimburgh, London, Melbourne, Tokyo: Churchill Livingstone Inc, v.2, 2005. Hepatitis A virus, p.1637-1656

BAUER, K.A., *et al.* Tumor necrosis factor infusions have a procoagulant effect on the hemostatic mechanism of humans. *Blood*, v.74, n.1, Jul, p.165-72. 1989.

BENTWICH, Z., *et al.* Immune activation is a dominant factor in the pathogenesis of African AIDS. *Immunol Today*, v.16, n.4, Apr, p.187-91. 1995.

\_\_\_\_\_. Immune activation in the context of HIV infection. *Clin Exp Immunol*, v.111, n.1, Jan, p.1-2. 1998.

BERMAN, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis*, v.24, n.4, Apr, p.684-703. 1997.

BERN, C., *et al.* The epidemiology of visceral leishmaniasis and asymptomatic leishmanial infection in a highly endemic Bangladeshi village. *Am J Trop Med Hyg*, v.76, n.5, May, p.909-14. 2007.

\_\_\_\_\_. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *Am J Trop Med Hyg*, v.63, n.3-4, Sep-Oct, p.153-7. 2000.

BERTHOLET, S., *et al.* Leishmania donovani-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation. *Infect Immun*, v.71, n.4, Apr, p.2095-101. 2003.

BEUTLER, E. e WAALEN, J. The definition of anemia: what is the lower limit of normal of the blood hemoglobin concentration? *Blood*, v.107, n.5, Mar 1, p.1747-50. 2006.

BHATTACHARYYA, S., *et al.* Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events. *Infect Immun*, v.69, n.3, Mar, p.1499-507. 2001.

BICK, R.L. Disseminated intravascular coagulation: objective clinical and laboratory diagnosis, treatment, and assessment of therapeutic response. *Semin Thromb Hemost*, v.22, n.1, p.69-88. 1996.

\_\_\_\_\_. Disseminated intravascular coagulation current concepts of etiology, pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am*, v.17, n.1, Feb, p.149-76. 2003.

BLOUNT, E.R., *et al.* Kala-azar as a cause of disseminated intravascular coagulation. *Clin Pediatr (Phila)*, v.19, n.2, Feb, p.139-40. 1980.

BOCHUD, P.Y. e CALANDRA, T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *Bmj*, v.326, n.7383, Feb 1, p.262-6. 2003.

BOELAERT, M., *et al.* A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, v.70, n.1, Jan, p.72-7. 2004.

BOGDAN, C., *et al.* The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev*, v.173, Feb, p.17-26. 2000.

BOGGILD, A.K., *et al.* Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru. *Am J Trop Med Hyg*, v.79, n.6, Dec, p.847-52. 2008.

BONE, R.C., *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, v.101, n.6, Jun, p.1644-55. 1992.

BOURGEOIS, N., *et al.* Long-term monitoring of visceral leishmaniasis in patients with AIDS: relapse risk factors, value of polymerase chain reaction, and potential impact on secondary prophylaxis. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v.48, n.1, May 1, p.13-9. 2008.

BOZZA, F.A., *et al.* Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care*, v.11, n.2, p.R49. 2007.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução No. 196 de 10 de outubro de 1996: Diretrizes e Normas de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos: Brasília, 1996. DOU nº 201 de 16/10/1996. Disponível em: < <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes>>. Acesso em 10 abr 2009. v.

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

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

\_\_\_\_\_. Conselho Nacional de Saúde. Resolução No. 347/05 de 10 de março de 2005: Diretrizes para Análise Ética de Projetos de Pesquisa que Envolve Armazenamento de Materiais ou Uso de Materiais Armazenados em Pesquisas Anteriores . DOU nº 47 de 10/03/05. Disponível em: < <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes>>. Acesso em 10 abr 2009. . 2005a.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral Grave: Normas e Condutas. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 22 p. 2005b.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral: Situação da doença no Brasil. Ministério da Saúde: Brasília, 2007 2007.

\_\_\_\_\_. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estimativas das populações residentes, em primeiro de julho de 2008, segundo os municípios. 2008. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/contagem2007/default.shtm>>. Acesso em 10 abr 2009. 2008.

CALDAS, A., *et al.* Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis*, v.5, p.113. 2005.

CALDAS, A.J., *et al.* Are there differences in clinical and laboratory parameters between children and adults with American visceral leishmaniasis? *Acta Trop*, v.97, n.3, Mar, p.252-8. 2006.

\_\_\_\_\_. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.96, n.1, Jan-Feb, p.21-8. 2002.

CAMPOS-JR., D. Características clínico-epidemiológicas do calazar na criança: estudo de 75 casos. *Jornal de Pediatria*, v.71, n. 5, p.261-265. 1995.

CARAVACA, F., *et al.* Acute renal failure in visceral leishmaniasis. *Am J Nephrol*, v.11, n.4, p.350-2. 1991.

CARVALHO, E.M., *et al.* Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol*, v.152, n.12, Jun 15, p.5949-56. 1994.

\_\_\_\_\_. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. *J Infect Dis*, v.165, n.3, Mar, p.535-40. 1992.

CAVALCANTE, M.H.L. Leishmaniose visceral americana: aspectos clínicos e laboratoriais preditivos de prognóstico. (Mestrado). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2007. 103 p.

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

CHAGAS, E. Primeira verificação em indivíduo vivo da leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil-Médico*, v.50, n.11, p.221-223. 1936.

CHAIGNE, V., *et al.* [A patient with visceral leishmaniasis and acute renal failure in necrotizing glomerulonephritis]. *Nephrologie*, v.25, n.5, p.179-83. 2004.

CHALIASOS, N., *et al.* A 7-month-old girl with fever and bleeding. *Lancet*, v.347, n.9008, Apr 20, p.1086. 1996.

