

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

Ricardo Luiz Fontes Moreira

**ASSOCIAÇÃO ENTRE CITOCINAS PLASMÁTICAS E
DOENÇA ATIVA, PARÂMETROS CLÍNICOS E
LABORATORIAIS DE GRAVIDADE E COINFECÇÃO COM
HIV NA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA**

Belo Horizonte
2014

Ricardo Luiz Fontes Moreira

**ASSOCIAÇÃO ENTRE CITOCINAS PLASMÁTICAS E
DOENÇA ATIVA, PARÂMETROS CLÍNICOS E
LABORATORIAIS DE GRAVIDADE E COINFECÇÃO COM
HIV NA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de doutor junto ao referido programa.

Área de Concentração: Ciências da Saúde – Infectologia e Medicina Tropical

Orientadora: Dra. Regina Lunardi Rocha
Co-orientadora: Dra. Walderez Ornelas Dutra

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina – UFMG
2014**



Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical

Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez
Reitor

Profa. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida
Vice-Reitora

Profa. Denise Maria Trombert de Oliveira
Pró-Reitora de Pós-Graduação

Prof. Dra. Adelina Martha dos Reis
Pró-Reitora de Pesquisa

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes
Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Dr. Humberto José Alves
Vice-Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Luiz Armando Cunha de Marco
Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Prof. Selmo Geber
Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação

Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical

Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro
Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro
Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos
Profa. Denise Utsch Gonçalves
Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho
Prof. Uná Tupinambás
Prof. Vandack Alencar Nobre Jr

Pollyana Anício Magalhães Gontijo – Representante Discente
Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical

Aos meus pais, Valter e Conceição (*in memoriam*).
A minha esposa Fabiane e meus filhos Matheus, Felipe e Letícia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por fazer bem todas as coisas, e guiar sempre meus caminhos.

Aos meus pais, Valter e Conceição (*in memoriam*), que me deram a vida e, com amor, me criaram, fundamentais na formação de quem sou hoje.

A minha esposa Fabiane, pelo carinho e amor, pela paciência e compreensão nas ausências devido ao trabalho e ao estudo. Pelo incentivo e amor incondicional, no sofrimento dos pilotos que falharam neste doutorado e na alegria do término do presente projeto.

Aos meus filhos Matheus, Felipe e Letícia, flores colhidas durante o caminho do mestrado e do doutorado. Presentes de Deus, que com a alegria e o carinho de filhos, tornam mais leve e feliz toda a minha vida.

Aos meus sogros, Otaviano e Alzira, pelo imenso apoio e carinho à minha família. Sempre presentes durante minhas ausências.

A professora Regina Lunardi, pela oportunidade deste trabalho, pela orientação, incentivo, paciência, e pela visão sempre otimista.

A professora Walderez Ornelas Dutra, grande incentivadora, que participou ativamente de todas as etapas do estudo, das frustrações dos experimentos que falharam à alegria de ver a tese concluída. Também pelo incentivo contínuo à vida na pesquisa científica e pelo exemplo de compromisso com a docência.

Ao professor Kenneth Gollob, pelo apoio e auxílio na estruturação de todo o projeto.

Ao Agostinho pela disponibilidade contínua e ajuda em toda a parte laboratorial do projeto. À Luisa e à Lívia pelo auxílio no laboratório e na realização do CBA. E, em especial, a esses tão queridos companheiros do LABIC, pelo apoio e o pensar

juntos, que foram essenciais quando dos experimentos que falharam, na formação de novas possibilidades e caminhos para este doutorado.

À equipe do Hospital Eduardo de Menezes, que me auxiliou diariamente na localização e acompanhamento dos novos pacientes. E aos pacientes, que são o motivo maior deste estudo, e que permitiram que esta pesquisa acontecesse.

Este trabalho foi realizado em colaboração com o Hospital Eduardo de Menezes da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais – FHEMIG, e o Laboratório de Biologia das Interações Celulares (LABIC/ICB/UFMG – Dra. Walderez Ornelas Dutra); e recebeu financiamento do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e INCT-DT (Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia – Doenças Tropicais).

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.”

(Fernando Sabino)

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma das mais graves doenças tropicais negligenciadas e fatal se não tratada. Os fatores de risco para o óbito e os mecanismos imunopatogênicos da doença ainda não estão totalmente estabelecidos. Assim, neste trabalho foram avaliadas citocinas plasmáticas durante a doença ativa e após o tratamento da LV e sua associação com a coinfeção com HIV e com a presença de parâmetros clínicos e laboratoriais de gravidade da doença ou a ocorrência de óbito. Os níveis plasmáticos das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF, IFN-gama foram obtidos pela citometria de fluxo, antes e após o tratamento da LV. Os pacientes com LV ativa apresentaram maiores concentrações plasmáticas de IL-2, IL-4 e IL-10 quando comparados aos pacientes após tratamento específico. Pacientes coinfectados com HIV apresentaram menores níveis de IL-10 que pacientes com LV sem coinfeção com HIV, na análise univariada. Menores níveis de IFN-gama foram encontrados na análise univariada entre os pacientes que apresentaram sangramentos e entre os pacientes que morreram, mostrando sua possível associação com a gravidade da doença. A ocorrência de icterícia foi associada ao aumento de IL-10 na análise univariada. Observou-se correlação negativa entre os níveis de hemoglobina e o número de leucócitos e os níveis plasmáticos de IL-2 e IL-6. Também foi encontrada correlação positiva entre o número de leucócitos e os níveis de IL-10. Assim, esses achados destacam a importância da IL-2, IL-4 e IL-10 durante a LV ativa, a associação entre a coinfeção LV/HIV e baixos níveis de IL-10 e o possível papel das citocinas nos complexos mecanismos envolvidos nos achados clínicos e laboratoriais na LV.

Palavras-chave: leishmaniose visceral, resposta imune, citocinas, HIV, fatores de risco.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is one of the most severe neglected tropical diseases and fatal if left untreated. Risk factors for death and immunopathogenesis of VL are still not fully elucidated. Thus, in this study plasma cytokines were evaluated during active disease and after VL treatment, as well as their association with HIV co-infection, and clinical and laboratorial parameters of disease severity or death. Plasma levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF and IFN-gamma were measured by flow cytometry, in VL patients before and after treatment. Active VL patients showed higher IL-2, IL-4 and IL-10 plasma concentrations as compared to VL patients after specific therapy. HIV co-infected patients showed lower levels of IL-10 as compared to patients with VL without HIV, in univariate analysis. Lower levels of IFN-gamma were found in patients who had bleeding episodes and it was also slightly lower in those who died, in univariate analysis, showing its possible association with disease severity. Occurrence of jaundice was associated with high IL-10. There were negative correlation between hemoglobin levels and leukocyte numbers with plasma IL-2 and IL-6. Positive association between leukocyte numbers with IL-10 were also found. Therefore, these findings highlight the importance of IL-2, IL-4 and IL-10 during active VL, the association between HIV co-infection and low IL-10 levels and the possible role of cytokines in the complex mechanisms involved in clinical and laboratorial findings in VL patients.

KEYWORDS: visceral leishmaniasis, immune response, cytokines, HIV, risk factors.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Célsio
CBA	<i>Cytometric beads array</i>
CD4+	Cluster de diferenciação de linfócitos 4
dL	Decilitros
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ELISA	Ensaio imunossorbente ligado a enzima
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
g	Gramas
h	hora
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina subclasse G
IL	Interleucina
Kg	Kilograma
LABIC	Laboratório de Biologia das Interações Celulares
LV	Leishmaniose visceral
MFI	Média de intensidade de fluorescência
mg	Miligrama
µL	Microlitros
mm ³	Milímetros cúbicos
mRNA	RNA mensageiro (ácido ribonucleico mensageiro)
NC	<i>Negative control</i> – controle negativo
NK	Células <i>natural killer</i> – células assassinas naturais
PCR	Reação da cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
pg	Picograma
rK39	Antígeno recombinante K39
ROS	Espécies de oxigênio reativo

rpm	Rotações por minuto
TGF	Fator de crescimento tumoral
TFH	Células T auxiliares foliculares
Th	Células T auxiliares
TNF	Fator de necrose tumoral
TS	<i>Top standard</i> – padrão
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1: Flowchart summarizing the study	66
Figure 2: Comparison between plasma cytokines concentration in patients with VL during active disease and after treatment	67
Figure 3: Comparison between plasma cytokine concentration in patients with VL and in patients with VL and HIV co-infection	68
Figure 4: Comparison between plasma cytokine concentration in patients with VL stratified by outcome	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com LV pré-tratamento, internados no Hospital Eduardo de Menezes, de agosto de 2013 a fevereiro de 2014 (N=21 pacientes).41

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1: Models of linear regression analysis performed for hematological data and cytokines measurements, in VL patients (N=21) before specific treatment.....64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 LEISHMANIOSES	17
2.2 CICLO DE VIDA DA <i>LEISHMANIA</i> NA LV	18
2.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	18
2.4 ASPECTOS CLÍNICOS	20
2.5 DIAGNÓSTICO DA LV	23
2.6 TRATAMENTO DA LV NO BRASIL	24
2.6.1 Antimoniais pentavalentes.....	24
2.6.2 Anfotericina B.....	25
2.7 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS.....	27
2.7.1 IL-2.....	27
2.7.2 IL-4.....	29
2.7.3 IL-6.....	30
2.7.4 IL-10.....	31
2.7.5 IL-17A.....	33
2.7.6 TNF.....	34
2.7.7 IFN-gama.....	36
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 PACIENTES E MÉTODOS	39
4.1 DELINEAMENTO	39
4.2 PACIENTES	39
4.2.1 Critérios de inclusão	39
4.2.2 Critérios de exclusão	40
4.2.3 Caracterização dos pacientes	40
4.2.4 Tamanho da amostra	41
4.3 MÉTODOS	42
4.3.1 História clínica e exame físico	42

4.3.2 Obtenção e congelamento do plasma.....	42
4.3.3 Preparo das amostras	43
4.3.4 Preparo dos padrões	43
4.3.5 Preparo da mistura de <i>beads</i>	43
4.3.6 Execução das reações	44
4.3.7 Aquisição e análise dos dados	44
4.3.8 Análises dos resultados.....	44
4.4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 ARTIGO.....	46
6 CONCLUSÕES	70
7 CONSIDERAÇÕES.....	71
REFERÊNCIAS.....	72
APÊNDICES	87
APÊNDICE A – PROTOCOLO DE PESQUISA.....	88
ANEXOS	93
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG	94
ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG DA EXTENSÃO DO PROJETO	95
ANEXO C - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FHEMIG	96
ANEXO D – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FHEMIG DA EXTENSÃO E EMENDAS AO PROJETO	98
ANEXO E – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL EDUARDO DE MENEZES – FHEMIG	100

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses estão entre as doenças tropicais mais negligenciadas do mundo. São doenças parasitárias causadas por protozoários flagelados, do gênero *Leishmania* spp., endêmicas em grandes áreas tropicais e subtropicais e na região do Mediterrâneo (WHO, 2007).

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é a mais grave das quatro principais síndromes clínicas associadas à *Leishmania* spp.: leishmaniose cutânea, leishmaniose muco-cutânea, leishmaniose visceral e leishmaniose dérmica pós calazar (CHAPPUIS et al., 2007).

Casos endêmicos de leishmanioses são reportados em 98 países e em três territórios nos cinco continentes. A cada ano, entre 200.000 e 400.000 casos de LV ocorrem no mundo. Os dados referentes à mortalidade não são totalmente confiáveis, pois, geralmente, referem-se apenas aos óbitos hospitalares. A taxa de letalidade da LV é estimada em 10% (ALVAR et al., 2012; MATHERS; EZZATI; LOPEZ, 2007).

As diversas síndromes clínicas e as heterogêneas manifestações da doença estão relacionadas à espécie do parasita, às características intrínsecas do patógeno como infectividade, patogenia e virulência e à resposta imune do hospedeiro (MURRAY et al., 2005; MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013).

A *Leishmania* spp. parasita macrófagos e células do sistema retículo endotelial. Os pacientes podem apresentar febre, aumento do volume ou desconforto abdominal, devido à hepatomegalia e à esplenomegalia, e infecções recorrentes ou sangramentos. O aumento discreto de enzimas hepáticas, a hipoalbuminemia e a hipergamaglobulinemia são comuns, porém, disfunção hepática grave, icterícia e ascite ocorrem mais frequentemente na doença avançada. Alterações nas séries sanguíneas como anemia, leucopenia e trombocitopenia são frequentes, as quais refletem o envolvimento esplênico e da medula óssea. Infecções graves e potencialmente letais são facilitadas devido à leucopenia. Sangramentos espontâneos como petéquias, equimoses, gengivorragia e sangramentos de grande volume ou letais podem ocorrer devido à plaquetopenia,

disfunção hepática e coagulação intravascular disseminada (OSMAN; KAGER; OSKAM, 2000; MURRAY et al., 2005; van GRIENSVEN; DIRO, 2012).

Os fatores de risco para o óbito ou recidiva da doença ainda não são totalmente conhecidos. Vários achados clínicos e laboratoriais como extremos de idade, baixo índice de massa corporal, anemia, sangramentos, dispneia, icterícia, edema, vômitos, presença de infecções bacterianas e coinfeção com HIV têm sido associados ao risco de óbito em pacientes com LV (SEAMAN et al., 1996; SANTOS et al., 2002; WERNECK et al., 2003; COLLIN et al., 2004 ; de ARAUJO et al., 2012).

A LV humana apresenta complexa resposta imune, com correção de citocinas pró, anti-inflamatórias e moduladoras, com supressão da produção de IL-2, IFN-gama e IL-12; e produção aumentada de IL-4 e IL-10 (CARVALHO et al., 1985; KHARAZMI et al., 1999; BACELLAR et al., 2000; CALDAS et al., 2005; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006).

O controle inicial da infecção está associado à ação do IFN-gama e à sua capacidade de ativação de macrófagos, levando à morte de parasitas intracelulares pela indução de produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (GANTT et al., 2001). A IL-10 modula a ativação Th1 e a produção de IL-12 e IFN-gama, e leva à inibição da ativação dos macrófagos (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998). A habilidade para inibir a ativação dos macrófagos, a baixa frequência de monócitos produtores de TNF no sangue periférico e a produção insuficiente de IFN-gama nos estágios iniciais da infecção podem estar associados ao desenvolvimento da LV nos pacientes infectados com *L. donovani* (CALDAS et al., 2005; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006).

Devido à potencial letalidade e à complexa imunopatogenia da LV, a expressão das citocinas plasmáticas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF e IFN-gama, pré e pós tratamento específico, sua associação com a coinfeção LV/HIV e sua relação com parâmetros clínicos e laboratoriais de gravidade e com o óbito foram avaliadas em pacientes com LV.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania* spp., endêmicas em grandes áreas tropicais, subtropicais e na região do Mediterrâneo, e consideradas pela Organização Mundial da Saúde como doenças tropicais negligenciadas (WHO, 2007).

São descritas 20 espécies de *Leishmania* spp. como patogênicas para o homem (LUKES et al., 2007). Esses protozoários são micro-organismos intracelulares obrigatórios, unicelulares, flagelados, portadores de cinetoplasto. Eles infectam células do sistema retículo endotelial e são transmitidos ao homem pela picada de insetos vetores (PEARSON; SOUSA, 1996).

A doença é transmitida pela picada de fêmeas de flebotomíneos de 30 espécies distintas, específicas de diferentes regiões (SHARMA; SINGH, 2008). No Velho e no Novo Mundo é transmitida, respectivamente, pela picada de insetos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013). As espécies do gênero *Lutzomyia* são encontradas em florestas e em áreas peri-domiciliares, e se reproduzem em matéria orgânica quando em condições favoráveis (LAINSON; RANGEL, 2005).

As leishmanioses compreendem quatro principais síndromes clínicas: a leishmaniose cutânea, a leishmaniose mucocutânea, a leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar ou kala-azar, e a leishmaniose dérmica pós calazar. A LV é a forma mais grave das leishmanioses, e, na sua apresentação clínica mais grave, é potencialmente fatal se não tratada (CHAPPUIS et al., 2007).

Os parasitas causadores da LV são membros do complexo *Leishmania donovani*. O complexo *Leishmania donovani* compreendia quatro espécies, previamente classificadas de acordo com as características dos insetos vetores, dos hospedeiros reservatórios e da patologia: *L. archibald*, *L. chagasi*, *L. donovani* e *L. infantum*. Atualmente, diferenciados por métodos moleculares de sequenciamento

de DNA, os parasitas do complexo *Leishmania donovani* são classificados em duas espécies: *Leishmania donovani*, e *Leishmania infantum* (pelas técnicas moleculares de DNA a *Leishmania chagasi* é sinônimo da *Leishmania infantum*) (LUKES et al., 2007).

A expressão da doença e as manifestações clínicas variam de acordo com a espécie do parasita e a região endêmica. As manifestações heterogêneas das leishmanioses são reguladas por propriedades do protozoário (infectividade, patogenicidade e virulência) e por fatores relacionados à resposta imunológica do hospedeiro (MURRAY et al., 2005; MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013).

2.2 CICLO DE VIDA DA *LEISHMANIA* spp. NA LV

A *Leishmania* spp. apresenta morfologias distintas durante seu ciclo de vida. A forma promastigota, alongada e móvel, é encontrada no inseto vetor. Uma vez inoculado na pele do hospedeiro vertebrado, o promastigota é, então, internalizado por células do sistema fagocítico (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas da pele). Após aproximadamente 12-24h da inoculação, o parasita promastigota diferencia-se na forma amastigota, de aspecto arredondado, imóvel e intracelular obrigatória (SHARMA; SINGH, 2008). A *Leishmania* spp. é protegida da degradação pelo fagolisossomo por uma série de processos adaptativos os quais inibem os mecanismos de defesa do hospedeiro dentro dos vacúolos parasitóforos. A fusão do fagolisossomo-endossomo é inibida, as vias de sinalização celular e a produção de óxido nítrico e de citocinas é alterada (CUNNINGHAM, 2002). Os amastigotas se multiplicam por divisão binária, levando ao aumento do número de parasitas intracelulares até ao rompimento da célula infectada e à liberação dos protozoários para infecção de outras células. Na LV a *Leishmania* spp. dissemina-se pelo sistema linfático e vascular e infecta outras células do sistema retículo-endotelial, resultando em infiltração da medula óssea, em hepatomegalia, em esplenomegalia e, algumas vezes, em linfadenomegalias (SHARMA; SINGH, 2008).

2.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Noventa e oito países e três territórios nos cinco continentes reportam transmissão endêmica das leishmanioses. No leste da África e no subcontinente

indiano a LV é causada pela *Leishmania donovani* e na Europa, no norte da África e na América Latina pela *Leishmania infantum* (sinônimo da *Leishmania chagasi* no Novo Mundo) (LUKES et al., 2007).

São estimados 200.000 a 400.000 novos casos de LV a cada ano no mundo. Mais de 90% dos casos ocorrem em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. Os dados de mortalidade são extremamente esparsos e refletem apenas óbitos hospitalares. A taxa de mortalidade da LV é estimada em 10%, ou seja de 20.000 a 40.000 mortes pela doença a cada ano no mundo (MATHERS; EZZATI; LOPEZ, 2007; ALVAR et al., 2012).

Apesar de previamente descrita como zoonose rural, que esporadicamente acometia o homem, a incidência da LV tem aumentado em grandes cidades. A emergência de LV urbana e periurbana não ocorre apenas no Brasil. Países como Itália (GRAMICCIA et al., 2013), Espanha (ARCE et al., 2013. CHICHARRO et al., 2013), Irã, México e Marrocos, também têm enfrentado a migração da LV para zonas não rurais (HARHAY et al., 2011). Várias cidades têm apresentado aumento da incidência de LV no Brasil (ALVES; BEVILACQUA, 2004; DANTAS-TORRES, 2006; de ALMEIDA; MEDRONHO; WERNECK, 2011; DRUMOND; COSTA, 2011;). A mudança na distribuição da doença pode ter sido influenciada pela redução dos espaços e dos reservatórios naturais da doença, pelas migrações humanas, pela grande população canina urbana e pela adaptação dos insetos vetores aos ambientes urbanos e periurbanos (GUERIN et al., 2002; HARHAY et al., 2011). O aumento da incidência da LV no mundo parece estar associado principalmente às migrações, às falhas nas medidas de controle de disseminação da doença e à coinfeção da LV com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (CHAPPUIS et al., 2007; DESJEUX, 2001; DESJEUX, 2004;).

Os cães domésticos constituem os principais reservatórios urbanos para a *L. infantum* e têm papel central no ciclo de transmissão para os homens (MORENO; ALVAR, 2002). Além dos cães domésticos, há diversos reservatórios silvestres para a doença, como raposas, gambás, tamanduás e outros mamíferos (LAINSON; RANGEL, 2005).

No Brasil a LV permanece endêmica, com 4.105 casos confirmados notificados ao Ministério da Saúde no ano de 2011, 3.392 casos confirmados em 2012 e 3.470 casos confirmados no ano de 2013 (BRASIL, 2014). Considerando os casos não notificados, estima-se uma incidência de 4.200 a 6.300 casos de LV por

ano no Brasil (ALVAR et al., 2012). O Estado de Minas Gerais é responsável por grande parte dos casos, tendo 506 casos confirmados no ano de 2011, 412 casos confirmados em 2012 e 339 casos confirmados em 2013 (BRASIL, 2014). A LV constitui uma das endemias infecciosas mais importantes do município de Belo Horizonte, com incidência de 4,0/100.000 habitantes em 2011 (BELO HORIZONTE, 2012).

