

**VANESSA VIANA CARDOSO**

**MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, LABORATORIAIS E A  
FUNÇÃO DOS FAGÓCITOS EM CRIANÇAS COM  
LEISHMANIOSE VISCERAL TRATADAS COM  
GLUCANTIME**

*DISSERTAÇÃO DE MESTRADO*

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Brasília-DF

2007

**VANESSA VIANA CARDOSO**

**MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, LABORATORIAIS E A  
FUNÇÃO DOS FAGÓCITOS EM CRIANÇAS COM  
LEISHMANIOSE VISCERAL TRATADAS COM  
GLUCANTIME**

BRASÍLIA – DF

2007

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, LABORATORIAIS E A  
FUNÇÃO DOS FAGÓCITOS EM CRIANÇAS COM  
LEISHMANIOSE VISCERAL TRATADAS COM  
GLUCANTIME**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em Medicina  
Tropical da Universidade de Brasília, como  
requisito para obtenção do título de Mestre em  
Medicina Tropical.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARIA IMACULADA MUNIZ BARBOZA JUNQUEIRA

BRASÍLIA – DF

2007



**“De tudo ficaram três coisas...  
A certeza de que estamos começando...  
A certeza de que é preciso continuar...  
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de  
terminar...**

**Façamos da interrupção, um caminho novo...  
Da queda, um passo de dança...  
Do medo, uma escada...  
Do sonho, uma ponte...  
Da procura, um encontro!”**

**Fernando Sabino**

# DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Sandra e João, por fazerem parte de todas as etapas da minha vida com muito carinho, amor e dedicação.

Ao meu noivo, Nelson, pelo intenso amor, dedicação, compreensão e cumplicidade.

À minha irmã Juliana e irmão Cláudio pelo carinho, amor e amizade.

À Minha orientadora, Doutora Maria Imaculada, pelo apoio constante durante toda esta etapa da minha vida. Por todo tempo a mim dedicado, pelos conselhos e conversas; por ter confiado, acreditado no meu potencial e ter me incentivado. Pela intensa sabedoria de vida.

# AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as mães que permitiram o uso do sangue de seus filhos para a realização deste trabalho e aos pacientes sem os quais este não teria sido possível.

Aos meus pais, João Euclides Cardoso e Sandra Maria Viana Cardoso, que sempre estiveram presentes nas etapas da minha vida com muita dedicação e amor e me ensinaram que a determinação e a honestidade são as maiores virtudes de uma pessoa. Ao meu irmão Cláudio, irmã Juliana e cunhado Felipe pelo carinho e apoio incondicional.

Ao meu noivo, Nelson Yasuo Oshiro Távora, que amo muito, que sempre esteve ao meu lado nas horas mais difíceis e soube contribuir com sua calma, paciência e força.

Aos meus sogros Célis Távora e Francisco Távora, minhas cunhadas Renata Kazumi e Carolina Akemi e cunhado Hugo Tadashi, que juntamente com seus cônjuges Vagner Pereira, Marcello Pacheco e Ana Schimit souberam compreender a dificuldade deste processo e a minha ausência em alguns momentos e contribuíram para tornar este caminho mais leve, principalmente com a chegada de Antônio Yoshi, meu sobrinho adorável.

À Professora Doutora Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, pelo apoio constante em todas as etapas desta tese, pelos conhecimentos adquiridos no mundo da imunologia e pelo exemplo e profunda admiração como profissional, pela sua capacidade técnica e ética, e como pessoa humana e sensível, que soube nos momentos mais difíceis com palavras poucas e simples me ajudar.

Ao Dr. Bruno Vaz da Costa e Dra. Tereza Cristina Ribeiro, por acreditarem na minha capacidade e me incentivar no caminho da infectologia. Pela admiração pela capacidade profissional, humana e ética, que muito influenciou e me acompanha pela minha vida profissional. E, por terem me dado a oportunidade de estudar os pacientes do Serviço de Infectologia Pediátrica do Hospital Regional da Asa Sul, sem o que este trabalho não teria sido realizado.

À Shirley Claudino Pereira Souto, técnica do Laboratório de Imunologia Celular, que me ajudou muito nos experimentos e acompanhou todas as dificuldades deste trabalho com muita serenidade, amizade, bom-humor e carinho. À você, o meu agradecimento especial.

À toda equipe de pediatras do Pronto Socorro do Hospital Regional da Asa Sul, que me ajudaram não só no meu aperfeiçoamento como pediatra, mas contribuíram na realização deste trabalho. Em especial, Dra Ana Lúcia Ramos que me ajudou desde a decisão de realizar o mestrado como também durante todo este processo, na captação dos casos, com conselhos e amizade.

À equipe de enfermagem da enfermaria de doenças infecciosas e parasitárias do Hospital Regional da Asa Sul que estava sempre pronta a me auxiliar e me acompanharam durante toda essa jornada.

Aos meus amigos Jefferson Augusto Piemonte Pinheiro, Patrícia de Alcântara Pinheiro, Andersen Othon Rocha Fernandes, Clara Greidinger Campos Fernandes, Nádia Teixeira Gabriel, Tatiana Vasconcelos Goyanna, Karine Santinelli, Melissa Vieira, Mariana de Melo Gadelha, Lucianny Almeida de Carvalho, Willeke Slegers e Lúcia Alves pela compreensão dos meus momentos de ausência e pela eterna amizade e carinho.

Aos amigos do laboratório de Imunologia Celular, César Augustus Fernandes da Silva, Selma Aparecida Kuckelhaus, Érika Alessandra Rocha Alves, Rosana Regina de Saldanha e Mariana Carminatti Martins Papa que me ajudaram com suas conversas, auxílios e brincadeiras tornar esta etapa mais leve.

À minhas amigas do Hospital Regional da Ceilândia, Julianne Lima e Silva, Kalessa Pontes Vaz, Kalianna Gameleira, Fabíola Tavares, Andréa Araújo, Elizabeth Maria Santos, Walkíria Chianca, Sheila Pacheco Silva, que apesar de toda dificuldade e estresse que enfrentamos juntas estiveram sempre prontas a me ouvir e me ajudar.

À enfermeira Andréa Araciaba Soares Coelho, ao Dr. Walter Gaia e ao meu chefe do centro de saúde de Sobradinho II, Rubens Dutra Filho, que souberam entender e valorizar o meu trabalho. E aos meus amigos da equipe da saúde da família por me auxiliarem nesta etapa da minha vida.

À equipe do Núcleo de Medicina Tropical, em especial Dra Celeste Nogueira Aída pelos conhecimentos passados pelas aulas e pela prática de ambulatório, Dr Pedro Tauil pelos seus conhecimentos e extrema gentileza, Dr Gustavo Romero pela admiração de sua capacidade profissional e Elza Noronha por estar sempre disposta a ajudar.

# SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	VIII
Resumo	X
Abstract	XIII
1. Introdução	1
2. Objetivos	19
3. Material e Métodos	21
3.1. Delineamento experimental	23
3.2. Grupos de estudos	24
3.3. Aspectos éticos	26
3.4. Caracterização clínica, laboratorial e das complicações	26
3.5. Caracterização da análise da função fagocitária	30
3.5.1. Teste de fagocitose	31
3.5.1.1. Teste de fagocitose pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos	32
3.5.1.2. Teste de fagocitose pelos receptores para opsoninas: componentes do complemento e fração Fc da imunoglobulina	33
3.5.1.3. Preparação da suspensão de estoque de leveduras para utilização no teste de fagocitose	34
3.5.1.4. Preparação das leveduras para uso no teste de fagocitose	35
3.5.2. Teste do Nitroblue Tetrazolium (NBT)	35
3.6. Análise estatística	36
4. Resultados	38

4.1. Parâmetros clínicos	39
4.1.1. Estado nutricional	39
4.1.2. Febre	40
4.1.3. Sintomas e sinais clínicos	43
4.1.4. Evolução da visceromegalia	43
4.1.5. Alterações hematológicas	45
4.1.6. Alterações das enzimas hepáticas	47
4.1.7. Relação entre albumina e globulina	50
4.1.8. Complicações	51
4.2. Avaliação funcional do sistema de fagócitos	53
4.2.1. Capacidade fagocitária dos monócitos	54
4.2.1.1. Influência do glucantime sobre a capacidade fagocitária de monócitos pelos receptores para complemento e fração Fc da imunoglobulina	54
4.2.1.2. Influência do glucantime sobre a capacidade fagocitária de monócitos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos	58
4.2.2. Capacidade fagocitária dos neutrófilos	58
4.2.2.1. Influência do glucantime sobre a capacidade fagocitária de neutrófilos pelos receptores para complemento e fração Fc da imunoglobulina	58
4.2.2.2. Influência do glucantime sobre a capacidade fagocitária de neutrófilos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos em crianças com leishmaniose visceral	62
4.2.3. Influência do glucantime sobre a produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos de crianças com leishmaniose visceral	67
4.3. Relação entre tamanho do baço e o índice fagocitário dos monócitos	67

4.4. Relação entre o tamanho do baço e a concentração de hemoglobina	69
4.5. Relação entre porcentagem de redução do NBT e índice fagocitário de monócitos de crianças com leishmaniose visceral	70
4.6. Relação entre porcentagem de redução do NBT e padrão nutricional avaliado pelo escore z da estatura para a idade das crianças com leishmaniose visceral	71
5. Discussão	73
6. Conclusões	89
7. Referências Bibliográficas	92
8. Anexos	110
8.1. Termo de consentimento livre e esclarecido	111
8.2. Aprovação do projeto de pesquisa no comitê de ética em pesquisa CEP – FM/UnB	113
8.3. Aprovação do projeto de pesquisa no comitê em pesquisa SES/DF	115
8.4. Ficha de acompanhamento	117
8.5. Tabelas – Análise clínica	119
8.6. Tabelas – Análise função fagocitária	120

# LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina fosfato
DP	Desvio padrão
CR1	Receptor para complemento tipo 1
CR3	Receptor para complemento tipo 3
C3b	Receptor para complemento fração 3b
ECG	Eletrocardiograma
FcR	Receptor para porção Fc
FNT- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
FR	Frequência respiratória
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-18	Interleucina 18
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
LPG	Lipofosfoglicana
LC	Leishmaniose cutânea
LM	Leishmaniose mucosa
LMC	Leishmaniose cutânea-mucosa

LV	Leishmaniose visceral
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase
NBT	Nitroblue tetrazolium
NO	Óxido nítrico
NOSi	Óxido nítrico sintase induzível
NK	Célula natural <i>killer</i>
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxila
PCC	Proteína cinase
PMN	Polimorfonuclear
Sb V	Antimoniato pentavalente
Sb III	Antimoniato trivalente
SFB	Soro fetal bovino
SH	Soro humano
STF	Solução salina tamponada com fosfato
Ta1	Linfócito auxiliar tipo 1
Ta2	Linfócito auxiliar tipo 2
TAP	Tempo de protombina
TGF-β	Fator transformador de crescimento-β
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
VVC	Vanessa Viana Cardoso
VHS	Velocidade de hemossedimentação

# RESUMO

A leishmaniose visceral é caracterizada pela visceralização da leishmânia pelo sistema fagocítico-mononuclear. A expressão clínica da doença depende de fatores como a espécie e virulência da cepa e o tipo de resposta do sistema imunitário, características individuais, genética e o meio ambiente em que o indivíduo está inserido. O glucantime continua sendo a droga de primeira escolha no tratamento desta doença e a resposta clínica ao tratamento depende da inter-relação de vários fatores. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do glucantime sobre a função dos monócitos e neutrófilos de crianças com leishmaniose visceral. Foram avaliados os parâmetros clínico-evolutivos e a função dos fagócitos de 23 crianças com leishmaniose visceral e 18 crianças controles sem a doença. A capacidade fagocitária dos monócitos e neutrófilos e a capacidade microbicida foram avaliadas antes, após 48 h e ao final do tratamento com glucantime. O teste de fagocitose foi realizado utilizando-se *Saccharomyces cerevisiae*, pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos e pelos receptores que reconhecem os componentes do complemento e porção Fc da IgG. A produção de ânions superóxido foi avaliada pelo teste do *nitroblue tetrazolium*. A desnutrição foi mais freqüente entre as crianças com leishmaniose visceral, e o escore z da estatura para idade (E/I) mostrou relação direta com a capacidade microbicida. Infecção bacteriana foi observada em 35% das crianças, sendo o pulmão o local mais freqüentemente acometido. Hepatite ocorreu em 74% dos casos e insuficiência hepática foi observada em uma criança. Provavelmente houve hepatotoxicidade em 13% dos casos. O tamanho do baço mostrou relação inversa com a concentração de hemoglobina

e com o índice fagocitário dos monócitos. Observou-se melhora da febre em 61% das crianças no sétimo dia de tratamento, redução do tamanho do baço e do fígado das crianças em 55% e 54%, respectivamente, na segunda semana, melhora da pancitopenia com aumento em 20% da concentração de hemoglobina, em 46% no número de glóbulos brancos e em 67% no número das plaquetas e tendência à diminuição das enzimas hepáticas na segunda semana de tratamento. Houve dois óbitos devidos a insuficiência respiratória e hepática. O índice fagocitário de neutrófilos e monócitos estava aumentado nas crianças com leishmaniose visceral antes do tratamento, devido ao aumento da média de levedura ingeridas por fagócito, o que sugere um aumento na expressão de receptores para complemento e porção Fc das IgG nestes fagócitos, induzidas pela infecção parasitária. Entretanto, observamos uma diminuição na capacidade microbicida dos fagócitos nas crianças com leishmaniose visceral antes do tratamento específico. O tratamento com o glucantime contribuiu para a melhora dos parâmetros clínicos e laboratoriais e aumentou a capacidade microbicida dos fagócitos. Entretanto, esta droga modulou negativamente a capacidade fagocitária. Mostramos a ação desta droga como moduladora da resposta do sistema de fagócitos. A aumentada capacidade fagocitária associada com a diminuída produção de moléculas microbicidas pode fazer parte dos mecanismos de escape do parasita da resposta imune do hospedeiro e o tratamento com o antimonial possivelmente está atuando como um mecanismo de contra-escape, aumentando a competência microbicida destas células.

# **ABSTRACT**

Visceralizing of leishmaniasis is in part due to the mononuclear phagocyte system. The clinical manifestations depend on several factors as parasite and virulence of the strain, the type of immune response, genetic and environment. The meglumine antimoniate remains the first choice for the treatment of the disease and the cure depends on several factors. This work aimed to evaluate the influence of meglumine antimoniate on phagocytosis and superoxide production by phagocytes from visceral leishmaniasis children. Phagocytosis was assessed in 16 infected children, before, 9 children 48h after treatment and in 16 children at the end of the therapy, and in 18 normal control, using *Saccharomyces cerevisiae*, through pattern recognition receptors and opsonin receptors. The production of superoxide was assessed by the *nitroblue tetrazolium* test. Clinical and laboratorial parameters of 23 children were evaluated and followed up. The malnutrition was frequent in children with visceral leishmaniasis and the z score height for age showed positive relationship with the microbicidal capacity. Bacterial infection was observed in 35% of the diseased children and the lung was the most frequent site of infection. Acute hepatitis was observed in 74% of the cases and hepatic insufficiency was present in one patient. In 13% of the cases hepatotoxicity was observed, probably secondary to meglumine antimoniate use. The spleen size showed negative relationship with the hemoglobin concentration and phagocytic index of monocytes. The fever decreased in 61% of the children in the seventh day of treatment. After two weeks there was 55% and 54% reduction of spleen and liver, respectively, 20% increase of hemoglobin concentration, 46% increase of leukocytes and 67% increase of platelets and showed tendency to

reduction of hepatic enzymes. There were two deaths due to hepatic insufficiency and respiratory failure. The phagocytic index of monocytes and neutrophils was increased in children with visceral leishmaniasis before treatment due to an increase of the median of ingested *S. cerevisiae* by phagocyte. This suggests an increase of opsonin receptors expression induced by parasitic infection. However, it was observed reduction of microbicidal capacity of phagocytes in children with visceral leishmaniasis before specific treatment. The antimonial treatment contributed to improve the clinical and laboratorial parameters and the microbicidal capacity of phagocytes. However, the antimonial modulated negatively the phagocytic capacity. The increased phagocytic capacity associated with the reduction of microbicidal molecules may play a role in the escape mechanism of the parasite from the host immune response and the antimonial treatment is probably acting as a counter escape mechanism, therefore increasing the microbicidal capability of these cells.



# **1. INTRODUÇÃO**

As leishmanioses são um conjunto de doenças caracterizado por uma grande diversidade e complexidade. A diversidade ocorre porque pode ser causada por 21 a 30 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (Shaw, 1994), transmitida por cerca de 30 espécies de vetores (Desjeux, 1996). A sua distribuição é endêmica em 88 países, atingindo o subcontinente indiano, África, Ásia, bacia do mediterrâneo e sul da América (Herwaldt, 1999).

Sua complexidade está no fato de que é o produto da inter-relação desta enorme variedade de espécies e de vetores associada a diferentes hospedeiros com diversas respostas do sistema imunitário sob a influência de diferentes condições ambientais. Esta complexidade determina diferentes apresentações clínicas, que se manifestam principalmente de quatro formas: cutânea (LC), mucosa (LM), cutâneo-mucosa (LMC) e visceral (LV). Estes tipos de apresentações clínicas dependem da espécie da *Leishmania*, do vetor e reservatório envolvidos, da distribuição geográfica, como também da resposta imune do hospedeiro frente ao parasita, caracterizando a especificidade desta nosologia (Ashford, 1996).

Dentre as várias síndromes clínicas existentes, a leishmaniose visceral é a forma de maior gravidade, pois se não tratada, pode ter evolução fatal, ou seja, relaciona-se com letalidade e mortalidade, enquanto as outras formas se relacionam principalmente com morbidade. Estima-se que sua incidência seja de 500.000 casos novos por ano, dos quais 90% estão distribuídos em cinco países: Bangladesh, nordeste da Índia, Nepal, Sudão e Brasil (Desjeux, 2004).

No Brasil, a leishmaniose visceral se distribui em todas as regiões administrativas, exceto na região sul. O Nordeste é considerado o maior foco

endêmico do país. Até a década de 90, apresentava cerca de 90% dos casos do país, no entanto, a partir de 2002, tem se observado uma redução dos casos para 77% devido ao aumento da doença nas regiões sudeste e centro-oeste (Ministério da Saúde, 2006). Associado, tem se observado modificações epidemiológicas, a leishmaniose visceral deixando de ser uma doença principalmente rural, como ocorre no nordeste, passando a atingir cidades de grande e médio porte, principalmente nas regiões sudeste e centro-oeste. Ademais, tem sido observada sua associação, como infecção oportunista, em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (Pintado, 2001) e o surgimento de casos importados após viagem a áreas endêmicas (Kafetiz e cols, 2002) têm contribuído para o aumento do número de casos.

Nos últimos anos, a letalidade pela leishmaniose visceral no Brasil vem aumentando paulatinamente, passando de 3,6% no ano em 1994 para 6,7% em 2003 e a análise parcial dos dados de novembro de 2004 demonstrou um aumento de 26% na letalidade, demonstrando a urgência de um melhor entendimento das manifestações clínicas, laboratoriais e imunológicas desta doença (MS, 2006).

No Distrito Federal não havia até o ano de 2005 nenhum caso registrado de leishmaniose visceral autóctone, sendo que, os casos registrados e tratados eram procedentes de outros estados. Em agosto de 2005, foi confirmado o primeiro caso autóctone da região, refletindo a importância desta doença para a região centro-oeste.