CHAPPUIS, F., *et al.* A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *Bmj*, v.333, n.7571, Oct 7, p.723. 2006.

CHOUHI, E., *et al.* [Cultures on NNN medium for the diagnosis of leishmaniasis.]. *Pathol Biol (Paris)*, May 2. 2008.

CHRISTOPHERS, S. A preliminary report on a parasite found in persons suffering from enlargement of the spleen in India. *Sci Mem Med Sanit Dep India*, VIII. 1904.

CHULAY, J.D. e BRYCESON, A.D. Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, v.32, n.3, May, p.475-9. 1983.

CINES, D.B., *et al.* Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, v.91, n.10, May 15, p.3527-61. 1998.

CLEVENBERGH, P., *et al.* Acute renal failure as initial presentation of visceral leishmaniasis in an HIV-1-infected patient. *Scand J Infect Dis*, v.34, n.7, p.546-7. 2002.

COLLIN S, D.R., RITMEIJER K, KEUS K, MELAKU Y, KIPNGETICH S, DAVIES C. Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. *Clin Infect Dis*, v.38, n.5, p.612-9. 2004.

COLLIN, S.M., *et al.* Unseen Kala-azar deaths in south Sudan (1999-2002). *Trop Med Int Health*, v.11, n.4, Apr, p.509-12. 2006.

COLMENARES, M., *et al.* Short report: detection of 72-75-kD and 123-kD fractions of *Leishmania* antigen in urine of patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, v.52, n.5, May, p.427-8. 1995.

CONROY, R.M., *et al.* Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J*, v.24, n.11, Jun, p.987-1003. 2003.

COOPER, A., *et al.* Pentoxifylline improves hemoglobin levels in patients with erythropoietin-resistant anemia in renal failure. *J Am Soc Nephrol*, v.15, n.7, Jul, p.1877-82. 2004.

COSTA, C.H., *et al.* Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. *J Infect Dis*, v.182, n.3, Sep, p.997-1000. 2000.

\_\_\_\_\_. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*, v.66, n.4, Apr, p.334-7. 2002.

\_\_\_\_\_. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*, v.99, n.3, Apr, p.229-36. 2005.

COSTA, C.H.N., *et al.* Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil (1980-1986). *Rev Saude Publica*, v.24, p.361-372. 1990.

CRUZ, I., *et al.* Leishmania/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res*, v.123, n.3, Mar, p.357-88. 2006.

CUNHA, S., *et al.* Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.89, n.2, Mar-Apr, p.155-8. 1995.

DAHER, E.F., *et al.* Clinical presentation and renal evaluation of human visceral leishmaniasis (kala-azar): a retrospective study of 57 patients in Brazil. *Braz J Infect Dis*, v.12, n.4, Aug, p.329-32. 2008.

DALEY, B.J., *et al.* Rapid clinical assessment of kidney function based on arm muscle circumference and serum creatinine. *Nutrition*, v.10, n.2, Mar-Apr, p.128-31. 1994.

DANTAS-TORRES, F. e BRANDÃO-FILHO, S.P. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.39, n.4, Jul-Aug, p.352-6. 2006.

DASGUPTA, B., *et al.* Antileishmanial drugs cause up-regulation of interferon-gamma receptor 1, not only in the monocytes of visceral leishmaniasis cases but also in cultured THP1 cells. *Ann Trop Med Parasitol*, v.97, n.3, Apr, p.245-57. 2003.

DAVIES, C.R. e MAZLOUMI GAUGANI, A.S. Age, acquired immunity and the risk of visceral leishmaniasis: a prospective study in Iran. *Parasitology*, v.119 ( Pt 3), Sep, p.247-57. 1999.

DEANE, L. e DEANE, M. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral. *O Hospital*, v.67, p.75-87. 1955.

DEANE, L.M. e DEANE, M.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.4, n.3, p.198-212. 1962.

DEMIRAG, M.D., *et al.* Circulating hepcidin in the crossroads of anemia and inflammation associated with rheumatoid arthritis. *Intern Med*, v.48, n.6, p.421-6. 2009.

DEMPFLE, C.E. What role does the measurement of fibrinogen and its derivatives have in the diagnosis of disseminated intravascular coagulation? *Blood Rev*, v.16 Suppl 1, Dec, p.S23-8. 2002.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, v.14, p.417-423. 1996.

\_\_\_\_\_. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v.27, n.5, Sep, p.305-18. 2004.

DINARELLO, C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*, v.27, p.519-50. 2009.

DINARELLO, C.A., *et al.* Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med*, v.163, n.6, Jun 1, p.1433-50. 1986.

DUARTE, M.I. e CORBETT, C.E. Histopathological and ultrastructural aspects of interstitial pneumonitis of experimental visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.78, n.5, p.683-8. 1984.

\_\_\_\_\_. Histopathological patterns of the liver involvement in visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v.29, n.3, May-Jun, p.131-6. 1987.

DUARTE, M.I., *et al.* Interstitial pneumonitis in human visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.83, n.1, Jan-Feb, p.73-6. 1989.

\_\_\_\_\_. Interstitial nephritis in human kala-azar. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.77, n.4, p.531-7. 1983.

DUTRA, M., *et al.* Renal involvement in visceral leishmaniasis. *Am J Kidney Dis*, v.6, n.1, Jul, p.22-7. 1985.

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

ECKMAN, M.H., *et al.* Screening for the Risk for Bleeding or Thrombosis. *Ann Intern Med*, v.138, p.W15-W24. 2003.

EL AMIN, E.M., *et al.* Characterization of the humoral immune response in Sudanese leishmaniasis: specific antibody detected by class- and subclass-specific reagents. *Clin Exp Immunol*, v.64, n.1, Apr, p.14-9. 1986.

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

ENGWERDA, C.R., *et al.* Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol*, v.20, n.11, Nov, p.524-30. 2004.