2.4 ASPECTOS CLÍNICOS

A LV caracteriza-se por amplo espectro clínico, desde formas assintomáticas até formas clássicas de grande gravidade da doença (MURRAY et al., 2005). O período de incubação geralmente varia de dois a seis meses, mas pode variar de semanas a anos. O desenvolvimento de manifestações clínicas e a gravidade de apresentação da doença parecem estar associados à virulência do parasita e à resposta imunológica do hospedeiro. Parte dos indivíduos infectados nunca irá desenvolver a forma clínica da doença (BADARO et al., 1986b; KHALIL et al., 2002;).

A infecção assintomática ou inaparente, mesmo que ausentes os sintomas, é geralmente identificada, em áreas endêmicas, por teste intradérmico (reação de Montenegro) ou por métodos sorológicos ou moleculares, em pesquisas de inquérito epidemiológico.

A forma subclínica apresenta sintomatologia inespecífica (febre baixa, retardo no crescimento, adinamia, hepatomegalia, hiper-gamaglobulinemia) sem esplenomegalia. A maioria dos casos terá resolução espontânea, porém parte dos casos pode evoluir para a forma clássica da doença (BADARO et al., 1986a; GAMA et al., 2004;).

Os indivíduos com a forma clássica da LV apresentam, tipicamente, febre, hepatomegalia, esplenomegalia e citopenias (OSMAN; KAGER; OSKAM, 2000; MURRAY et al., 2005).

Os pacientes apresentam início insidioso de febre, perda de peso e aumento do fígado e do baço. A hepatomegalia é associada ao parasitismo das células de Küpffer e às alterações da resposta imune (MURRAY, 2001). A esplenomegalia é acompanhada de alterações na microarquitetura esplênica, incluindo expansão da vasculatura da polpa vermelha, neovascularização da polpa branca e

remodelamento das subpopulações do estroma celular (YURDAKUL et al., 2011). Hipoalbuminemia e aumento leve a moderado de enzimas hepáticas são comuns, já disfunção hepática, icterícia e ascite podem acontecer na doença avançada. Os pacientes podem apresentar caquexia e edema secundário à hipoalbuminemia (van GRIENSVEN; DIRO, 2012).

Alterações das séries sanguíneas como anemia, trombocitopenia e leucopenia são frequentes, refletindo o acometimento do baço e da medula óssea. A anemia pode estar associada ao sequestro e à destruição de hemácias no baço aumentado de volume (VARMA; NASSEM, 2010). Pode estar associada à atividade da *L. donovani*, a qual necessita de composto heme para crescer, contudo não o produz, fato responsável pela lise das hemácias para acesso à hemoglobina e à sobrevivência (THAKUR et al., 2013). Pode estar, também, associada à deficiência de ferro e à resposta inflamatória (COSTA et al., 2013) ou a outros mecanismos imunológicos, como ocorre na malária e na anemia de Fanconi (DUFOR et al., 2003; KINRA; DUTTA, 2013). A redução dos leucócitos pode ser atribuída ao hiperesplenismo ou à invasão medular pela *L. donovani*. Entretanto a intensa produção de citocinas durante a LV ativa pode alterar o crescimento, a diferenciação e a migração das células do sistema imune. A trombocitopenia pode estar relacionada diretamente ao sequestro esplênico (VARMA; NASSEM, 2010) ou a mecanismos de coagulação intravascular disseminada (COSTA et al., 2013).

Podem ocorrer, espontaneamente, epistaxe, gengivorragia, petéquias e outros sangramentos de maior importância. Os sangramentos podem ser atribuídos à plaquetopenia (VARMA; NASSEM, 2010), à disfunção plaquetária (DUBE et al., 1995), à coagulação intravascular disseminada (COSTA et al., 2013) e a distúrbios de coagulação devido ao acometimento hepático. Os pacientes podem apresentar edema associado à hipoalbuminemia ou à insuficiência cardíaca devido à anemia (van GRIENSVEN; DIRO, 2012).

Infecções bacterianas como otites, pneumonias e sepses são comuns devido à leucopenia e à frequente neutropenia (van GRIENSVEN; DIRO, 2012). Além disso, os pacientes podem apresentar hipergamaglobulinemia, devido à ativação policlonal de células B, possivelmente associada a estímulo direto por componentes da *L. donovani* (BUNN-MORENO et al., 1985), que não é relacionada ao controle da doença. Outras alterações como diarreia, vômitos, tosse, dispneia, insuficiência renal, linfonomegalias podem estar presentes (COSTA et al., 2010).

Os pacientes com LV clássica, não tratados, evoluem para o óbito dentro de um a dois anos do início dos sintomas, geralmente devido a hemorragias ou a infecções (MURRAY et al., 2005).

A apresentação inicial da LV em pacientes portadores do HIV geralmente é semelhante à apresentação em indivíduos não infectados pelo HIV, com febre, esplenomegalia, pancitopenia, fraqueza e emagrecimento (HURISSA et al., 2010). Porém, o acometimento do trato gastrointestinal e, esporadicamente, manifestações cutâneas ou apresentações atípicas podem acontecer. Apesar das manifestações clínicas semelhantes, pacientes com condição imunossupressora de base (coinfectados com HIV, neoplasias hematológicas, transplantados e usuários de drogas imunossupressoras) apresentam alta taxa de mortalidade, maior falência ao tratamento inicial e recidivas mais frequentes pós-tratamento que os pacientes imunocompetentes. As causas para maior falência ao tratamento e para maior probabilidade de recidiva nesses grupos não são bem estabelecidas. (FERNANDEZ-GUERRERO et al., 2004; RITMEIJER et al., 2011; SINHA et al., 2011; COTA et al., 2013).

Os fatores de risco para óbito ou recidiva da LV pós-tratamento ainda não estão totalmente elucidados. Pacientes com idade superior a 45 anos, com sinais e sintomas prolongados da doença (cinco meses ou mais), que apresentam baixo índice de massa corporal ou anemia intensa apresentam maior risco de morrer em decorrência da LV (SEAMAN et al., 1996). Além desses fatores, idade inferior a dois anos, diarreia, vômitos, sangramento ou grande esplenomegalia foram associados ao maior risco de óbito entre pacientes com LV no Sudão (COLLIN et al., 2004). No Brasil, crianças com menos de um ano de idade e pacientes com comorbidades ou infecções bacterianas apresentavam maior risco de resposta insatisfatória ao tratamento da LV com antimonial pentavalente (SANTOS et al., 2002). Evidenciou-se, também, que anemia intensa, febre por mais de 60 dias, diarreia e icterícia são fatores de risco para o óbito (WERNECK et al., 2003). Mais recentemente, um trabalho também realizado no Brasil descreveu que pacientes com fraqueza, coinfeção com HIV, idade igual ou superior a 60 anos, sangramentos, outras infecções ou icterícia apresentam maior chance de óbito por LV (ARAUJO et al., 2012).

2.5 DIAGNÓSTICO DA LV

Vários métodos complementares podem ser utilizados no diagnóstico da LV. Historicamente, este é confirmado pela observação direta das formas amastigotas da *Leishmania* spp. em exame de microscopia óptica de aspirado de medula óssea, aspirado esplênico, aspirado de linfonodos ou em exame anatomopatológico de peça de biópsia (geralmente fígado, baço ou linfonodos). Apesar da alta especificidade, a sensibilidade da microscopia é variável, apresentando-se em aproximadamente 93 a 99% para o aspirado esplênico, 53 a 86% para o aspirado de medula óssea e de 53 a 65% para o aspirado de linfonodo. A acurácia do exame microscópico é influenciada pela habilidade do examinador e pela qualidade dos reagentes utilizados (CHAPPUIS et al., 2007).

Testes sorológicos, para pesquisa de anticorpos antileishmania, baseados em aglutinação direta, imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio imunossorbente ligado à enzima ELISA têm sido propostos, com alta acurácia no diagnóstico da LV. No Brasil, os testes mais utilizados pelos laboratórios de referência do Ministério da Saúde são baseados na IFI. Em estudo brasileiro, o teste de IFI tem sensibilidade de 92,0% (83,8 – 96,5) e especificidade de 83,8% (75,1 – 90,0) (PEDRAS et al., 2008). Os kits para diagnóstico rápido mais utilizados contêm testes imunocromatográficos em fita para detecção de anticorpos IgG, em plasma ou sangue total, contra o antígeno recombinante rK39, antígeno protéico bem conservado dentro do complexo *L. donovani* (KUMAR et al., 2013). Os testes com antígeno rK39 apresentam alta sensibilidade e especificidade para as espécies causadoras de LV, sem reação cruzada com as espécies causadoras de leishmaniose cutânea ou muco-cutânea, mesmo em áreas endêmicas de sobreposição de ambas as doenças (MOLINET et al., 2013). Uma metanálise, a qual compara o teste rápido ao antígeno rK39 – e outros métodos sorológicos, considerando o padrão ouro a observação direta de formas amastigotas de *Leishmania* spp., em espécimes hematológicos – apresentou sensibilidade de 92% (91,49 – 92,99) e especificidade de 95% (94,30 – 95,48) para o teste rápido imunocromatográfico (MAIA et al., 2012).

A identificação laboratorial da leishmaniose pode ser feita, também, pela detecção de material genético da *Leishmania* spp. por reação da cadeia da polimerase (PCR) ou por hibridização, em aspirado de medula óssea ou esplênico,

material de biópsia e, inclusive, em sangue ou soro dos pacientes (MURRAY et al., 2005; MORENO et al., 2006).

Em coinfectados com HIV, os testes sorológicos para LV apresentam menor sensibilidade. Quando esses testes encontram-se positivos e este paciente apresenta sintomatologia clínica para LV, os testes sorológicos apresentam bom valor diagnóstico. Contudo, testes sorológicos negativos não excluem a possibilidade de LV nestes pacientes, por isso são necessários testes moleculares ou parasitológicos adicionais (COTA et al., 2012).

Os anticorpos séricos contra a *L. donovani* permanecem detectáveis por período de tempo ainda indeterminado, porém, sabe-se que este tempo é longo, mesmo após tratamento efetivo da doença (SILVA et al., 2006). Os ensaios sorológicos, portanto, não fazem distinção entre doença ativa e passada, não auxiliando no diagnóstico de recidivas. Outra limitação seria a proporção de indivíduos saudáveis vivendo em áreas endêmicas, que poderiam ter exames sorológicos positivos, porém sem doença ativa. Os testes sorológicos devem ser sempre utilizados em combinação com a definição clínica de caso suspeito para LV (SUNDAR et al., 2006).

Portanto, o diagnóstico da LV pode ser feito pela associação da história clínica e epidemiológica e a observação direta do parasita ou o exame sorológico positivo (BRASIL, 2003). O diagnóstico pode também ser feito pela associação da história clínica e epidemiológica e pela observação do parasita em cultura de material biológico ou identificação de material genético das espécies do complexo *L. donovani*, por PCR ou hibridização.

2.6 TRATAMENTO DA LV NO BRASIL

Várias drogas, com diversos esquemas terapêuticos, têm sido utilizadas para o tratamento dos pacientes com LV, entre elas os antimoniais pentavalentes, as anfotericinas B, a pentamidina, a paramomicina e o miltefosin. No Brasil, rotineiramente são utilizados os antimoniais pentavalentes (antimonial de n-metil glucamina), e a anfotericina B (anfotericina B deoxicolato e formulações lipídicas da anfotericina B) para o tratamento da LV.

2.6.1 Antimoniais pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes (antimonial de n-metilglucamina e estibogluconato de sódio) estão entre as drogas mais antigas para o tratamento da LV. Os antimoniais foram, durante décadas, a primeira escolha para o tratamento de pacientes com LV e continuam como primeira linha terapêutica em grande parte do mundo. Em algumas regiões, especialmente na Índia, observa-se aumento progressivo da resistência à droga e nessas regiões o tratamento padrão é, geralmente, realizado com formulações de anfotericina B. (OLLIARO et al., 2005). Entretanto, não têm sido reportadas taxas significativas de resistência a esse tratamento no Brasil (MELO; FORTALEZA, 2013).

Os mecanismos de ação dos antimoniais pentavalentes ainda são incertos. Apesar de não totalmente estabelecida, a ação leishmanicida dos antimoniais parece estar associada à glicólise, à inibição da fosforilação ADP dependente e à inibição da topoisomerase I e da trypanothione redutase (CROFT; YARDLEY, 2002).

A medicação pode ser administrada por via venosa ou intramuscular. O esquema terapêutico mais utilizado de n-metilglucamina, no Brasil, é de 20mg/Kg/dia do antimonial, com dose máxima diária de 1215mg/dia, durante 20 a 40 dias (BRASIL, 2006). Apesar da correlação observada entre a dose total da medicação e a taxa de cura, o aumento da toxicidade parece estar relacionado ao aumento da dose total da medicação (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013). A eficácia no tratamento com antimonial encontra-se acima de 95% em diversas partes do mundo, onde a resistência aos antimoniais é baixa (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013). Porém, pacientes coinfectados com HIV apresentam piores resultados, com taxa de mortalidade até três vezes maior com o uso dos antimoniais quando comparada ao uso de formulações lipídicas de anfotericina B (COTA et al., 2013). Os eventos adversos mais frequentemente associados aos antimoniais são mialgia, artralgia, elevação de transaminases, pancreatite e alterações eletrocardiográficas, sendo necessário o acompanhamento dos eventos adversos durante o uso da medicação.

2.6.2 Anfotericina B

As anfotericinas B se ligam aos precursores do ergosterol, levando à ruptura da membrana e à morte da *Leishmania* spp (CROFT; YARDLEY, 2002). Diferentes

esquemas terapêuticos e diferentes formulações de anfotericina B têm sido utilizados para o tratamento da LV, os quais, geralmente, apresentam altas taxas de cura.

A anfotericina B deoxicolato (formulação convencional da anfotericina B) é geralmente administrada na dose de 1mg/Kg/dia, por via intravenosa, em administração por mais de quatro horas, durante o período de 14 a 21 dias (MELO; FORTALEZA, 2013). Apesar da eficácia do tratamento, o uso da anfotericina B deoxicolato exige internação hospitalar e a medicação é sabidamente associada a reações infusionais (febre, calafrios, flebites), à nefrotoxicidade, à hipocalcemia e à miocardite. A anfotericina B deoxicolato é tão efetiva quanto as formulações lipídicas para o tratamento da LV (OLLIARO et al., 2005).

A anfotericina B lipossomal consiste na anfotericina B envolvida por colesterol e outros fosfolípidos em um lipossoma, o qual mantém a mesma eficácia dos tratamentos com anfotericina B convencional, porém com maior estabilidade da droga e menor toxicidade, especialmente menor nefrotoxicidade (OLLIARO et al., 2005). A dose usualmente preconizada para tratamento da LV é de 20mg/Kg de dose acumulada, em diversos esquemas terapêuticos. No Brasil, a anfotericina B lipossomal é administrada, por via intravenosa, na dose de 3mg/Kg/dia, durante 7 dias ou 4mg/Kg/dia, durante 5 dias (BRASIL, 2006). Devido ao alto custo da medicação e da internação hospitalar, diversos esquemas terapêuticos têm sido testados nos pacientes com LV. Alguns estudos mostram esquemas de dose única venosa de anfotericina B lipossomal, na posologia de 5mg/Kg ou 7.5mg/Kg, como seguros e eficazes em aproximadamente 90% dos pacientes com LV, reduzindo, dessa forma, os custos e o tempo de internação (SUNDAR et al., 2003). Porém, estudos mais recentes ou outras regiões do mundo não consideram tais esquemas como seguros, com taxas de falha terapêutica que contraindicam o uso de dose única (KHALIL et al., 2013). Portanto, apesar da recomendação de uso de dose acumulada de 20mg/Kg, o melhor esquema terapêutico para tratamento da LV com anfotericina B lipossomal ainda não está totalmente definido. Uma metanálise sugere que os esquemas terapêuticos com anfotericina B lipossomal sejam superiores aos com antimonial entre os pacientes coinfectados com HIV. Entretanto, os pacientes coinfectados com HIV apresentam maior risco de recidivas (COTA; de SOUSA; RABELLO, 2011) e o melhor esquema de tratamento para estes ainda não está estabelecido (COTA et al., 2013; BURZA et al., 2014).

Os manuais de recomendação de tratamento da LV do Ministério da Saúde do Brasil recomendam os antimoniais pentavalentes como primeira escolha ao tratamento dos pacientes com LV e a anfotericina B deoxicolato como primeira opção de terapêutica a pacientes com LV grave (extremos de idade, icterícia, fenômenos hemorrágicos, edema generalizado, toxemia, desnutrição grave e comorbidades), gestantes e pacientes com contra indicação ao uso dos antimoniais (BRASIL, 2006). Porém, atualmente, o Ministério da Saúde do Brasil tem recomendado o uso da anfotericina B lipossomal a pacientes com mais de 50 anos, àqueles com disfunção renal, hepática ou cardíaca, a indivíduos transplantados e a casos muito graves de LV (BRASIL, 2011).

2.7 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

A manifestação clínica da infecção por parasitas do complexo *Leishmania donovani* é influenciada por fatores relacionados à virulência do parasita e à resposta imune do hospedeiro. A resposta imune celular específica tem importante papel no controle da infecção, levando à ativação de macrófagos e à resposta citotóxica e, conseqüentemente, à morte dos parasitas intracelulares.

A LV humana apresenta complexa resposta imune, com correção de citocinas pró e anti-inflamatórias, e aumento sérico de IFN-gama e IL-10 em pacientes com doença ativa, quando comparados à população não infectada (CALDAS et al., 2005; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006). Além das profundas alterações na imunidade celular, ocorre ativação policlonal de células B, levando à hipergamaglobulinemia e a elevados níveis de imunocomplexos circulantes (HAILU et al., 2005).

A expressão de várias citocinas como IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF e IFN-gama tem sido avaliada na imunopatogenia da LV. Considerando-se que essas citocinas serão alvo deste estudo, são descritos, abaixo, trabalhos relacionados ao que se sabe a respeito destas na LV.

2.7.1 IL-2

A IL-2 é importante fator de crescimento de células T. A resistência inicial à infecção, na LV experimental, é associada à ativação de macrófagos pelo IFN-gama

e à produção de granuloma tecidual hepático, levando à redução da replicação e à destruição do parasita. Em estudos em animais, a IL-2 reduz a carga parasitária hepática devido ao aumento da expressão de mRNA para IFN-gama *in vivo*, à subsequente ativação de macrófagos induzida por IFN-gama e à consequente morte de parasitas intracelulares. Induz, também, a proliferação celular e o acúmulo local de células mononucleares, auxiliando na formação dos granulomas teciduais e no controle inicial da doença (MURRAY et al., 1993).

Camundongos atímicos virgens BALB/c, infectados com *L. donovani*, adquirem resistência e reduzem a carga parasitária esplênica e hepática após quatro semanas de infecção. Apesar desses animais permanecerem com baixas cargas parasitárias por período de tempo prolongado, eles se tornam resistentes à recidiva da doença. A administração de anticorpos anti-IL-2 pode aumentar novamente a carga parasitária hepática em até cinco vezes, sugerindo a importante participação da IL-2 na proteção contra a LV (MURRAY; HARIPRASHAD; FICHTL, 1996).

Em camundongos, a IL-2 parece crucial no controle da atividade anti-leishmania das células T. A IL-2 induz a produção de IFN-gama durante a primeira semana de infecção, que determina a proteção inicial do hospedeiro. Entretanto, a IL-2 estimula, também, a replicação das células T com funções regulatórias, cujas ações são mediadas pela IL-10, que suprime a resposta celular protetora do hospedeiro. O tratamento precoce com anticorpos anti-IL-2 e anti-receptores de IL-2 (anti-IL-2R) associa-se à melhora clínica da doença. Porém, o início do tratamento após uma semana de infecção leva à redução no efeito protetor. O tratamento com anticorpos anti-IL-10 funciona mesmo tardiamente após a infecção. Os efeitos de ambos tratamentos foram associados à redução de IL-10 e à elevação da produção de IFN-gama pelas células T CD4, sugerindo que as funções supressoras e protetoras das células T não foram definitivamente alteradas. As funções regulatórias podem ser reduzidas e as funções de proteção das células T podem ser recuperadas com o bloqueio da IL-2 ou IL-10, dependendo do tempo de início da infecção (BODAS et al., 2006).

Pacientes com LV geralmente não demonstram adequada resposta imune celular. Dessa forma, em estudos com humanos, pacientes com LV ativa, apresentam concentrações plasmáticas de IL-2 menores que pacientes curados ou com infecção assintomática (COSTA et al., 2012). Crianças com LV grave, que evoluíram para o óbito não apresentavam dosagens plasmáticas detectáveis de IL-2

(GAMMA et al., 2013). Devido ao efeito de estimulação na replicação das células T, a IL-2 pode aumentar a contagem de células T CD4 em pacientes HIV+, apesar disso, o uso de IL-2 recombinante não foi associado à recuperação imune em um paciente coinfestado com LV e HIV (BOSSOLASCO et al., 2007).