A leishmaniose visceral é causada por protozoário pertencente à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania*, sendo que a

espécie endêmica no Brasil é a *L. chagasi*, que faz parte do complexo *donovani*. Este gênero apresenta-se sob duas formas evolutivas: a forma aflagelada (amastigota), parasito intracelular obrigatório, e a forma flagelada (promastigota). A primeira se reproduz no citoplasma dos macrófagos/monócitos do hospedeiro, enquanto que a segunda o faz no intestino do inseto vetor, as fêmeas do flebotomíneo do gênero *Lutzomyia*.

O *Lutzomyia longipalpis* é a principal espécie transmissora no Brasil, sendo antroponozofílica, e com característica de transmissão domiciliar e peridomiciliar (Barata e cols, 2004). No meio urbano, os cães são as principais fontes de infecção, pois quando infectados podem permanecer assintomáticos ou oligossintomáticos, perpetuando o ciclo e promovendo a disseminação da doença (Marzochi e cols, 1994). Já no meio silvestre, as principais fontes de infecção são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) (Silva e cols, 2001) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (Sherlock, 1996).

A transmissão ocorre após a inoculação da forma promastigota existente na saliva do vetor durante o repasto sanguíneo. A saliva do flebotomo parece ter um papel importante na transmissão da forma infectante bem como no escape do parasita à defesa do organismo. Nela existem substâncias que interferem na apresentação de antígenos (Kamhawi, 2000) e estimulam a produção de IL-4 e IL-10 que modulam negativamente a função dos macrófagos (Roger e cols, 2002), inibindo a produção de óxido nítrico (NO) e a morte dos parasitas por estas células (Hall e cols, 1995).

Após a introdução no hospedeiro, o parasita se liga a receptores, como os receptores para componentes do complemento, CR1, CR3 e C3b, na

superfície dos macrófagos, antes de ser interiorizado (Saha e cols, 2004). Dentro do macrófago, a forma promastigota metacíclica se transforma em amastigota onde se divide por multiplicação binária. Com o rompimento do macrófago, as formas amastigotas produzidas se espalham e infectam outros macrófagos perpetuando o ciclo no hospedeiro.

Somada à capacidade de disseminação por meio do sistema fagocítico-mononuclear a leishmânia desenvolveu mecanismos de escape à resposta do hospedeiro contra o parasita conseguindo sobreviver em locais nos quais outros organismos seriam rapidamente destruídos. Estes mecanismos possibilitam a sobrevivência do parasito dentro do fagolisossomo por meio da ativação da bomba de  $H^+$ , modificando o pH do meio intracelular, pela presença de moléculas de superfície capazes de inibir ou digerir as enzimas do hospedeiro, pela capacidade de entrar na célula do hospedeiro sem ativar a produção de radicais de oxigênio e nitrogênio, pela inibição da fusão do fagolisossomo e pela presença de moléculas com capacidade de inibir a produção de NO em resposta ao  $IFN\gamma$  (Homell, 1999).

Inicialmente, a disseminação dos parasitos acontece primeiramente para os gânglios linfáticos regionais e depois por meio da circulação sanguínea são levados dentro dos macrófagos para o fígado, baço e medula óssea, quando estimulam a resposta imune mediada por células que poderá resultar apenas em infecção ou doença em graus variáveis. Como a doença se manifestará no hospedeiro dependerá de fatores como a virulência e a espécie da *Leishmania* envolvida, o tipo de resposta imune do hospedeiro, bem como do estado

funcional do seu sistema imunitário e das características individuais e genéticas do hospedeiro (Gangneux e cols, 2000).

Desta forma, o tipo de resposta do sistema imunitário mediada pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, bem como o padrão das citocinas envolvidas, determinarão a apresentação clínica do paciente. Em até 85% dos pacientes a infecção pode se apresentar assintomática ou nas formas subclínica ou oligossintomática e muitos casos podem resolver espontaneamente ou não requerer tratamento (Berman e cols, 1997; Badaró e cols, 1986; Holaday e cols, 1993). Nestes pacientes observa-se a ativação de linfócitos T auxiliar do tipo 1 (Ta<sub>1</sub>), específicos para antígenos das leishmânias, com capacidade de secretar citocinas que ativam macrófagos, como IFN- $\gamma$  e IL-12, respondem ao teste cutâneo de hipersensibilidade retardada aos antígenos de leishmânia e apresentam granulomas nos tecidos envolvidos (Meller-Melloul e cols, 1991; Sacks e cols, 1987; Carvalho e cols, 1992).

Já nos pacientes sintomáticos ou com infecções mais graves, que são consequência da multiplicação desenfreada do parasita no sistema fagocítico-mononuclear, as respostas associadas às células Ta<sub>1</sub> podem estar deprimidas e seus efeitos inibidos pela ativação da resposta dos linfócitos CD4<sup>+</sup>Ta<sub>2</sub>. Desta forma, as citocinas relacionadas aos linfócitos Ta<sub>2</sub> (IL-4, IL-10, IL-13) redirecionam as respostas dos linfócitos CD4<sup>+</sup> e inibem a secreção das citocinas pró-inflamatórias, desativando os macrófagos e perpetuando a infecção intracelular (Reiner e cols, 1995; Ghalib e cols, 1993; Murray e cols, 1997). Assim, ocorre uma baixa produção de IL-12 com menor produção de IFN- $\gamma$  (Carvalho, 1992) e o aumento na produção de TGF- $\beta$ , o que propicia a

inibição dos macrófagos e a menor produção de IFN- $\gamma$  (Barral e cols, 1992; Wilson e cols, 1998).

A proliferação exacerbada de parasitas na forma sintomática da doença leva à exposição do sistema imunitário à uma grande quantidade de antígenos, estimulação da resposta imune humoral, dependente de linfócitos CD4<sup>+</sup> Ta2, com liberação de IL-4 e IL-10, ativando os linfócitos B, e levando à plasmocitose medular e hipergamaglobulinemia policlonal. A ativação da resposta imune humoral, com o aumento dos títulos de anticorpos anti-leishmânia, acontece no início da infecção e depois das alterações imunológicas celulares, no entanto, o papel destes anticorpos na resolução da doença ou na imunidade protetora ainda é desconhecido (Saha, 2006).

As manifestações clínicas da LV sintomática são caracterizadas por sinais e sintomas que variam no grau de intensidade e gravidade de acordo com o período da evolução clínica da doença e do órgão acometido. Estão presentes: febre intermitente prolongada (pela produção de FNT- $\alpha$ ) (Ortega, 2003), palidez cutânea (devido ao acometimento da medula óssea, hiperesplenismo, mecanismos autoimunes, infiltração medular, hemólise, hemorragias e deficiência de ferro associada) (Ortega, 2003), inapetência e perda de peso (síndrome consumptiva pelo efeito catabólico e anorético da produção exacerbada de FNT- $\alpha$ ) (Ortega, 2003; Pearson, 1992), distensão abdominal e diarreia (pelo acometimento dos linfonodos mesentéricos e por causar uma enteropatia perdedora de proteínas) (Mugai e cols, 1983), tosse (pela pneumonite intersticial) (Duarte, 1989), petéquias, equimoses e sangramentos pela diminuição do número e presença de anticorpos anti-

plaquetas (Pollack e cols, 1988) e pela alteração da função hepática (Rodrigues e cols, 1958) e hepatomegalia e/ou esplenomegalia (pela hiperplasia do sistema fagocítico-monuclear) (Ortega, 2003). A icterícia também pode ocorrer em casos avançados (Ortega, 2003).

Manifestações raras podem acontecer como alterações hepáticas cursando com cirrose e insuficiência hepática (Rodrigues e cols, 1958), hepatite fulminante (Singh e cols, 1995) ou hepatite aguda (Khaldi e cols, 1990); alterações renais causando desde quadros leves até insuficiência renal aguda, com nefrites e depósitos de imunocomplexos levando à glomerulonefrites (Salgado Filho e cols, 2003), síndrome hemofagocítica (Gagnaire e cols, 2000) e síndrome de Guillain-Barre (Ortega,2003).

As alterações laboratoriais, que auxiliam no diagnóstico desta doença, podem refletir tanto o acometimento dos órgãos e tecidos afetados quanto podem determinar o estágio da doença, ser preditor de pior prognóstico ou demonstrar a melhora após o tratamento instituído. Os achados mais comuns são a anemia normocrômica–normocítica, neutropenia, trombocitopenia e inversão da relação albumina/globulina, com hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia (Ortega, 2003). Outros achados podem ser o aumento das enzimas hepáticas, elevação da bilirrubina sérica e atividade de protrombina entre 60 e 80% (Ortega, 2003), proteinúria, hematúria macroscópica, aumento das escórias nitrogenadas e diminuição do clearance de creatinina, conforme o órgão envolvido (Salgado Filho e cols, 2003).

Devido ao fato de na leishmaniose visceral haver acometimento do sistema fagocítico-mononuclear, a compreensão da função dos macrófagos é

fundamental, pois estas células podem atuar tanto na defesa quanto na imunopatogenia da doença. Atuam na defesa anti-leishmânia por meio da fagocitose, processando e apresentando antígeno com ativação da resposta imune mediada por células, mas, por outro lado, servem como célula na qual os parasitos se multiplicam e podem escapar do sistema de defesa do hospedeiro e disseminar a infecção.

A fagocitose ocorre desde a fase inicial da infecção, sendo parte da resposta imune inata. Os macrófagos também estimulam a resposta mediada por células. Dependendo do tipo de contato entre o agente infeccioso e os fagócitos, sinais intracelulares são induzidos e ativam vários processos celulares, como rearranjo do citoesqueleto, alterações no tráfico de membrana, ativação de mecanismos microbicidas, produção de quimiocinas e citocinas pro- e anti-inflamatórias, ativação da apoptose e produção de substâncias que atuam na apresentação de antígeno para o sistema imunitário adaptativo (Ozinsky e cols, 2002).

O reconhecimento do agente infeccioso pelas células fagocíticas pode ser dependente ou não de opsoninas (Ofek, 1995), que são componentes séricos que ligam o microorganismo a receptores específicos na superfície dos fagócitos. Entre as opsoninas estão os componentes do sistema do complemento, como o fragmento C3bi do componente C3 do complemento que se liga ao receptor para complemento tipo 3 (CR3) e as imunoglobulinas que se ligam ao domínio Fc no receptor para porção Fc da IgG nos fagócitos (FcR). Além destas, existem outras opsoninas séricas, como as colecitinas (Kuhlman, 1989). A fagocitose independente de opsoninas é mediada pelo

reconhecimento diretamente de estruturas na superfície dos microorganismos por receptores específicos da superfície dos fagócitos, os receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, como os receptores para manose, glucana, fibronectina e receptores de limpeza (Gordon, 2002).

Na infecção pela leishmânia, após a aderência do parasita ao fagócito pelos receptores, o parasita é interiorizado. Neste processo, vários receptores presentes na superfície dos fagócitos podem ter um papel facilitador, como os receptores para frações do complemento (CR1, CR3) (Cunnigham, 2002). No entanto, a resposta que se segue após interiorização por determinado receptor pode variar, podendo auxiliar no escape do parasita aos mecanismos de defesa do hospedeiro ou ajudando no clareamento da infecção. Assim, a fagocitose da leishmânia por meio do receptor CR3 inibe a explosão respiratória e a produção de IL-12 (Bradonísio e cols, 2000), inibindo a imunidade celular e contribuindo para o escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Por outro lado, há relatos que a ligação ao CR1 pode aumentar a fagocitose mediada via FcR com o aumento da liberação de superóxido e, conseqüentemente, o aumento do mecanismo microbicida (Ozisky e cols, 2002). Já os receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos parecem estar relacionados à invasão do fagócito pelos parasitas (Peiser e cols, 2002), com a estimulação da produção de radicais intermediários de oxigênio e citocinas (Ozisky e cols, 2002; Gordon, 2002).

A capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores para opsoninas e por receptores para padrões moleculares de patógenos em pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana encontra-se diminuída

(Martins-Papa, 2007). Entretanto, não está ainda esclarecida a capacidade fagocitária de monócitos e de neutrófilos por vias dependentes ou independentes de opsoninas em pacientes portadores da forma visceral da doença.

A fagocitose pode ocorrer tanto por células mononucleares quanto polimorfonucleares. Dentre as primeiras estão os monócitos e macrófagos, sendo que os macrófagos são células residentes em vários tipos de tecidos do organismo do hospedeiro. A ativação dos macrófagos é o primeiro mecanismo de defesa inata que ocorre para eliminar a leishmânia, mediada pela explosão oxidativa, com a produção de ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e óxido nítrico (NO) (Assreuy, 1994). Ao mesmo tempo, representa também o primeiro evento que liga a resposta imune inata com a adquirida. (Trinchieri, 1997).

Além do desencadeamento dos mecanismos microbicidas, os macrófagos ativados são capazes de produzir diferentes citocinas como FNT- $\alpha$ , IL-6, IL-18, IL-12 e IFN- $\gamma$ , que participarão do clareamento da infecção. A IL-12 atua como adjuvante e é um pré-requisito para a ativação da resposta imune tipo Ta1 (Afonso, 1994). Geralmente quando associada à IL-18, induz a produção de IFN- $\gamma$  por macrófagos murinos (Munder, 1998). O IFN- $\gamma$  apresenta grande importância, pois pode, independentemente de outras citocinas, estimular a transcrição de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a liberação de NO por macrófagos peritoneais estimulados (Ding, 1988). Ademais, várias citocinas que aumentam a produção de NO, são sinérgicas com o IFN- $\gamma$  no controle da leishmânia *in vivo* (Saha e cols, 2004). Dentre elas está o FNT- $\alpha$

que é sinérgico com o IFN- $\gamma$  na indução da iNOS e na produção de óxido nítrico pelos macrófagos *in vitro* (Ding, 1993).

Além da atuação dos macrófagos no combate à leishmania mediante a fagocitose, os polimorfonucleares (PMN) parecem também estar envolvidos neste processo, mas seu papel na defesa contra a leishmânia ainda não está bem esclarecido. Os neutrófilos são as primeiras células a migrar para o sítio de infecção (Pearson, 1981; Chang, 1981). Após a fagocitose, o parasita pode ser destruído pelas enzimas e grânulos armazenados e também pela produção de radicais de oxigênio pela resposta oxidativa com produção de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Pearson, 1981; Chang, 1981).

Laufts e cols (2002) demonstraram que os PMN possuem mecanismos de fagocitose dependentes ou não de opsoninas, e dependendo de qual mecanismo for ativado, pode-se ou não induzir ativação dos mecanismos microbicidas e levar ou não à morte do parasita. Desta forma a fagocitose dependente de componentes séricos leva à ativação do PMN com ativação da resposta oxidativa e eliminação da leishmânia, conforme verificado em cães (Bradonísio e cols, 1996), enquanto que a fagocitose sem componentes séricos, não induz ou leva à baixa ativação da respiração oxidativa, de forma que após a fagocitose, os parasitas sobrevivem em seu interior, servindo como um mecanismo de escape. Somado à capacidade microbicida pela produção de radicais oxidativos, os PMN também são capazes de produzirem várias citocinas que modulam a resposta imune, como IL-12 e TNF- $\alpha$  (Bliss, 1999).

Além deste mecanismo de escape, parece que a leishmânia sobrevive no interior dos PMN devido a mecanismo de inibição da caspase-3, que retarda a apoptose desta célula. No processo de limpeza dos PMN apoptóticos, a ingestão pelos macrófagos dos PMN infectados e apoptóticos não leva a ativação da função microbicida dos macrófagos (Meagher e cols, 1992) e seria um meio para entrada “silenciosa” da leishmânia na célula do hospedeiro.

Os polimorfonucleares parecem ter papel importante logo no início da infecção. Rosseau e cols (2001) demonstraram que os neutrófilos contribuem para o controle da replicação parasitária no início da infecção por *Leishmania infantum* em baço de camundongos BALB/c, mas sem nenhum efeito em fases tardias da infecção e em nenhum órgão acometido. Smelt e cols (2000) mostraram que em camundongos C57BL/6 infectados por *Leishmania donovani* a depleção de neutrófilos determinou importante aumento na multiplicação do parasita no fígado e baço, demonstrando a importância dos neutrófilos no clareamento da infecção.

Tanto os monócitos quanto os PMN podem ativar mecanismos microbicidas, com a ativação da explosão oxidativa, que é um dos principais mecanismos efetores contra a leishmânia (Bogdan e Rollinghoff, 1998). Além da ação antimicrobicida, os oxidantes, principalmente o óxido nítrico, têm apresentado efeito também na sinalização, na regulação da atividade das células *natural killer* (NK) e no recrutamento das células inflamatórias (Diefenbach, 1999). Os diferentes estágios da leishmânia ativam diferentemente a resposta oxidativa. No início da infecção a fagocitose da forma promastigota opsonizada pode estimular a resposta oxidativa, sendo a

produção do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) o radical oxidativo mais crítico no controle da infecção neste período, sendo produzido por macrófagos murinos e humanos (Gantt e cols, 2001). A forma promastigota da leishmânia tem se mostrado susceptível a morte pela exposição ao  $O_2^-$  e radical hidroxila ( $OH^-$ ) gerado na produção de  $H_2O_2$  (Miller e cols, 2000; Zarley e cols, 1991), processo que pode ser tóxico para uma pequena porcentagem dos organismos já fagocitados (Pearson e cols, 1982).

A produção de superóxido é catalisada pela NADPH oxidase existente no plasma e nos fagolisossomas. Esta enzima é precursora de vários outros oxidantes microbicidas, como o peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso (produzido pela ação da mieloperoxidase) (Hoffman, 2005), tendo papel importante no desencadeamento da resposta oxidativa. Kumar e cols (2002) demonstraram a diminuição da produção desta enzima e da mieloperoxidase por monócitos de pacientes portadores da forma visceral da leishmaniose, sugerindo que a diminuição destas enzimas pode contribuir para a persistência do parasita nesta doença, pela menor produção dos radicais intermediários de oxigênio.

A forma amastigota, ao contrário da forma promastigota, estimula muito pouco a resposta oxidativa durante o processo fagocítico. A morte da forma amastigota intracelular é mediada pela ativação dos macrófagos pela ação de citocinas como FNT- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  que ativam tanto as vias oxidativas quanto as não oxidativas (Bogdan e cols, 1990; Murray e cols, 1983; Murray e cols, 1982). A produção de radicais de nitrogênio, principalmente o óxido nítrico, ocorre pela ação da enzima óxido nítrico sintase induzida, que quando reage com os

componentes dos radicais intermediários do oxigênio formam os peroxinitritos, compostos altamente tóxicos para os microorganismos (Abbas, 2005). O NO que é produzido pelos macrófagos ativados e estimulados pelo FNT- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  representa o principal mecanismo microbicida para a forma amastigota (Liew e cols, 1990).

Tanto as formas amastigotas como as promastigotas das leishmânias desenvolveram mecanismos capazes de diminuir a explosão oxidativa e com isso escapar dos mecanismos microbicidas do hospedeiro. A primeira pode diminuir a mobilização de cálcio e com isso alterar a fosforilação da proteína cinase C (PCC) que é um fator essencial para a ativação da NADPH oxidase e também diminuir a ação do IFN- $\gamma$  (Oliver e cols, 1992). Já a forma promastigota, que expressa em sua superfície uma forma diferente da lipofosfoglucona (LFG), favorece o mecanismo de escape pela inibição da fusão do fagossomo com o lisossoma e conseqüentemente a ação dos radicais hidroxilas e dos ânions de superóxido (McNeely e cols, 1989), favorecendo a transformação do parasita para a forma amastigota, que é mais resistente à ação das enzimas e ao pH ácido do fagolisossomo (Bogdan, 1998).