ERGONUL, O., *et al.* Evaluation of serum levels of interleukin (IL)-6, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Infect Dis*, v.193, n.7, Apr 1, p.941-4. 2006.

EVANS, T.G., *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Infect Dis*, v.166, n.5, Nov, p.1124-32. 1992.

FAQUIN, W.C., *et al.* Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. *Blood*, v.79, n.8, Apr 15, p.1987-94. 1992.

FERRER, R., *et al.* [Role of coagulation in acute pulmonary lesion physiopathology. Parallelism with sepsis]. *Med Intensiva*, v.32, n.6, Aug-Sep, p.304-11. 2008.

FORGET, G., *et al.* Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in *Leishmania donovani*-induced inhibition of nitric oxide production. *Infect Immun*, v.74, n.11, Nov, p.6272-9. 2006.

FRANCISCHETTI, I.M., *et al.* Blood coagulation, inflammation, and malaria. *Microcirculation*, v.15, n.2, Feb, p.81-107. 2008.

FUJISHIMA, S., *et al.* Serum MIP-1a and IL-8 in septic patients. *Intensive Care Med*, v.22, p.1169-1175. 1996.

\_\_\_\_\_. Serum MIP-1 alpha and IL-8 in septic patients. *Intensive Care Med*, v.22, n.11, Nov, p.1169-75. 1996.

GAGNAIRE, M.H., *et al.* Hemophagocytic syndrome: A misleading complication of visceral leishmaniasis in children--a series of 12 cases. *Pediatrics*, v.106, n.4, Oct, p.E58. 2000.

GAMA, M.E., *et al.* Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*, v.37, n.1, Jan, p.129-36. 2004.

GANTT, K.R., *et al.* Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *J Immunol*, v.170, n.5, Mar 1, p.2613-20. 2003.

GARCÉS, J.M., *et al.* Bacterial infection as a presenting manifestation of visceral leishmaniasis. *Rev Infect Dis*, v.12, n.3, May-Jun, p.518-9. 1990.

GARG, R., *et al.* Consequences of the natural propensity of *Leishmania* and HIV-1 to target dendritic cells. *Trends Parasitol*, v.23, n.7, Jul, p.317-24. 2007.

GASIM, S., *et al.* High levels of plasma IL-10 and expression of IL-10 by keratinocytes during visceral leishmaniasis predict subsequent development of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*, v.111, n.1, Jan, p.64-9. 1998.

GEORGE, J.N. For low platelets, how low is dangerous? *Cleve Clin J Med*, v.71, n.4, Apr, p.277-8. 2004.

GHALIB, H.W., *et al.* Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J Clin Invest*, v.92, n.1, Jul, p.324-9. 1993.

GOLDMAN, L. e AUSIELLO, D. Approach to the patient with renal disease. In: (Ed.). *Internal Medicine*, Philadelphia, PA: Saunders-Elsevier Inc, v.1, 2008. Approach to the patient with renal disease, p.3078

GORCZYNSKI, R.M. Effect of neonatal injection with antibodies to *Leishmania mexicana* on its growth in adult infected mice. *Infect Immun*, v.56, n.5, May, p.1376-81. 1988.

GOUVEA, M.V., *et al.* Factors associated to Montenegro skin test positivity in Teresina, Brazil. *Acta Trop*, v.104, n.2-3, Nov-Dec, p.99-107. 2007.

GRECH, V., *et al.* Visceral leishmaniasis in Malta--an 18 year paediatric, population based study. *Arch Dis Child*, v.82, n.5, May, p.381-5. 2000.

GRIGNANI, G. e MAIOLO, A. Cytokines and hemostasis. *Haematologica*, v.85, n.9, Sep, p.967-72. 2000.

GROUX, H., *et al.* A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells. *J Immunol*, v.162, n.3, Feb 1, p.1723-9. 1999.

GUERIN, P.J., *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis*, v.2, n.8, Aug, p.494-501. 2002.

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

GUERREIRO, J., *et al.* [Bacterial infection in patients with visceral leishmaniasis]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.80, n.4, Oct-Dec, p.447-52. 1985.

GUPTA, V., *et al.* A study of clinico-haematological profiles of pancytopenia in children. *Trop Doct*, v.38, n.4, Oct, p.241-3. 2008.

HACK, C.E. e ZEERLEDER, S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med*, v.29, n.7 Suppl, Jul, p.S21-7. 2001.

HARMS, G., *et al.* Leishmaniasis in Germany. *Emerg Infect Dis*, v.9, n.7, Jul, p.872-5. 2003.

HARRISON, L.H., *et al.* Reciprocal relationships between undernutrition and the parasitic disease visceral leishmaniasis. *Rev Infect Dis*, v.8, n.3, May-Jun, p.447-53. 1986.

HAYNES, L. e SWAIN, S.L. Why aging T cells fail: implications for vaccination. *Immunity*, v.24, n.6, Jun, p.663-6. 2006.

HEIJMANS-ANTONISSEN, C., *et al.* Multiplex bead array assay for detection of 25 soluble cytokines in blister fluid of patients with complex regional pain syndrome type 1. *Mediators Inflamm*, v.2006, n.1, p.28398. 2006.

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

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. *Lancet*, v.354, n.9185, Oct 2, p.1191-9. 1999.

HIDE, M., *et al.* A microculture technique for isolating live *Leishmania* parasites from peripheral blood of visceral leishmaniasis patients. *Acta Trop*, v.102, n.3, Jun, p.197-200. 2007.

HO, J.L., *et al.* Diminished in vitro production of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha during acute visceral leishmaniasis and recovery after therapy. *J Infect Dis*, v.165, n.6, Jun, p.1094-102. 1992.

HOLADAY, B.J., *et al.* Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala azar. *J Clin Invest*, v.92, n.6, Dec, p.2626-32. 1993.