2.7.2 IL-4

A IL-4 é uma citocina produzida principalmente pelos linfócitos T CD4+ e pelos mastócitos ativados. Ela estimula a produção de anticorpos IgE, importantes na defesa de infecções helmínticas; estimula o desenvolvimento de células Th2; contribui, junto à IL-13, para uma forma de ativação de macrófagos que leva à inibição da defesa contra microrganismos intracelulares e estimula o agrupamento de leucócitos (GORDON; MARTINEZ, 2010; PAUL; ZHU, 2010).

A susceptibilidade aos patógenos intracelulares ocorre durante a transição precoce da imunidade inata à imunidade específica. Classicamente, a IL-4 induz a diferenciação de células T virgens para o perfil Th2, entretanto, o papel da IL-4 na indução da resposta Th2 não está totalmente elucidado. Em modelos experimentais, a IL-4, quando presente na ativação inicial das células dendríticas, estimula a produção de IL-12. Ao seu turno, a IL-12 estimula a resposta imune do tipo Th1, protetora para *L. major* em camundongos BALB/C, previamente susceptíveis (BIEDERMANN et al., 2001). Porém, camundongos cuja ação da IL-4 foi bloqueada, como os camundongos IL-4(-/-) ou os camundongos IL-4 receptor alfa(-/-), apresentam aumento de carga parasitária hepática, retardo na maturação dos granulomas hepáticos e diminuição na ação anti-leishmania nas fases iniciais da infecção pela *L. donovani* (STÄGER et al., 2003). Entretanto, quando presente tardiamente, a IL-4 induz a diferenciação para o perfil Th2 e a progressão da doença, mesmo em animais previamente resistentes (BIEDERMANN et al., 2001). A IL-4 inibe a ativação de macrófagos para a destruição de microrganismos intracelulares e permite, assim, o aumento da replicação intracelular da *Leishmania* spp. (MIRALES et al., 1994).

Considerando a imunidade inata, pacientes com LV apresentam maior frequência de neutrófilos e de células NK produtoras de IL-4 que pacientes tratados e curados de LV (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2005). Pacientes com LV ativa apresentam maiores concentrações plasmáticas de IL-4 que indivíduos sem LV

(ZWINGENBERGE et al., 1990; COSTA, 2012; DUTHIE et al., 2014). As altas concentrações de IL-4 durante a doença ativa podem ter importante papel na inibição da ativação de macrófagos e na consequente diminuição da sua capacidade de eliminação da *Leishmania* spp. intracelular.

Pacientes coinfectados LV/HIV apresentam maiores concentrações de IL-4 e IL-10 circulantes que pacientes HIV sem LV. As células mononucleares do sangue periférico de pacientes com coinfeção LV/HIV apresentam aumento de produção de IL-4 após estimulação com fitohemaglutinina, o que não ocorre com pacientes HIV sem LV. A IL-4 apresenta importante papel na manutenção do perfil de resposta Th2 e, provavelmente, pode estar relacionada à pior resposta ao tratamento e a maior risco de recidiva entre os pacientes coinfectados com o HIV (NIGRO et al., 1999).

2.7.3 IL-6

A IL-6 exerce efeitos em diferentes alvos moleculares e tipos celulares, apresentando efeitos locais e sistêmicos em respostas inflamatórias agudas. Ela pode ser produzida por monócitos, células endoteliais e células T ativa genes alvos envolvidos na diferenciação, na sobrevivência, na apoptose e na proliferação celular. Suas principais ações consistem na indução da produção hepática de proteínas de fase aguda, na estimulação da produção de neutrófilos na medula óssea, na diferenciação final e produção de anticorpos de linfócitos B ativados e na ativação de células T (HEINRICH et al., 2003). A IL-6, juntamente à IL-21, apresentam papel crucial na diferenciação das células T auxiliares foliculares (TFH), as quais exercem interação com células B nos centros germinativos dos folículos linfóides, mediando a imunidade humoral, diferenciando plasmócitos de vida longa e células B de memória, e cuja desregulação na produção de anticorpos pode estar associada a doenças autoimunes (CANNONS; LU; SCHWARTZBERG, 2013; PARK et al., 2014; VINUESA; SANZ; COOK, 2009).

Quando comparados com indivíduos saudáveis, os níveis de IL-6 encontram-se elevados em pacientes com LV durante a fase ativa da doença. Após o tratamento, as concentrações séricas de IL-6 reduzem rapidamente (CENINI et al., 1993; ANSARI; SALUJA; SALOTRA, 2006). Os níveis de IL-6 permanecem em baixos títulos por longo período de tempo, porém significativamente maiores que em

controles negativos (ANSAR; SALUJA; SALOTRA, 2006). Nos pacientes que apresentam recidiva da LV, entretanto, observam-se altas concentrações séricas de IL-6 logo ao diagnóstico da reativação (van der POLL; ZIJLSTRA; MEVISSSEN, 1995). Em cães observam-se altas concentrações de IL-6 durante a doença ativa, sugerindo que essa citocina pode, nesses animais, ser útil como marcador de doença em atividade (de LIMA; PEIRO; de OLIVEIRA VASCONCELOS, 2007).

A IL-6 parece exercer função crítica na habilidade das células dendríticas em inibir o desenvolvimento de células T CD4+ produtoras de IL-10, o que auxilia na proteção do hospedeiro contra a *L. donovani* na LV experimental (STAGER et al., 2006).

Apesar de ser considerada como citocina pró-inflamatória, a IL-6 pode exercer também sua função por intermédio de ações supressivas e anti-inflamatórias na LV. Observa-se que camundongos IL-6 (-/-) com LV apresentam melhor controle da replicação da *L. donovani*, morte precoce dos parasitas e resolução acelerada da infecção hepática (MURRAY, 2008).

Em estudo cujo objetivo é avaliar o papel das citocinas na gravidade da apresentação clínica da LV, altos títulos de IL-6 foram encontrados entre os pacientes que evoluíram para o óbito. A IL-6 estava direta e independentemente associada a edema, à coagulação intravascular disseminada, à neutropenia, a dano hepático, à produção de proteínas de fase aguda e à indução de outras citocinas como IL-1-beta, IFN-gama e IL-8, sugerindo papel importante da citocina na letalidade da doença (COSTA et al., 2013).

Na coinfeção LV/HIV, os parasitas estabelecem complexa relação no microambiente celular. Em cultura de células humanas, o aumento dos níveis de IL-6 e TNF, devido à infecção pela *Leishmania infantum*, leva ao aumento da replicação viral do HIV nas células dendríticas e nas células T (GARG et al., 2009).

2.7.4 IL-10

A IL-10 inibe a ativação e a função efetora das células T, monócitos e macrófagos. Regula o crescimento e a diferenciação de células B, células NK, células T auxiliares, células T citotóxicas, mastócitos e granulócitos e influi na diferenciação e função das células T reguladoras. Dessa forma, a IL-10 está

envolvida no controle das respostas imunes inata e induzida por células e nos mecanismos de tolerância imunológica (MOORE et al., 2001).

A IL-10 atua de forma decisiva quanto à inibição da resistência a *L. donovani* (MURPHY et al., 2001). A IL-10 modula a ativação Th1 o que leva à redução na produção de IL-12 e IFN-gama e inibe a ativação de macrófagos e a habilidade dessas células em destruir a *Leishmania* spp. (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998). As células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com LV tratada apresentam alto índice de proliferação quando estimuladas com antígeno de *L. infantum*. O índice de proliferação e a produção de IFN-gama são reduzidos na presença de neutralizantes de IL-12 ou na presença de IL-10 recombinante, fato o qual destaca a importância dessas citocinas na patogênese da LV (BACELLAR et al., 2000).

Em modelos experimentais, a infecção inicial pela *L. infantum* pode levar à regulação negativa de fatores de transcrição em culturas de macrófagos humanos isolados, levando à falha na ativação clássica dos macrófagos. Entretanto, a adição de células T virgens estimula a produção de citocinas de padrão Th1 como IL-6 e IFN-gama e, simultaneamente, a produção de citocinas moduladoras, como IL-10. As modificações precoces no microambiente do sítio de infecção podem, portanto, conduzir ao desenvolvimento de uma resposta protetora Th1, e em seguida pela modulação dessa mesma resposta, determinando o curso inicial da resposta imune contra a *L. infantum* (ETTINGER; WILSON, 2008).

Os pacientes com LV ativa apresentam níveis plasmáticos de IL-10 maiores que pacientes assintomáticos, curados ou controles não infectados (COSTA et al., 2012; KURKJIAN et al., 2006; ANSARI; SALUJA; SALOTRA, 2006; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006; CALDAS et al., 2005; HAILU et al., 2005). Os níveis de IL-10 diminuem significativamente após tratamento específico da LV (ANSARI; SALUJA; SALOTRA, 2006).

Os elevados níveis de IFN-gama, de TNF, de IL-6 e de IL-10 estão associados ao estado de doença na LV, evidenciando a complexa interação entre citocinas inflamatórias e regulatórias na doença (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006). Em indivíduos infectados com *L. donovani*, a presença da IL-10 e sua capacidade de inibir a ativação de macrófagos para a destruição dos parasitas intracelulares, a baixa frequência de monócitos produtores de TNF no sangue periférico e a deficiência da produção do IFN-gama nos estágios iniciais da infecção

podem estar associadas ao desenvolvimento da LV (CALDAS et al., 2005; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006).

Os pacientes com coinfeção LV/HIV apresentam menores dosagens de IL-10 que pacientes com LV sem coinfeção com HIV (MEDRANO et al., 1998; COSTA et al., 2013). As células mononucleares do sangue periférico de pacientes coinfectados com HIV produzem mais IL-10 após estimulação que os pacientes HIV sem coinfeção. Este aumento na produção de IL-10 pode estar associado a falhas de tratamento e a recidivas mais frequentes da LV nessa população (NIGRO et al., 1999).

Além disso, os níveis circulantes de IL-10 se correlacionam significativamente à carga parasitária na LV (VERMA et al., 2010).

Os pacientes que evoluem para cura após tratamento da LV apresentam queda significativa de IL-10, após o tratamento específico. A permanência dos níveis de IL-10 em pacientes aparentemente curados foi associada à recidiva da LV (MONDAL et al., 2010). Já os que apresentam sinais de gravidade para LV exibem altos níveis de IL-10 (GAMA et al., 2013)

2.7.5 IL-17A

A IL-17A é uma citocina produzida principalmente pelas células Th17 e atua estimulando a produção de quimiocinas e de TNF, sendo capaz de recrutar neutrófilos e monócitos e aumentar a geração desses primeiros na medula óssea. Estimula, também, a produção de substâncias antimicrobianas como as defensinas, as quais demonstram-se importantes ao mecanismo de defesa propiciado pela ação dos neutrófilos, em sua capacidade de ingerir e de matar bactérias e fungos extracelulares (OUYANG; KOLLS; ZHENG, 2008). A diferenciação das células Th17 é estimulada pelo TGF-beta, assim como a diferenciação de células T virgens para células T regulatórias CD4+CD25+FoxP3+ (Treg), colocando as células Th17 em estreita interrelação com as células Treg (KORN et al., 2009).

Na leishmaniose mucosa, camundongos com deficiência de regulação mediada pela IL-10 apresentam lesões maiores e níveis de IFN-gama e IL-17 mais elevados. O IFN-gama contribui para a regulação da resposta IL-17. O bloqueio do IFN-gama leva ao aumento de IL-17 e à piora das lesões (GONZALEZ-LOMBANA et al., 2013).

As células mononucleares do sangue periférico de pacientes humanos com leishmaniose cutânea ou mucosa produzem maiores concentrações de IL-17 que pacientes controle. Existe correlação fortemente positiva entre o número de células expressando IL-17 e a intensidade do infiltrado inflamatório nas lesões de leishmaniose cutânea, sugerindo a participação da IL-17 na patogênese das leishmanioses (BACELLAR et al., 2009).

Pacientes com LV em atividade apresentam maiores níveis de IL-17 (DUTHIE et al., 2014; ELSHAFIE et al., 2011). A IL-17 e a IL-22 são citocinas fortemente associadas à proteção contra LV em humanos. Durante surto de LV no Sudão, verificou-se que o risco de passado de LV em indivíduos produzindo baixos níveis de IL-17 era 20 vezes maior que em indivíduos produzindo altos níveis de IL-17. Pacientes naturalmente resistentes, com níveis elevados de IL-17 e IL-22, podem reagir mais rapidamente a infecção por *L. donovani* atraindo efetores da imunidade inata e recrutando células Th1 para os tecidos, aumentando, conseqüentemente, a atividade microbicida dos fagócitos. Dessa forma Th1 e Th17 podem apresentar papel complementar na proteção contra LV (PITTA et al., 2009).

Estudo experimental para tratamento da LV com curdian (nova droga imunomoduladora) mostra que a medicação leva à produção de citocinas de padrão Th1 e Th17 e à melhora clínica em camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*, sugerindo, também, o papel complementar das respostas Th1 e Th17 no controle e na melhora precoce da LV (GHOSH et al., 2013) .

2.7.6 TNF

O TNF é produzido por macrófagos, por células dendríticas e por linfócitos T. É capaz de ativar as células endoteliais, levando à inflamação e à coagulação, de ativar neutrófilos, de aumentar a síntese hepática de proteínas de fase aguda, de aumentar o catabolismo celular e de desencadear a apoptose em diversos tipos celulares. O TNF exerce papel essencial na cascata de citocinas de várias doenças inflamatórias (PARAMESWARAN; PATIAL, 2010).

Em estudos animais, o TNF é essencial no recrutamento de linfócitos para a formação de granulomas hepáticos, necessários à redução da replicação inicial da *L. donovani*. A produção de óxido nítrico sintase induzível, necessária para a morte dos parasitas intracelulares, é diminuída em camundongos deficientes em TNF. Dessa

forma, destaca-se a importância do TNF para o controle da LV (WILHELM et al., 2001; ENGWERDA et al., 2004).

Apesar do papel do TNF no controle inicial da infecção pela *Leishmania* spp., os pacientes com LV ativa apresentam maiores dosagens plasmáticas de TNF que os indivíduos não infectados ou com infecção assintomática (BARRAL-NETTO et al., 1991; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006; COSTA et al., 2012). Porém, observa-se baixa frequência de leucócitos produtores de TNF no sangue periférico dos indivíduos com doença ativa, especialmente de monócitos produtores de TNF, fato o qual sugere que outros sítios corporais acometidos pela *L. chagasi* podem ser os responsáveis pela produção de TNF na LV (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006). Os níveis séricos de TNF reduzem rapidamente após o tratamento específico, entretanto, pacientes que não respondem ao tratamento mantêm níveis elevados de TNF (BARRAL-NETTO et al., 1991).

Em pacientes com LV após o tratamento, o aumento na produção de IL-12, TNF e IFN-gama por células mononucleares de sangue periférico estimuladas por antígeno específico de *L. donovani* foi associado à cura da LV. Os indivíduos que não apresentam aumento da produção de IL-12, TNF e IFN-gama estímulo-específico apresentam maior risco de recidiva da doença, o que reforça a participação dessas citocinas no controle da LV (MONDAL et al., 2010).

O TNF está fortemente associado à gravidade clínica da LV. Pacientes exibindo sangramentos espontâneos apresentam maiores dosagens de TNF que aqueles sem sangramentos. Descreve-se, também, correlação negativa entre os níveis de TNF e a contagem de neutrófilos nos pacientes com LV (COSTA et al., 2013).

A participação do TNF no controle inicial das leishmanioses também pode ser destacada pelos diversos relatos de casos de LV e leishmaniose cutânea em pacientes em uso de drogas anti-TNF para tratamento de doenças autoimunes (de LEONARDIS et al., 2009; KRITIKOS et al., 2010).

Ao se avaliar a coinfeção com HIV, o aumento dos níveis de IL-6 e TNF, secundário à infecção pela *L. infantum*, leva ao aumento da replicação viral em cultura de células dendríticas e de células T humanas (GARG et al., 2009). Os pacientes coinfectados com LV e HIV apresentam maiores concentrações séricas de TNF e IFN-gama que os pacientes com HIV sem LV. As dosagens de TNF podem permanecer aumentadas mesmo após o tratamento da LV. Durante o curso da

doença, os pacientes coinfectedados com HIV apresentam queda da contagem de linfócitos T CD4+ e aumento transitório da viremia, o qual sugere que o TNF pode ter relação com a complexa interação LV/HIV, levando a curso mais acelerado da infecção pelo HIV (MEDRANO et al., 1998).

2.7.7 IFN-gama

O IFN-gama é a principal citocina ativadora dos macrófagos. O IFN-gama ativa diversas vias de sinalização e fatores de transcrição, induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a produção de óxido nítrico e de enzimas lisossômicas, destruindo micro-organismos intracelulares fagocitados nos macrófagos. Promove, entre várias funções, a diferenciação de células T CD4+ para o perfil Th1 e inibe a diferenciação de células Th2 e Th17; estimula a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal e a apresentação de antígenos, amplificando a resposta imunológica dependente de células T (BILLIAU; MATTHYS, 2009).

A resistência inicial à infecção pela *L. donovani* está associada à ação do IFN-gama e à ativação de macrófagos, induzindo a produção de ROS e óxido nítrico e, conseqüentemente, levando à destruição dos parasitas intracelulares (GANTT et al., 2001).

O desenvolvimento da LV após a infecção inicial pela *L. donovani* está associada à supressão Th1 e ao aumento de produção de citocinas Th2 como IL-4 e moduladoras como a IL-10 (KHARAZMI et al., 1999; CARVALHO et al., 1985; BACELLAR et al., 2000).

Os indivíduos com LV ativa apresentam níveis plasmáticos de IFN-gama maiores que os pacientes assintomáticos, os curados ou os controles não infectados (CALDAS et al., 2005; HAILU et al., 2005; COSTA et al., 2012). Neutrófilos, eosinófilos, células NK, células T CD4+ e células T CD8+ produtoras de IFN-gama são encontradas mais frequentemente no sangue periférico de doentes com LV ativa que em assintomáticos ou não infectados. (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006). Após tratamento, a diminuição significativa dos níveis de IFN-gama e IL-10 ocorre (CALDAS et al., 2005; ANSARI; SALUJA; SALOTRA, 2006). Apesar das concentrações séricas de IFN-gama durante a doença ativa, a falha na atividade do

IFN-gama pode estar relacionada à presença de elevados níveis de IL-10 e de TGF-beta, citocinas que diminuem a ativação dos macrófagos (NYLÉN; SACKS, 2007).

Os pacientes com LV sintomáticos apresentam diminuição na produção de IFN-gama pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, após estimulação, quando comparados a indivíduos assintomáticos ou à população controle. Porém, pacientes com infecção assintomática pela *L. donovani* apresentam produção de IFN-gama em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ semelhantes à população não infectada. Isso sugere o papel da supressão de resposta dessas subpopulações celulares para a evolução da doença (HAILU et al., 2005).

No que tange aos pacientes, os que apresentam sinais e sintomas classicamente relacionados à gravidade na LV apresentam menores concentrações de IFN-gama e maiores níveis de IL-10 circulantes que os pacientes sem sinais de gravidade (GAMA et al., 2013).

Os portadores do HIV coinfectados com LV apresentam maiores níveis séricos de IFN-gama que portadores do HIV sem LV (MEDRANO et al., 1998). Porém, as células mononucleares do sangue periférico de pacientes coinfectados com HIV produzem menos IFN-gama após estimulação que as de pacientes HIV+ sem coinfecção, podendo a menor produção de IFN-gama antígeno-induzida estar associada à maior chance de falha de tratamento nos pacientes com a coinfecção LV/HIV (NIGRO et al., 1999).

Apesar do grande avanço na compreensão dos aspectos imunológicos associados à leishmaniose, o papel das citocinas na resposta imune na LV e sua relação com a gravidade de apresentação clínica da doença ainda não estão totalmente esclarecidos.

Dessa forma, partindo da hipótese que as citocinas têm importante ação na imunopatogenia da doença, foram aqui comparadas as dosagens plasmáticas das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF e IFN-gama antes e após o tratamento de pacientes com LV. Considerando a hipótese de que as citocinas estão envolvidas na gravidade da apresentação clínica da LV, foi avaliada a associação entre as dosagens plasmáticas das mesmas citocinas e a coinfecção com HIV, e entre as citocinas e a presença de fatores de risco para gravidade e para óbito, como sangramentos espontâneos, dispneia, icterícia, hemoglobina basal, global de leucócitos, contagem de plaquetas e evolução para óbito.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão de citocinas plasmáticas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF e IFN-gama em pacientes com LV ativa e pós-tratamento, a sua relação com a coinfeção LV/HIV e com parâmetros clínicos e laboratoriais de gravidade na LV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar a expressão das citocinas plasmáticas em pacientes com LV antes e após o tratamento específico.

Comparar a expressão das citocinas plasmáticas em pacientes com LV e em pacientes com a coinfeção LV/HIV.

Avaliar a relação entre a expressão das citocinas plasmáticas e a ocorrência de óbito em pacientes com LV.

Avaliar a relação entre os níveis plasmáticos das citocinas e a ocorrência de critérios clínicos de gravidade da LV.

Avaliar a correlação entre as citocinas estudadas e os dados hematológicos nos pacientes com LV.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO

O presente trabalho apresenta dois delineamentos de pesquisa distintos. Para a avaliação da expressão das citocinas plasmáticas na doença ativa foi realizado um estudo experimental, no qual as dosagens das citocinas foram comparadas antes e após o tratamento específico da LV. Para a avaliação da associação das dosagens das citocinas e a presença da coinfeção com HIV, ou a presença de parâmetros clínicos e laboratoriais de gravidade da LV ou o óbito foi realizado um estudo transversal, com os pacientes com LV antes do tratamento específico.