Kumar e cols (2001) demonstraram que a explosão oxidativa estava diminuída em pacientes portadores de leishmaniose visceral em atividade, apresentando diminuição da produção dos ânions superóxido e peróxido de hidrogênio e dos níveis de IFN- $\gamma$ , e observaram após o tratamento com anfotericina-B aumento significativo destes radicais e desta citocina, sendo difícil avaliar se a melhora foi devido à recuperação da imunidade do paciente ou pela ação da droga utilizada.

A influência do glucantime sobre a capacidade microbicida de monócitos e neutrófilos de indivíduos normais foi avaliada *in vitro* pela produção de radicais de oxigênio, sendo observado aumento na produção de ânions superóxido ( $O_2^-$ ) após o uso de diferentes doses do antimoniato de meglumina (Coelho, 2003). No entanto, se o glucantime está relacionado com o aumento da capacidade microbicida no tratamento de pacientes com leishmaniose visceral ainda não está esclarecido.

O antimoniato de meglumina (glucantime) e o estibogluconato de sódio (Pentostam) são metalóides pentavalentes que têm sido utilizados no tratamento da leishmaniose visceral a mais de 7 décadas. Mesmo apesar do surgimento de cepas resistentes à droga, principalmente na Índia, e de se desconhecer se a resistência deve-se a fatores relacionados ao hospedeiro ou parasita, associada ao fato de serem drogas tóxicas e seu mecanismo de ação ainda não estar totalmente esclarecido (Basu e cols, 2006; Balaña-Fouce, 1998), os antimoniais ainda são a terapêutica de primeira escolha no tratamento desta doença (Herwaldt, 1999; Murray e cols, 2005).

Os antimoniais pentavalentes parecem ter uma ação anti-parasitária, por influenciar a bioenergética do parasita, pela inibição da glicólise, da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos do parasita e da fosforilação do ADP (Berman e cols, 1985; Berman e cols, 1987). Tem sido demonstrado que também podem promover o efluxo de tióis, glutathiona e tripanotona, com alteração no metabolismo de redução dos tióis, tornando o parasita mais sensível ao estresse oxidativo (Wyllie e cols, 2004).

Após a administração, os antimoniais pentavalentes precisam ser convertidos para sua forma trivalente para que possam exercer seu efeito anti-leishmânia (Ouelette, 2004). Esta redução pode ocorrer tanto nos macrófagos (Frezard e cols, 2001) quanto no parasita (Shaked-Mishan e cols, 2001), de forma que podem ter ação tanto na forma amastigota no interior dos macrófagos, quanto nas formas amastigotas e promastigotas extracelulares. No entanto, a atividade *in vitro* dos antimoniais revelou-se menor na forma promastigota extracelular em relação à forma amastigota intracelular, evidenciando, possivelmente, uma maior concentração da droga nos fagolisossomos contendo o parasita com uma forma mais ativa no interior dos macrófagos ou uma diferença na susceptibilidade dos diferentes estágios do parasita ao antimônio (Carrió e cols, 2000).

Os antimoniais parecem modular o sistema imunitário (Basu e cols, 2006). Vários trabalhos têm demonstrado a interferência da ação de interleucinas (IL-2, IL-4, IL-12) na efetividade da quimioterapia com os antimoniais pentavalentes (Murray e cols, 1993; Murray e cols, 2000; Nabors e Farrell, 1994).

Ação do antimoniato sobre as células do sistema imunitário, estimulando os mecanismos de defesa antiparasitários, também tem sido sugerida (Murray 2000 e cols, Berger e Fairlamb, 1992). Coelho (2003) demonstrou o aumento *in vitro* da capacidade fagocitária, bem como da capacidade microbicida, em fagócitos de indivíduos normais após o tratamento com glucantime em diferentes doses. O glucantime estimulou os mecanismos leishmanicidas dos fagócitos de indivíduos normais, sugerindo uma defesa antiparasitária mais

adequada. No entanto, se o antimoniato possui a mesma ação em indivíduos com a doença e qual seu papel durante a evolução do tratamento ainda não está esclarecido. O esclarecimento da ação do glucantime sobre os mecanismos de defesa antiparasitária em crianças com leishmaniose visceral pode propiciar o melhor entendimento da ação desta droga como também propiciar um tratamento mais adequado desta doença.

Desta forma, o conhecimento das manifestações clínicas, laboratoriais, das complicações e da função dos fagócitos de crianças com leishmaniose visceral antes do tratamento, bem como da influência do glucantime neste processo, se faz necessário para que possamos entender melhor a ação desta droga durante o tratamento e, com isso, contribuir para a diminuição da morbidade e mortalidade desta doença.

## **2. OBJETIVOS**

## Objetivos Gerais

- Avaliar a ação do glucantime sobre a imunidade inata, pelo sistema de fagócitos, em crianças com leishmaniose visceral.

## Objetivos Específicos

- Caracterizar a influência do glucantime sobre o perfil clínico, laboratorial e complicações em crianças com leishmaniose visceral.
- Avaliar a influência do glucantime sobre a fagocitose e produção de radicais de oxigênio em crianças com leishmaniose visceral e suas possíveis relações com os parâmetros clínicos.

Os objetivos foram alcançados por meio de:

- Avaliação da influência do glucantime sobre a capacidade fagocitária de monócitos e neutrófilos do sangue periférico para *Saccharomyces cerevisiae*, pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos e pelos receptores para componentes do complemento em crianças com leishmaniose visceral antes, com 48 horas e no final do tratamento e crianças controles.
- Avaliação da influência do glucantime sobre o metabolismo oxidativo dos fagócitos pelo teste do *nitroblue tetrazolium* (NBT) em crianças com leishmaniose visceral antes, com 48 horas e no final do tratamento e crianças controles normais.
- Avaliação do perfil clínico, laboratorial e complicações pelo acompanhamento durante a internação.

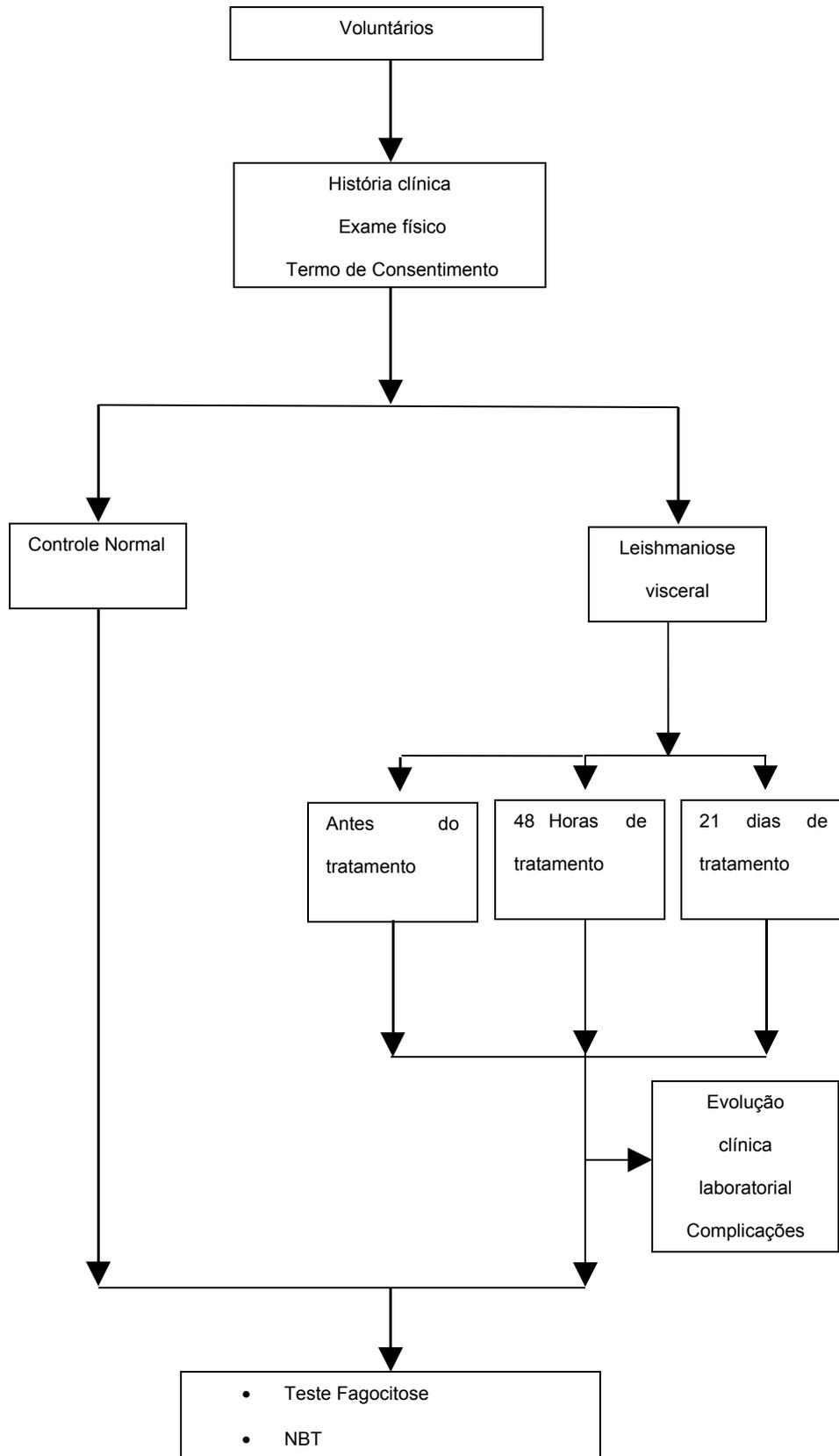
## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho é um estudo prospectivo, cujos indivíduos foram selecionados no setor de Doenças Infecciosas da Pediatria do Hospital Regional da Asa Sul e a parte experimental foi desenvolvida no Laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Foi composto por três partes: 1) A primeira foi a avaliação do perfil clínico, laboratorial e de complicações do tratamento de crianças com diagnóstico confirmado de leishmaniose visceral que necessitaram de internação para tratamento. 2) A segunda parte foi a análise da função dos fagócitos destas crianças por meio do teste de fagocitose e NBT, bem como a influência do antimoniato de meglumina sobre a função fagocitária. 3) E a terceira foi a avaliação das relações entre a evolução clínica, características clínicas e laboratoriais e complicações observadas e a resposta do sistema de fagócitos do hospedeiro.

O delineamento experimental encontra-se na figura 1.

### 3.1. Delineamento experimental



### 3.2. Grupos de estudos

Foram incluídas no estudo crianças com leishmaniose visceral (LV) sintomática, com idades entre 11 meses e 12 anos, internadas para tratamento no Hospital Regional da Asa Sul no período de fevereiro de 2006 até maio de 2007. Foram estudadas 23 crianças com as idades variando entre 11 meses e 20 dias a 132 meses. A média±DP de idade das crianças foi de 49±37 meses, sendo 9/23 (39%) menores que 2 anos; 8/23 (35%) entre 2 e 6 anos e 26% (6/23) entre 6 e 12 anos; 15 do sexo feminino e 8 do sexo masculino.

Dos 23 pacientes, 22 completaram o tratamento em regime de internação no Hospital Regional da Asa Sul, sendo que um deles terminou seu tratamento em sua cidade de origem após o décimo terceiro dia de internação. O tratamento foi feito com antimoniato de meglumina (Glucantime®, Aventis Pharma), 20mg/kg/dia do antimônio base por 20 dias para 20 pacientes, tendo sido necessário o prolongamento para 30 dias em 3 pacientes por falta de resposta clínica à terapia inicial.

O Hospital Regional da Asa Sul é o hospital de referência do Distrito Federal para atendimento de crianças com leishmaniose visceral e recebe crianças do próprio DF e de outros estados do Brasil. Desta amostra, 57% eram procedentes de Minas Gerais, 22% da Bahia, 9% de Goiás, 9% do Piauí, 3% de Tocantins.

Foram considerados critérios de inclusão: crianças com diagnóstico de LV (forma sintomática) por meio de dados clínicos, laboratoriais, imunológicos,

parasitológicos ou epidemiológicos, virgens de tratamento ou uso prévio do glucantime há mais do que 3 meses e que tiveram como indicação terapêutica o antimoniato de meglumina pelo seu médico assistente. Dos incluídos, os pais ou responsáveis, leram e assinaram o termo de consentimento que se encontra no anexo 1.

Foram excluídas todas as crianças, com base na história clínica, com qualquer condição clínica possível de influenciar as funções do sistema imunitário, lúpus eritematoso sistêmico, doenças auto-imunes, idade menor do que 11 meses, cirurgias há menos de um ano, diabetes, alterações renais ou câncer.

Como grupo controle normal foram estudadas crianças normais, sem fatores que pudessem interferir com as funções do sistema imunitário e provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral. Este grupo consistiu-se de 18 crianças com idades variando de 7 a 144 meses, média $\pm$ DP de 68 $\pm$ 43 meses, sendo 6 do sexo feminino e 12 do sexo masculino.

A definição clínica e epidemiológica de leishmaniose visceral dos nossos casos foi feita com base na história e exame físico consistindo de crianças com febre e esplenomegalia, provenientes de área com ocorrência de transmissão de LV, descartados clinicamente outros diagnósticos diferenciais. O diagnóstico laboratorial específico consistiu do encontro do parasito nos exames parasitológicos pela demonstração de formas amastigotas no aspirado de medula óssea ou pela reação sorológica reativa, sendo utilizado o método de imunofluorescência indireta. Foi considerado também a resposta favorável ao teste terapêutico em criança com manifestação clínica sugestiva, proveniente

de área endêmica para leishmaniose visceral (Campos, Jr, 1992; Carvalho, 1995).

### **3.3. Aspectos éticos**

As normas éticas para pesquisa científica em seres humanos, estabelecidas pela declaração de Helsinki (WMA, 2004) e pelo Ministério da Saúde Brasileiro, resolução 196/96 (MS, 196/1996), foram rigorosamente observadas e o presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (Anexo 2) e da Secretaria de Saúde do Distrito Federal (Anexo 3). Este projeto foi desenvolvido com total isenção de conflitos de interesse.

### **3.4. Caracterização clínica, laboratorial e das complicações**

Os dados foram coletados e organizados em uma ficha de protocolo que se encontra em anexo, que continha informações sobre identificação, procedência, estado nutricional, dados clínicos e laboratoriais e complicações clínicas (Anexo 4).

Os grupos etários foram divididos em lactentes (crianças menores que 02 anos de vida), pré-escolares (entre 02 e 06 anos de vida) e escolares (entre 06 e 12 anos) (Needlman, 2002).

A avaliação nutricional dos pacientes foi feita pelo escore Z utilizando-se as tabelas do *National Center for Health Statistics* (NCHS). Foi avaliado o escore Z do peso/idade (P/I); peso para estatura (P/E), e estatura para idade (E/I).

A avaliação clínica foi realizada por meio do exame clínico dos pacientes sempre pelo mesmo observador (VVC), em cinco períodos durante a internação (na admissão, com 48 horas, na 1ª semana, na 2ª semana e ao final do tratamento).

Foram considerados sintomas relatados pelo responsável como tempo de febre antes da internação, aumento do volume abdominal, dor abdominal, apatia, emagrecimento, tosse, vômito e diarreia e os sinais e achados clínicos verificados pelo exame clínico realizado sempre pelo mesmo observador (VVC) como palidez, visceromegalias, taquipnéia, edema, icterícia e petéquias.

A medida do baço e do fígado foi feita utilizando uma fita métrica inextensível, sendo o fígado medido na linha hemiclavicular direita em linha reta abaixo do rebordo costal. O baço foi medido em seu maior eixo abaixo do rebordo costal esquerdo (Pastorino e cols, 2002).

A definição de taquipnéia seguiu as normas do manual de assistência e controle das infecções respiratórias agudas do Ministério da Saúde (1994) que considera taquipnéia em menores de 2 meses uma frequência respiratória (FR) > 60irpm; entre 2 meses e 1 ano- FR > 50 irpm; entre 1 e 5 anos- FR > 40 irpm e acima de 5 anos FR > 30 irpm.

Os exames laboratoriais foram avaliados em três períodos: na admissão, na 1ª semana e na 2ª semana, sendo analisados hemograma completo,

enzimas hepática (TGO e TGP), eletrólitos, proteínas totais e frações, exame sumário de urina, velocidade de hemossedimentação (VHS) e tempo de protrombina (TAP). Outros exames analisados foram o eletrocardiograma (ECG) e radiografia de tórax quando pertinente.

Do hemograma foram considerados 1) a série vermelha e determinação da hemoglobina para avaliação da anemia; 2) série branca para análise de leucopenia e neutropenia; e 3) a contagem de plaquetas.

Da determinação de proteínas séricas foram analisados a presença de hiperglobulinemia e a inversão da relação albumina/globulina.

A leucopenia foi definida como contagem de leucócitos abaixo de 5000/mm<sup>3</sup>. A anemia foi definida como hemoglobina <11g/dl para pacientes entre 6 meses e 5 anos, <11,5 g/dl para pacientes com idade entre 5 e 9 anos e <12g/dl para adolescentes femininos e <12,5g/dl para adolescentes masculinos. Trombocitopenia foi definida quando a contagem absoluta de plaquetas foi inferior a 150.000 (Queiroz, 2004)

Considerou-se que a criança estava neutropênica quando a contagem absoluta de neutrófilos apresentava valores inferiores a 500 células/mm<sup>3</sup> ou a 1000 células/mm<sup>3</sup> com tendência à queda para 500 células/mm<sup>3</sup> (Hughes, 2002). A contagem absoluta de neutrófilos incluiu o somatório dos segmentados e bastões.

O diagnóstico imunológico foi feito pelo método de imunofluorescência indireta e considerado positivo para títulos acima de 80. O diagnóstico parasitológico foi feito pela demonstração de formas amastigotas da leishmânia no aspirado de medula realizado na crista ílica pósterio-superior pelo exame

ao microscópio, com aumento de 1000X, das lâminas fixadas com metanol e coradas com Giemsa. Os resultados encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1- Diagnóstico imunológico e sorológico das crianças com calazar**

Número de identificação do paciente	Mielograma	Titulação sorológica	Dados epidemiológicos	Resposta clínica ao tratamento	Prolongamento do tempo de tratamento
1	positivo	Não realizada	Sim	Sim	Não
2	negativo	Não realizada	Sim	Sim	Não
3	positivo	> 80	Sim	Sim	Não
4	positivo	> 80	Sim	Sim	Não
5	positivo	> 80	Sim	Óbito	Não
6	positivo	> 80	Sim	Sim	Não
7	positivo	40	Sim	Sim	Não
8	positivo	> 80	Sim	Sim	Não
9	positivo	> 80	Sim	Sim	Não
10	positivo	> 80	Sim	Sim	Não
11	positivo	> 80	Sim	Sim	Não
12	negativo	> 80	Sim	Sim	Não
13	positivo	> 80	Sim	Sim	Não
14	positivo	> 80	Sim	Sim	Não
15	positivo	> 80	Sim	Sim	Não
16	positivo	> 80	Sim	Sim	Não
17	positivo	> 80	Sim	Não	Sim
18	positivo	> 80	Sim	Óbito	Não
19	positivo	> 80	Sim	Não	Sim
20	negativo	> 80	Sim	Sim	Sim
21	positivo	> 80	Sim	Sim	Não
22	positivo	> 80	Sim	Sim	Não
23	negativo	> 80	Sim	Sim	Não

As complicações analisadas foram: infecção bacteriana associada, particularmente infecções respiratórias e distúrbios hematológicos e a toxicidade ao glucantime foi avaliada pelas alterações hepáticas, renais e cardíacas.