HOOTS, W.K. Non-overt disseminated intravascular coagulation: definition and pathophysiological implications. *Blood Rev*, v.16 Suppl 1, Dec, p.S3-9. 2002.

HORAN, J.T. e FRANCIS, C.W. Fibrin degradation products, fibrin monomer and soluble fibrin in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost*, v.27, n.6, Dec, p.657-66. 2001.

HOSMER, D.W. e LEMESHOW, S. Asseting fit. In: *Inter-Science (Ed.). Applied Logistic Regression*, New York: John Wiley & Sons, v.1, 1989. Asseting fit, p.135-175

IBRAHIM, M.E. e BARKER, D.C. The origin and evolution of the *Leishmania donovani* complex as inferred from a mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequence. *Infect Genet Evol*, v.1, n.1, Jul, p.61-8. 2001.

IHALAMULLA, R.L., *et al.* Microculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions -- Sri Lankan experience. *Ann Trop Med Parasitol*, v.99, n.6, Sep, p.571-5. 2005.

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

\_\_\_\_\_. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.88, n.4, Jul-Aug, p.386-8. 1994.

JERONIMO, S.M.B., *et al.* *Leishmania* Species: Visceral (Kala-Azar), Cutaneous, and Mucocutaneous Leishmaniasis. In: Mandell, *et al* (Ed.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, New York: Churchill Livingstone Inc, v.2, 2005. *Leishmania* Species: Visceral (Kala-Azar), Cutaneous, and Mucocutaneous Leishmaniasis, p.3145-3154

JIANG, Q., *et al.* Febrile core temperature is essential for optimal host defense in bacterial peritonitis. *Infect Immun*, v.68, n.3, Mar, p.1265-70. 2000.

KADIVAR, M.R., *et al.* Childhood visceral leishmaniasis complicated by bacterial infections. *East Mediterr Health J*, v.6, n.5-6, Sep-Nov, p.879-83. 2000.

KAGER, P.A., *et al.* Splenic aspiration; experience in Kenya. *Trop Geogr Med*, v.35, n.2, Jun, p.125-31. 1983.

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

KARPLUS, T.M., *et al.* Association between the Tumor Necrosis Factor Locus and the Clinical Outcome of *Leishmania chagasi* Infection. *Infection and immunity*, v.70, n.12, p.6919-6925. 2002.

KELLAR, K.L., *et al.* Multiplexed fluorescent bead-based immunoassays for quantitation of human cytokines in serum and culture supernatants. *Cytometry*, v.45, n.1, Sep 1, p.27-36. 2001.

KELLER, W. Stature and weight as indicators of undernutrition. In: Himes (Ed.). *Anthropometric Assessment of nutritional status*, New York, EUA: Wiley-Liss, Inc 1991. Stature and weight as indicators of undernutrition, p.113-122

KHALDI, F., *et al.* [Severe forms of liver involvement in visceral leishmaniasis. Apropos of 7 cases]. *Arch Fr Pediatr*, v.47, n.4, Apr, p.257-60. 1990.

KHAN, S.S., *et al.* Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. *Cytometry B Clin Cytom*, v.61, n.1, Sep, p.35-9. 2004.

KHARAZMI, A., *et al.* T-cell response in human leishmaniasis. *Immunol Lett*, v.65, n.1-2, Jan, p.105-8. 1999.

KNAUS, W.A., *et al.* APACHE-acute physiology and chronic health evaluation: a physiologically based classification system. *Crit Care Med*, v.9, n.8, Aug, p.591-7. 1981.

KORNBLIT, B., *et al.* Association of HMGB1 polymorphisms with outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care*, v.12, n.3, p.R83. 2008.

KOTWAL, J., *et al.* Hematological changes in visceral leishmaniasis. *J Assoc Physicians India*, v.48, n.3, Mar, p.363-4. 2000.

KRISHNAMURTI, C., *et al.* Mechanisms of hemorrhage in dengue without circulatory collapse. *Am J Trop Med Hyg*, v.65, n.6, Dec, p.840-7. 2001.

KULAKSIZ, H., *et al.* Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut*, v.53, n.5, May, p.735-43. 2004.

KUMAR, R. e BURNS, E.A. Age-related decline in immunity: implications for vaccine responsiveness. *Expert Rev Vaccines*, v.7, n.4, May, p.467-79. 2008.

KURKJIAN, K.M., *et al.* Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. *Cytometry A*, v.69, n.5, May, p.353-8. 2006.

LACHAUD, L., *et al.* Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J Clin Microbiol*, v.38, n.1, Jan, p.236-40. 2000.

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

LEVI, M., *et al.* The diagnosis of disseminated intravascular coagulation. *Blood Rev*, v.16, n.4, Dec, p.217-23. 2002.

\_\_\_\_\_. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res*, v.60, n.1, Oct 15, p.26-39. 2003.

LEVI, M. e LOWENBERG, E.C. Thrombocytopenia in critically ill patients. *Semin Thromb Hemost*, v.34, n.5, Jul, p.417-24. 2008.

LEVI, M., *et al.* Endothelium: interface between coagulation and inflammation. *Crit Care Med*, v.30, n.5 Suppl, May, p.S220-4. 2002.

\_\_\_\_\_. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation*, v.109, n.22, Jun 8, p.2698-704. 2004.

LITA, G., *et al.* Pediatric visceral leishmaniasis in Albania. *Int J Infect Dis*, v.6, n.1, Mar, p.66-8. 2002.

LOMTADZE, M.L., *et al.* [Study of intravascular coagulation activation markers in patients with visceral leishmaniasis]. *Georgian Med News*, n.124-125, Jul-Aug, p.47-50. 2005.

LOPEZ-VELEZ, R., *et al.* Parasitic culture of buffy coat for diagnosis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol*, v.33, n.4, Apr, p.937-9. 1995.