4.2 PACIENTES

Foram identificados 40 pacientes, internados ou atendidos consecutivamente no Hospital Eduardo de Menezes da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), no período de agosto de 2013 a fevereiro de 2014, que apresentaram pelo menos dois de três sinais, a saber: i) febre; ii) hepatomegalia e/ou esplenomegalia e iii) citopenias. Desses pacientes, 21 tiveram confirmação do diagnóstico de LV e foram incluídos no estudo. Não houve restrição de sexo, de idade ou de cor de pele dos pacientes.

4.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo pacientes com manifestações clínicas e epidemiologia compatíveis com LV, antes do início do tratamento específico, e com diagnóstico confirmado por observação direta do parasita em aspirado de medula óssea ou presença do parasita pelo PCR positivo ou teste sorológico positivo para infecção por *Leishmania* do complexo *Leishmania donovani* (teste imunocromatográfico de pesquisa de anticorpos anti-rK39 ou imunofluorescência indireta), excluídos outros diagnósticos.

4.2.2 Critériode exclusão

Pacientes em uso de drogas imunomoduladoras (corticoides em dose imunossupressora, quimioterápicos, citostáticos etc).

4.2.3 Caracterização dos pacientes

Foram estudados inicialmente 40 pacientes, dos quais 21 tiveram diagnóstico confirmado de LV. Entre os pacientes excluídos, 11 tiveram confirmação de patologia diferente da LV, a qual justificava os sinais e sintomas, sete não tiveram confirmação de LV por nenhum dos métodos utilizados e um se recusou a participar do estudo, entretanto o seu diagnóstico não era de LV.

Dos pacientes incluídos na pesquisa 14 (66,67%) eram masculinos. A idade dos pacientes variou de 15 a 68 anos, com média de aproximadamente 42 anos e mediana de 39 anos.

O diagnóstico da LV foi realizado por observação direta do parasita em aspirado de medula óssea em 17 pacientes (80,95%), por associação de sinais e sintomas clínicos e exame sorológico em três pacientes (14,29%) e em um (4,76%) pela história clínica compatível, pela sorologia positiva e pela detecção de *L. donovani* por PCR em sangue periférico.

Febre esteve presente em 85,71% dos pacientes, hepatomegalia em 85,71% e esplenomegalia em 80,95% dos pacientes. Além disso, todos apresentavam anemia, com hemoglobina variando de 5,7g/dL a 10,4g/dL, média de 8,0g/dL. O global de leucócitos variou de 400cel/mm³ a 4.900cel/mm³, com média de 1.631cel/mm³. O número de neutrófilos variou de 60cel/mm³ a 2.378cel/mm³, com média de 821cel/mm³. O número de linfócitos variou de 140cel/mm³ a 2.450cel/mm³, com média de 600cel/mm³. A dosagem de plaquetas variou de 16.000cel/mm³ a 149.000cel/mm³, com média de 77.381cel/mm³.

A coinfeção com HIV estava presente em sete pacientes, sendo seis com diagnóstico prévio do HIV, em uso irregular de antirretrovirais. Em outro paciente, o diagnóstico de HIV foi estabelecido em função do diagnóstico da LV. Nos pacientes coinfectados com HIV, a contagem média de linfócitos T CD4+ foi de 80cel/mm³, variando de 4 a 171cel/mm³ (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com LV pré-tratamento, internados no Hospital Eduardo de Menezes, de agosto de 2013 a fevereiro de 2014 (N=21 pacientes).

<i>DADO DEMOGRÁFICO, CLÍNICO OU LABORATORIAL</i>	<i>N (%) ou MÉDIA ± DESVIO PADRÃO</i>
SEXO M	14 (66,67%)
IDADE (anos)	42 ± 16
DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO EM ASPIRADO DE MEDULA OSSEA	17 (80,95%)
FEBRE	18 (85,71%)
HEPATOMEGALIA	18 (85,71%)
ESPLENOMEGALIA	17 (80,95%)
HEMOGLOBINA (g/dL)	8,0 ± 1,5
GLOBAL DE LEUCÓCITOS (cel/mm ³)	1.631 ± 975
PLAQUETAS (cel/mm ³)	77.381 ± 39.586
COINFEÇÃO COM HIV	7 (33,33%)

As citocinas plasmáticas foram dosadas antes e, aproximadamente, 40 dias após o início do tratamento específico. Como a opção terapêutica para tratamento da LV ficou à escolha dos médicos assistentes, optou-se por um período de coleta das amostras de sangue após o tratamento que seria compatível com qualquer esquema de tratamento. Porém, dos 21 pacientes acompanhados, 20 foram tratados com anfotericina B lipossomal na dose total de 20mg/Kg e um paciente foi tratado com anfotericina B deoxicolato, dose total de 25mg/Kg.

Foram obtidas 12 amostras após o tratamento. Entre os pacientes cujas amostras não foram coletadas após o tratamento três haviam evoluído para óbito, dois apresentavam critérios sugestivos de recidiva da doença na data da coleta da amostra, após o tratamento, e quatro não retornaram para nova coleta de sangue. Por isso, não foi possível a coleta do material após o tratamento, mesmo com a tentativa de busca ativa dos pacientes. Apesar da gravidade dos doentes, nenhum apresentava critérios de síndrome de resposta inflamatória sistêmica no momento da coleta do sangue antes ou após o tratamento.

4.2.4 Tamanho da amostra

Devido à escassez de dados na literatura, foram analisadas, para o cálculo amostral, somente as dosagens de IL-10, de TNF e de IFN-gama, em estudos prévios (ANSARI; SALUJA; SALOTRA, 2006; CALDAS et al., 2005). Para obter poder de 80% e erro alfa de 0,05 e considerando o desfecho de diferença entre as dosagens de citocinas antes e após o tratamento específico, o tamanho da amostra

seria de nove pacientes. Quando considerado o desfecho de diferença nas dosagens das citocinas entre pacientes coinfectados ou não com HIV, para o mesmo poder e erro, analisando as dosagens de IL-10 e IFN-gama em estudos prévios (MEDRANO et al., 1998), o tamanho da amostra poderia ser de 21 pacientes, dos quais sete deveriam ser coinfectados com HIV. Foi utilizado o programa estatístico Power and Sample Size Calculation 3.0.43.(Dupont WD, Plummer WD, free software, USA).

4.3 MÉTODOS

4.3.1 História clínica e exame físico

Os pacientes foram submetidos à anamnese detalhada e ao exame clínico minucioso pelo doutorando. Estes ou seus responsáveis legais foram convidados a participar voluntariamente do estudo e, a eles, foi apresentado o TCLE. Os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa tiveram seus dados demográficos, clínicos e laboratoriais anotados em formulário próprio da pesquisa, para caracterização da população de pacientes em estudo (APÊNDICE A). Os exames laboratoriais de acompanhamento dos pacientes suspeitos de LV foram coletados de acordo com a rotina dos médicos assistentes.

4.3.2 Obtenção e congelamento do plasma

Os pacientes foram submetidos à punção venosa para coleta de alíquota de sangue (6mL), para a dosagem das citocinas, antes e aproximadamente 40 dias após o início do tratamento específico,. As amostras de sangue pré-tratamento foram colhidas no momento em que se tinha a suspeita de LV, portanto os pacientes já apresentavam sinais e sintomas sugestivos da doença.

Após as coletas, as amostras de sangue periférico foram imediatamente centrifugadas e tiveram o plasma separado ou foram encaminhadas imediatamente para processamento no Laboratório de Biologia das Interações Celulares (LABIC/ICB/UFMG). As amostras foram centrifugadas a 1.200 rpm por 10 minutos, à temperatura ambiente (20°C), o plasma foi separado e congelado à -20°C.

4.3.3 Preparo das amostras

O plasma foi descongelado em banho-maria à temperatura de 37°C. As amostras foram novamente centrifugadas na microcentrífuga por 10min a 14.000rpm e foi separado o sobrenadante.

4.3.4 Preparo dos padrões

As dosagens das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF e IFN-gama foram realizadas utilizando o BD™ *Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit*.

As esferas de padrão liofilizado humano Th1/Th2/Th17 foram transferidas para um tubo Falcon, identificado como “Top Standard - TS”. O padrão foi reconstituído com 2mL do Reagente G. O tubo reconstituído permaneceu em repouso por 15 minutos, à temperatura ambiente. Foram, então, numerados 8 tubos de FACS para realização de diluições seriadas: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 e 1/256. Foram adicionados 300 µL de reagente G em todos os tubos e, então, transferidos 300 µL da solução “Top Standard” para o frasco ½. A nova solução foi homogeneizada delicadamente. Foram realizadas diluições seriadas, utilizando 300 µL da solução do frasco ½ para o ¼ e assim sucessivamente até a diluição de 1/256. Foi utilizado um tubo adicional apenas com o Reagente G, como Controle Negativo (CN), com total contabilizado em 10 tubos para a curva de padrões.

4.3.5. Preparo da mistura de *beads*

A mistura de *beads* foi preparada imediatamente antes do uso, considerando o volume de 3 µL de cada suspensão de *beads* para cada ensaio. O volume total de cada suspensão de *beads* foi adicionado em tubo único para preparação da mistura. Foram utilizados 21µL da mistura de *beads* para cada amostra. Os frascos contendo as *beads* foram homogeneizados no *vórtex* antes de pipetá-las, tanto durante o preparo, quanto na distribuição dos 21 µL/tubo. A mistura de *beads* foi utilizada logo após o preparo.

4.3.6. Execução das reações

Foram adicionados 21µL da mistura de *beads* a 25 µL dos padrões, nas diluições previamente definidas, e a 25µL das amostras, nos respectivos tubos. Foram adicionados em todos os tubos 22 µL do Reagente B (Reagente de detecção marcado com PE). As amostras foram incubadas por 3h, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Foram adicionados 500 µL do Reagente F (*wash buffer*) em cada tubo. Os tubos foram centrifugados a 1.300rpm, por 7 min, a 18°C. O sobrenadante foi aspirado com bomba de vácuo. Foram novamente adicionados 150 µL do Reagente F em cada tubo.

4.3.7. Aquisição e Análise dos dados

As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto II, BD, USA). A aquisição das amostras foi feita utilizando o software específico (BD FACSDiva™, Softflow, USA). A análise dos dados foi realizada por meio da construção de curvas de calibração obtidas a partir dos padrões de citocinas do *kit*, utilizando software específico (FCAP Array, BD, USA). Após a construção das curvas, a concentração dos analitos nas amostras foi determinada em pg/mL, a partir dos valores de Intensidade Média de Fluorescência (MFI) obtidos na leitura da Fluorescência 2.

4.3.8 Análise dos resultados

Os resultados foram apresentados em tabelas e em gráficos. As variáveis qualitativas foram apresentadas como valores absolutos e relativos (porcentagem) e as quantitativas como média e desvio padrão. As proporções das variáveis categóricas foram comparadas utilizando o teste Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher.

Para comparação das dosagens das citocinas em pacientes apresentando ou não critérios de gravidade para a LV, foram realizados testes para avaliação de distribuição Gaussiana das variáveis contínuas (teste Kolmogorov-Smirnov, teste de normalidade D'Agostino e Pearson e teste de normalidade de Shapiro-Wilk) e,

posteriormente, realizados os testes de Mann-Whitney ou t de Student para comparação de dados não paramétricos ou paramétricos, respectivamente.

Para análise das dosagens de citocinas antes e após o tratamento (amostras pareadas, não paramétricas) foi utilizado o teste Wilcoxon pareado.

Foram realizadas, também, análises de correlação entre as dosagens das citocinas e os dados hematológicos, utilizando o teste de Spearman.

Foram realizadas análises de regressão logística, entre as variáveis dicotômicas associadas à gravidade da LV e entre as dosagens das citocinas, as quais foram testadas, na análise multivariada, as variáveis que apresentaram, na análise univariada, associação com $p < 0,2$.

Análises de regressão linear foram realizadas considerando como variáveis de desfecho as variáveis contínuas associadas à gravidade da LV, procurando associação entre estas e as dosagens das citocinas. Foram realizados teste de normalidade do resíduo de cada modelo com o teste estatístico Shappiro-Wilk e teste de heterocedasticidade com o Breusch-Pagan.

Os resultados das análises univariadas e os modelos finais da regressão logística e das análises de regressão linear foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ (JUUL, 2008).

A análise estatística foi realizada ao se fazer uso do programa GraphPad Prism 5.0. (GraphPad Software, San Diego, California, USA) e STATA 11 (StataCorp, USA).

4.4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais – COEP/UFMG (ETIC 103.0.287.203/08), pelo Núcleo de Ética em Pesquisa do Hospital Eduardo de Menezes da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais – NEP/HEM/FHEMIG e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FHEMIG – CEP/FHEMIG (Registro 123/2008, CAAE 103.0.287.203-08) (ANEXOS A, B, C, D, E).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ARTIGO

ASSOCIATION AMONG CIRCULATING CYTOKINES, DISEASE ACTIVITY, CLINICAL AND LABORATORIAL PARAMETERS AND HIV CO-INFECTION IN HUMAN VICERAL LEISHMANIASIS

MOREIRA, R. L. F.^{1,2}; ROCHA, R. L.¹; VIANA, A. G.³; PASSOS, L. S. A.³; MAGALHÃES, L. M. D.³; GOLLOB, K.^{4,5}; DUTRA, W. O.^{3,5}

1 Graduate Program in Health Sciences – Infectious Diseases and Tropical Medicine - Medicine School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

2 Eduardo de Menezes Hospital – Hospital Foundation of Minas Gerais State, Belo Horizonte, MG, Brazil

3 Laboratory of Cell-cell Interactions, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

4 Institute for Education and Research, Santa Casa Hospital, Belo Horizonte, MG, Brazil

5 National Institute for Science and Technology – Tropical Diseases (INCT-DT), Belo Horizonte, MG, Brazil

Conflict of Interest: None of the authors has any potential financial conflict of interest related to this manuscript.

ABSTRACT

Background: Visceral leishmaniasis (VL) is one of the most severe neglected tropical diseases that can progress to death if left untreated. Risk factors for death and immunopathogenesis of VL are still not fully elucidated. Thus, we evaluated plasma cytokine levels during active disease and after specific therapy, as well as their association with HIV co-infection and clinical and laboratorial parameters of disease severity or death.

Methods: Plasma levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF and IFN-gamma were measured by Cytometric Bead Array in VL patients before and after treatment. Cytokine levels were associated with HIV co-infection and with parameters of severity such as bleeding, jaundice, anemia and leukocyte counts.

Results: Active VL patients showed higher IL-2, IL-4 and IL-10 plasma concentrations as compared to VL patients after specific therapy. Interestingly, HIV co-infected patients showed lower levels of IL-10 as compared to HIV-/VL cases. Lower levels of IFN-gamma were found in patients who had bleeding episodes and they were also slightly lower in those who died, showing its correlation with disease severity. However, occurrence of jaundice was associated with higher IL-10. IL-2 and IL-6 were negatively correlated to hemoglobin levels and leukocytes counts. Positive association among leukocytes numbers with IL-10 was also found.

Conclusion: Considering these findings, we highlight the association of IL-2, IL-4 and IL-10 with disease activity and the association between HIV co-infection and low IL-10 levels. While IL-2 and IL-6 were associated with lower white blood cell counts and hemoglobin, indicating severity, IL-10 was associated with higher leukocytes numbers, but also with jaundice, highlighting the complex mechanisms involved in VL progression.

KEYWORDS: visceral leishmaniasis, immune response, cytokines, HIV, risk factors.

AUTHOR SUMMARY

Visceral leishmaniasis (VL) is a parasitic disease, endemic in east and northern Africa, Mediterranean region, Indian subcontinent and in Latin America. There are 200,000 to 400,000 new cases each year in the world. Patients present fever, enlargement of liver and spleen, and reduced blood cell counts. If untreated, the disease is potentially fatal, and patients die by secondary infection, bleeding or cachexia. The host's immune response is closely related to disease development or protection. Cytokines, small proteins involved in cell signaling may be associated with disease immunopathogenesis. In this study, the authors highlight the importance of cytokines during active VL, the association between HIV co-infection and cytokines levels and the possible role of cytokines in clinical and laboratorial findings in VL patients. This study may contribute to better understanding mechanisms of VL immunopathogenesis and exhort new studies exploring the role of cytokines in clinical and laboratory findings in VL patients.

INTRODUCTION

Leishmaniasis, infectious diseases caused by kinetoplastid flagellates protozoan of the genus *Leishmania* spp., are endemic in large areas of the tropics, subtropics and Mediterranean, and are amongst the most neglected tropical diseases [1]. There are four main clinical syndromes of leishmaniasis: cutaneous leishmaniasis, muco-cutaneous leishmaniasis; visceral leishmaniasis (VL) (also known as kala-azar); and post-kala-azar dermal leishmaniasis. VL is the most severe syndrome, which is fatal if left untreated [2]. Case fatality rate is estimated in 10%, with about 20,000 to 40,000 leishmaniasis deaths per year in the world [3, 4].

Disease expression is influenced by parasite species, parasite characteristics such as infectivity, pathogenicity and virulence, and by the host's immune response. These factors lead to heterogeneous clinical manifestations [5, 6]. VL patients can present insidious fever, weight loss and enlargement of liver and spleen. Changes in blood characteristics such as anemia, thrombocytopenia and leukopenia are frequent, reflecting bone marrow and spleen involvement in VL. Hypoalbuminemia, hypergammaglobulinemia and mild to moderate increases in liver enzymes are common. Hepatic dysfunction, jaundice and ascites may occur in advanced disease. Patients can show spontaneous bleeding due to thrombocytopenia, liver involvement or disseminated intravascular coagulation. In addition to VL typical symptoms,

potentially lethal recurrent bacterial infections can happen because of leukopenia [5, 7, 8].

Despite sporadic atypical presentation, with cutaneous or gastrointestinal involvement, patients with VL/HIV co-infection commonly show similar clinical presentation to patients with VL without HIV [9]. However, HIV co-infected patients have poor outcome with high risk of treatment failure, relapse and death [10 – 13].

Although many clinical symptoms have been identified, risk factors for death or relapse of VL are still not fully elucidated. Extremes of age, low body mass index, anemia, bleeding, dyspnea, jaundice, edema, vomiting, bacterial infections and HIV co-infection have been associated with increased risk of death among VL patients [14 – 18].

Human VL shows complex immune response, with suppression of production of Th1 cytokines such as IL-2, IFN-gamma and IL-12, and increased production of Th2 and modulatory cytokines, such as IL-4 and IL-10 in patients with active disease [19 – 23]. Resistance to initial infection is associated with IFN-gamma activity and macrophage activation, leading to death of intracellular parasites mediated by reactive oxygen species and nitric oxide production [24]. IL-10 modulates Th1 activation leading to reduced IL-2 and IFN-gamma production and inhibits activation of macrophages and the ability to kill *Leishmania* spp. [25]. The ability of IL-10 to inhibit macrophages activation, associated with low frequency of TNF-producing monocytes in peripheral blood and impaired production of IFN-gamma in early stages of infection, may be associated with VL development in *L. donovani* infected individuals [19, 20].

Considering the possible role of cytokines in VL pathogenesis, this work proposes to evaluate the relationship between plasma levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF and IFN-gamma and disease activity, HIV co-infection, and clinical and laboratorial parameters of VL severity or death.

MATERIALS AND METHODS

Ethical considerations and study design

The study was carried out at Eduardo de Menezes Hospital during the period of August 2013 until February 2014 in the city of Belo Horizonte, a referral center for infectious diseases in Minas Gerais State, in Brazil. This study received approval from the Human Research Ethics Committee of Federal University of Minas Gerais

(ETIC 103.0.287.203/08) and the Human Research Ethics Nucleus of Eduardo de Menezes Hospital (Reg. 123/2008, CAAE 103.0.287.203-08).

Forty patients with signs and suggestive symptoms of VL (fever, splenomegaly, hepatomegaly and/or cytopenias) were analysed. Twenty-one eligible patients with confirmed diagnosis of VL by direct observation of parasites in bone marrow aspirate, positive test of Polymerase Chain Reaction or positive serologic test for *L. donovani* were enrolled in the study. After agreeing to participate, a statement of informed consent was obtained from all patients or their legal representative. Cytokines were measured by flow cytometry before and 40 days after beginning the specific treatment. No patient had signs or symptoms of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) at the moment of blood collection for cytokines measurements. No patients were taking immunosuppressive drugs such as corticosteroids in immunosuppressive doses or chemotherapeutic drugs (Figure 1).

Clinical and laboratorial parameters of VL patients as spontaneous bleeding, dyspnea, jaundice, hemoglobin, leukocytes and platelets counts and HIV co-infection were evaluated.

Cytokines measurements

All patients were submitted to venipuncture for collection of 6 mL of peripheral blood. The samples were centrifuged at 1,200 rpm for 10 minutes at room temperature (20 °C), plasma was separated and frozen at -20 °C. Plasma was later thawed in a water bath at a temperature of 37 °C. The samples were centrifuged again in a microcentrifuge for 10 minutes at 14,000 rpm to remove suspended particles and the supernatant was collected.

We used BD™ Cytometric Bead Array (CBA) kit Human Cytokine Th1/Th2/Th17 to measure IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF and IFN-gamma, according to manufacturer's instructions.