Foi considerado como portador de infecção bacteriana aquele paciente que necessitou de antibioticoterapia durante seu período de internação e o local da infecção foi identificado.

Os pacientes que evoluíram com epistaxes, sangramento em cavidade oral (gengivorragia), vias digestivas (hematêmese, hematoquezia), cutâneas (petéquias, equimoses) ou coagulopatia (prolongamento do TAP) foram considerados como portadores de distúrbio hematológicos (Gurgueira, 2004).

Os efeitos colaterais do glucantime foram avaliados pela presença de mialgia, artralgia, tromboflebite; a toxicidade hepática pela alteração das enzimas hepáticas 5 vezes acima do valor normal (TGO=200 U/l e TGP=280U/l); e a cardiotoxicidade pela presença de distúrbios de repolarização inversão e achatamento da onda T e aumento do intervalo QTC, ao eletrocardiograma.

Foi considerado como recidiva o recrudescimento da sintomatologia em até 12 meses após cura clínica (MS, 2006).

O Glucantime utilizado para o tratamento das crianças incluídas no trabalho foi do mesmo lote (número 503644) e foi fornecido pelo Ministério da Saúde.

### **3.5. Caracterização da análise da função fagocitária**

A função imunológica dos fagócitos foi avaliada pela realização do teste de fagocitose e do teste da porcentagem de redução do NBT, após coleta de 5 a 10ml de sangue venoso, feitos em três momentos (antes do tratamento, 48 horas e ao término no vigésimo primeiro dia) individualmente para as 23 crianças com leishmaniose visceral. Como controle normal foram estudadas 18 crianças clinicamente normais, não procedentes de área endêmica para leishmaniose visceral.

O primeiro ponto foi perdido em 7 crianças; o segundo em 14 e o terceiro em 7, por dificuldades técnica que, depende do manuseio de células vivas, pelo fato de crianças terem alta sem a coleta da última amostra e na admissão e em 48 horas pela recusa dos responsáveis.

Dos pacientes incluídos, o sangue foi coletado com *vacutainer* heparinizado com agulha de coleta múltipla, da região da fossa cubital, com material estéril e descartável, sendo utilizado para as análises das funções dos fagócitos. A capacidade fagocitária dos monócitos e neutrófilos foi avaliada pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos e pelos receptores para componentes do complemento e fração Fc da IgG pelo teste de fagocitose descrito por Brandi (1993), enquanto que a produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos foi analisado pelo teste do NBT (Campbell and Douglas, 1997).

### **3.5.1. Teste de fagocitose**

O teste de fagocitose em lâmina utilizado permite avaliar a fagocitose pelos neutrófilos e monócitos na mesma preparação. A fagocitose foi analisada pela ingestão de partículas pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, entre eles, os receptores para manose, glucana e receptores de limpeza, presentes na superfície dos fagócitos (Gordon, 2002) ou pelos receptores para opsoninas, como os componentes do sistema complemento e os receptores para a fração Fc dos anticorpos. Foi utilizada a

levedura *Saccharomyces cerevisiae* como partícula a ser fagocitada, pois elas são fagocitadas pelos mesmos receptores que fagocitam as leishmânias.

### **3.5.1.1. Teste de fagocitose pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos**

Após a coleta, o sangue era disposto em volumes de 40µL por escavação, em lâminas para microscopia, previamente marcadas com epóxi, delimitando uma área de 7mm de diâmetro, contendo 8 áreas cada lâmina. Em seguida as lâminas eram incubadas, em câmara úmida, a 37°C por 45 minutos, e as células não aderentes, principalmente hemácias e linfócitos, eram retiradas pela lavagem das lâminas com solução salina tamponada com fosfato (STF), pH 7,2 a 37°C, em ambiente umidificado. Após a lavagem, as escavações eram incubadas, em câmara úmida, por 30 minutos, a 37°C, com uma suspensão de *Saccharomyces cerevisiae*, nas proporções de 5 ou 20 leveduras por fagócito, contendo  $6,25 \times 10^4$  ou  $2,5 \times 10^5$  leveduras em 20 µL, respectivamente, em Hanks-triz (Gibco), na presença de soro fetal bovino (SFB). A média de fagócitos aderidos à lâmina já havia sido previamente padronizado,  $12,534 \pm 5,050$  células/área,  $5,63 \pm 0,85\%$  monócitos e  $93,5 \pm 1,08\%$  neutrófilos (Muniz-Junqueira, 2003). Em seguida as preparações eram novamente lavadas com STF para retirar as leveduras não fagocitadas, sendo que a última lavagem era realizada com Hanks-triz (Gibco), contendo 30% de SFB, para melhor preservar as preparações. As preparações eram então secas

em vento quente, fixadas com metanol absoluto (Vetec) por um minuto e coradas com Giemsa (Dinâmica) a 10%, por 10 minutos. Os fagócitos eram analisados ao microscópio óptico em imersão (aumento de 1000X), sendo contados 200 neutrófilos e 200 monócitos por preparação, para a determinação do índice fagocitário. As lâminas eram identificadas somente ao final da leitura.

O índice fagocitário era calculado pela multiplicação da média de *Saccharomyces cerevisiae* aderidas/ingeridas por fagócito pela proporção de fagócitos envolvidos na fagocitose (Shaw e Griffin, 1981), sendo quantificada individualmente para monócitos e para neutrófilos.

### **3.5.1.2. Teste de fagocitose pelos receptores para opsoninas: componentes do complemento e fração Fc da imunoglobulina**

O procedimento para análise da fagocitose pelos receptores para opsoninas foi realizado pela mesma técnica acima descrita, substituindo as leveduras não sensibilizadas por leveduras previamente incubadas com o soro fresco do próprio indivíduo, por 30 min, em banho Maria, a 37°C (Muniz-Junqueira e cols, 2003). O soro fresco é fonte de componentes do sistema do complemento e anticorpos, e quando incubado com as leveduras podem adsorver-se à superfície das mesmas. Brandi (1993) demonstrou que anticorpos presentes no soro podem também adsorver-se às leveduras quando preparadas pela técnica acima descrita.

### **3.5.1.3. Preparação da suspensão de estoque de leveduras para utilização no teste de fagocitose**

Para a realização dos testes, as leveduras foram previamente preparadas para uso e mantidas a 4°C.

Para a preparação da suspensão de estoque de leveduras foi utilizada a técnica de Lachman e Hobart (1978). Com esta técnica ocorre uma modificação na superfície do fungo *Saccharomyces cerevisiae* que facilita a adsorção do componente C3 do complemento e de anticorpos presentes no soro.

Um tablete de 50 g de fermento fresco para pão (Fleischmann) foi dissolvido em 220 ml de STF e autoclavado a 121°C, em uma atmosfera, por 30 minutos. Em seguida a suspensão foi lavada com STF por várias vezes por centrifugação até obter-se o sobrenadante límpido. O sedimento foi suspenso em 28 ml de STF contendo 0,1M de 2- mercaptoetanol e em seguida foi incubado a 37°C, por 2h, em agitação. A suspensão foi lavada três vezes para retirar o 2-mercaptoetanol e suspensa em 55ml de solução de iodocetamida 0,02M em STF. Foi feita outra incubação a temperatura ambiente, por 2h, com agitação, e em seguida a suspensão foi lavada três vezes por centrifugação em STF, suspensa em 220ml de STF e o pH acertado para 7,2. A suspensão foi autoclavada novamente por 30 minutos, a 121°C, em seguida lavada por centrifugação até obter-se o sobrenadante límpido e foi suspensa em 110ml de tampão veronal, pH 7,2, contendo 200mg/L de azida sódica como preservativo. O estoque foi mantido a temperatura de 4°C tendo sido utilizada em 6 meses.

#### **3.5.1.4. Preparação das leveduras para uso no teste de fagocitose**

A preparação das leveduras para uso era feita em cada experimento, sendo retirado 40 µL da suspensão estoque, o volume completado para 1mL de STF e a suspensão lavada três vezes por centrifugação. Após a última centrifugação a preparação era homogeneizada e quantificada em câmara de Neubauer.

#### **3.5.2. Teste do nitroblue tetrazolium (NBT)**

A produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos de pacientes portadores de leishmaniose visceral e indivíduos controles normais foi realizada pelo teste do *nitroblue tetrazolium*. Este teste detecta de maneira indireta a produção de ânions superóxido (Nydegger, 1973) pela transformação do NBT de um composto amarelo e solúvel para outro de coloração azul e insolúvel, visível no citoplasma do fagócito, sendo que a proporção de células que reduzem o NBT têm relação direta com a produção de radicais de oxigênio pela célula (Campbell e Douglas, 1977).

Os fagócitos do sangue total eram separados por aderência à lâmina como acima descrito. Em seguida eram incubados com uma solução de NBT (Sigma) a 0,05% em Hanks-triz (Gibco), por 20 minutos, em câmara úmida, a

37°C, para avaliar a produção basal de radicais de oxigênio. Para testar a produção de radicais de oxigênio após estímulo, os fagócitos eram incubados com uma suspensão de NBT (Sigma) a 0,05%, em Hanks-triz (Gibco), contendo  $6,25 \times 10^4$  leveduras, por 20 minutos, em câmara úmida, a 37°C. Após a incubação as lâminas eram lavadas com STF, sendo a última lavagem feita com Hanks-triz (Gibco), contendo 30% de STF. As preparações eram secas com vento quente, fixadas com metanol absoluto (Vetec) por um minuto e contra-coradas com safranina a 0,05% (Reagen), por 5 minutos.

As preparações eram examinadas ao microscópio óptico sendo determinado em 200 células por preparação, basal ou estimuladas, determinando-se a porcentagem de fagócitos que reduziram o corante NBT.

### **3.6. Análise estatística**

As análises estatísticas e as apresentações gráficas foram realizadas empregando-se o *software* Prism® 4 for Windows (GraphPad Software, Inc., USA, 2005).

Antes da aplicação dos testes estatísticos verificou-se a normalidade ou não das variáveis amostrais. Para comparação entre duas variáveis independentes com distribuição normal foi utilizado o teste *t* de *Student* e para aquelas que não apresentaram distribuição normal foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para análise de mais do que duas variáveis com distribuição normal foi utilizado o teste de ANOVA seguido do método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos, e para aquelas com distribuição não

normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos.

Para analisar a relação entre as variáveis foi aplicado o teste de correlação de Pearson se a distribuição amostral dos dados era normal e a de Spearman para aquelas com distribuição anormal.

As diferenças entre as variáveis comparadas foram consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade bi-caudal da sua ocorrência devida ao acaso (erro tipo I) foi menor que 5 % ( $p < 0,05$ ).

Para homogeneidade das representações os dados foram expressos graficamente como mediana, quartis e extremos e as tabelas respectivas encontram-se no anexo. Os parâmetros clínicos foram representados em histograma.

## **4. RESULTADOS**

## **4.1. Parâmetros Clínicos**

Foram estudadas 23 crianças que tiveram indicação de internação para o tratamento de leishmaniose visceral com glucatime no Hospital Regional da Asa Sul e que preenchiam os critérios de inclusão no trabalho, das quais 22 eram primoinfectadas e uma era recidiva.

### **4.1.1. Estado nutricional**

O estado nutricional das crianças foi avaliado pelo escore z do peso para a idade (P/I), estatura para idade (E/I) e do peso para estatura (P/E) (Tabela 2 e Figura 2). As crianças com calazar foram mais desnutridas em relação ao E/I do que as crianças normais, sendo a mediana do escore z da E/I menor do que o das crianças normais,  $p=0,02$ , pelo teste t. Das crianças com calazar, 30% apresentavam algum grau de desnutrição pelo escore z do P/I, 22% pelo escore z do P/E e 35% pelo escore z da E/I, enquanto 22%, 6% e 17%, respectivamente, das crianças normais apresentaram algum grau de desnutrição. Os dados encontram-se discriminados na Tabela 2.

**Tabela 2 - Estado nutricional avaliado pelo escore Z em crianças com calazar e controles normais**

Escore Z	Peso /idade		Estatura/idade		Peso/altura	
	Controle n(%)	Calazar n(%)	Controle n(%)	Calazar n(%)	Controle n(%)	Calazar n(%)
$\geq -1$	14	16	17	15	15	18
Bem nutrido	(78%)	(70%)	(94%)	(65%)	(83%)	(78%)
$-1 > Z \geq -2$	4	5	1	5	3	2
Desnutrição leve	(22%)	(22%)	(6%)	(22%)	(17%)	(9%)
$-2 > Z \geq -3$	0	1	0	1	0	3
Desnutrição moderada	(0%)	(4%)	(0%)	(4%)	(0%)	(13%)
$< -3$	0	1	0	2	0	0
Desnutrição grave	(0%)	(4%)	(0%)	(9%)	(0%)	(0%)

#### 4.1.2. Febre

O tempo de febre relatado pelos responsáveis dos pacientes até o momento da admissão variou de 4 a 150 dias, com média $\pm$ DP de 26 $\pm$ 30 dias, sendo que em 61% (14/23) das crianças o tempo de febre foi menor do que 30 dias (Tabela 3).

Na evolução da febre durante a internação observamos que na admissão, 100% dos pacientes apresentavam febre, na primeira semana de tratamento houve redução de 61% no número de crianças que apresentaram febre, na segunda semana do tratamento a redução foi de 83% e ao final do tratamento a febre estava ausente em 100% das crianças (Figura 3).

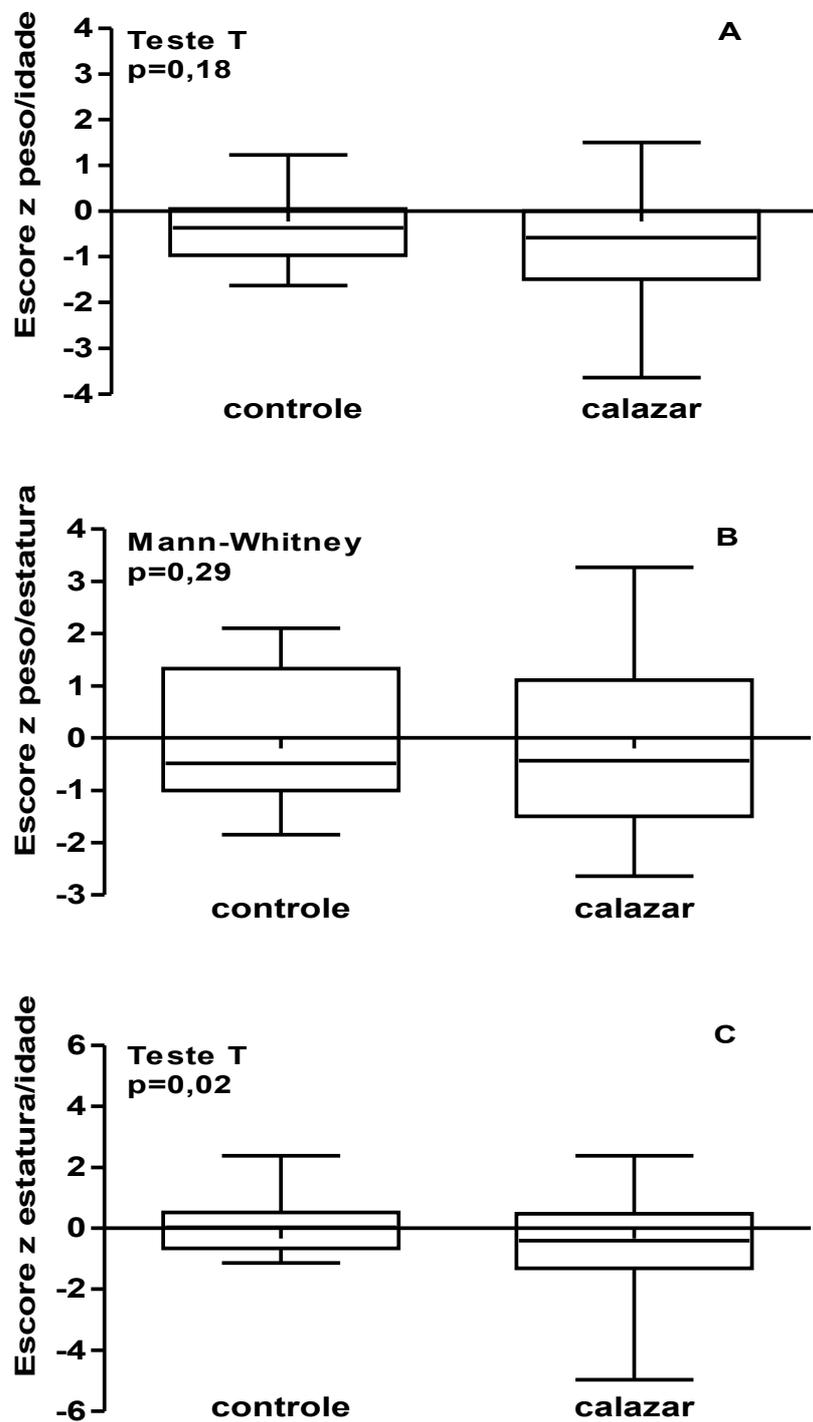


Figura 2- Estado nutricional pelo escore z do peso para idade (P/I) (A), peso para estatura (P/E) (B) e estatura para idade (E/I) (C) de crianças com leishmaniose visceral e controles normais,  $p=0,02$  teste t.

**Tabela 3 - Frequência do tempo de febre até a admissão**

Tempo de febre	n (%)
<30 dias	14 (61%)
30-60 dias	8 (35%)
>60 dias	1 (4%)

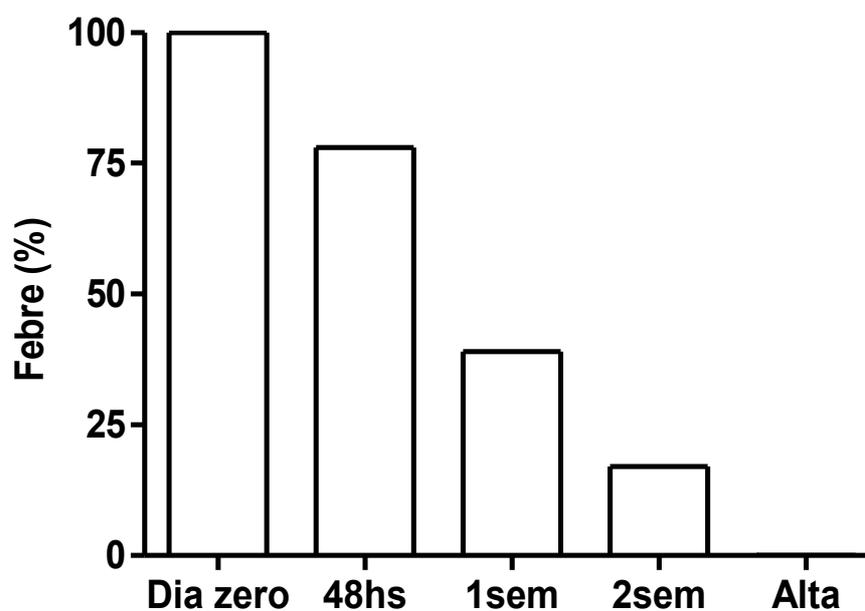


Figura 3- Tempo de redução da febre durante o tratamento com glucantime de crianças com calazar.