\_\_\_\_\_. Amphotericin B lipid complex versus no treatment in the secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother*, v.53, n.3, Mar, p.540-3. 2004.

LUH, S.P. e CHIANG, C.H. Acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS): the mechanism, present strategies and future perspectives of therapies. *J Zhejiang Univ Sci B*, v.8, n.1, Jan, p.60-9. 2007.

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

LYONS, S., *et al.* Visceral leishmaniasis and HIV in Tigray, Ethiopia. *Trop Med Int Health*, v.8, n.8, Aug, p.733-9. 2003.

MACIEL, B.L., *et al.* Association of nutritional status with the response to infection with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*, v.79, n.4, Oct, p.591-8. 2008.

MAHAJAN, V. e MARWAHA, R.K. Immune mediated hemolysis in visceral leishmaniasis. *J Trop Pediatr*, v.53, n.4, Aug, p.284-6. 2007.

MAIA-ELKHOURY, A.N., *et al.* [Analysis of visceral leishmaniasis reports by the capture-recapture method]. *Rev Saude Publica*, v.41, n.6, Dec, p.931-7. 2007.

MALAFIA, G., *et al.* Protein-energy malnutrition decreases immune response to *Leishmania chagasi* vaccine in BALB/c mice. *Parasite Immunol*, v.31, n.1, Jan, p.41-9. 2009.

MALLA, N. e MAHAJAN, R.C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis - some recent concepts. *Indian J Med Res*, v.123, n.3, Mar, p.267-74. 2006.

MANETTI, R., *et al.* Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med*, v.177, n.4, Apr 1, p.1199-204. 1993.

MANSON-BAHR, P.E.C. e APTED, F.I.C. Leishmaniasis. In: Manson-Bahr e Apted (Ed.). *Manson's Tropical Diseases*, London: Bailliere Tindall, 1982. Leishmaniasis, p.93-115

MARQUES, N., *et al.* [Visceral leishmaniasis and HIV infection in the HAART era]. *Acta Med Port*, v.20, n.4, Jul-Aug, p.291-8. 2007.

MARTINEZ, F.J. Idiopathic interstitial pneumonias: usual interstitial pneumonia versus nonspecific interstitial pneumonia. *Proc Am Thorac Soc*, v.3, n.1, p.81-95. 2006.

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

MARZOCHI, M.C., *et al.* Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitol Today*, v.10, n.1, Jan, p.37-40. 1994.

MATLASHEWSKI, G. *Leishmania* infection and virulence. *Med Microbiol Immunol*, v.190, n.1-2, Nov, p.37-42. 2001.

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

\_\_\_\_\_. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*, v.16, n.5, May, p.188-9. 2000.

MAVROMMATIS, A.C., *et al.* Activation of the fibrinolytic system and utilization of the coagulation inhibitors in sepsis: comparison with severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med*, v.27, n.12, Dec, p.1853-9. 2001.

\_\_\_\_\_. Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit Care Med*, v.28, n.2, Feb, p.451-7. 2000.

MCFARLANE, E., *et al.* Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun*, v.76, n.2, Feb, p.532-41. 2008.

MINODIER, P., *et al.* [Mediterranean visceral leishmaniasis: physiopathology]. *Presse Med*, v.28, n.1, Jan 9, p.33-9. 1999.

\_\_\_\_\_. [First-line liposomal amphotericin B for pediatric visceral leishmaniasis in southern France]. *Arch Pediatr*, v.12, n.7, Jul, p.1102-8. 2005.

MISHRA, P., *et al.* Disseminated intravascular coagulation as an unusual presentation of Kala-azar: report of two cases. *Scand J Infect Dis*, v.36, n.6-7, p.519-21. 2004.

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

MOURÃO, O.G. A medula óssea no calazar: importância diagnóstica e interpretação da síndrome pancitopênica. Cadeira de Terapêutica Clínica da Faculdade de Medicina, Universidade de Minas Gerais, Belos Horizonte, Minas Gerais, 1960. 151 p.

MUKHOPADHYAY, S., *et al.* Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. *Respir Res*, v.7, p.125. 2006.

MULLER, I., *et al.* Age-related alteration of arginase activity impacts on severity of leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, v.2, n.5, p.e235. 2008.

MURRAY, H.W. e CARTELLI, D.M. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. *J Clin Invest*, v.72, n.1, Jul, p.32-44. 1983.

NAJERA, O., *et al.* CD45RA and CD45RO isoforms in infected malnourished and infected well-nourished children. *Clin Exp Immunol*, v.126, n.3, Dec, p.461-5. 2001.

NATIONAL. National Commission for the Protection of Human Subjects of Biomedical and Behavioral Research. Belmont report: ethical principles and guidelines for the protection of human subjects of research. Washington, D.C.: Government Printing Office, 1988. (GPO 887-809.). 1988.

NEMETH, E., *et al.* IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*, v.113, n.9, May, p.1271-6. 2004.

NETO, V.A. [Visceral leishmaniasis with an incubation period of at least 4 years]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v.20, n.5, Sep-Oct, p.312-4. 1978.

NICHOLSON, J.F. e PESCE, M.A. Laboratory Testing and Reference Values in Infant and Children. In: Nelson, *et al* (Ed.). *Textbook of Pediatrics*, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996. Laboratory Testing and Reference Values in Infant and Children, p.2031-2058

NYLEN, S., *et al.* Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. *J Exp Med*, v.204, n.4, Apr 16, p.805-17. 2007.

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

OLIVEIRA, C.D., *et al.* Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cad Saude Publica*, v.17, n.5, Sep-Oct, p.1231-9. 2001.

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

OSORIO, Y., *et al.* Pregnancy enhances the innate immune response in experimental cutaneous leishmaniasis through hormone-modulated nitric oxide production. *J Leukoc Biol*, v.83, n.6, Jun, p.1413-22. 2008.