The samples were read in a flow cytometer (FACSCanto II, BD). The acquisition of samples was performed using specific software (BD FACSDiva™, BD). Data analysis was performed using a specific software (FCAP Array, Softflow) through the construction of calibration curves obtained from the patterns of cytokine kit. After construction of the curves, the analyte's concentration in the samples was determined in pg/mL based on the values of Mean Fluorescence Intensity (MFI) obtained in the second fluorescence reading.

Statistical analysis

Due to the lack of data in literature, we calculate the sample size based on two outcomes: differences in cytokines before and after treatment and among VL patients HIV co-infected or not. Considering levels of IL-10 and IFN-gamma (cytokines most studied), for a power of 80%, alpha error of 0.05 and outcome of differences in strengths of cytokines before and after specific treatment, the sample size was nine patients. When considering the outcome of difference between measurement of cytokines among HIV co-infected patients or not, for same power and error, the sample size could be up to 21 patients, seven of whom HIV co-infected. We used literature data and Power and Sample Size Calculation 3.0.43 (Dupont WD, Plummer WD, USA) software.

Results were shown as tables or graphs, and qualitative variables were expressed as absolute value and percentages, and quantitative variables were expressed as means and standard deviation. The proportion of categorical variables was compared using X^2 or Fisher's exact test. For continuous variables, Mann-Whitney test or Student t-test were used for non-parametric or parametric data. Wilcoxon matched-pairs rank test was used for paired non-parametric data. Spearman correlation analysis was performed for non-parametric data. Logistic regression analyses were made considering variables with $p < 0.2$ in univariate analysis. Linear regression analyses were performed for continuous variables. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$. Statistical analysis were performed using the GraphPad Prism 5.0. (GraphPad Software, San Diego California USA) and STATA 11 (StataCorp, USA) softwares.

RESULTS

During the study period, 40 patients were assessed for eligibility. Twenty one patients had a confirmed diagnosis of VL by direct observation of the parasite in bone marrow aspirate (N=17), positive test of Polymerase Chain Reaction in blood (N=1), or positive serologic test for infection with *L. donovani* complex (N=18) and were enrolled in the study. Amongst the excluded patients, 11 had confirmation of other specific diagnoses; seven patients had no laboratory confirmation of *L. donovani* infection and one refused to participate in the study.

Fourteen patients included in the study were male. Patients' ages ranged from 15 to 68 years, with a median of 39 years old. Analyzing the eligibility criteria, 85.71% of patients had fever, 85.71% of patients had hepatomegaly and 80.95% of patients had splenomegaly. All patients had anemia, and basal hemoglobin ranged from 5.7g/dL to 10.4g/dL, mean of 7.96g/dL. White blood cell counts ranged from 400/mm³ to 4,900/mm³, mean of 1,631/mm³. Neutrophil counts varied from 60/mm³ to 2,378/mm³, mean of 821 neutrophils/mm³. Lymphocytes levels were between 140/mm³ and 2,450/mm³, mean of 600cels/mm³. Platelet counts ranged from 16,000/mm³ to 149,000/mm³, mean 77,381/mm³. Seven patients (33%) were co-infected with HIV. Amongst HIV co-infected patients, only one had HIV diagnosis associated with the occurrence of VL. Six patients were in irregular use of highly active antiretroviral therapy, and the mean of CD4+ Tcells was 80 cells/mm³ (range from 4 to 171 cells/mm³).

Twenty patients were treated with liposomal amphotericin B (total of 20mg/Kg) and one patient was treated with deoxycholate amphotericin B. After treatment we obtained samples of blood from 12 patients. Three patients died, two patients presented suggestive criteria of disease recurrence at the time of sample collection and four patients did not return for medical monitoring.

To evaluate cytokine expression during active VL, plasma cytokines were measured before and after specific treatment. Were performed paired analyses of cytokines levels (N=12). Plasma IL-2, IL-4 and IL-10 levels significantly decreased after treatment. There were no significant differences in IL-6, IL-17A, TNF and IFN-gamma concentration in patients with VL before and after specific drug therapy (Figure 2).

Evaluating possible differences in HIV co-infected patients, we compared some clinical features to those without co-infection. No significant differences in sex, age, baseline hemoglobin, leukocyte, neutrophils or lymphocytes, platelets, presence of signs and symptoms as bleeding, dyspnea, edema, jaundice, recent bacterial infection or history of kidney injury were identified (data not shown).

Plasma levels of cytokines were compared in patients with VL and VL/HIV co-infection. Lower concentrations of IL-10 were found in patients with HIV co-infection than in patients without HIV (p=0.01) in univariate analysis. However, in logistic regression model, significant difference in IL-10 levels was not maintained (p=0.06). There were no significant differences in plasma concentrations of IL-2, IL-4, IL-6, IL-

17A, TNF and IFN-gamma in patients with VL and with VL and HIV co-infection (Figure 3).

In order to assess the possible association between cytokines and death, plasma levels of cytokines were compared between patients who died and those who did not die. Patients who died had lower level of IFN-gamma than patients who did not die ($p < 0.05$). However, this association was not maintained in logistic regression models. No significant differences between IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A and TNF concentrations were found among those who progressed or not to death (Figure 4).

To assess cytokine production in patients presenting signs and symptoms associated with severity, we compared the plasma cytokine levels between patients who had or had not spontaneous bleeding, dyspnea or jaundice. Patients presenting spontaneous bleeding had lower plasma concentrations of the inflammatory cytokine IFN-gamma than those who had no evidence of bleeding in univariate analysis ($p = 0.03$). When we analyzed patients with VL without HIV co-infection, and in logistic regression models, significant difference in IFN-gamma levels was not maintained between those who had or had not bleeding. Patients presenting jaundice had higher IL-10 levels than patients without jaundice in univariate analysis ($p = 0.03$). However, considering only patients with VL without HIV co-infection, and in logistic regression models, this difference was not maintained. No significant differences in other cytokine levels were observed in patients presenting or not bleeding, dyspnea or jaundice.

Hematological findings may be associated with severity or risk of death in patients with VL. Linear regression analysis between cytokines and laboratory data such as hemoglobin, leukocytes and platelets were made prior to treatment onset. There was negative association between basal hemoglobin levels and plasma concentrations of IL-2 and IL-6. Negative association between leukocyte counts and measurements of IL-2 and IL-6, and positive association between leukocytes and IL-10 were found. (Table 1). There were no significant associations between platelet counts and IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF and IFN-gamma.

DISCUSSION

Patients with VL pre-treatment have a higher plasma concentrations of IL-2, IL-4 and IL-10, as compared to VL patients after treatment. In initial experimental infection, IL-2 reduces parasite load due to increased hepatic expression of IFN-

gamma mRNA, subsequent macrophages activation and consequent death of intracellular parasites. IL-2 induces cell proliferation and local accumulation of mononuclear cells, assisting hepatic granuloma formation and initial disease control [26]. However, IL-2 also stimulates the replication of regulatory T cells, whose IL-10 mediated actions suppresses cell protective response in later stages [27]. IL-4 induces differentiation to Th2 profile and disease progression even in resistant animals [28]. Previous studies have shown that VL patients have higher neutrophils and NK cells producing IL-4 expression than cured patients [29] and higher serum IL-4 than subjects without VL [30 – 32]. IL-4 acts in macrophage activation in a pathway leading to the inhibition of the control of intracellular microorganisms, allowing increased intracellular replication of *L. donovani* [33, 34]. IL-10 modulates Th1 activation leading to lower production of IL-12 and IFN-gamma. IL-10 also inhibits macrophages activation and the ability of these cells to kill *Leishmania* spp. [25]. It has been shown that active VL patients exhibit greater IL-10 levels than asymptomatic, cured or uninfected controls [19, 20, 31, 35 – 37]. Interestingly, peripheral blood mononuclear cells from treated VL patients, stimulated with *L. infantum* antigen, have high proliferation index; however, proliferation index and IFN-gamma production are reduced in presence of recombinant IL-10 [23]. Thereby, although high levels of IL-2 were observed in patients with active VL as compared to VL patients after treatment, this cytokine cannot control the disease, possibly due to high IL-4 and IL-10 levels which may facilitate disease progression. The high IL-4 and IL-10 plasma concentrations in active VL can be directly responsible for inhibition of macrophage activation and maintenance of VL.

HIV infection has been considered an important risk factor for relapse and death in VL [9, 37]. VL and HIV co-infection have been observed primarily among HIV patients with irregular use, or no use, of highly active antiretroviral therapy (HAART). Nevertheless, HAART use and increased CD4+ levels are not associated with full protection against relapse [38, 39]. Despite lymphopenia caused by HIV, there was no significant difference between lymphocyte number in co-infected patients and those without HIV co-infection ($p=0.75$). This finding is probably due to the fact that VL itself led to significant subsequent leukopenia and lymphopenia. T cell suppression is intimately involved in VL immunopathogenesis. T cells of untreated VL patients did not respond with increased proliferation and IFN-gamma production upon *Leishmania* spp. antigen stimulation. However, lymphocyte

proliferation and increased IFN-gamma production happened when stimulation occurred in the presence of anti-IL10 [40]. Mononuclear cells from HIV co-infected patients produce more IL-10 upon stimulation than HIV+ that are not VL co-infected. This increase in IL-10 production may be associated with treatment failure and relapses of VL in this population [41]. Despite the fact that controversial participation of IL-10-producing regulatory T cells (CD4+CD25+FoxP3+) in VL has been shown, an important part of plasma IL-10 is produced by other T cell subsets [42 – 44]. Although presenting similar lymphopenia, HIV co-infected patients have lower expression of CD4+ T cells, primary target cells of HIV infection. Depletion of CD4+ subpopulation may be associated to low plasma concentrations of IL-10 found in patients co-infected with HIV and VL. Despite lower plasma concentrations of IL-10, HIV patients have poor control of VL, probably due to lower IFN-gamma-induced antigen production [40] and weak overall immune response.

We observed low IFN-gamma concentration among patients who died ($p < 0.05$) in univariate analysis, and IFN-gamma is a classic macrophage activator. *Leishmania* spp. is an intracellular parasite of macrophages, and macrophage activation is important for control of VL [24]. Patients who relapsed VL have negligible increase in levels of antigen-induced IFN-gamma after VL treatment, suggesting the inability of these patients to devise an adequate immune response to control *L. donovani* infection [45]. Thus, it is possible that low levels of IFN-gamma could be associated with decrease in macrophage activation and parasite elimination, leading to patients' death.

Several studies attempt to define clinical or laboratory risk factors of poor prognosis in patients with VL. Some authors have described higher frequency of spontaneous bleeding and jaundice in VL patients with fatal outcomes [18, 46 – 48]. Our data shows that patients with VL and spontaneous bleeding have lower IFN-gamma plasma concentrations in univariate analysis. Costa et al. found different results, showing that bleeding is associated with high levels of IFN-gamma. Costa et al. also found association between high serum IFN-gamma and IL-6 and increased serum fibrin degradation products, suggesting an involvement of IL-6 and IFN-gamma in disseminated intravascular coagulation [49]. It is possible that the differences between our results and those of Costa et al. are due to parasite characteristics, population characteristics (in our study patients did not have signs or

symptoms of SIRS in the moment of blood collection) or previous experience of immune adaptive response.

Some authors have described anemia as a risk factor for poor prognosis in VL [17, 47,48]. VL patients often present with normocytic, normochromic anemia. Multiple pathophysiologic mechanisms have been described for anemia in VL patients. Red blood cells can be sequestered and destroyed due to enlarged spleen [50]. Lowering of hemoglobin levels may be related to direct activity of *L. donovani*, which requires exogenous heme compound for growth in cultures, by intrinsic deficiency for heme synthesis. *Leishmania* spp. requires erythrocytes lysis to acquire hemoglobin and to survive [51]. In this study, VL patients exhibit negative association between IL-6 and hemoglobin in linear regression model ($p=0.03$). Inflammatory cytokine IL-6 have been shown to induce hepcidin production. Hepcidin is the central regulatory protein that controls intestinal iron absorption and block the metal export from tissue stores, leading to the retention of iron within macrophages. This mechanism results in limited available iron for extracellular pathogens, but can result in the development of anemia [52, 53]. Thus, negative association between hemoglobin levels and IL-2 and IL-6 concentrations open perspectives for possible role of these cytokines in complex pathophysiology of anemia in VL.

Leukopenia is common in VL patients, and severe neutropenia has been associated with mortality in these patients [46, 48]. Leukocyte reduction can be attributed to hypersplenism or direct bone marrow invasion by *L. donovani*. However, intense cytokine production in VL patients can alter growth, differentiation and migration of immune cells. IL-2 is a potent signal for T cells, NK cells and other cells activated by cytokines proliferation [54]. In experimental VL, early resistance to *L. donovani* was associated with macrophages activation and liver granuloma formation. IL-2 can reduce parasite load by IFN-gamma mRNA expression enhanced and macrophage activation, and by proliferation and migration of immune cells and granuloma formation [26, 55]. IL-10 has modulating action on growth and differentiation of B cells, T cells, mast cells and inhibits production of granulocyte survival mediators, controlling inflammatory responses [56]. IL-10 acts in a decisive way inhibiting macrophages activation and *L. donovani* resistance [25, 57]. Regulatory and protective T cell functions can be changed with blocking of IL-2 or IL-10, depending on the time of onset of infection [23, 27]. Thus, negative association between IL-2 levels and leukocyte counts, and positive association between IL-10

and leukocyte counts, found in this study, may reflect an attempt to stimulate cell proliferation, inhibited by IL-10 modulating action.

Therefore, considering these findings, we highlight the importance of IL-2, IL-4 and IL-10 during active disease; the association of HIV co-infection and low IL-10 levels, reinforcing CD4+ T cells participation in IL-10 expression; the likely role of IL-6 in multiple pathophysiologic mechanism of anemia and a complex interaction among IL-2 and IL-10 and leukocyte counts in VL patients.

REFERENCES

1. World Health Assembly (2007) The World Health Assembly Resolution (WHA60.13) on the "Control of Leishmaniasis". Geneva, Switzerland.
2. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, et al. (2007) Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 5: 873-882.
3. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, et al. (2012) Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 7(5): e35671
4. Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD (2007) Measuring the Burden of Neglected Tropical Diseases: The Global Burden of Disease Framework. *PLoS Negl Trop Dis* 1(2): e114.
5. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561-1577.
6. McCall L-I, Zhang W-W, Matlashewski G (2013) Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. *PLoS Pathog* 9(1): e1003053.
7. Osman OF, Kager PA, Oskam L (2000) Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects. *Trop Med Int Health* 5: 553-562.

8. van Griensven J, Diro E (2012) Visceral leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am* 26: 309-322.
9. Hurissa Z, Gebre-Silassie S, Hailu W, Tefera T, Lalloo DG, et al. (2010) Clinical characteristics and treatment outcome of patients with visceral leishmaniasis and HIV co-infection in northwest Ethiopia. *Trop Med Int Health* 15: 848-855.
10. Fernandez-Guerreiro ML, Robles P, Rivas P, Majer F, Muniz G, et al. (2004) Visceral leishmaniasis in immunocompromised patients with and without AIDS: a comparison of clinical features and prognosis. *Acta Trop* 90: 11-16.
11. Ritmeijer K, ter Horst R, Chane S, Aderie EM, Piening T, et al. (2011) Limited effectiveness of high-dose liposomal Amphotericin B (AmBisome) for treatment of visceral leishmaniasis in an ethiopian population with high HIV prevalence. *Clinical Infectious Diseases* 53: e152–158.
12. Sinha PK, van Griensven J, Pandey K, Kumar N, Verma N, et al. (2011) Liposomal Amphotericin B for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-coinfected patients: 2-year treatment outcomes in Bihar, India. *Clinical Infectious Diseases* 53: e91–e98.
13. Cota GF, de Sousa MR, Fereguetti TO, Rabello A (2013) Efficacy of anti-leishmania therapy in visceral leishmaniasis among HIV infected patients: a systematic review with indirect comparison. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 7(5):e2195.
14. Seaman J, Mercer AJ, Sondorp HE, Herwaldt BL (1996) Epidemic visceral leishmaniasis in Southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. *Ann Intern Med* 124: 664-672.
15. Collin S, Davidson R, Ritmeijer K, Keus K, Melaku Y, et al. (2004) Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in Southern Sudan. *Clin Infect Dis* 38: 612-619.

16. Santos MA, Marques RC, Farias CA, Vasconcelos DM, Stewart JM, et al. (2002) Predictors of an unsatisfactory response to pentavalent antimony in the treatment of American visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 629-633.
17. Werneck GL, Batista MS, Gomes JR, Costa DL, Costa CH (2003) Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Infection* 31: 174-177
18. de Araujo VEM, Morais MHF, Reis IA, Rabello A, Carneiro M (2012) Early Clinical Manifestations Associated with Death from Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 6(2): e1511.
19. Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, van Weyenbergh J, et al. (2005) Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis* 5:113.
20. Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva LA, Rabello A, et al. (2006) Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol* 146: 124-132.
21. Kharazmi A, Kemp K, Ismail A, Gasim S, Gaafar A, et al. (1999) T-cell response in human leishmaniasis. *Immunol Lett* 65: 105-108.
22. Carvalho EM, Badaró R, Reed SG, Jones TC, Johnson WD Jr. (1985) Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest* 76: 2066-2069.
23. Bacellar O, D'oliveira A Jr, Jerônimo S, Carvalho EM (2000) IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine* 12: 1228-1231.
24. Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SM, et al. (2001) Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J Immunol* 167: 893-901.

25. Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM (1998) Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 31: 143-148.
26. Murray HW, Miralles GD, Stoeckle MY, McDermott DF (1993) Role and effect of IL-2 in experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol* 151: 929-938.
27. Bodas M, Jain N, Awasthi A, Martin S, Penke Loka RK, et al. (2006) Inhibition of IL-2 induced IL-10 production as a principle of phase-specific immunotherapy. *J Immunol* 177: 4636-4643
28. Biedermann T, Zimmermann S, Himmelrich H, Gumy A, Egeter O, et al. (2001) IL-4 instructs Th1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nat Immunol* 2: 1054-1060.
29. Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva Lde A, Rabello A, et al. (2005) Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. *Scand J Immunol* 62: 487-495.
30. Zwingenberger K, Harms G, Pedrosa C, Omena S, Sandkamp B, et al. (1990) Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis: evidence for predominance of endogenous interleukin 4 over interferon-gamma production. *Clin Immunol Immunopathol* 57: 242-249.
31. Costa AS, Costa GC, Aquino DM, Mendonça VR, Barral A, et al. (2012) Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 735-739.
32. Duthie MS, Guderian J, Vallur A, Bhatia A, Lima dos Santos P, et al. (2014) Alteration of the serum biomarker profiles of visceral leishmaniasis during treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33: 639-649.

33. Gordon S, Martinez FO (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32: 593-604.
34. Paul WE, Zhu J (2010) How are Th2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* 10: 225-235.
35. Ansari NA, Saluja S, Salotra P (2006) Elevated levels of interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. *Clin Immunol* 119: 339-345.
36. Kurkjian KM, Mahmutovic AJ, Kellar KL, Haque R, Bern C, et al. (2006) Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. *Cytometry A* 69: 353-358.
37. Hailu A, van Baarle D, Knol GJ, Berhe N, Miedema F, et al. (2005) T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. *Clin Immunol* 117: 182-191.
37. Pintado V, Martín-Rabadán P, Rivera ML, Moreno S, Bouza E (2001) Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. *Medicine (Baltimore)* 80: 54-73.
38. ter Horst R, Collin SM, Ritmeijer K, Bogale A, Davidson RN (2008) Concordant HIV infection and visceral leishmaniasis in Ethiopia: The influence of antiretroviral treatment and other factors on outcome. *Clin Infect Dis* 46: 1702-1709.
39. Cota GF, de Sousa MR, Rabello A (2011) Predictors of Visceral Leishmaniasis Relapse in HIV-Infected Patients: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 5(6): e1153.

40. Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, et al. (1994) Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol* 152: 5949-5956.
41. Nigro L, Cacopardo B, Preiser W, Braner J, Cinatl J, et al. (1999) *In vitro* production of type 1 and type 2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells from subjects co-infected with human immunodeficiency virus and *Leishmania infantum*. *Am J Trop Med Hyg* 60: 142-145.
42. Rai AK, Thakur CP, Singh A, Seth T, Srivastava SK, et al. (2012) Regulatory T Cells Suppress T Cell Activation at the Pathologic Site of Human Visceral Leishmaniasis. *PLoS ONE* 7(2): e31551.
43. Maurya R, Kumar R, Prajapati VK, Manandhar KD, Sacks D, et al. (2010) Human visceral leishmaniasis is not associated with expansion or accumulation of Foxp3+ CD4 cells in blood or spleen. *Parasite Immunol* 32: 479-483.
44. Nylén S, Sacks D (2007) Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol* 28: 378-384.
45. Mondal S, Bhattacharya P, Rahaman M, Ali N, Goswami RP (2010) A Curative Immune Profile One Week after Treatment of Indian Kala-Azar Patients Predicts Success with a Short-Course Liposomal Amphotericin B Therapy. *PLoS Negl Trop Dis* 4(7): e764.
46. Sampaio MJAdQ, Cavalcanti NV, Alves JGB, Fernandes Filho MJC, Correia JB (2010) Risk Factors for Death in Children with Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 4(11): e877.
47. Madalosso G, Fortaleza CM, Ribeiro AF, Cruz LL, Nogueira PA, et al. (2012) American visceral leishmaniasis: factors associated with lethality in the State of São Paulo, Brazil. *J Trop Med* 2012: 281572

48. Costa CH, Werneck GL, Costa DL, Holanda TA, Aguiar GB, et al. (2010) Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? – A case control study. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 386-392.
49. Costa DL, Rocha RL, Carvalho RM, Lima-Neto AS, Harhay MO, et al. (2013) Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathog Glob Health* 107: 78-87.
50. Varma N, Naseem S (2010) Hematologic changes in visceral leishmaniasis/kala azar. *Indian J Hematol Blood Transfus* 26: 78-82.
51. Thakur AK, Bimal S, Singh SK, Gupta AK, Das VN, et al. (2013) Degree of anemia correlates with increased utilization of heme by *Leishmania donovani* parasites in visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol* 135: 595-598.
52. Sun CC, Vaja V, Babitt JL, Lin HY (2012) Targeting the Hepcidin-Ferroportin axis to develop new treatment strategies for anemia of chronic disease and anemia of inflammation. *Am J Hematol* 87: 392–400.
53. Nairz M, Haschka D, Demetz E, Weiss G (2014) Iron at the interface of immunity and infection. *Front Pharmacol* 5: 152.
54. Mizel SB (1989) The interleukins. *FASEB J* 3: 2379-2388.
55. Murray HW, Hariprashad J, Fichtl RE (1996) Models of relapse of experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 173: 1041-1043.
56. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19: 683-765.
57. Murphy ML, Wille U, Villegas EN, Hunter CA, Farrell JP (2001) IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol* 31: 2848-2856.

TABLE

Table 1: Models of linear regression analysis performed for hematological data and cytokines measurements, in VL patients (N=21) before specific treatment.

	Coef.	[95% conf. interval]	Std. err.	p	
Hemoglobin Adj. R-squared=0.38					
IL-6	-0.0040	-0.0075	-0.0005	0.0017	0.03
IL-2	-0.1330	-0.2402	-0.0257	0.0511	0.02
cons	8.9971	8.2000	9.7943	0.3794	0.00
Leukocytes Adj. R-squared=0.39					
IL-10	10.3676	2.1283	18.6069	3.9052	0.02
IL-6	-2.3799	-4.7929	0.0330	1.1436	0.05
IL-2	-91.1500	-161.4187	-20.8813	33.3056	0.01
cons	1861.771	1285.371	2438.171	273.1992	0.00

FIGURES LEGENDS

Figure 1: Flowchart summarizing the study

Figure 2: Comparison between plasma cytokines concentration in patients with VL during active disease and after treatment. Paired plasma levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL17A, TNF and IFN-gamma were measured by cytometry in plasma of VL patients before and after specific treatment (N= 12). The results are expressed as scattering of individual values and lines linking the same patient before and after treatment. Wilcoxon matched-pairs rank test was used. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Figure 3: Comparison between plasma cytokine concentration in patients with VL and in patients with VL and HIV co-infection. Plasma levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL17A, TNF and IFN-gamma were measured by cytometry in plasma of VL patients (N=14) and in patients with VL and HIV co-infection (N=7), before specific treatment. The results are expressed as scattering of individual values and lines represent median with interquartile range. Mann-Whitney test was used. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Figure 4: Comparison between plasma cytokine concentration in patients with VL stratified by outcome. Plasma levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL17A, TNF and IFN-gamma were measured by cytometry in plasma of VL patients who died (N=3) and in patients who didn't die (N=18), before specific treatment. The results are expressed as scattering of individual values and lines represent median with interquartile range. Mann-Whitney test was used. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

FIGURES

Figure 1

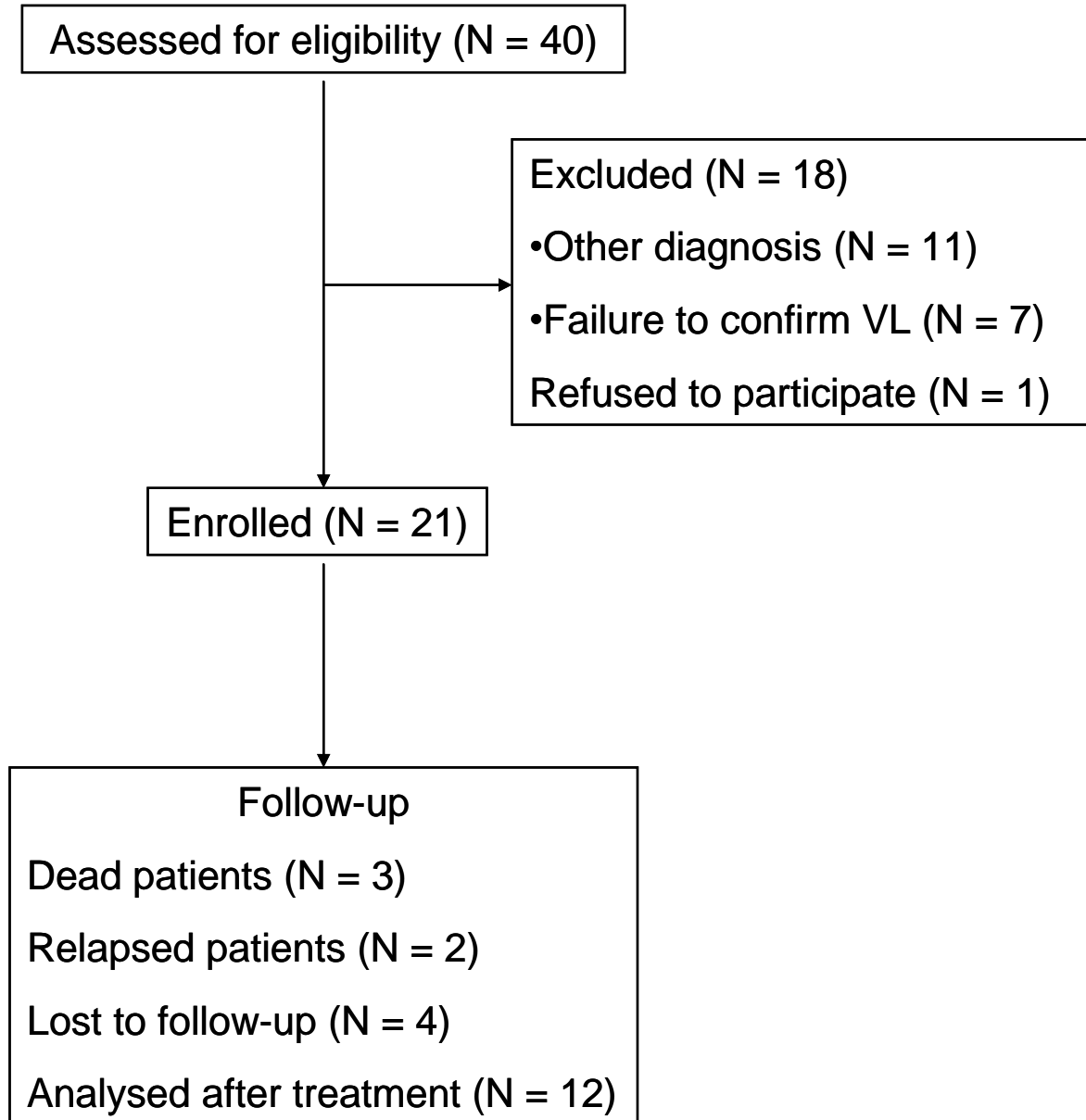


Figure 2

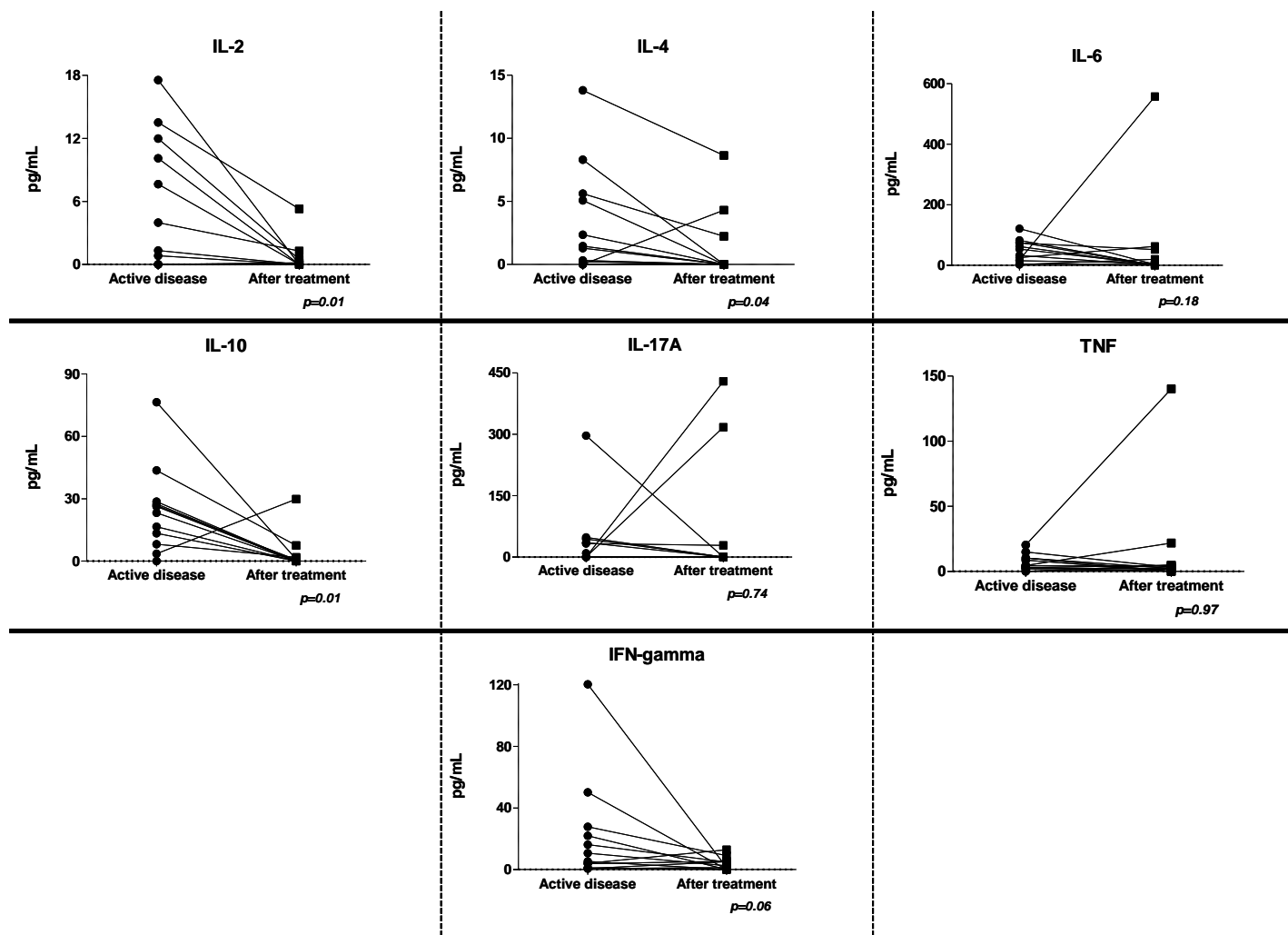


Figure 3

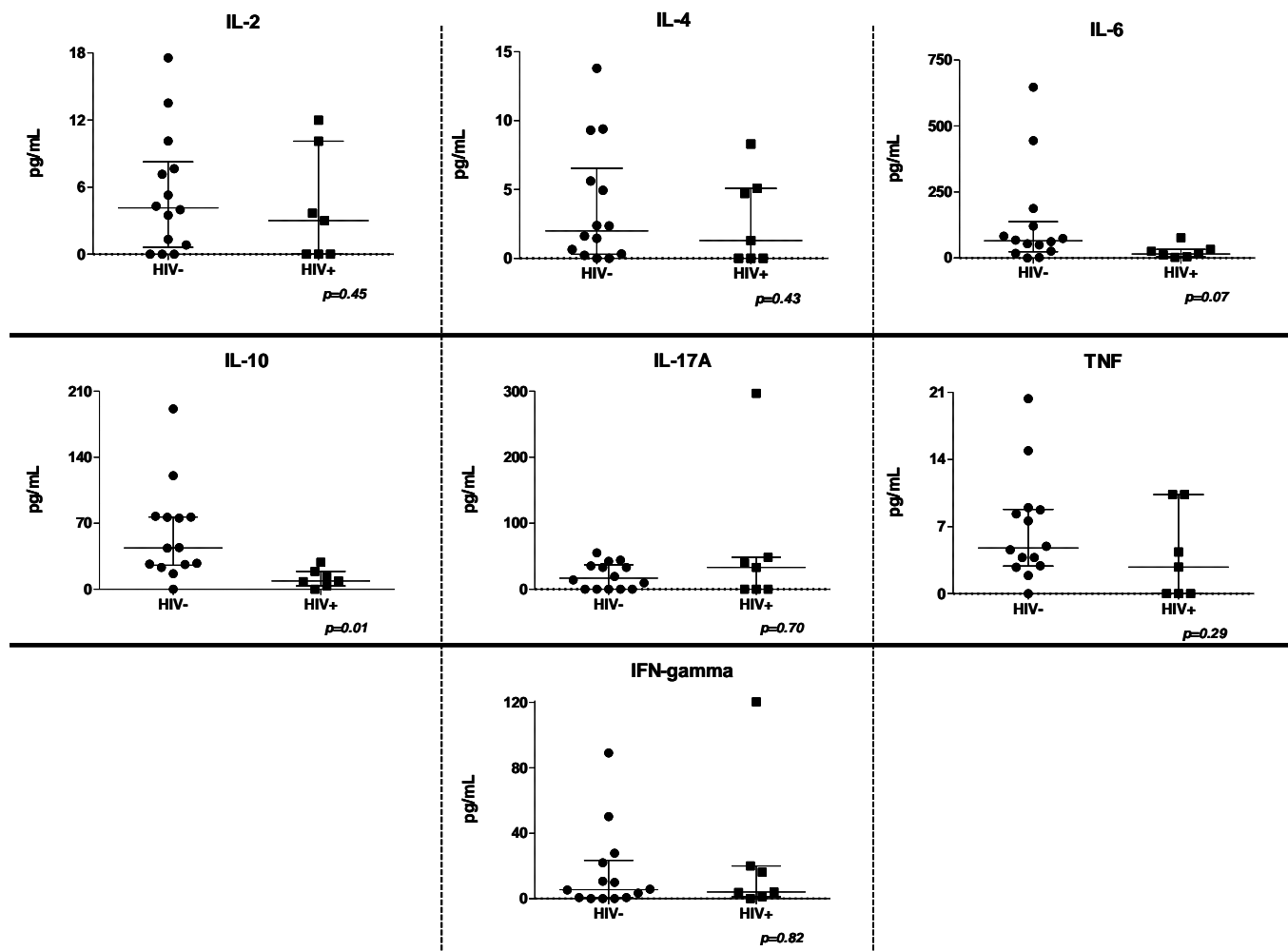
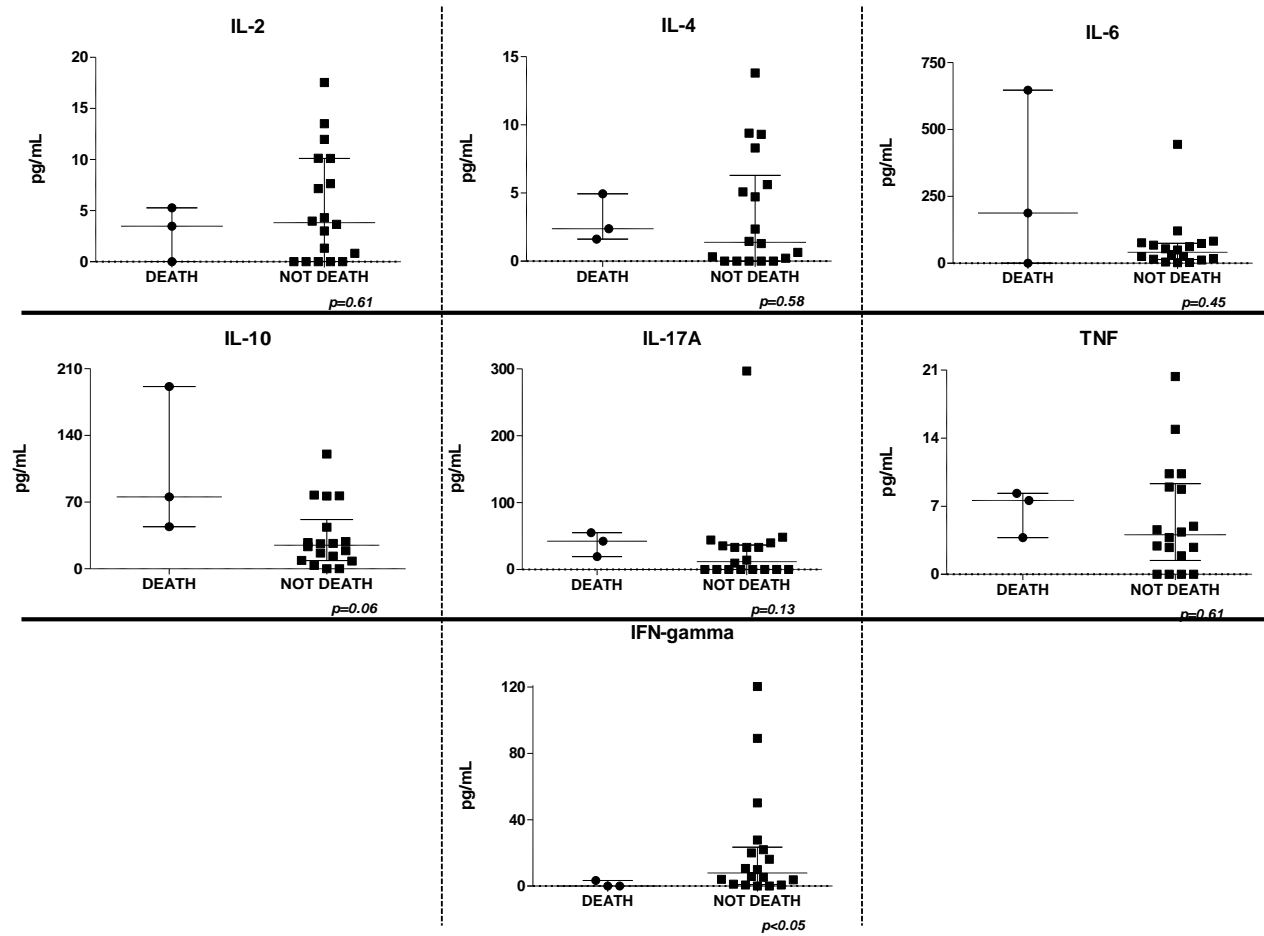


Figure 4



6 CONCLUSÕES

Os pacientes com LV ativa apresentam maiores concentrações plasmáticas de IL-2, de IL-4 e de IL-10 antes do tratamento específico que após o tratamento. Não houve diferença significativa nas dosagens plasmáticas de IL-6, de IL-17A, de TNF e de IFN-gama antes e após o tratamento da LV.

Os pacientes coinfectados com HIV e com LV apresentaram, na análise univariada, menores níveis plasmáticos de IL-10 que os pacientes com LV sem coinfeção com HIV. Entretanto, essa diferença não se manteve na análise multivariada ($p=0,06$). Não houve diferença significativa nas concentrações plasmáticas de IL-2, de IL-4, de IL-6, de IL-17A, de TNF ou de IFN-gama entre os pacientes com LV coinfectados ou não com HIV.

Os pacientes com LV que evoluíram para óbito apresentaram menores dosagens plasmáticas de IFN-gama que aqueles que não evoluíram para o óbito, na análise univariada. Não houve diferença significativa nos níveis plasmáticos de IL-2, de IL-4, de IL-6, de IL-10, de IL-17A ou de TNF entre os pacientes que evoluíram ou não para óbito.

A presença de sangramentos foi associada a menores dosagens plasmáticas de IFN-gama e a presença de icterícia foi associada a maiores níveis de IL-10 na análise univariada. Tais achados não se mantiveram na análise multivariada. Não houve associação entre a presença de dispneia e nenhuma das citocinas estudadas.

Houve associação negativa entre a hemoglobina e os níveis plasmáticos de IL-2 e de IL-6. Observou-se associação positiva entre a contagem de leucócitos e as dosagens de IL-10 e associação negativa entre a os leucócitos e os níveis de IL-2 e de IL-6. Não houve associação entre as citocinas estudadas e o número de plaquetas.

7 CONSIDERAÇÕES

O maior limitador do presente estudo foi o número de pacientes avaliados. Apesar de adequado à comparação de pacientes antes e após o tratamento específico e também adequado à avaliação das citocinas em pacientes coinfectedados ou não pelo HIV, a variabilidade das dosagens de citocinas em humanos é grande, por isso, amostras maiores poderiam corroborar de forma mais concreta os resultados encontrados. Inclusive poderiam permitir que se mantivessem algumas associações encontradas na análise univariada que não se mantiveram nas análises multivariadas.

Apesar do tamanho da amostra não ter sido calculado para a avaliação da associação entre as citocinas e os achados clínicos e laboratoriais e à gravidade na LV, devido à escassez de estudos na literatura, optamos por realizar as análises e discutir os resultados, uma vez que estes apresentam grande plausibilidade biológica.