### **4.1.3. Sintomas e sinais clínicos**

Pela análise dos sintomas relatados pelo acompanhante observamos que a febre e o aumento do volume abdominal foram os sintomas mais freqüentes. A febre estava presente na história em 100% dos casos no momento da admissão e o aumento do volume abdominal em 74% (17/23). Apatia ocorreu em 52% dos casos (12/23), emagrecimento em 48% (11/23), tosse em 39% (9/23), vômito em 26% (6/23), dor abdominal em 26% (6/23) e diarreia em 17% (4/23) (Figura 4A).

O exame clínico na admissão mostrou que a palidez cutânea e a visceromegalia estavam presentes em 100% dos casos, a taquipnéia em 26% (6/23), edema em 17% (4/23), icterícia em 9% (2/23) e petéquia em 9% (2/23) (Figura 4B).

### **4.1.4. Evolução da visceromegalia**

A mediana do tamanho do baço na admissão foi de 9 cm, variando de 2 a 13 cm. Ao término do tratamento a mediana foi de 3 cm variando de zero a 8cm. O tratamento ocasionou uma diminuição da mediana do tamanho do baço de 9 cm para 3 cm,  $p < 0,0001$ , Kruskal-Wallis, seguida pelo método de Dunn para a comparação entre os grupos (Figura 5A).

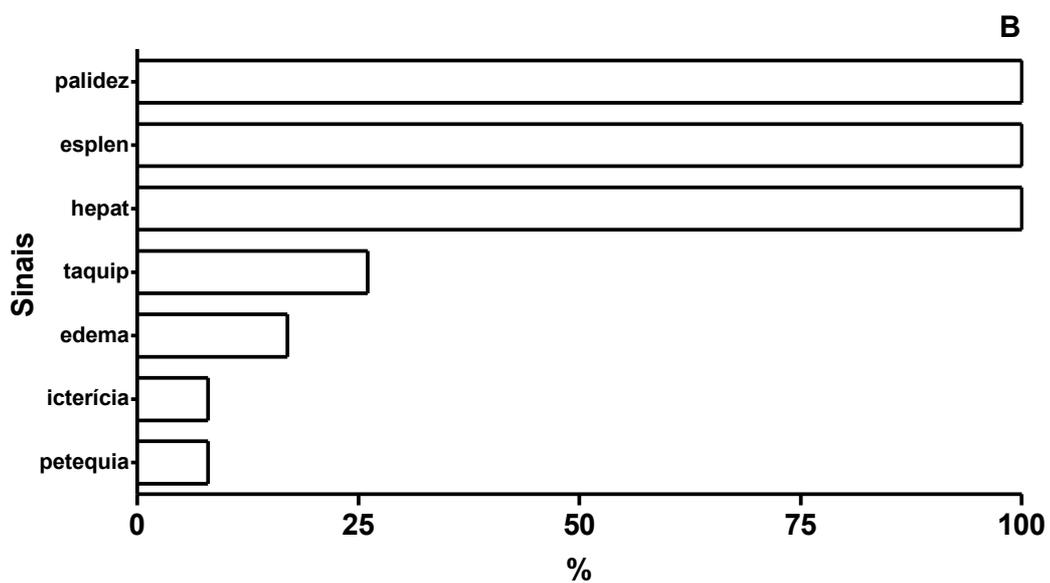
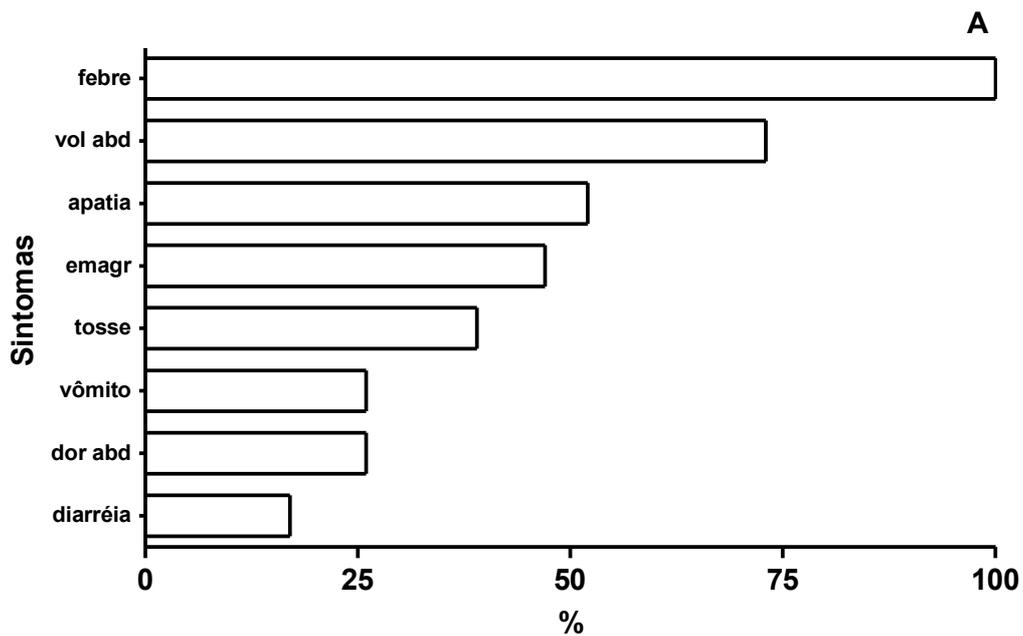


Figura 4- Sintomas relatados pelos responsáveis (A) e sinais observados (B) na admissão de crianças com calazar. Vol Abd= aumento volume abdominal, emagr= emagrecimento, dor abd= dor abdominal, esplen=esplenomegalia, hepat= hepatomegalia, taquip=taquipnéia.

A mediana do tamanho do fígado abaixo do rebordo costal direito na admissão foi de 5,5 cm variando de 3 a 9 cm. Na alta, a mediana foi de 2 cm variando de 0 a 5 cm,  $p < 0,0001$ , Kruskal-Wallis, seguida pelo método de Dunn para a comparação entre os grupos) (Figura 5B).

#### **4.1.5. Alterações hematológicas**

A análise do hemograma mostrou que na admissão 100% (23/23) das crianças apresentavam anemia, 96% (22/23) plaquetopenia, 78% (18/23) leucopenia e 35% (8/23) neutropenia. A evolução destas variáveis foi analisada durante o tratamento destas crianças com glucantime, demonstrando uma melhora dos parâmetros hematimétricos durante a internação, pois em duas semanas de tratamento estes valores eram 65% (15/23), 22% (5/23), 35% (8/23), respectivamente.

A mediana da concentração de hemoglobina foi de 7,4 g/dl variando de 4,5 a 11,1 g/dl. A mediana da concentração de hemoglobina aumentou de 7,4 para 9,3 após duas semanas do tratamento clínico com glucantime,  $p=0,001$ , Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para a comparação entre os grupos (Figura 6A).

A mediana da contagem absoluta de leucócitos foi de 3000/mm<sup>3</sup>, variando de 1700 a 9600/mm<sup>3</sup>. Após duas semanas do tratamento o valor foi de 5600/mm<sup>3</sup>,  $p=0,004$ , Kruskal-Wallis, seguida pelo método de Dunn para a comparação entre os grupos) (Figura 6B).

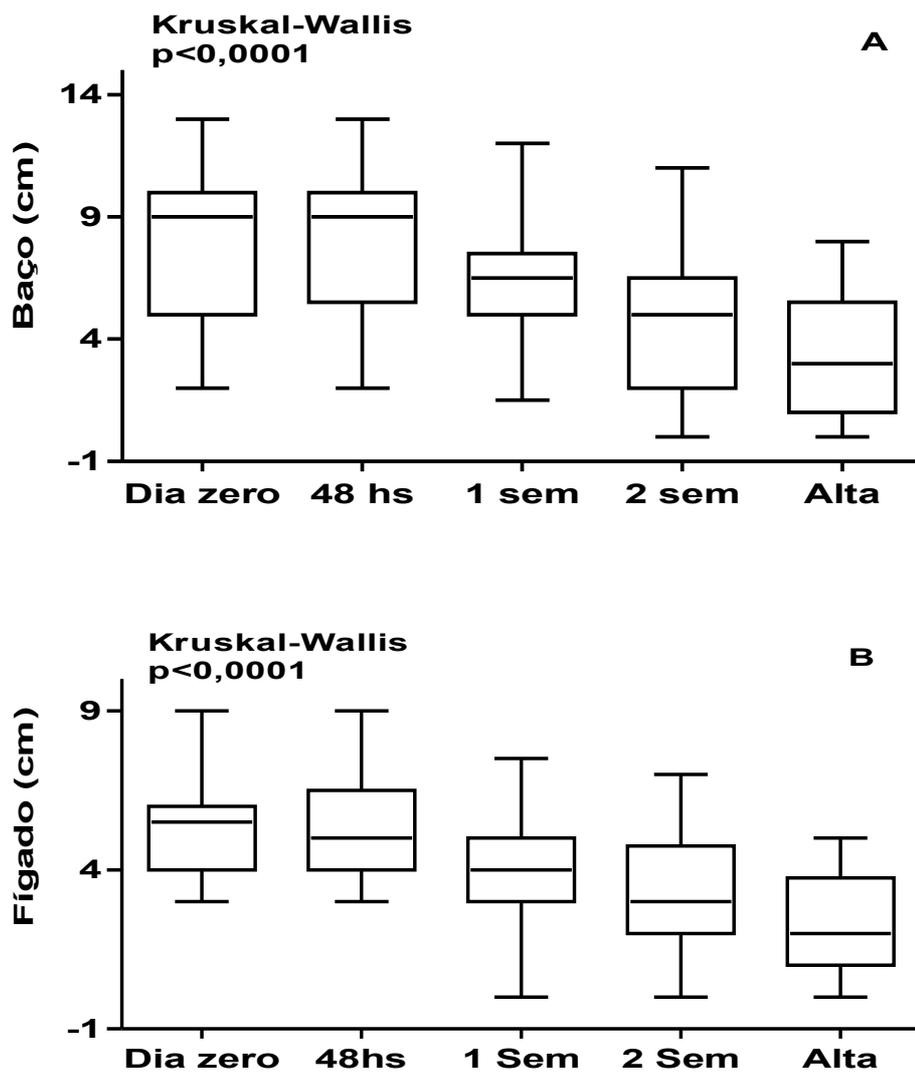


Figura 5- Evolução do tamanho do baço (A) e do fígado (B) de crianças com calazar durante o tratamento clínico com o glucantime,  $p < 0,0001$ , Kruskal-Wallis seguido de Dunn. (Dunn- Dia zero vs 2 semana/ Dia zero vs alta/ 48hs vs 2 semana/ 48hs vs alta/ 1 semana vs alta;  $p < 0,05$  para A // Dunn- Dia zero vs 2 semana/ Dia zero vs alta/ 48hs vs 2 semana/ 48hs vs alta;  $p < 0,05$  para B)

A mediana da contagem absoluta de neutrófilos foi 1344/mm<sup>3</sup> variando de 360 a 4482/mm<sup>3</sup>. Após duas semanas do tratamento, os valores dos neutrófilos passaram de 1344 para 2640/mm<sup>3</sup>, p=0,0007, Kruskal-Wallis, seguida pelo método de Dunn para a comparação entre os grupos ( Figura 6C).

A mediana da contagem absoluta de plaquetas foi 74000/ mm<sup>3</sup> variando de 25000 a 270000/ mm<sup>3</sup>. Após duas semanas do tratamento, observou-se aumento deste valor de 74000 para 228000/ mm<sup>3</sup>, p=0,0007, Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para a comparação entre os grupos (Figura 6D)

#### **4.1.6. Alterações das enzimas hepáticas**

A análise das enzimas hepáticas mostrou que na admissão a mediana da TGO foi de 69 U/L variando de 15 a 1040 U/L. Sendo que em 74 % (17/23) das crianças com calazar encontrava-se com este valor elevado. Após a segunda semana de tratamento a mediana foi de 46 U/L, p=0,2, Kruskal-Wallis. A mediana da TGP foi de 44 U/L variando de 10 a 698 U/L. Após duas semanas a mediana foi de 33 U/L, p=0,46, Kruskal-Wallis (Figura 7).

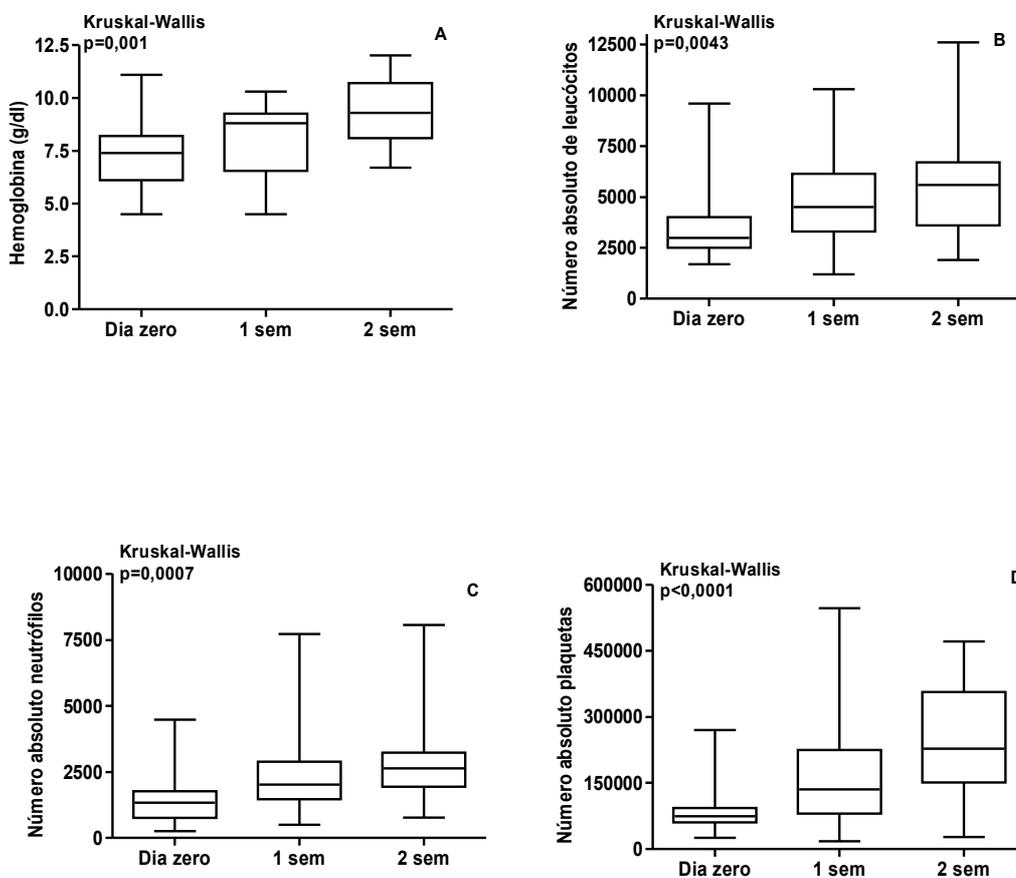


Figura 6- Evolução das alterações hematológicas de crianças com leishmaniose visceral durante as primeiras duas semanas de tratamento com glucantime. Em A: hemoglobina (g/dl),  $p=0,001$ , Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Em B: número absoluto de leucócitos,  $p=0,0043$ , Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Em C: número absoluto de neutrófilos,  $p=0,0007$ , Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Em D: número absoluto de plaquetas,  $p<0,0001$ , Kruskal-Wallis, seguido de Dunn. (Dunn- Dia zero vs 2 semana;  $p<0,05$  para A,B,C, D/ Dia zero vs 1 semana;  $p<0,05$  para C e D)

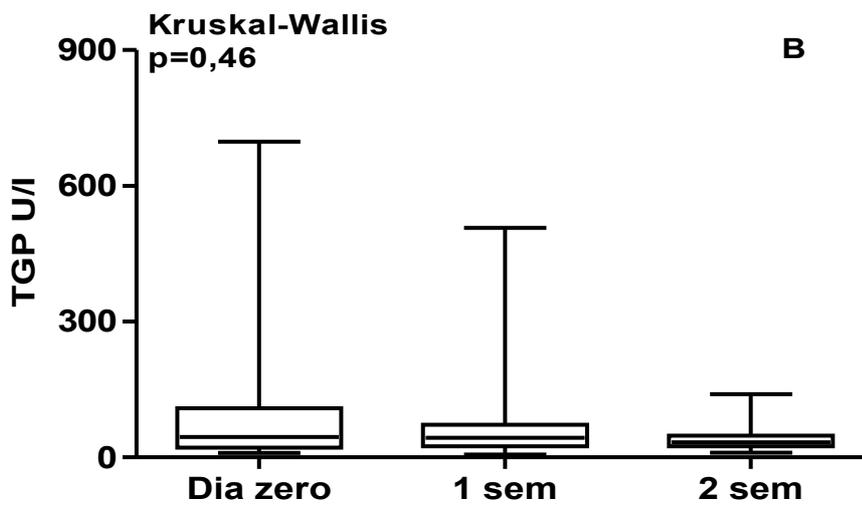
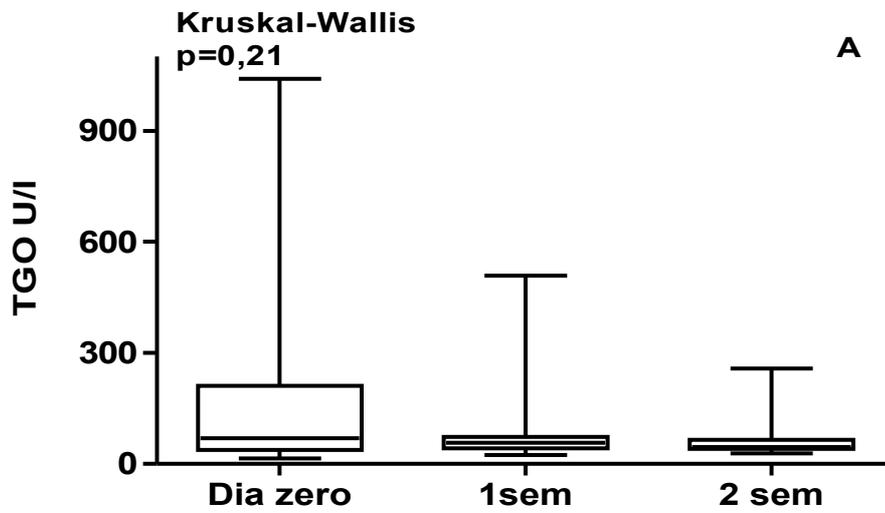


Figura 7- Evolução dos níveis séricos de TGO (U/l) (A) e TGP(U/l) (B) até a segunda semana de tratamento com glucantime de crianças com calazar, para A:  $p=0,21$ , Kruskal-Wallis, seguido de Dunn, e para B:  $p=0,46$ , Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

#### 4.1.7. Relação entre albumina e globulina

Na admissão, a mediana das concentrações séricas de albumina foi de 3 g/dl, sendo que 72% (13/18) das crianças com calazar mostravam concentrações séricas de albumina abaixo de 3,5 g/dl. A mediana dos níveis séricos de globulina foi 3,4 g/dl. Observamos uma tendência estatística de relação inversa entre albumina e globulina nos pacientes com calazar. Coeficiente de correlação de Pearson  $r_p = -0,41$ ,  $p = 0,08$

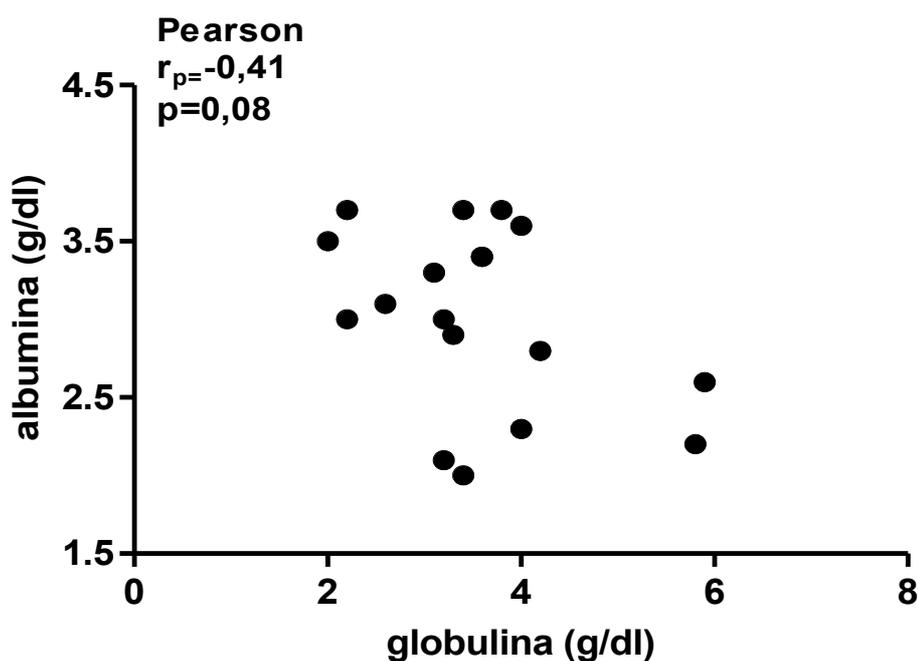


Figura 8- Relação negativa entre concentração sérica de albumina (g/dl) e globulina (g/dl) de crianças com calazar antes do início do tratamento. Coeficiente de correlação de Pearson,  $r_p = -0,41$ ,  $p = 0,08$

#### 4.1.8. Complicações

Observamos infecção bacteriana associada em 35% dos pacientes (8/23) com calazar, sendo que destes, 62,5% (5/8) também apresentavam neutropenia. Os locais de infecção foram: pulmonar em 75% (6/8) dos pacientes e de partes moles em 25% (2/8) das crianças, sendo um abscesso em membro superior e o outro abscesso perianal. Um dos pacientes com infecção pulmonar evoluiu para septicemia e óbito em insuficiência respiratória.