PAREDES, R., *et al.* Leishmaniasis in HIV infection. *J Postgrad Med*, v.49, n.1, Jan-Mar, p.39-49. 2003.

PASTORINO, A.C., *et al.* [Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects]. *J Pediatr (Rio J)*, v.78, n.2, Mar-Apr, p.120-7. 2002.

PEARSON, R.D., *et al.* Visceral leishmaniasis: a model for infection-induced cachexia. *Am J Trop Med Hyg*, v.47, n.1 Pt 2, Jul, p.8-15. 1992.

\_\_\_\_\_. Circulating immune complexes and rheumatoid factors in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, v.147, n.6, Jun, p.1102. 1983.

PEARSON, R.D. e SOUSA, A.D.Q. *Leishmania* Species: Visceral (Kala-Azar), Cutaneous, and Mucocutaneous Leishmaniasis. In: Mandell, *et al* (Ed.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, New York, Edimburgh, London, Melbourne, Tokyo: Churchill Livingstone Inc, v.2, 1995. *Leishmania* Species: Visceral (Kala-Azar), Cutaneous, and Mucocutaneous Leishmaniasis, p.2428-2442

PEDRAS, M.J., *et al.* Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.102, n.2, Feb, p.172-8. 2008.

PEDROSA, C.M. e DA ROCHA, E.M. [Clinical and epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in children up to 15 years of age in Alagoas, Brasil]. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.37, n.4, Jul-Aug, p.300-4. 2004.

PENNA, H.A. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil-Médico*, v.48, n.46, 17 de novembro de 1934, p.929-30. 1934.

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

PETERS, B.S., *et al.* Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS: clinical features and response to therapy. *Q J Med*, v.77, n.283, Nov, p.1101-11. 1990.

PETERSON, R.G. e RUMACK, B.H. Age as a variable in acetaminophen overdose. *Arch Intern Med*, v.141, n.3 Spec No, Feb 23, p.390-3. 1981.

PIAUI. Piauí (Estado). Prefeitura Municipal de Teresina. Secretaria Municipal de Planejamento e Coordenação Geral  
Perfil de Teresina-1993: Aspectos e Características. Teresina: Prefeitura Municipal de Teresina, 1994. 186p 1994.

PINEIRO-CARRERO, V.M. e PINEIRO, E.O. Liver. *Pediatrics*, v.113, n.4 Suppl, Apr, p.1097-106. 2004.

PIPPARD, M.J., *et al.* Mechanism of anaemia in resistant visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*, v.80, n.3, Jun, p.317-23. 1986.

PISCOPO, T.V. e MALLIA AZZOPARDI, C. Leishmaniasis. *Postgrad Med J*, v.83, n.976, Feb, p.649-57. 2007.

POLLACK, S., *et al.* Immunological studies of pancytopenia in visceral leishmaniasis. *Isr J Med Sci*, v.24, n.2, Feb, p.70-4. 1988.

PRATA, A.R. Quadro clínico e laboratorial do calazar. Faculdade de Medicina, Universidade da Bahia, Salvador, Bahia, 1957.

PUNG, O.J., *et al.* Influence of estrogen on host resistance: increased susceptibility of mice to *Listeria monocytogenes* correlates with depressed production of interleukin 2. *Infect Immun*, v.50, n.1, Oct, p.91-6. 1985.

QUEIROZ, M.J., *et al.* Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. *J Pediatr (Rio J)*, v.80, n.2, Mar-Apr, p.141-6. 2004.

RABELLO, A., *et al.* Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol*, v.97 Suppl 1, Oct, p.17-28. 2003.

RAHMAN, K.M. e ISLAM, N. Resurgence of visceral leishmaniasis in Bangladesh. *Bull World Health Organ*, v.61, n.1, p.113-6. 1983.

RATHORE, M.H., *et al.* Visceral leishmaniasis in Pakistani children. *South Med J*, v.89, n.5, May, p.491-3. 1996.

REINER, N.E., *et al.* Modulation of in vitro monocyte cytokine responses to *Leishmania donovani*. Interferon-gamma prevents parasite-induced inhibition of interleukin 1 production and primes monocytes to respond to *Leishmania* by producing both tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1. *J Clin Invest*, v.85, n.6, Jun, p.1914-24. 1990.

REY, L.C., *et al.* American visceral leishmaniasis (kala-azar) in hospitalized children from an endemic area. *J Pediatr (Rio J)*, v.81, n.1, Jan-Feb, p.73-8. 2005.

RIBEIRO-DE-JESUS, A., *et al.* Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*, v.31, n.1, Jan, p.143-8. 1998.

RIEDEMANN, N.C., *et al.* The enigma of sepsis. *J Clin Invest*, v.112, n.4, Aug, p.460-7. 2003.

RIZOS, E., *et al.* Cryoglobulinemic purpura in visceral leishmaniasis. *Rheumatol Int*, v.25, n.6, Aug, p.469-71. 2005.

ROBERTS, M.T. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Med Bull*, v.75-76, p.115-30. 2005.

RODRIGUEZ, L., *et al.* Assessment by flow cytometry of cytokine production in malnourished children. *Clin Diagn Lab Immunol*, v.12, n.4, Apr, p.502-7. 2005.

ROMAGNANI, S. Understanding the role of Th1/Th2 cells in infection. *Trends Microbiol*, v.4, n.12, Dec, p.470-3. 1996.

\_\_\_\_\_. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol*, v.85, n.1, Jul, p.9-18; quiz 18, 21. 2000.

ROSA, G.D., *et al.* Toward an operative diagnosis in sepsis: a latent class approach. *BMC Infect Dis*, v.8, p.18. 2008.

RUOPP, M.D., *et al.* Youden Index and optimal cut-point estimated from observations affected by a lower limit of detection. *Biom J*, v.50, n.3, Jun, p.419-30. 2008.