O presente estudo abre perspectivas para outros novos, no que se refere à relação entre as citocinas e à sua participação nos achados clínicos e laboratoriais de pacientes com LV. Em especial, destaca-se o papel das citocinas na fisiopatologia de diversos achados como, por exemplo, sua participação na anemia dos pacientes com LV, antes considerada quase exclusivamente como secundária ao hiperesplenismo.

O estudo também reforça a possibilidade de que a IL-10 e outras citocinas ou subpopulações celulares específicas estejam envolvidas na grande frequência de recidivas da LV em pacientes com LV coinfectedados com HIV.

Apesar dos resultados encontrados no presente trabalho, muito ainda há de se pesquisar para avaliar o papel das citocinas nas doenças infecciosas e sua potencial participação na gravidade da apresentação das doenças.

REFERÊNCIAS

de ALMEIDA, A.S.; MEDRONHO, R.A.; WERNECK, G.L. Identification of Risk Areas for Visceral Leishmaniasis in Teresina, Piauí State, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.84, n.5, p.681–687, 2011.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v.7, n.5, p.e35671, maio 2012.

ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v.20, n.1, p.259-265, 2004.

ANSARI, N.A.; SALUJA, S.; SALOTRA, P. Elevated levels of interferon- γ , interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. **Clinical Immunology**, v.119, p.339-345, mar. 2006.

de ARAÚJO, V.E.M. et al. Early clinical manifestations associated with death from visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.6, n.2, p.e1511, fev. 2012.

ARCE, A. et al. Reemergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. **European Surveillance**, v.18, n.30, pii=20546, jul. 2013.

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

BACELLAR, O. et al. IL-17 production in patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v.200, n.1, p.75–78, jul. 2009.

BADARÓ, R. et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v.154, n.4, p.639-649, out. 1986a.

BADARÓ, R. et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v.154, n.6, p.1003-1011, dez. 1986b.

BARAL-NETTO, M. et al. Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v.163, n.4, p.853-857, abr. 1991.

BELO HORIZONTE. Vigilância em Saúde. **Boletim de vigilância em saúde**. Belo Horizonte, set. 2012.

BIEDERMANN, T. et al. IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. **Nature Immunology**, v.2, n.11, p.1054-1060, nov. 2001.

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Interferon- γ : a historical perspective. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.20, p.97–113, 2009.

BODAS, M. et al. Inhibition of IL-2 induced IL-10 production as a principle of phase-specific immunotherapy. **The Journal of Immunology**, v.177, p.4636–4643, 2006.

BOSSOLASCO, S. et al. Lack of immune recovery in HIV/Leishmania co-infection treated with human recombinant IL-2. **AIDS**, v.21, n.9, p.1223-1225, 2007.

BRASIL. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2003.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

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

_____. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. DATASUS. Sistema de Informações de Agravos de Notificação – SINAN. **Leishmaniose visceral – casos confirmados notificados no sistema de informações de agravos de notificação – SINAN Net**. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>, Acesso em: 30 set 2014.

BUNN-MORENO, M.M. et al. Hypergammaglobulinaemia in *Leishmania donovani* infected hamsters: possible association with a polyclonal activator of B cells and with suppression of T cell function. **Clinical experimental Immunology**, v.59, p.427-434, 1985.

BURZA, S. et al. Visceral Leishmaniasis and HIV Co-infection in Bihar, India: Long-term Effectiveness and Treatment Outcomes with Liposomal Amphotericin B (AmBisome). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.8, p.e3053, ago. 2014.

CALDAS, A. et al. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC Infectious Diseases**, v.19, n.5, p.113-121, dez. 2005.

CANNONS, J.C; LU, K.T.; SCHWARTZBERG, P.L. T follicular helper cell diversity and plasticity. **Trends Immunology**, v.34, n.5, p.200–207, maio 2013.

CARVALHO, E.M. et al. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Investigation**, v.76, n.6, p.2066-2069, dez. 1985.

CENINI, P. et al. Mononuclear cell subpopulations and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. **Journal of infectious diseases**, v. 168, n.4, p.986-993, out. 1993.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v.5, n.11, p.873-882, nov. 2007.

CHICHARRO, C. et al. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. **European Surveillance**, v.18, n.30, pii=20545, jul. 2013.

COLLIN, S. et al. Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in Southern Sudan. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p.612–9, mar. 2004.

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

COSTA, A.S.A. et al. Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, n.6, p.735-739, set. 2012.

COSTA, D.L. et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. **Pathogens and Global Health**, v.107, n.2, p.78-87, 2013.

COTA, G.F.; de SOUSA, M.R., RABELLO, A. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-infected patients: a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.5, n.6, p.e1153, jun. 2011.

COTA, G.F. et al. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.6, n.5, p.e1665, maio 2012.

COTA, G.F. et al. Efficacy of anti-leishmania therapy in visceral leishmaniasis among HIV infected patients: a systematic review with indirect comparison. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.5, p.e2195, maio 2013.

CROFT, S.L.; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Current Pharmaceutical Design**, v.8, n.4, p.319-342, 2002.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v.72, n.2, p.132-141, abr. 2002.

DANTAS-TORRES, F. Current epidemiological status of visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v.40, n.3, p.537-541, 2006.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.95, n.3, p.239-243, maio/jun. 2001.

_____. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.27, n.5, p.305-318, set. 2004.

DRUMOND, K.O.; COSTA, F.A.L. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v.53, n.1, p.3-11, jan./fev. 2011.

DUBE, B. et al. Platelet function studies in Indian kala-azar. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.98, n.3, p.166-168, jun. 1995.

DUFOUR, C. et al. TNF- α and IFN- γ are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF- α suppresses erythropoiesis in vitro. **Blood**. v.102, n.6, p.2053-2059, set. 2013.

DUTHIE, M.S. et al. Alteration of the serum biomarker profiles of visceral leishmaniasis during treatment. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.33, p.639–649, 2014.

ELSHAFIE, A.I. et al. Activity and turnover of eosinophil and neutrophil granulocytes are altered in visceral leishmaniasis. **International Journal for Parasitology** v.41, p.463–469, 2011.

ENGWERDA, C.R. et al. Distinct roles for lymphotoxin- α and tumor necrosis factor in the control of *Leishmania donovani* infection. **American Journal of Pathology**, v.165, n.6, p.2123-2133, dez. 2004.

ETTINGER, N.A.; WILSON, M.E. Macrophage and T-Cell gene expression in a model of early Infection with the protozoan *Leishmania chagasi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.2, n.6, p.e252, jun. 2008.

FERNANDEZ-GUERRERO, M.L. et al. Visceral leishmaniasis in immunocompromised patients with and without AIDS: a comparison of clinical features and prognosis. **Acta Tropica**, v. 90, p.11-16, mar. 2004.

GAMA, M.E.A. et al. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.8, p.889- 893, dez. 2004.

GAMA, M.E.A. et al. Severe visceral leishmaniasis in children: the relationship between cytokine patterns and clinical features. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.46, n.6, p.741-745, nov./dez. 2013.

GANTT, K.R. et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **The Journal of Immunology**, v.167, p.893–901, jul. 2001.

GARG, R. et al. *Leishmania infantum* amastigotes enhance HIV-1 production in cultures of human dendritic cells and CD4+ T cells by inducing secretion of IL-6 and TNF- α . **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.3, n. 5, p.e441, maio 2009.

GHOSH, K. et al. Successful therapy of visceral leishmaniasis with curdlan involves T-helper 17 cytokines. **The Journal of Infectious Diseases**, v.207, p.1016–25, mar. 2013.

GONZALEZ-LOMBANA, C. et al. IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. **PLoS Pathogens**, v.9, n.3, p.e1003243, mar. 2013.

GORDON, S.; MARTINEZ, F.O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v.32, p.593-604, maio 2010.

GRAMICCIA, M. et al. The burden of visceral leishmaniasis in Italy from 1982 to 2012: a retrospective analysis of the multi-annual epidemic that occurred from 1989 to 2009. **European Surveillance**, v.18, n.29, pii=20535, jul. 2013.

van GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v.26, p.309–322, jun. 2012.

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

HAILU, A. et al. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. **Clinical Immunology**, v.117, n.2, p.182-191, nov. 2005.

HARHAY, M.O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v.27, n.9, p.403-409, set. 2011.

HEINRICH, P.C. et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochemica Journal**, v.374, p.1–20, ago. 2003.

ter HORST, R. et al. Concordant HIV infection and visceral leishmaniasis in Ethiopia: The influence of antiretroviral treatment and other factors on outcome. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, p.1702–1709, jun. 2008.

HURISSA, Z. et al. Clinical characteristics and treatment outcome of patients with visceral leishmaniasis and HIV co-infection in northwest Ethiopia. **Tropical Medicine and International Health**, v.15, n.7, p.848–855, jul. 2010.

JULL, S. **An introduction to Stata for health researchers**. 2^o Ed. 2008, Texas, College Station, United States. A Stata press publication.

KHALIL, E.A.G. et al. Epidemiology and clinical manifestations of *Leishmania donovani* infection in two villages in an endemic area in eastern Sudan. **Tropical Medicine and International Health**, v.7, n.1, p.35-44, jan. 2002.

KHALIL, E.A.G. et al. Safety and efficacy of single dose versus multiple doses of AmBisome for treatment of visceral leishmaniasis in Eastern Africa: A randomised trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.1, p.e2613, jan. 2014.

KHARAZMI, A. et al. T-cell response in human leishmaniasis. **Immunology Letters**, v.65, p.105-108, jan. 1999.

KINRA, P.; DUTTA, V. Serum TNF alpha levels: a prognostic marker for assessment of severity of malaria. **Tropical Biomedicine**, v.30, n.4, p.645–653, dez. 2013.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 cells. **Annual Review of Immunology**, v.27, p.485–517, 2009

KRITIKOS, K. et al. An atypical presentation of visceral leishmaniasis infection in a patient with rheumatoid arthritis treated with infliximab. **Journal of Clinical Rheumatology**, v.16, n.1, p.38-39, jan. 2010.

KUMAR, D. et al. Comparative evaluation of blood and serum samples in rapid immunochromatographic tests for visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, n.12, p.3955–3959, dez. 2013.

KURKJIAN, K.M. et al. Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. **Cytometry Part A** v. 69A, p.353–358, maio 2006

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.8, p.811-827, dez. 2005.

de LEONARDIS, F.; GOVONI, M.; lo MONACO, A.; TROTTA, F. Visceral leishmaniasis and anti-TNF-alpha therapy: case report and review of literature. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v.27, n.3, p.503-506, maio/jun. 2009.

de LIMA, V.M.; PEIRO, J.R.; de OLIVEIRA VASCONCELOS, R. IL-6 and TNF-alpha production during active canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.115, n.1-2, p.189-93, jan. 2007.

LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **PNAS** v.104, n.2, p.9375-9380, maio 2007.

MAIA, Z. et al. Comparative study of rK39 leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.6, n.1, p.e1484, jan. 2012.

MATHERS, C.D.; EZZATI M.; LOPEZ, A.D. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.1, n.2, p.e114, nov. 2007.

MCCALL, L-I.; ZHANG, W-W.; MATLASHEWSKI, G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. **PLoS Pathogens**, v.9, n.1, p.e1003053, jan. 2013.

MEDRANO, F.J. et al. Dynamics of serum cytokines in patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v.114, p.403–407, dez. 1998.

MELO, E.C.; FORTALEZA, C.M.C.B. Challenges in the therapy of visceral leishmaniasis in Brazil: a public health perspective. **Journal of Tropical Medicine** v.2013, article ID 319234.

MIRALLES, G.D. et al. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v.62, n.3, p.1058-1063, mar. 1994.

MOLINET, F.J.L. et al. Specificity of the rapid rK39 antigen-based immunochromatographic test Kalazar Detect® in patients with cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.108, n.3, p.293-296, maio 2013.

MONDAL, S. et al. A curative immune profile one week after treatment of Indian kala-azar patients predicts success with a short-course liposomal Amphotericin B therapy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.4, n.7, p.e764, jul. 2010.

MONGE-MAILLO, B; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Therapeutic options for visceral leishmaniasis. **Drugs**, v.73, p.1863–1888, out. 2013.

MOORE, K.W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor **Annual Reviews of Immunology**, v.19, p.683–765, 2001.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends of Parasitology**, v.18, n.9, p.399-405, set. 2002.

MORENO, E.C. et al. Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.5, p.421-427, set./out. 2006.

MURPHY, M.L. et al. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. **European Journal of Immunology**, v.31, p.2848–2856, out. 2001.

MURRAY, H.W.; HARIPRASHAD, J.; FICHTL, R.E. Models of relapse of experimental visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.173, p.1041-1043, 1996.

MURRAY, H.W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Experimental Pathology**, v.82, p.249-267, out. 2001.

MURRAY, H.W. Accelerated control of visceral *Leishmania donovani* Infection in interleukin-6-deficient mice. **Infection and immunity**, v.76, n.9, p.4088-4091, set, 2008.

MURRAY, H.W. et al. Role and effect of IL-2 in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v.151, n.2, p.929-938, jul. 1993.

MURRAY, H.W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v.366, n. 9496, p.1561-1577, out. 2005.

NAIRZ, M. et al. Iron at the interface of immunity and infection. **Frontiers in Pharmacology**, v.16, n.5, p.e.152, jul. 2014.

NIGRO, L. et al. *In vitro* production of type 1 and type 2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells from subjects coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania infantum*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.60, n.1, p.142-145, jan. 1999.

NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends of Immunology**, v.28, n.9, p.378-384, set. 2007.

OLLIARO, P.L. et al. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980–2004. **Lancet Infectious Diseases**, v.5, p.763–74, dez. 2005.

OUYANG, W.; KOLLS, J.K.; ZHENG, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. **Immunity**, v.28, p.454-467, abr. 2008.

OSMAN, O.F.; KAGER, P.A.; OSKAM, L. Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects. **Tropical Medicine and International Health**, v.5, n.8, p.553-562, ago. 2000.

PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v.20, n.2, p.87–103, 2010.

PARK, H.J. et al. Insights into the role of follicular helper T cells in autoimmunity. **Immune Network**, v.14, n.1, p.21-29, fev. 2014.

PAUL, W.E.; ZHU, J. How are TH2-type immune responses initiated and amplified? **Nature Review Immunology**, v.10, n.4, p.225–235, abr. 2010.

PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.22, n.1, p.1-13, jan. 1996.

PEDRAS, M.J. et al. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, p.172—178, fev. 2008.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V. et al. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile

and disease outcome. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.62, n.5, p.487-495, nov. 2005.

PERUHYPE-MAGALHÃES, 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. **Clinical Experimental Immunology**, v.146, n.1, p124-132, out. 2006.

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

van der POLL, T.; ZIJLSTRA, E.E.; MEVISSSEN, M. Interleukin 6 during active visceral leishmaniasis and after treatment. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.77, n.1, p.111-114, out. 1995.

RAI, A.K. et al. Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic site of human visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v.7, n.2, p.e31551, fev, 2012.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n.1, p.143-148, 1998.

RITMEIJER, K. et al. Limited effectiveness of high-dose liposomal Amphotericin B (AmBisome) for treatment of visceral leishmaniasis in an ethiopian population with high HIV prevalence. **Clinical Infectious Diseases**, v.53, n.12, p.e152–58, dez. 2011.

SANTOS, M.A. et al. Predictors of an unsatisfactory response to pentavalent antimony in the treatment of American visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V.35, n.6, p.629-633, nov./dez. 2002.

SEAMAN, J. et al. Epidemic visceral leishmaniasis in Southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. **Annals of Internal Medicine**, v.124, n.7, p.664-67, abr. 1996.

SILVA, L.A. et al. Immunologic tests in patients after clinical cure of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, n.4, p.739–743, 2006.

SINHA, P.K. et al. Liposomal Amphotericin B for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-coinfected patients: 2-year treatment outcomes in Bihar, India. **Clinical Infectious Diseases**, v.53, n.7, p.e91–e98, out. 2011.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **Journal Vector Borne Diseases**, v.45, n.4, p.255-272, dez. 2008.

STÄGER, S. et al. Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 Receptor signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. **Infection and Immunity**, v.71, n.8, p.4804–4807, ago. 2003.

STÄGER, S. et al. Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against *Leishmania donovani* and the expansion of IL-10+ CD4+ T cells. **European Journal of Immunology**, v.36, p.1764–1771, 2006.

SUN, C.C. et al. Targeting the Hecpidin-Ferroportin axis to develop new treatment strategies for anemia of chronic disease and anemia of inflammation. **American Journal of Hematology**, v.87, n.4, p.392–400, abr. 2012.

SUNDAR, S.; et al. Single-dose liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in India: a multicenter study. **Clinical Infectious Diseases**, v.37, n.6, p.800-804, set. 2003.

SUNDAR, S. et al. Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.100, n.6, p.533-537, jun. 2006.

THAKUR, A.K. et al. Degree of anemia correlates with increased utilization of heme by *Leishmania donovani* parasites in visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v.135, p.595–598, 2013.

VARMA, N.; NASEEM, S. Hematologic changes in visceral leishmaniasis/kala azar. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 26, n.3j p.78–82, jul./set. 2010.

VERMA, S. et al. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 levels correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. **PLOS ONE**, v.5, n.4, p.e10107, abr. 2010.

VINUESA, C.G.; SANZ, I.; COOK, M.C. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. **Nature Reviews. Immunology**, v.9, n.12, p.845-57, dez. 2009.

WERNECK, G.L. et al. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Infection**, v.31, n.3, p.174–177, jun. 2003.

WILHELM, P. et al. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. **The Journal of Immunology**, v.166, p.4012–4019, mar. 2001.

WHO. World Health Organization. **Sixtieth World Health Assembly – Resolutions and decisions**. Geneva, 2007.

YURDAKUL, P. et al. Compartment-specific remodeling of splenic micro-architecture during experimental visceral leishmaniasis. **The American Journal of Pathology**, v.179, n.1, p.23-29, jul. 2011.

ZWINGENBERGER, K. et al. Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis: evidence for predominance of endogenous interleukin 4 over interferon- γ production. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.57, p.242-249, nov. 1990.

APÊNDICES

APÊNDICE A – PROTOCOLO DE PESQUISA

PROTOCOLO LEISHMANIOSE VISCERAL

Parte 1 - Identificação

1.1 Nome: _____	
1.2 Número de registro na pesquisa: _____	□ □ □ □
1.3 Hospital: HC – 1 HIJPII – 2 HEM – 3	□
1.4 Número do prontuário: _____	□ □ □ □ □ □ □ □
1.5 Data de Nascimento: ____/____/____	□ □ □ □ □ □ □ □
1.6 Idade completa em anos até a data da entrevista: _____	□ □
1.7 Município onde reside atualmente: _____ UF ____	□ □ □ □ □ □ □ □
1.8 Endereço: _____	□ □ □ □ □ □ □ □
1.9 Telefone: _____	□ □ □ □ □ □ □ □
1.10 Telefone: _____	□ □ □ □ □ □ □ □
1.11 Profissão: _____	□ □ □ □
1.12 Sexo: Masculino – 1 Feminino – 2	□
1.13 Naturalidade: _____ UF ____	□ □ □ □ □ □ □ □

Parte 2 – Diagnóstico

2.1 Teste rápido: Positivo – 1 Negativo – 2 Não realizado - 9	□
2.2 RIFI: Positivo – 1 Negativo – 2 Não realizado - 9	□
A - Título: _____	□ □ □ □ □
2.3 ELISA: Positivo – 1 Negativo – 2 Não realizado - 9	□
2.4 Mielograma: Positivo – 1 Negativo – 2 Não realizado - 9	□
A – Laudo: _____	

2.5 Cultura: Positivo – 1 Negativo – 2 Não realizado - 9	□

3.23 Neutropenia: Sim – 1 Não – 2	<input type="checkbox"/>
A – Contagem de neutrófilos: _____/mm ³	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
3.24 ALT ou AST > 100U/L Sim – 1 Não – 2	<input type="checkbox"/>
3.25 Infecção prévia: Sim – 1 Não – 2	<input type="checkbox"/>
A – Qual: _____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
3.26 Sangramentos (exceto epistaxe): Sim – 1 Não – 2	<input type="checkbox"/>
A – Qual: _____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
3.27 Comorbidades: Sim – 1 Não – 2	<input type="checkbox"/>
A – Qual: _____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
3.28 Outros: _____	
3.29 Duração da febre após início do tratamento (dias): ____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

Parte 4 – Tratamento	
4.1 Droga: _____	<input type="checkbox"/>
A – Dose diária: _____mg/dia	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
B – Dose por peso: _____mg/Kg/dia	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
C – Dose acumulada a suspensão da droga: _____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
D – Data de início do uso: ____/____/____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
E – Data do término do uso: ____/____/____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
F – Tempo de uso: ____ dias	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
G – Via de administração: VO – 1 IM – 2 IV – 3	<input type="checkbox"/>
4.2 Droga: _____	<input type="checkbox"/>
A – Dose diária: _____mg/dia	
B – Dose por peso: _____mg/Kg/dia	
C – Dose acumulada a suspensão da droga: _____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
D – Data de início do uso: ____/____/____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
E – Data do término do uso: ____/____/____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
F – Tempo de uso: ____ dias	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
G – Via de administração: VO – 1 IM – 2 IV – 3	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>

Parte 5 – Efeitos colaterais	
Data de início:	
5.1 Náusea/vômitos: ___/___/___	_ _ _ _ _ _ _ _ _
5.2 Mialgia: ___/___/___	_ _ _ _ _ _ _ _ _
5.3 Cefaleia: ___/___/___	_ _ _ _ _ _ _ _ _
5.4 Anorexia: ___/___/___	_ _ _ _ _ _ _ _ _
5.5 Artralgia: ___/___/___	_ _ _ _ _ _ _ _ _
5.6 Dor abdominal: ___/___/___	_ _ _ _ _ _ _ _ _
5.7 Palpitações: ___/___/___	_ _ _ _ _ _ _ _ _
5.8 Parestesias: ___/___/___	_ _ _ _ _ _ _ _ _
5.9 Febre: ___/___/___	_ _ _ _ _ _ _ _ _
5.10 Rash: ___/___/___	_ _ _ _ _ _ _ _ _
5.11 Alterações do paladar: ___/___/___	_ _ _ _ _ _ _ _ _
5.12 Alterações comportamentais: ___/___/___	_ _ _ _ _ _ _ _ _
5.13 Insuficiência renal: ___/___/___	_ _ _ _ _ _ _ _ _
5.14 Pancreatite: ___/___/___	_ _ _ _ _ _ _ _ _
5.15 Cardiotoxicidade: ___/___/___	_ _ _ _ _ _ _ _ _
5.16 Distúrbio hidro-eletrolítico: ___/___/___	_ _ _ _ _ _ _ _ _
5.17 Mielotoxicidade: ___/___/___	_ _ _ _ _ _ _ _ _
5.18 Flebite: ___/___/___	_ _ _ _ _ _ _ _ _

Parte 6 – Evolução	
6.1 Tempo de acompanhamento: _____ meses	_ _
6.2 Cura – 1 Óbito – 2 Recidiva – 3	_

Parte 7 – Exames complementares							
DATA							
Hb							
Ht							
Htg							
Leucócitos							
Seg							
Bast							
Linf							
Eos							
Mono							
Baso							
At. Prot							
RNI							
AST							
ALT							
FA							
GGT							
Bb CVI							
Alb/Glob.							
Amilase							
Lipase							
Uréia							
Creatinina							
LDH							
ECG							
QTc							
ST							
Eco							
US abdome							
Baço							
Fígado							
TC abdome							
Baço							
Fígado							

ANEXOS

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 103.0.287.203/08

Interessado(a): Profa. Regina Lunardi Rocha
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Faculdade - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 15 de janeiro de 2009, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Resposta imunológica na leishmaniose visceral clinicamente manifesta, pré e pós tratamento, e na leishmaniose visceral inaparente"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG DA EXTENSÃO DO PROJETO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto nº. CAAE - 103.0.287.203-08

Interessado(a): **Profa. Regina Lunardi Rocha**
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 19 de dezembro de 2012, a extensão do projeto de pesquisa intitulado **"Resposta imunológica na leishmaniose visceral clinicamente manifesta, pré e pós tratamento, e na leishmaniose visceral inaparente"**.