Observamos distúrbios hematológicos em 13% (3/23) dos casos, sendo que 9% (2/23) das crianças apresentaram apenas petúquia e em uma delas ocorreu distúrbio hemorrágico associado a coagulopatia, com hemorragia no local de punção e alteração das provas de função hepática (TAP 51% e dosagem sérica de albumina 2 g/dl). Este último caso evoluiu com insuficiência hepática e óbito.

Os efeitos colaterais ao glucantime evidenciados foram mal-estar e mialgia e/ou artralgia em 13% (3/23) das crianças tratadas e a sintomatologia ocorreu durante a infusão da droga. Houve provável toxicidade hepática em 13% (3/23) das crianças tratadas, pois não têm como diferenciar entre a ação da leishmânia e a hepatotoxicidade da droga. Não observamos complicações renais ou cardíacas.

Houve dois óbitos. O primeiro caso foi de um paciente que apresentava na admissão história de febre há 30 dias, com queixas de aumento abdominal, emagrecimento, apatia e tosse. Ao exame clínico palidez cutânea, fígado a 4,5 cm e baço a 6 cm, taquipnéia e edema. Os exames laboratoriais mostravam

anemia (Hb=6g/dl), leucopenia (3200/mm<sup>3</sup>), e plaquetopenia (103000/mm<sup>3</sup>). Apresentou na enfermaria queda da contagem de neutrófilos para o qual foi introduzido cefepime por ser neutropênico febril. Foi introduzido cefepime e a criança evoluiu bem sem intercorrências, sendo suspenso cefepime após o décimo dia de tratamento. Apresentou piora do quadro da tosse e dificuldade respiratória sendo transferido à unidade de terapia intensiva devido ao quadro de pneumonia e insuficiência respiratória. Morreu no vigésimo dia do tratamento. Não foi possível analisar a lâmina da fagocitose pelo número restrito de células aderidas na lâmina. A porcentagem de redução basal do NBT foi de 94% e 96% em 48 horas. A porcentagem de redução após estímulo foi de 100% ao início e 98% em 48 horas.

O outro caso foi de um paciente que na admissão apresentava 19 dias de febre, com queixas de aumento abdominal, emagrecimento, apatia, diarreia, vômito e ao exame clínico apresentava palidez cutânea, icterícia, edema generalizado com ascite e fígado a 4,5 cm e baço a 6cm. Os exames revelavam anemia (Hb=4,5 g/dl), leucopenia (2500/mm<sup>3</sup>), neutropenia (450/mm<sup>3</sup>), plaquetopenia (44.000/mm<sup>3</sup>), TGO=480U/L e TGP=130U/L, albumina 2g/dl, TAP= 19,8 (51%). Evoluiu com sangramento em local de punção óssea e foi removido para unidade de terapia intensiva no dia seguinte. Fez uso de uma dose de glucantime, sendo modificada para anfotericina lipossomal no primeiro dia de internação na unidade de terapia intensiva, por isso somente foi avaliado o teste de fagocitose na admissão. Nesta criança a capacidade fagocitária dos monócitos estava alterada apresentando o menor índice fagocitário observado para receptores para opsoninas, mesmo após aumento

das partículas a ser fagocitadas. A capacidade dos neutrófilos neste paciente não pôde ser verificada pela escassez de neutrófilos aderida na lâmina.

## **4.2. Avaliação funcional do sistema de fagócitos**

Foram utilizados como parâmetro para avaliar a capacidade fagocitária dos monócitos e dos neutrófilos o índice fagocitário, a proporção de fagócitos envolvidos na fagocitose e a média de leveduras ingeridas/aderidas por fagócito.

A fagocitose foi avaliada pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos quando as leveduras foram sensibilizadas com soro fetal bovino inativado e pelos receptores para complemento e anticorpos quando as leveduras foram sensibilizadas com o soro fresco do próprio indivíduo. Na sensibilização com soro fresco, particularmente as frações C3 do sistema do complemento ligam-se as leveduras facilitando a fagocitose. Anticorpos podem também adsorver-se a superfície das leveduras (Brandi, 1993).

A capacidade microbicida dos fagócitos foi avaliada pela porcentagem de redução do *nitroblue tetrazolium* basal e estimulada.

## **4.2.1. CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DOS MONÓCITOS**

### **4.2.1.1. Influência do glucantime sobre a capacidade fagocitária de monócitos de crianças com leishmaniose visceral pelos receptores para complemento e fração Fc da imunoglobulina**

Com objetivo de avaliar a influência da infecção pela leishmânia sobre a função fagocitária o índice fagocitário dos monócitos foi avaliado em crianças com leishmaniose visceral em comparação com crianças controles normais.

Observamos que a mediana do índice fagocitário dos monócitos das crianças com leishmaniose visceral foi significativamente maior do que o das crianças normais, tanto quando foi utilizado  $6,25 \times 10^4$  leveduras por escavação (199,5 *versus* 132, respectivamente,  $p=0,01$ , ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos, quanto  $2,5 \times 10^5$  leveduras por escavação (272 *versus* 215, respectivamente,  $p=0,04$ , Kruskal Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). O mesmo padrão ocorreu para o número de leveduras ingeridas por monócitos (2,7 *versus* 1,8, respectivamente para  $6,25 \times 10^4$  leveduras por escavação,  $p<0,001$ , Kruskal Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos), e 4 *versus* 2,7, respectivamente para  $2,5 \times 10^5$  leveduras por escavação,  $p=0,003$ , Kruskal Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos. Não houve diferença estatística na proporção de monócitos envolvidos na fagocitose entre os dois grupos (77 *versus* 73

respectivamente, para  $6,25 \times 10^4$  leveduras por escavação  $p=0,33$ , Kruskal Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos; e para  $2,5 \times 10^5$  leveduras por fagócito 82 *versus* 76,  $p=0,89$ , Kruskal Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos (Figura 9 e 10)

A influência do glucantime sobre a capacidade fagocitária dos monócitos foi avaliada após 48 h e 21 dias de tratamento. Observamos diminuição do índice fagocitário ao final do tratamento, tanto para  $6,25 \times 10^4$  (de 199,5 *versus* 199 *versus* 135,5,  $p=0,01$ , ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos), quanto para  $2,5 \times 10^5$  leveduras por escavação (de 272 *versus* 265 *versus* 215,  $p=0,04$ , Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). Esta diminuição ocorreu pela ingestão de menor número de leveduras por fagócito ao final do tratamento (de 2,7 *versus* 2,6 *versus* 2,1,  $p<0,001$ , Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos, quando avaliado utilizando  $6,25 \times 10^4$  leveduras por escavação. O mesmo ocorreu quando foi utilizado  $2,5 \times 10^5$  leveduras por escavação (de 4 *versus* 3,4 *versus* 2,7,  $p=0,003$ , Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos). Não houve diferença na proporção de monócitos envolvidos na fagocitose até o final do tratamento para  $6,25 \times 10^4$  e para  $2,5 \times 10^5$  leveduras por escavação (73 *versus* 62 *versus* 60,5 após 21 dias,  $p=0,33$ , Kruskal-Wallis; e 76 *versus* 71 *versus* 75,  $p=0,89$ , Kruskal-Wallis, respectivamente) (Figura 9 e 10).

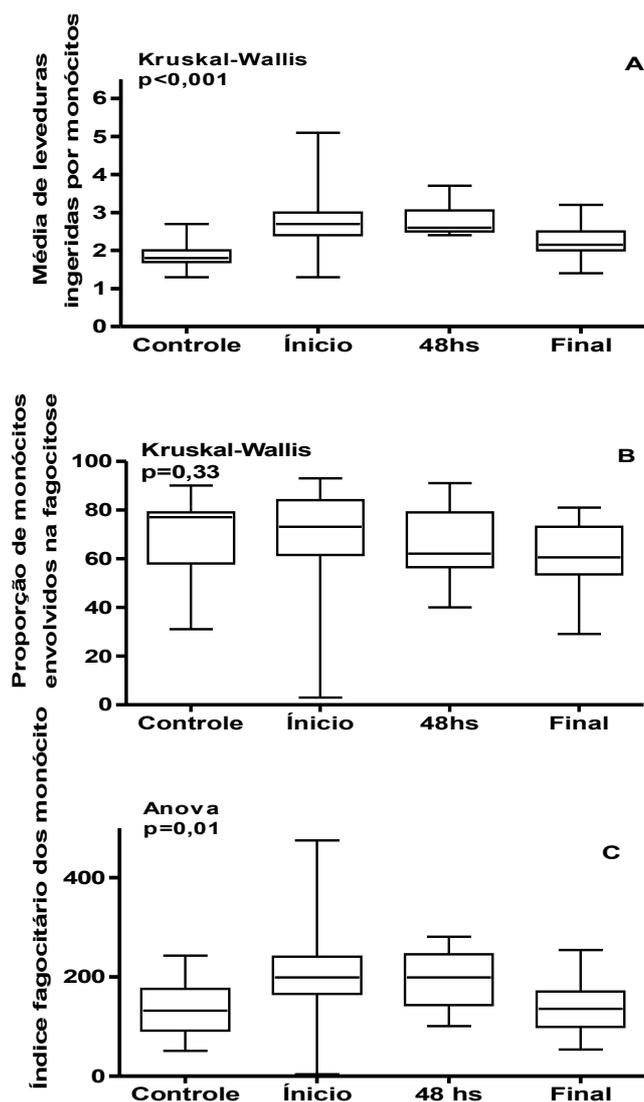


Figura 9- Influência do tratamento com glucantime em crianças com leishmaniose visceral, após 48 horas e ao final do tratamento, sobre a capacidade fagocitária de monócitos, utilizando  $6,25 \times 10^4$  *Saccharomyces cerevisiae* por escavação, na presença de soro do próprio indivíduo, comparados com a capacidade fagocitária antes do tratamento e com crianças normais. Média de leveduras ingeridas por monócito (A); Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose (B); Índice fagocitário (C). Em A: aumento da média de leveduras ingeridas por monócito comparadas com crianças normais e redução ao final do tratamento ( $p < 0,001$ , Kruskal-Wallis seguido de Dunn). Em B: não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na proporção dos monócitos envolvidos na fagocitose. ( $p = 0,33$ , Kruskal-Wallis seguido de Dunn). Em C: aumento do índice fagocitário comparado com crianças normais e redução ao final do tratamento ( $p = 0,01$ , ANOVA, seguido de Newman-Keuls). Dados expressos como mediana, quartis e extremos. (Dunn-controle vs início/ controle vs 48hs;  $P < 0,05$ ) (Student-Newman-Keuls-controle vs início / início vs final;  $p < 0,05$ )

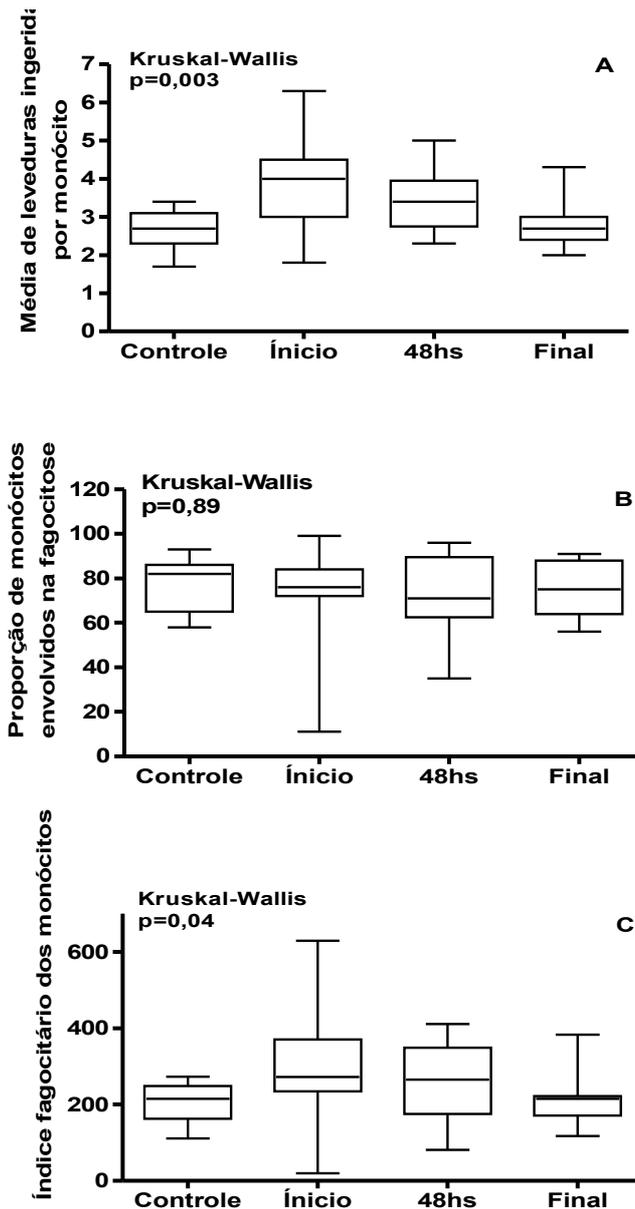


Figura 10- Influência do tratamento com glucantime em crianças com leishmaniose visceral com 48 horas e ao final do tratamento sobre a capacidade fagocitária de monócitos utilizando  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* por escavação, na presença de soro do próprio indivíduo, comparados com a capacidade fagocitária antes do tratamento e com crianças normais. Média de leveduras ingeridas por monócito (A); Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose (B); Índice fagocitário (C). Em A: aumento da média de leveduras ingeridas por monócitos comparadas com crianças normais e redução ao final do tratamento ( $p < 0,003$ , Kruskal-Wallis seguido de Dunn). Em B: não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na proporção dos monócitos envolvidos na fagocitose. ( $p = 0,89$ , Kruskal-Wallis seguido de Dunn). Em C: aumento do índice fagocitário comparado com crianças normais e redução ao final do tratamento ( $p = 0,04$ , Kruskal-Wallis seguido de Dunn). Dados expressos como mediana, quartis e extremos. (Dunn-control vs início / início vs final;  $p < 0,05$ )

#### **4.2.1.2. Influência do glucantime sobre a capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos em crianças com leishmaniose visceral.**

Nenhuma diferença pode ser observada quando a fagocitose foi avaliada pelos receptores para padrões moleculares de patógenos (Figuras 11 e 12).

### **4.2.2. CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DOS NEUTRÓFILOS**

#### **4.2.1.1. Influência do glucantime sobre a capacidade fagocitária de neutrófilos de crianças com leishmaniose visceral pelos receptores para complemento e fração Fc da imunoglobulina**

Para avaliar a influência da infecção sobre a capacidade fagocitária dos neutrófilos foi analisado o índice fagocitário dos neutrófilos, a proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose e a média de partículas fagocitadas por neutrófilo de crianças com leishmaniose visceral antes do tratamento com glucantime em comparação com crianças normais.

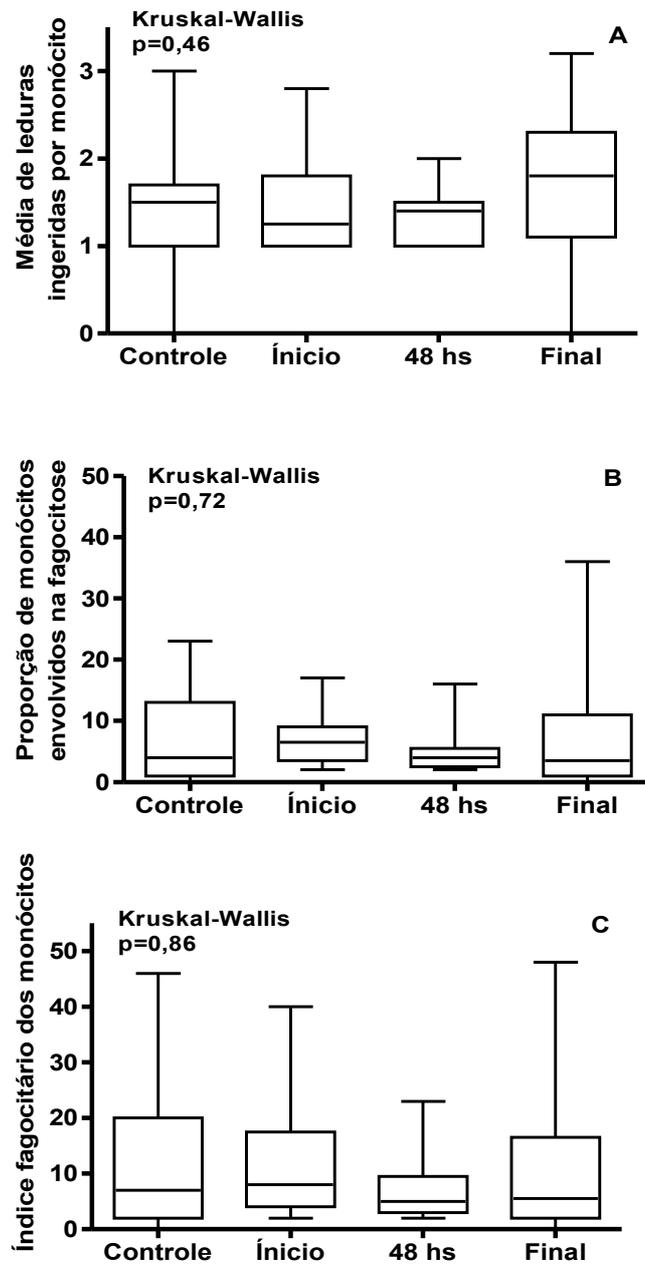


Figura 11-Influência do tratamento com glucantime em crianças com leishmaniose visceral com 48 horas e ao final do tratamento sobre a capacidade fagocitária de monócitos utilizando  $6,25 \times 10^4$  *Saccharomyces cerevisiae* por escavação, na presença de soro fetal bovino, comparados com a capacidade fagocitária antes do tratamento e com crianças normais. Média de leveduras ingeridas por monócito (A); Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose (B); Índice fagocitário (C). Em A, B e C não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos. ( $p=0,46$ ;  $p=0,72$ ;  $p=0,86$ ; respectivamente). Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Dados expressos como mediana, quartis e extremos.