RUSSO, R., *et al.* Visceral leishmaniasis in those infected with HIV: clinical aspects and other opportunistic infections. *Ann Trop Med Parasitol*, v.97 Suppl 1, Oct, p.99-105. 2003.

SAHA, S., *et al.* Immune responses in kala-azar. *Indian J Med Res*, v.123, n.3, Mar, p.245-66. 2006.

SALGADO-FILHO, N., *et al.* Envolvimento da função renal em pacientes com leishmaniose visceral (calazar) *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.36 n.2. 2003.

SAMOILOVA, E.B., *et al.* IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol*, v.161, n.12, Dec 15, p.6480-6. 1998.

SANCEAU, J., *et al.* Tumor necrosis factor-alpha and IL-6 up-regulate IFN-gamma receptor gene expression in human monocytic THP-1 cells by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Immunol*, v.149, n.5, Sep 1, p.1671-5. 1992.

SATOSKAR, A. e ALEXANDER, J. Sex-determined susceptibility and differential IFN-gamma and TNF-alpha mRNA expression in DBA/2 mice infected with *Leishmania mexicana*. *Immunology*, v.84, n.1, Jan, p.1-4. 1995.

SAVINO, W., *et al.* The thymus is a common target in malnutrition and infection. *Br J Nutr*, v.98 Suppl 1, Oct, p.S11-6. 2007.

SCHULTZ, M.J., *et al.* Pulmonary coagulopathy as a new target in therapeutic studies of acute lung injury or pneumonia--a review. *Crit Care Med*, v.34, n.3, Mar, p.871-7. 2006.

SCRIMSHAW, N.S. Historical concepts of interactions, synergism and antagonism between nutrition and infection. *J Nutr*, v.133, n.1, Jan, p.316S-321S. 2003.

SEAMAN, J., *et al.* Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. *Ann Intern Med*, v.124, n.7, Apr 1, p.664-72. 1996.

SHAHA, C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J Med Res*, v.123, n.3, Mar, p.233-44. 2006.

SILVA, A.R., *et al.* [Visceral leishmaniasis (kala-azar) on Ilha de Sao Luis, Maranhao, Brazil: its evolution and outlook]. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.30, n.5, Sep-Oct, p.359-68. 1997.

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

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

SINGH, K., *et al.* Clinical and laboratory study of kala-azar in children in Nepal. *J Trop Pediatr*, v.45, n.2, Apr, p.95-7. 1999.

SINGH, N., *et al.* Age-influenced population kinetics and immunological responses of *Leishmania donovani* in hamsters. *Parasitol Res*, v.101, n.4, Sep, p.919-24. 2007.

SINGH, U.K., *et al.* Fulminant hepatitis in Kala-azar. *Indian J Pediatr*, v.62, n.5, Sep-Oct, p.571-4. 1995.

SINHA, A.K., *et al.* Incidence of megaloblastic anaemia and its correction in leishmaniasis--a prospective study at BPKIHS hospital, Nepal. *Indian J Pathol Microbiol*, v.49, n.4, Oct, p.528-31. 2006.

SINHA, P.K., *et al.* Diagnosis & management of leishmania/HIV co-infection. *Indian J Med Res*, v.121, n.4, Apr, p.407-14. 2005.

SNIDER, H., *et al.* Sex hormones and modulation of immunity against leishmaniasis. *Neuroimmunomodulation*, v.16, n.2, p.106-13. 2009.

SOARES, V.Y., *et al.* Clinical and epidemiological analysis of patients with HIV/AIDS admitted to a reference hospital in the northeast region of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v.50, n.6, Nov-Dec, p.327-32. 2008.

SOTUCA FERNANDEZ, J.V., *et al.* [Hemophagocytic syndrome secondary to visceral leishmaniasis]. *An Pediatr (Barc)*, v.69, n.1, Jul, p.46-8. 2008.

SQUIRES, K.E., *et al.* Defect in the tissue cellular immune response: experimental visceral leishmaniasis in euthymic C57BL/6 ep/ep mice. *Infect Immun*, v.58, n.12, Dec, p.3893-8. 1990.

STANLEY, A.C. e ENGWERDA, C.R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol*, v.85, n.2, Feb-Mar, p.138-47. 2007.

STENVINKEL, P. The role of inflammation in the anaemia of end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, v.16 Suppl 7, p.36-40. 2001.

STEYL, C. e VAN ZYL-SMIT, R. Mechanisms of oedema formation: the minor role of hypoalbuminaemia. *S Afr Med J*, v.99, n.1, Jan, p.57-9. 2009.

STONE, H.H., *et al.* Kala-azar (visceral leishmaniasis): report of a case with 34 month incubation period and positive Doan-Wright test. *Ann Intern Med*, v.36, n.2:2, Feb, p.686-93. 1952.

SUNDAR, S. e RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*, v.9, n.5, Sep, p.951-8. 2002.

SUNDAR, S., *et al.* Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet*, v.351, n.9102, Feb 21, p.563-5. 1998.

TANIR, G., *et al.* Pediatric visceral Leishmaniasis in Turkey. *Pediatr Int*, v.48, n.1, Feb, p.66-9. 2006.

TAYLOR, F.B., JR., *et al.* Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost*, v.86, n.5, Nov, p.1327-30. 2001.

\_\_\_\_\_. Description of compensated and uncompensated disseminated intravascular coagulation (DIC) responses (non-overt and overt DIC) in baboon models of intravenous and intraperitoneal *Escherichia coli* sepsis and in the human model of endotoxemia: toward a better definition of DIC. *Crit Care Med*, v.28, n.9 Suppl, Sep, p.S12-9. 2000.