A extensão é válida por dois anos (19 de dezembro de 2012 a 18 de dezembro de 2014).

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO C - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FHEMIG

FHEMIG
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DO
ESTADO DE MINAS GERAIS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

FUNDAÇÃO HOSPITALAR DO ESTADO DE MINAS GERAIS

PARECER Nº 123/2008

1 – Título:

"Resposta imunológica na leishmaniose visceral clinicamente manifesta, pré e pós tratamento, e na leishmaniose visceral inaparente"

Folha de Rosto: 224091

2 – Pesquisadores:

Pesquisadores: Regina Lunardi Rocha

Titulação: Médica – Doutora

Pesquisadores: Ricardo Luiz Fontes Moreira

Titulação: Médico – Especialista

Pesquisadores: Maria Vitória Assumpção Mourão

Titulação: Médica – Especialista

4 – Histórico:

Recebimento do projeto pelo CEP – 15 de outubro de 2008.

Recebimento do projeto pelo Parecerista – 15 de outubro de 2008.

Apresentação do projeto na Reunião do CEP – 13 de novembro de 2008.

Entrega do Relatório pelo Parecerista ao CEP – 18 de novembro de 2007.

5 – Resumo do estudo:

Visão Geral:

- A leishmaniose visceral é uma zoonose cuja incidência vem aumentando em Belo Horizonte e região metropolitana nos últimos anos, causando desde formas inaparentes de infecção até formas sintomáticas graves levando ao óbito. O estudo avaliará as diferenças no padrão de resposta imunológica nos casos com manifestação clínica e naqueles com infecção inaparente.

Objetivos:

- "Estudar a resposta imunológica em indivíduos com leishmaniose visceral manifesta e naqueles indivíduos infectados, porém com forma inaparente da doença."

Metodologia:

- Estudo de coorte com 10 pacientes com doença manifesta e 10 pacientes com infecção inaparente, de todas as faixas etárias, com diagnóstico realizado no Hospital das Clínicas/UFMG ou HJUPI/FHEMIG, no primeiro grupo e familiares ou vizinhos dos mesmos, no segundo grupo. Serão coletadas amostras de sangue para exame sorológico e dados de prontuário médico.

6 – Proteção dos Participantes:

- Esta pesquisa apresenta baixo risco, pois se baseia na aplicação de questionário;
- Esta pesquisa apresenta baixos riscos aos pacientes, pois a única intervenção realizada consiste na coleta de alíquota de sangue de 6 a 8 ml, por profissionais capacitados. - Os pesquisadores garantem o cumprimento da resolução 196/96.

- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE):

- O TCLE usa de linguagem clara e acessível tanto para paciente como para profissionais;
- Esclarece os possíveis riscos e benefícios;
- Deixa claro que o indivíduo tem liberdade para participar, recusar ou se retirar do trabalho a qualquer momento e sem nenhum prejuízo ou ônus;
- Esclarece que não haverá custo nem remuneração ao participante;
- Garante o sigilo e anonimato no tratamento das informações;
- Disponibiliza três contatos telefônicos para esclarecimentos de dúvidas.

7 – Considerações e Mérito:

- **Projeto:** Relevante, pertinente e de valor científico.
- **Metodologia:** Adequada para se alcançar o objetivo proposto.
- **Currículos:** Os pesquisadores apresentam currículo suficiente para a condução do trabalho
- **Cronograma:** Adequado
- **Folha de Rosto** Devidamente preenchida e assinada
- **Orçamento:** Adequado e de responsabilidade dos próprios pesquisadores
- **TCLE:** Adequado
- **Aspectos Éticos:** O projeto cumpre a Resolução 196/96 do CNS;

8 – Parecer:

APROVADO.

Belo Horizonte, 18 de Novembro de 2008.


Vanderson Assis Romualdo

Vice-coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO D – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FHEMIG DA EXTENSÃO E EMENDAS AO PROJETO

FHEMIG
 FUNDAÇÃO HOSPITALAR DO ESTADO DE MINAS GERAIS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
SOLICITAÇÃO DE ANÁLISE


FUNDAÇÃO HOSPITALAR DO ESTADO DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
SOLICITAÇÃO DE ANÁLISE

CEP/Comitê de Ética em Pesquisa - Alameda Águas
 Celso - Rua Elzevir - Belo Horizonte - MG - CEP
 30150-160 - (31) 3239-9332 - cep@fhemig.mg.gov.br

O CEP-FHEMIG recebeu Solicitação de Análise para documentos da pesquisa: "Resposta imunológica na Leishmaniose visceral clinicamente manifestada, pré e pós-tratamento, e na leishmaniose visceral inaparente".

-Pesquisadores Responsáveis: Regina Lunardi Rocha, Ricardo Luiz Fontes Moreira Maria Vitória Assumpção Mourão.

I. HISTÓRICO DO PROJETO Projeto aprovado em - 18.Nov.2008, com Parecer Nº123/2008; Solicitação de Extensão e Emendas recebidas em 30.Nov.2012.	CONSIDERAÇÕES DO CEP: - Neste ensejo peço desculpas aos pesquisadores pelo atraso na resposta. Quando do recebimento destas solicitações estava o Relatório Final do estudo anexo e, como este estava de acordo, não se fazia necessária nenhuma resposta ao NEP. Sendo assim todos os documentos foram arquivados, incluindo as solicitações de Extensão e Emendas. Após contato do NEP-HDPTII, esta falha foi detectada e o relatório enviado no mesmo dia.
II. SOLICITAÇÃO DE EXTENSÃO 01. Prolongamento da coleta de dados por mais dois anos;	CONSIDERAÇÕES DO CEP: - Solicitação devidamente encaminhada e justificada pois o estudo será base para obtenção do título de doutor junto a UFMG;
III. SOLICITAÇÃO DE EMENDAS 01. Inclusão de grupo de pacientes com doença clinicamente manifesta; 02. Alterações dos critérios de exclusão;	CONSIDERAÇÕES DO CEP: - Emenda devidamente justificada, devido ao aumento gradativo dos casos de leishmaniose visceral no Brasil; - Devidamente justificadas e geram maior rigor metodológico ao estudo;

Assinatura: 
 Regina Lunardi Rocha
 Coordenadora
 Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO E – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL EDUARDO DE MENEZES – FHEMIG

HOSPITAL EDUARDO DE MENEZES – HEM/FHEMIG
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO

1 IDENTIFICAÇÃO

Título do projeto: “Resposta imunológica na leishmaniose visceral clinicamente manifesta, pré e pós tratamento, e na leishmaniose visceral inaparente”.

Pesquisador responsável: Regina Lunardi Rocha (orientadora)

Pesquisador autorizados (doutorando): Ricardo Luiz Fontes Moreira

Instituição de origem: Universidade Federal de Minas Gerais

Instituições onde a pesquisa será realizada:

- Hospital das Clínicas da UFMG;
- Hospital Infantil João Paulo II – FHEMIG;
- Hospital Eduardo de Menezes – FHEMIG (solicitação atual de inclusão).

Área temática: Ciências da Saúde – Medicina – Nível Epidemiológico

OBSERVAÇÃO: Os pesquisadores vêm solicitar a extensão do projeto (aprovado em 2008 pelo CEP/FHEMIG e em 2009 pelo COEP/UFMG) e de suas emendas (aprovadas em 2013 por ambos os Comitês) devido à intenção de incluir pacientes atendidos no HEM na casuística de sua pesquisa (o pesquisador enfatiza a importância do HEM no contexto de atendimento aos pacientes com leishmaniose visceral em MG e resalta o fato de que trabalha como infectologista na instituição).

2 MARCO TEÓRICO E JUSTIFICATIVA

Dados do Ministério da Saúde têm demonstrado, nos últimos anos, aumento gradativo na letalidade da leishmaniose visceral no Brasil, passando de 3,4% em 1994 para 5,7% em 2009. Em Belo Horizonte, a letalidade da doença está próximo a 15%. Desta forma, os pesquisadores pretendem estudar a resposta imunológica dos pacientes com leishmaniose visceral clinicamente manifesta pré tratamento e avaliar a existência ou não de

algum marcador da resposta imunológica associado à gravidade da apresentação clínica da doença (mesmos objetivos essenciais e metodologia do projeto original, já aprovado).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar a resposta imunológica em indivíduos com leishmaniose visceral manifesta e naqueles indivíduos infectados, porém com forma inaparente da doença.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Estudar o padrão de resposta imunológica em pacientes com leishmaniose visceral sintomática antes do início do tratamento específico;
- b) Estudar o padrão de resposta imunológica em pacientes com leishmaniose visceral sintomática após o término do tratamento específico;
- c) Verificar a existência de diferença no padrão de resposta imunológica nos pacientes antes e após tratamento específico para leishmaniose visceral;
- d) Estudar o padrão de resposta imunológica nos indivíduos infectados que não desenvolveram forma sintomática da doença (leishmaniose visceral inaparente);
- e) Verificar a existência de diferenças no padrão de resposta imunológica entre os pacientes com leishmaniose visceral clinicamente manifesta e os indivíduos com forma inaparente da infecção.

5 METODOLOGIA

Desenho do estudo: estudo de caso controle.

Grupos estudados: Como **emenda** ao projeto, o presente estudo **não trabalhará com pacientes com a forma inaparente da doença**, correspondente ao grupo controle do projeto original. Como será mantido um grupo caso e um grupo controle, não haverá mudanças significativas na metodologia do projeto. Os grupos do novo projeto, portanto, são:

- Grupo1 ("casos"): Pacientes com leishmaniose visceral clinicamente manifesta, forma grave;

- Grupo2 ("controles"): Pacientes com leishmaniose visceral clinicamente manifesta, forma não-grave.

Coleta dos dados: os pacientes serão identificados através de busca ativa nas unidades de internação das instituições participantes e, posteriormente, serão acompanhados nos respectivos ambulatórios.

Todos os pacientes candidatos a participação no estudo serão submetidos a anamnese e exame clínico por um dos pesquisadores e serão verificados em prontuário os dados para confirmação dos critérios de inclusão e acompanhamento clínico. Os exames complementares para confirmação da leishmaniose visceral são realizados na rotina habitual dos pacientes com suspeita de leishmaniose. Caso necessário o diagnóstico sorológico poderá ser feito através de teste rápido para detecção de anticorpos contra leishmania do complexo *L. donovani* (Kalazar Detect TM Rapid Test – Inútilis), disponíveis com os pesquisadores.

Será realizada punção venosa de todos os pacientes para coleta de alíquota de sangue (6 mL) para a dosagem de citocinas e determinação por citometria de fluxo do padrão de resposta imunológica antes e após o término do tratamento. **Será feita estocagem de material biológico (plasma e células sanguíneas dos pacientes)** para estudo posterior, no Laboratório de Biologia das Interações Celulares (LBIC), no ICB/UFMG conforme a Resolução 347 de 13 de janeiro de 2005 do Conselho Nacional de Saúde. **Não serão solicitadas em decorrência da pesquisa exames complementares adicionais no acompanhamento dos pacientes;** serão coletados dados apenas dos exames solicitados pelos médicos assistentes na rotina habitual do acompanhamento a tais pacientes.

Como **emenda** ao projeto, os pesquisadores solicitam a **liberação para coleta de 2mL de aspirado de medula óssea nos pacientes cujos médicos assistentes tenham indicado a realização do aspirado de medula óssea**, justificando que a análise da resposta imunológica do material processado a partir desse sítio poderia trazer estar significativamente associado ao prognóstico da doença. O aspirado de medula óssea será utilizado na pesquisa somente se for indicada a punção de medula óssea pelo médico assistente. Não será realizada punção de medula óssea dos pacientes com o objetivo único da pesquisa. Os pesquisadores estão cientes dos possíveis riscos do procedimento e afirmam que tais informações passaram a constar no TCLE.

Critério de inclusão: Pacientes com quadro clínico compatível com leishmaniose visceral, antes do início do tratamento específico, e **diagnóstico confirmado de leishmaniose visceral por observação direta ou cultura positiva para o parasita** em aspirado de medula óssea, aspirado esplênico ou biópsia de medula óssea;

ou

Pacientes com quadro clínico e epidemiológico compatíveis com leishmaniose visceral, antes do início do tratamento específico, e **teste sorológico positivo para complexo *Leishmania donovani*, excluídos outros diagnósticos.**

Critérios de exclusão:

- Pacientes com leishmaniose visceral que já iniciaram tratamento específico;
- Pacientes em uso de drogas imunomoduladoras;
- Crianças com menos de dois anos de idade (NOVO critério, solicitado pela **emenda**, considerando que a alíquota total de sangue a ser retirada para a rotina, somada àquela para a pesquisa, poderia corresponder a um grande volume para crianças dessa faixa etária).

No projeto original, havia também os critérios abaixo, mas **foi solicitada na emenda a retirada dos mesmos**, alegando que vários correspondem a comorbidades que podem interferir na gravidade dos casos, que é determinante para separar os grupos do estudo:

- Indivíduos com sinais ou sintomas de outras doenças infecciosas não relacionadas à leishmaniose visceral, exceto infecção bacteriana secundária a leishmaniose visceral;
- Pacientes com insuficiência renal crônica IV ou V;
- Pacientes com diabetes mellitus descontrolado;
- Pacientes com insuficiência hepática descompensada.

Cálculo amostral: segundo projeto inicial, o cálculo amostral, baseado nos dados da literatura, indica um número de aproximadamente 10 pacientes em cada grupo.

Análise e apresentação dos dados: A análise dos dados será feita após o término da coleta de dados (planejamento do projeto inicial: 12 meses), por um período de três meses. Os dados serão armazenados em banco de dados e analisados utilizando o programa EPI-INFO versão 3.3.2. Será utilizado o teste Qui-quadrado para variáveis paramétricas, dicotômicas e análise de variância para comparação de médias. O nível de significância estatística será de $p < 0,05$.

Aspectos éticos: foram assegurados o sigilo e a integridade da população do estudo. O projeto original foi aprovado pelo CEP-FHEMIG em 20 de novembro de 2008, registro CEP/FHEMIG 123/08, CAAE: 0103.0.287.203-08 e pelo COEP-UFMG em 15 de janeiro de 2009, parecer no. ETIC 103.0.287.203/08. A solicitação de extensão do projeto e de suas emendas foram analisadas e aprovadas pelo CEP/FHEMIG em 14 de fevereiro de 2013, e pelo COEP-UFMG, ficando pendente, apenas, o parecer do CEP do Hospital Eduardo de Menezes.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE: linguagem fácil e acessível, expõe com clareza possíveis riscos da participação no estudo e deixa claro o caráter voluntário da mesma. Telefones de contato dos pesquisadores e dos Comitês de Ética estão em evidência. Há um termo para adultos, um para crianças menores de 6 anos de idade, outro para 7 a 12 anos, outro para 13 a 17 anos (esses três últimos para serem assinados por um responsável legal) e outro para ser assinado pelos jovens de 13 a 17 anos, desde que alfabetizados.

Riscos: a técnica para coleta de sangue para a determinação do padrão de resposta imunológica é idêntica à técnica utilizada para exames de sangue comuns, sendo mínimos os riscos para o paciente; podem surgir pequeno hematoma e dor leve momentânea no local da punção. Para coleta do aspirado de medula óssea, é comum dor ou algum desconforto transitório durante o procedimento. Quando realizada em manúbrio esternal, caso a punção ultrapasse a tábua óssea interna, pode-se atingir o esôfago; e quando realizado em crista ilíaca pósterio-superior, caso a punção ultrapasse a tábua óssea interna, pode-se atingir alças intestinais. Complicações graves como as descritas acima são extremamente raras, com frequência de aproximadamente 0,05%. Ressalta-

se que tal exame só será realizado quando houver indicação pelo médico assistente, o mesmo não será feito para fins exclusivos da pesquisa.

Benefícios: o projeto contribuirá diretamente para o maior entendimento da resposta imunológica e da gravidade da evolução com a leishmaniose visceral.

Publicação dos resultados: compromisso em publicar os resultados, favoráveis ou não. O projeto original era para dissertação de Mestrado e a solicitação de extensão e suas emendas são para a elaboração de tese de Doutorado.

Cronograma: prevê o início da coleta dos dados após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa. ...

Orçamento: Os exames complementares diagnósticos e de acompanhamento dos pacientes com suspeita de leishmaniose visceral são realizados na rotina de atendimento habitual a tais pacientes nas instituições participantes, não acarretando gasto adicional às mesmas. Não serão solicitados exames complementares adicionais decorrentes da pesquisa no acompanhamento dos pacientes.

Os testes rápidos Kalazar Detect™ serão feitos com kits e materiais (agulhas, seringas, tubos para coleta de sangue, luvas...) adquiridos previamente pelos pesquisadores com recursos próprios dos mesmos.

As dosagens de citocinas e a citometria de fluxo serão realizadas em colaboração com o Laboratório de Biologia das Interações Celulares (LBIC), coordenado pela Dra. Walderez Ornelas Dutra, no ICB-UFMG, onde são feitas rotineiramente tais análises, não acarretando ônus adicional às instituições participantes.

Os pesquisadores não receberão remuneração específica para este estudo.

Conflitos de interesse: não há.

6 PARECER

Os pesquisadores vêm solicitar a extensão do projeto (aprovado em 2008 pelo CEP/FHEMIG e em 2009 pelo COEP/UFMG) e de suas emendas (aprovadas em 2013 por ambos os Comitês) devido à intenção de incluir pacientes atendidos no HEM na casuística de sua pesquisa e a realização de algumas modificações nos objetivos e metodologia, adequando o projeto original, que era de uma dissertação de Mestrado, para a elaboração de uma tese de Doutorado.

O estudo proposto tem grande valor científico, dada a relevância da Leishmaniose Visceral no Brasil, e seus objetivos são indiscutivelmente relevantes. A metodologia é exequível e apropriada aos objetivos propostos, e as alterações em relação ao projeto original são pequenas e não interferem na sua exequibilidade e adequação. O TCLE é muito completo, tem linguagem acessível e é bem redigido. Os possíveis benefícios envolvem a avaliação da existência ou não de marcadores da resposta imunológica associados à gravidade de apresentação clínica da doença.

Assim, proponho a aprovação da solicitação de extensão e emendas do projeto. Solicito o envio de relatório semestral para o CEP para acompanhar o andamento do mesmo.

Belo Horizonte, 12 de junho de 2013.



Jader Bernardo Campomizzi

Coordenador do CEP/Hospital Eduardo de Menezes – FHEMIG