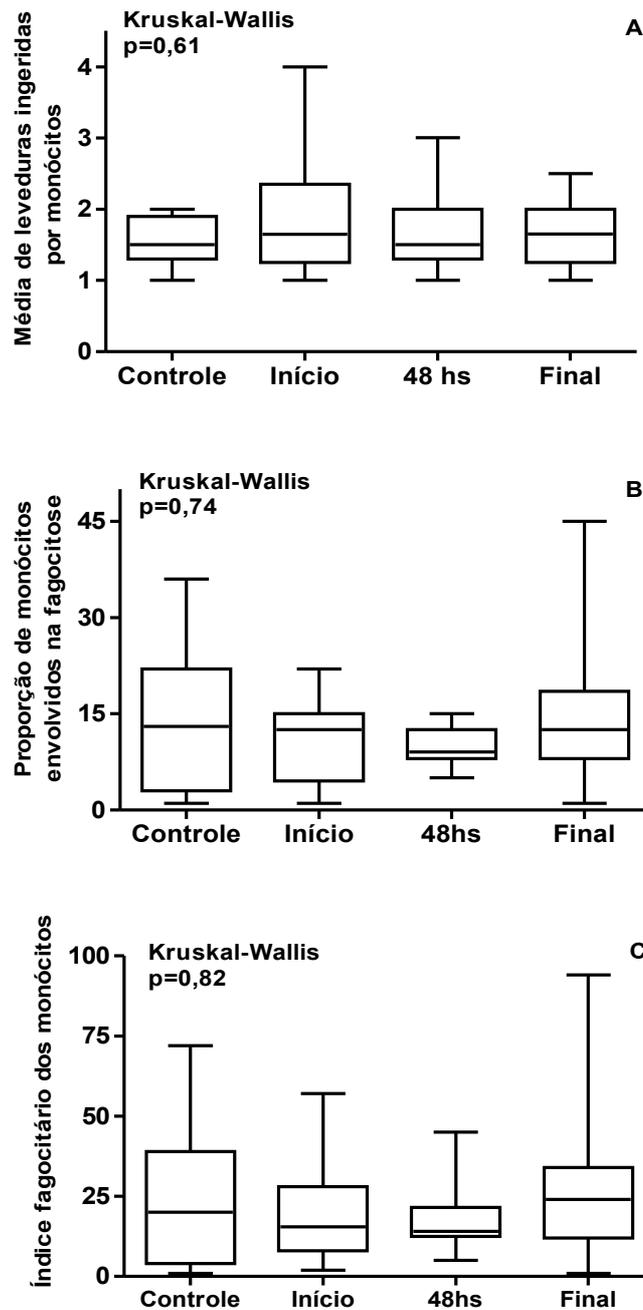


Figura 12- Influência do tratamento com glucantime em crianças com leishmaniose visceral com 48 horas e ao final do tratamento sobre a capacidade fagocitária de monócitos utilizando  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* por escavação, na presença de soro fetal bovino, comparados com a capacidade fagocitária antes do tratamento e com crianças normais. Média de leveduras ingeridas por monócito (A); Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose (B); Índice fagocitário (C). Em A, B e C não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. ( $p=0,61$ ;  $p=0,74$ ;  $p=0,82$ ; respectivamente). Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Dados expressos como mediana, quartis e extremos.

A mediana do índice fagocitário dos neutrófilos das crianças com leishmaniose visceral foi significativamente maior do que o das crianças normais tanto para  $6,25 \times 10^4$  quanto para  $2,5 \times 10^5$  leveduras por escavação (261 *versus* 151,  $p=0,006$ , ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos; e 347,5 *versus* 264,  $p=0,012$ , teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos, respectivamente). O mesmo padrão ocorreu quando avaliamos o número de leveduras ingeridas por neutrófilo (3,1 *versus* 2,  $p<0,0001$ , ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos; 3,7 *versus* 2,9,  $p=0,001$ , respectivamente). Não houve diferença na proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose entre as crianças normais e aquelas com leishmaniose visceral (82,5 *versus* 76,  $p=0,25$ , ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos; 91 *versus* 86,  $p=0,42$ , Kruskal-Wallis seguido de Dunn, respectivamente) (Figura 13 e 14).

A influência do glucantime sobre a função dos neutrófilos foi avaliada após 48h e ao final do tratamento. As medianas do índice fagocitário dos neutrófilos das crianças com LV antes do tratamento encontravam-se elevadas em comparação com as crianças normais e passou a valores semelhantes as das crianças normais após o final do tratamento. Os valores do índice fagocitário em 48 horas e ao final do tratamento, tanto para  $6,25 \times 10^4$  quanto para  $2,5 \times 10^5$  leveduras por escavação foram: 261 *versus* 256 *versus* 180,  $p=0,0006$ , ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos; 347,5 *versus* 297 *versus* 263,5,  $p= 0,012$ ,

Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados para a média de leveduras ingeridas por neutrófilos (3,1 *versus* 3,3 *versus* 2,1,  $p < 0,0001$ , ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos; 3,7 *versus* 3,6 *versus* 3,0 ,  $p = 0,001$ , ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos). Não houve diferença estatística na proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose em 48 horas e ao final do tratamento (82,5 *versus* 73 *versus* 75,5,  $p = 0,25$ , ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos; 91 *versus* 85 *versus* 88,  $p = 0,42$ , ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos, respectivamente (Figura 13 e 14).

#### **4.2.1.2. Influência do glucantime sobre a capacidade fagocitária dos neutrófilos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos em crianças com leishmaniose visceral**

Não foi possível detectar diferenças na fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos entre as crianças com leishmaniose visceral e controles normais e nem após o tratamento com o glucantime (Figuras 15 e 16).

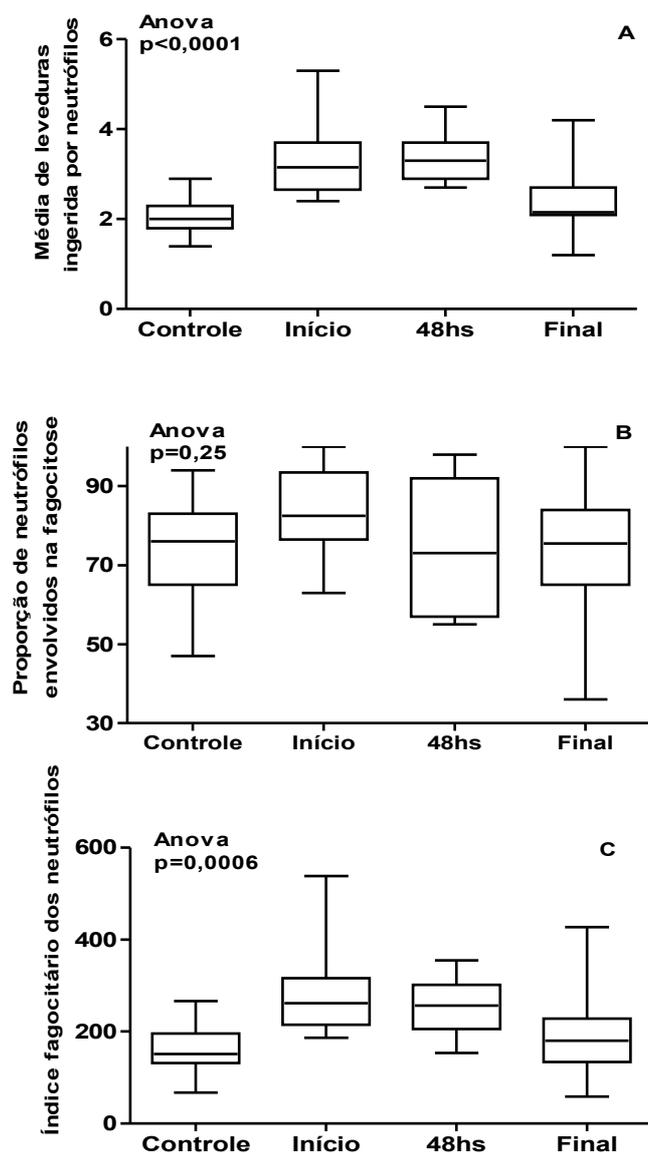


Figura 13- Influência do tratamento com glucantime em crianças com leishmaniose visceral com 48 horas e ao final do tratamento sobre a capacidade fagocitária de neutrófilos utilizando  $6,25 \times 10^4$  *Saccharomyces cerevisiae* por escavação, na presença de soro do próprio indivíduo, comparados com a capacidade fagocitária antes do tratamento e com crianças normais. Média de leveduras ingeridas por neutrófilo (A); Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose (B); Índice fagocitário (C). Em A: aumento da média de leveduras por neutrófilos quando comparadas com crianças normais e redução ao final do tratamento ( $p < 0,0001$ , ANOVA, seguido de Newman-Keuls). Em B: não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na proporção dos neutrófilos envolvidos na fagocitose ( $p = 0,25$ , ANOVA, seguido de Newman-Keuls). Em C: aumento do índice fagocitário quando comparado com crianças normais e redução ao final do tratamento. ( $p = 0,0006$ , ANOVA, seguido de Newman-Keuls). Dados expressos como mediana, quartis e extremos. (Dunn- controle vs 48hs/ controle vs início/ início vs final/ 48hs vs final;  $p < 0,05$ ) (Student-Newman-Keuls - controle vs início/ controle vs 48hs/ início vs final;  $p < 0,05$ )

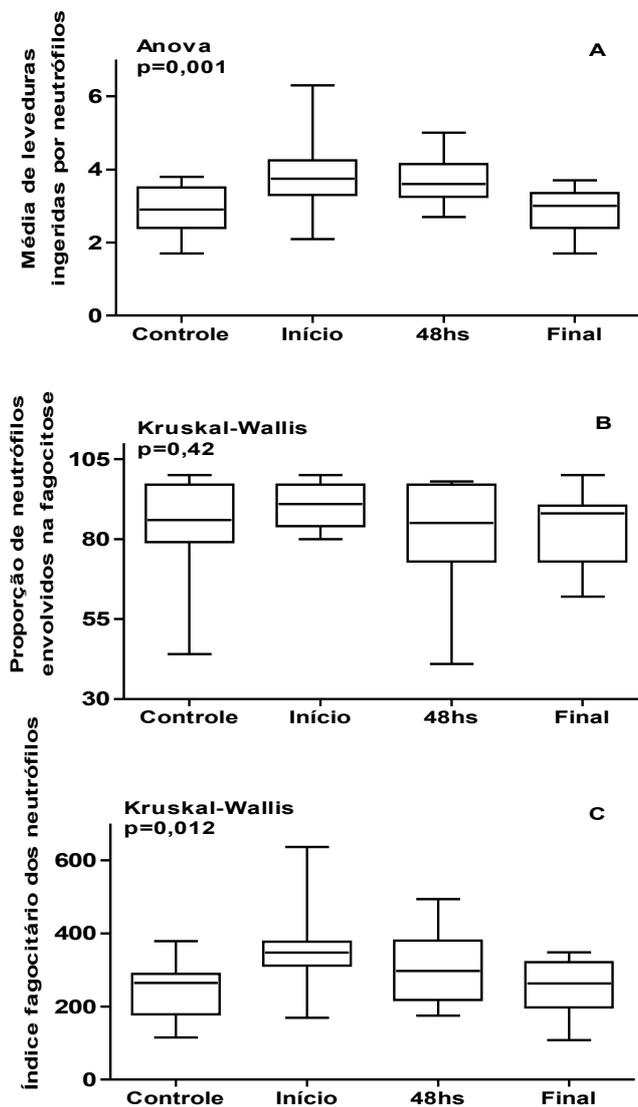


Figura 14- Influência do tratamento com glucantime em crianças com leishmaniose visceral com 48 horas e ao final do tratamento sobre a capacidade fagocitária de neutrófilos utilizando  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* por escavação, na presença de soro do próprio indivíduo, comparados com a capacidade fagocitária antes do tratamento e com crianças normais. Média de leveduras ingeridas por neutrófilo(A); Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose(B); índice fagocitário (C). Em A: aumento da média de leveduras ingeridas por neutrófilo quando comparadas com crianças normais e redução ao final do tratamento ( $p=0,001$ , ANOVA, seguido de Newman-Keuls). Em B: não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na proporção dos neutrófilos envolvidos na fagocitose. ( $p=0,42$ , Kruskal-Wallis seguido de Dunn). Em C: aumento do índice fagocitário quando comparadas com crianças normais e redução ao final do tratamento ( $p=0,012$ , Kruskal-Wallis seguido de Dunn). Dados expressos como mediana, quartis e extremos. (Dunn - controle vs início / início vs final  $p<0,05$ ) (Student-Newman-Keuls - controle vs início/ início vs final;  $p<0,05$ )

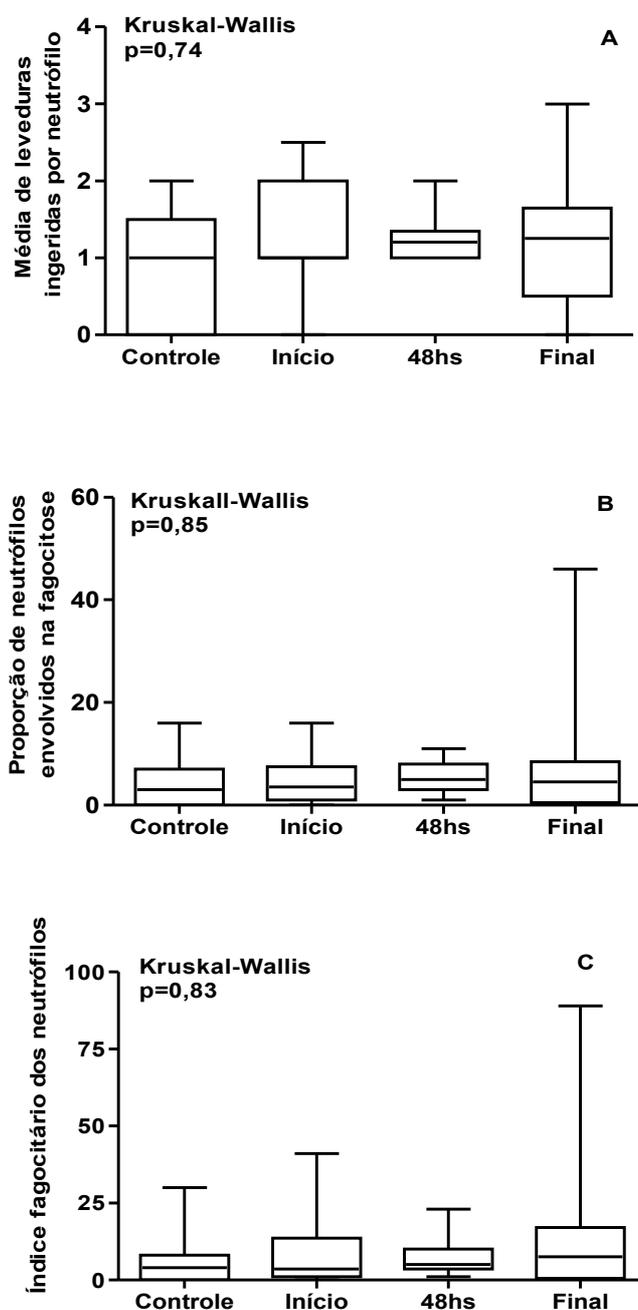


Figura 15– Influência do tratamento com glucantime em crianças com leishmaniose visceral com 48 horas e ao final do tratamento sobre a capacidade fagocitária de neutrófilos utilizando  $6,25 \times 10^4$  *Saccharomyces cerevisiae* por escavação, na presença de soro de soro fetal bovino, comparados com a capacidade fagocitária antes do tratamento e com crianças normais. Média de leveduras ingeridas por neutrófilo (A); Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose (B); Índice fagocitário (C). Em A, B e C não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. ( $p=0,74$ ;  $p=0,85$ ;  $p=0,83$ ; respectivamente). Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Dados expressos como mediana, quartis e extremos.

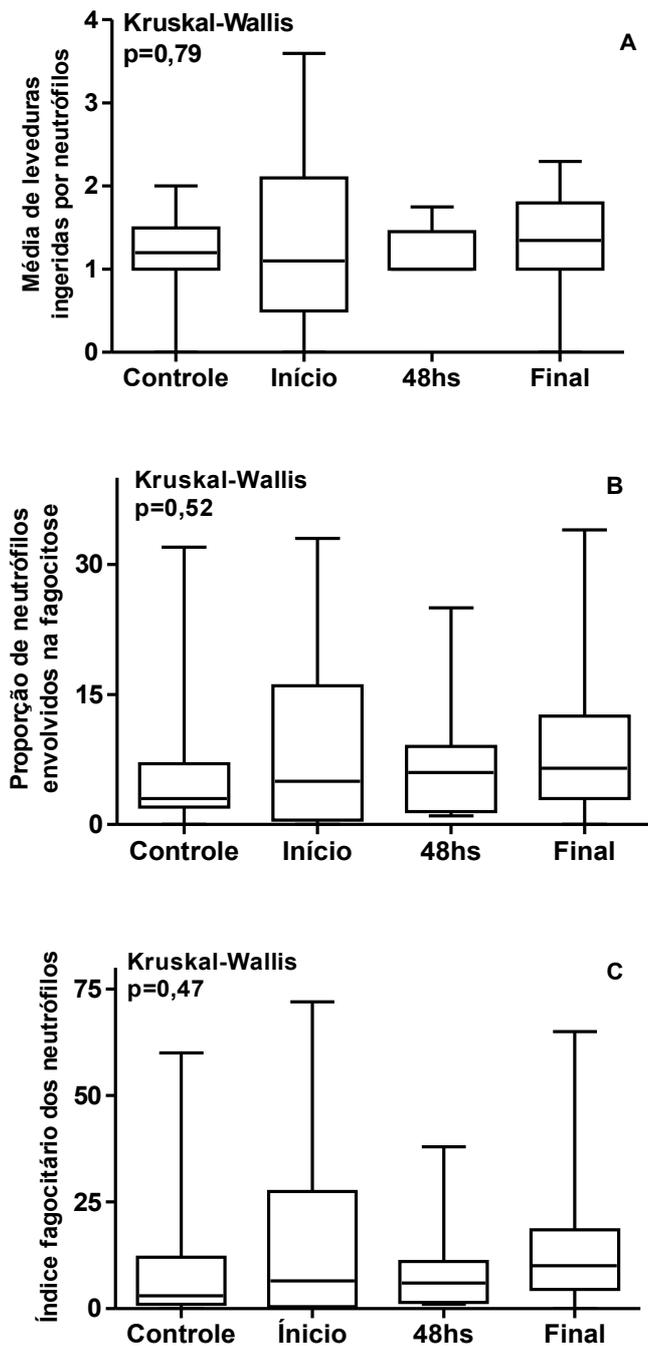


Figura 16– Influência do tratamento com glucantime em crianças com leishmaniose visceral com 48 horas e ao final do tratamento sobre a capacidade fagocitária de neutrófilos utilizando  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* por escavação, na presença de soro de soro fetal bovino, comparados com a capacidade fagocitária antes do tratamento e com crianças normais. Média de leveduras ingeridas por neutrófilo (A); Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose (B); Índice fagocitário (C). Em A, B e C não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos. ( $p=0,79$ ;  $p=0,52$ ;  $p=0,47$ ; respectivamente). Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Dados expressos como mediana, quartis e extremos.