TEAGUE, T.K., *et al.* Activation-induced inhibition of interleukin 6-mediated T cell survival and signal transducer and activator of transcription 1 signaling. *J Exp Med*, v.191, n.6, Mar 20, p.915-26. 2000.

TEIXEIRA, M.J., *et al.* Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol*, v.22, n.1, Jan, p.32-40. 2006.

THAKUR, C.P. Epidemiological, clinical and therapeutic features of Bihar kala-azar (including post kala-azar dermal leishmaniasis). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.78, n.3, p.391-8. 1984.

TOH, C.H. Laboratory testing in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost*, v.27, n.6, Dec, p.653-6. 2001.

TOMOSUGI, N., *et al.* Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. *Blood*, v.108, n.4, Aug 15, p.1381-7. 2006.

TRAMONT, E.C. e HOOVER, D.L. General or nonspecific host defense mechanisms. In: Mandell, *et al* (Ed.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, New York, Edimburgh,

London, Melbourne, Tokyo: Churchill Livingstone Inc, v.2, 1995. General or nonspecific host defense mechanisms, p.30-35

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

TUON, F.F., *et al.* In situ immune responses to interstitial pneumonitis in human visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol*, v.31, n.2, Feb, p.98-103. 2009.

UZONNA, J.E., *et al.* Vaccination with phosphoglycan-deficient *Leishmania major* protects highly susceptible mice from virulent challenge without inducing a strong Th1 response. *J Immunol*, v.172, n.6, Mar 15, p.3793-7. 2004.

VAN DER MEER, W., *et al.* Pseudoplatelets: a retrospective study of their incidence and interference with platelet counting. *J Clin Pathol*, v.56, n.10, Oct, p.772-4. 2003.

VAN DER POLL, T., *et al.* Interleukin 6 during active visceral leishmaniasis and after treatment. *Clin Immunol Immunopathol*, v.77, n.1, Oct, p.111-4. 1995.

VAN WEYENBERGH, J., *et al.* Zinc/copper imbalance reflects immune dysfunction in human leishmaniasis: an *ex vivo* and *in vitro* study. *BMC Infect Dis*, v.4, Nov 17, p.50. 2004.

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

WADA, H., *et al.* Comparison of diagnostic criteria for disseminated intravascular coagulation (DIC): diagnostic criteria of the International Society of Thrombosis and Hemostasis and of the Japanese Ministry of Health and Welfare for overt DIC. *Am J Hematol*, v.74, n.1, Sep, p.17-22. 2003.

\_\_\_\_\_. High plasma fibrinogen level is associated with poor clinical outcome in DIC patients. *Am J Hematol*, v.72, n.1, Jan, p.1-7. 2003.

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

WANG, Y., *et al.* Predictors of body surface area. *J Clin Anesth*, v.4, n.1, Jan-Feb, p.4-10. 1992.

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

WATERLOW, J.C. Classification and definition of protein-calorie malnutrition. *Br Med J*, v.3, n.5826, Sep 2, p.566-9. 1972.

WEIGAND, M.A., *et al.* The systemic inflammatory response syndrome. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, v.18, n.3, Sep, p.455-75. 2004.

WEISS, G. e GOODNOUGH, L.T. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*, v.352, n.10, Mar 10, p.1011-23. 2005.

WERNECK, G.L., *et al.* Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Infection*, v.31, n.3, Jun, p.174-7. 2003.

\_\_\_\_\_. The burden of *Leishmania chagasi* infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop*, v.83, n.1, Jul, p.13-8. 2002.

WHO. World Medical Association Declaration of Helsinki. Adotada na 18a. Assembleia Médica Mundial, Helsinki, 1964, e revisada pela 48a. Assembleia Médica Mundial, Republica da África do Sul, 1996. 1996.

\_\_\_\_\_. World Health Organization. Strategic Directions for Research. Leishmaniasis: disease burden and epidemiological trends. WHO: Geneva, Switzerland, 2002. 2002.

\_\_\_\_\_. World Health Organization. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Scientific Working Group (SWG). Report of the Scientific Working Group meeting on Leishmaniasis. WHO: Geneva, Switzerland, 2004. 2004.

\_\_\_\_\_. World Health Organization. Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection. WHO: Addis Ababa, Ethiopia, 2007: 32 p. 2007.

WICKRAMASINGHE, S.N., *et al.* Ultrastructure of bone marrow in patients with visceral leishmaniasis. *J Clin Pathol*, v.40, n.3, Mar, p.267-75. 1987.

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

\_\_\_\_\_. The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. *J Immunol*, v.161, n.11, Dec 1, p.6148-55. 1998.

WOLDAY, D., *et al.* Leishmania-HIV interaction: immunopathogenic mechanisms. *Parasitol Today*, v.15, n.5, May, p.182-7. 1999.

WOODRUFF, A.W., *et al.* The anaemia of kala-azar. *Br J Haematol*, v.22, n.3, Mar, p.319-29. 1972.

WORLD. World Health Organization. International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects. Geneva: Council for International Organizations of Medical Sciences, 1993. 1993.

ZEERLEDER, S., *et al.* Disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Chest*, v.128, n.4, Oct, p.2864-75. 2005.

ZIJLSTRA, E.E., *et al.* Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.86, n.5, Sep-Oct, p.505-7. 1992.

\_\_\_\_\_. Kala-azar in displaced people from southern Sudan: epidemiological, clinical and therapeutic findings. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.85, n.3, May-Jun, p.365-9. 1991.

ZWINGENBERGER, K., *et al.* Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis: evidence for predominance of endogenous interleukin 4 over interferon-gamma production. *Clin Immunol Immunopathol*, v.57, n.2, Nov, p.242-9. 1990.

\_\_\_\_\_. Generation of cytokines in human visceral leishmaniasis: dissociation of endogenous TNF-alpha and IL-1 beta production. *Immunobiology*, v.183, n.1-2, Sep, p.125-32. 1991.