### **4.2.3. Influência do glucantime sobre a produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos de crianças com leishmaniose visceral**

A influência do glucantime sobre a capacidade microbicida dos fagócitos foi avaliada pela capacidade de redução do *nitroblue tetrazolium*. A mediana da capacidade de redução basal do NBT foi significativamente menor nas crianças com LV antes do tratamento do que a das crianças normais, voltando aos valores normais ao final do tratamento com o glucantime (97 *versus* 98,5,  $p=0,03$ , Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 17A).

Resultados semelhantes foram observados quando a produção de radicais de oxigênio foi testada após estímulo (99 *versus* 100,  $p=0,018$ , Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 17B).

### **4.3. Relação entre o tamanho de baço e o índice fagocitário dos monócitos**

Observamos relação negativa entre o tamanho do órgão e a capacidade fagocitária dos monócitos na admissão das crianças com leishmaniose visceral,  $p=0,04$ ,  $r_p=0,58$ , coeficiente de correlação de Pearson (Figura 18).

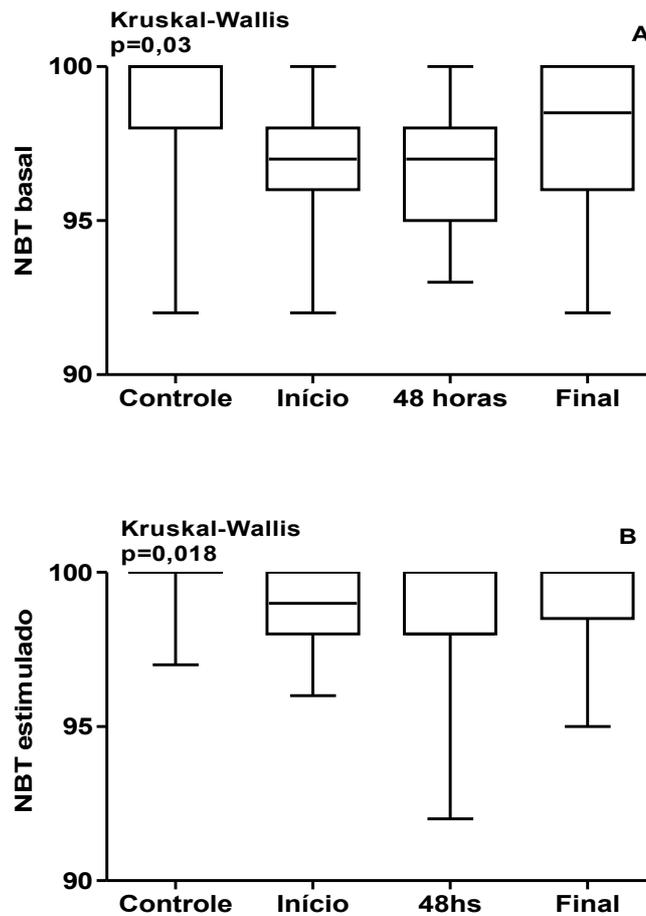


Figura 17– Influência do tratamento com glucantime em crianças com leishmaniose visceral com 48 horas e ao final do tratamento sobre a porcentagem de redução do NBT comparados com a porcentagem de redução antes do tratamento e com crianças normais. Porcentagem de redução do NBT basal (A). Porcentagem de redução de NBT estimulado (B). Em A: houve diminuição na porcentagem de redução do NBT ao início e 48hs comparados com as crianças normais e aumento ao final do tratamento ( $p=0,03$ , Kruskal-Wallis seguido de Dunn). Em B: houve redução no início e em 48 horas em relação ao controle e aumento ao final do tratamento. ( $p=0,018$ , Kruskal-Wallis seguido de Dunn). Dados expressos em mediana, quartis e extremos. (Dunn - controle vs 48hs  $p<0,05$  em B)

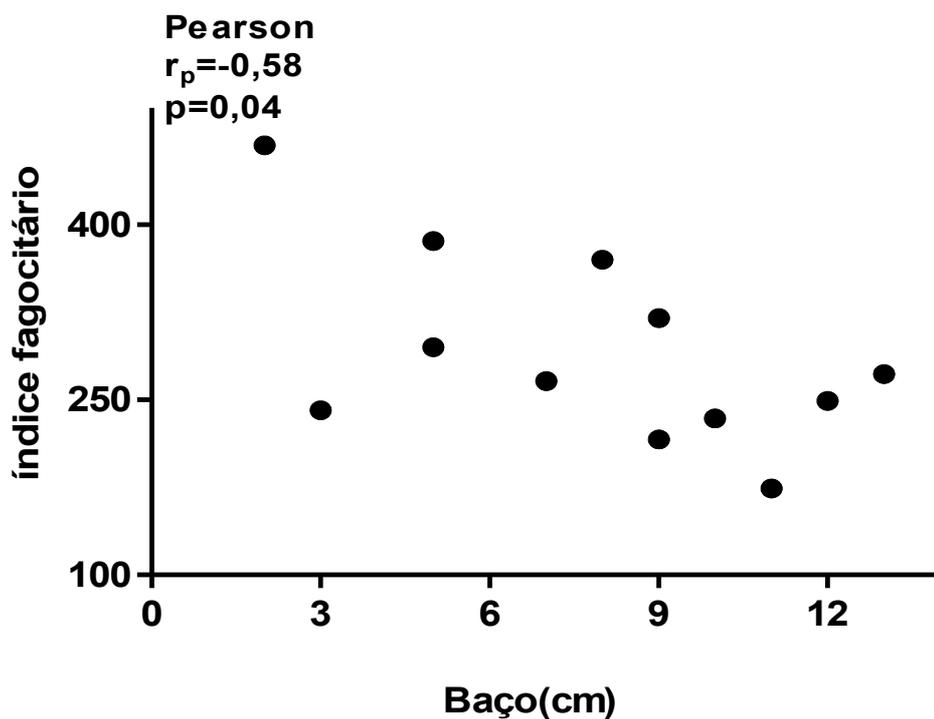


Figura 18- Relação negativa entre tamanho do baço na admissão e índice fagocitário de monócitos. Fagocitose de  $2,5 \times 10^5$  leveduras sensibilizadas por monócitos de pacientes portadores de leishmaniose visceral. Coeficiente de correlação de Pearson,  $r_p = -0,58$ ,  $p = 0,04$

#### 4.4. Relação entre o tamanho do baço e a concentração de hemoglobina

Observamos relação negativa entre o tamanho do baço e a concentração de hemoglobina na admissão das crianças com leishmaniose visceral,  $p = 0,01$ ,  $r_p = 0,52$ , coeficiente de correlação de Pearson (Figura 19).

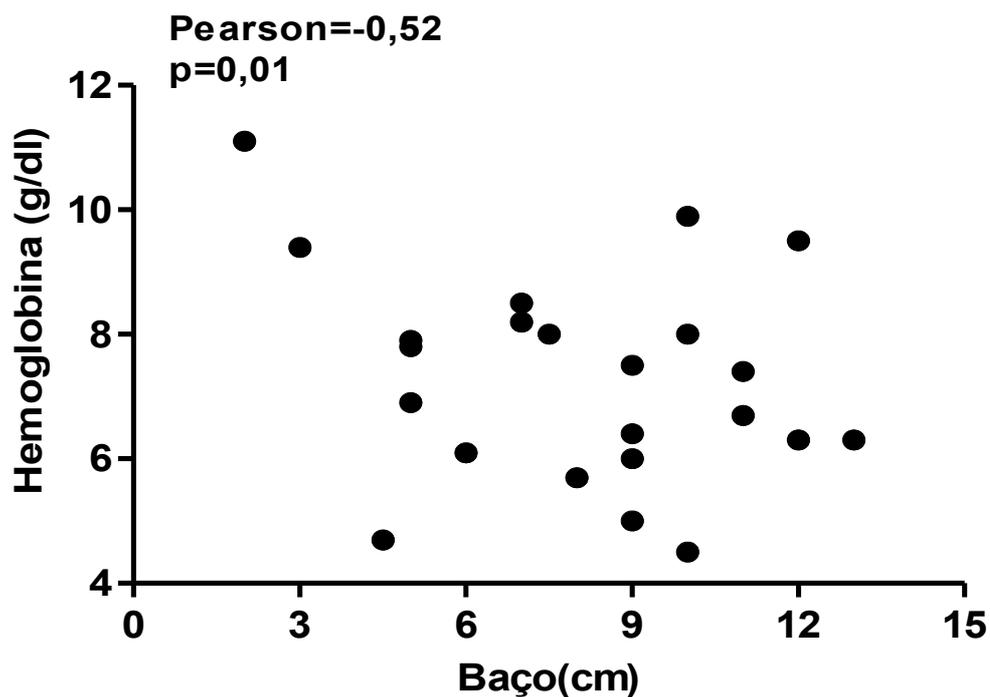


Figura 19- Relação negativa entre tamanho do baço e a concentração de hemoglobina (g/dl) dos pacientes portadores de leishmaniose visceral na admissão. Coeficiente de correlação de Pearson,  $r_p = -0,52$ ,  $p=0,01$

#### 4.5. Relação entre porcentagem de redução do NBT e índice fagocitário de monócitos de crianças com leishmaniose visceral

Observamos relação inversa entre a porcentagem de redução do NBT e o índice fagocitário dos monócitos para  $2,5 \times 10^5$  leveduras sensibilizadas por fagócito na admissão das crianças com leishmaniose visceral,  $p=0,02$ ,  $r_p = -0,66$ , coeficiente de correlação de Pearson (Figura 20).

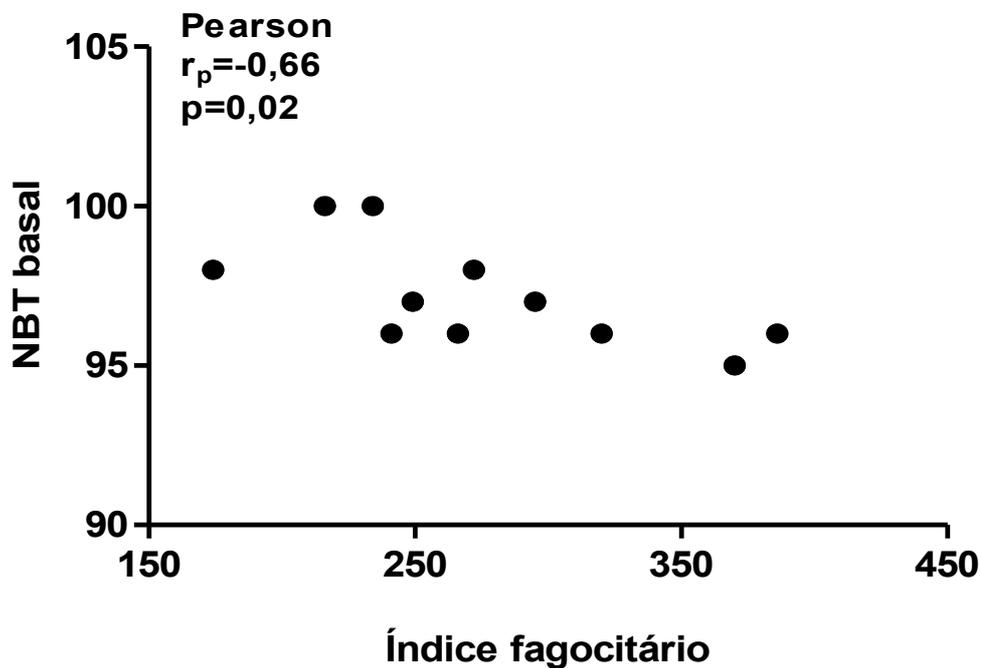


Figura 20- Relação negativa entre porcentagem de redução do NBT basal e índice fagocitário de monócitos na admissão do paciente. Fagocitose de  $2,5 \times 10^5$  leveduras sensibilizadas por monócitos de pacientes portadores de leishmaniose visceral. Coeficiente de correlação de Pearson,  $r_p = -0,66$ ,  $p = 0,02$ .

#### 4.6. Relação entre porcentagem de redução do NBT e padrão nutricional avaliado pelo escore z da estatura para a idade das crianças com leishmaniose visceral

Observamos tendência para uma relação direta entre a porcentagem de redução do NBT e o índice fagocitário dos monócitos para  $2,5 \times 10^5$  leveduras sensibilizadas por fagócito na admissão das crianças com leishmaniose visceral,  $p = 0,07$ ,  $r_p = 0,43$ , coeficiente de correlação de Pearson (Figura 21).

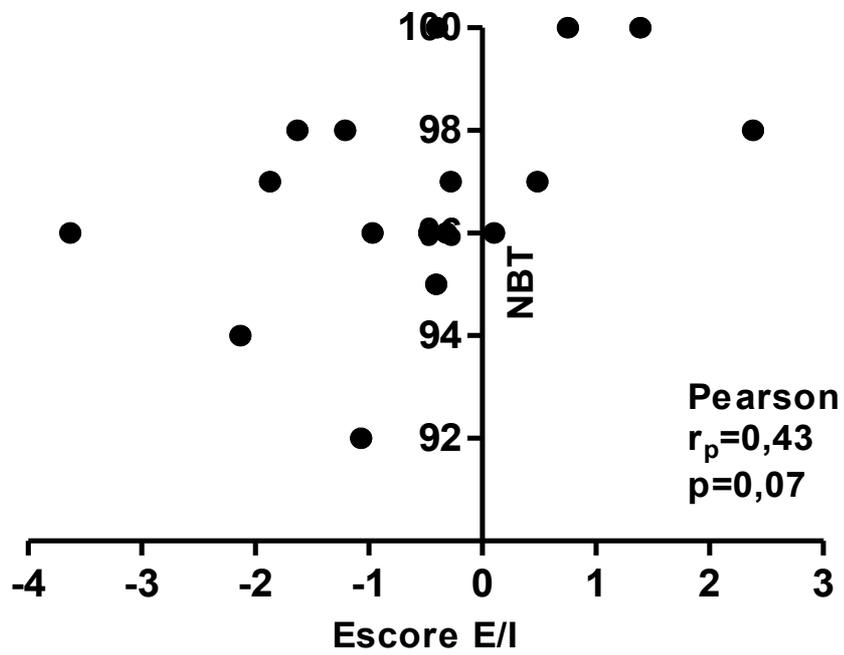


Figura 21- Relação direta entre porcentagem de redução do NBT e escore z estatura/idade. Coeficiente de correlação de Pearson,  $r_p = 0,43$ ,  $p = 0,07$ .

## **5. DISCUSSÃO**

As manifestações clínicas, laboratoriais e imunológicas da leishmaniose visceral são uma consequência do acometimento do sistema fagocítico-mononuclear. As repercussões nos diversos órgãos envolvidos devem-se à disseminação das leishmânias pelo sistema de fagócitos e à sua ativação. O esclarecimento das funções do sistema de fagócitos na criança doente antes e após o tratamento com glucantime, bem como a inter-relação destes fatores entre si podem propiciar um maior entendimento dos mecanismos da imunidade e da imunopatogenia da doença.

Estas manifestações, bem como a resposta ao tratamento, dependem de fatores como a genética, o meio ambiente e a resposta individual do sistema imunitário e do sistema de fagócitos de cada hospedeiro; como também de fatores relacionados à cepa envolvida e a droga utilizada. Por isso, é comum na prática clínica pacientes apresentarem manifestações clínicas e respostas diferentes ao tratamento na dependência das diferentes interações destes fatores.

Neste trabalho avaliamos a influência do glucantime sobre a função dos fagócitos e os parâmetros clínicos e laboratoriais em crianças com leishmaniose visceral e observamos que esta droga foi capaz de melhorar tanto os parâmetros clínicos e laboratoriais da doença, como também modular a capacidade fagocitária e microbicida dos monócitos e neutrófilos das crianças tratadas. Uma ação imunomoduladora do glucantime tem sido sugerida, mas este trabalho mostrou que esta droga pode ter ação sobre a função dos monócitos e neutrófilos em crianças com leishmaniose visceral, além de sua

ação na melhora dos parâmetros clínicos e laboratoriais, também observado por outras drogas, no processo de cura.

Em nossa amostra a idade de maior incidência da doença foi de 4 anos e 78% das crianças estudadas tinham menos do que 6 anos de idade. Dados do Brasil mostram que a faixa etária de crianças menores do que dez anos representam 54,4% dos casos, sendo que idade menor do que cinco anos corresponde a 41% das crianças acometidas. Tem sido sugerido que a predileção da doença pela população infantil está relacionada à grande proporção de crianças desnutridas, particularmente nas regiões mais pobres do país, o que pode ocasionar o comprometimento da resposta imune ao parasita, à imaturidade da resposta do sistema imunitário nas crianças mais novas e à maior exposição ao vetor (Ministério da Saúde, 2006). De fato, nossos dados mostraram maior frequência e gravidade da desnutrição nas crianças com leishmaniose visceral em relação às crianças controles sem a doença. Queiroz e cols (2004) e Rey e cols (2005) encontraram frequências maiores de desnutrição nas crianças com LV estudadas nas cidades de Recife e Fortaleza em comparação com os nossos dados. É possível que este fato deva-se as diferenças de condições sócio-econômicas e possivelmente de acesso mais precoce ao tratamento entre as regiões nordeste e centro-oeste do país.

Das crianças com LV por nós estudadas, apenas 22% mostraram inadequação no escore z do peso para a estatura, que reflete a gravidade da desnutrição recente. E apenas 35% mostraram desnutrição crônica pelo parâmetro do escore z da estatura / idade, que é um parâmetro da cronicidade da desnutrição. Este fato chama a atenção para a importância do diagnóstico

da LV em pacientes sem desnutrição crônica, conforme já observado por Pastorino e cols (2002).

O real papel da desnutrição na leishmaniose visceral é ainda controverso. Não está esclarecido se a desnutrição é fator predisponente ou consequência da doença. Os fatos que sugerem a desnutrição como fator predisponente da LV são que a desnutrição é uma das mais frequentes causas de imunodeficiência secundária (Revillard e cols, 1990) e tem sido descrito como um dos principais fatores de risco para LV (Harrison e cols, 1986). De fato, nossos dados do escore z da estatura para idade sugerem que a desnutrição crônica já estava presente em algumas crianças previamente à infecção.

Os fatos que sugerem que a desnutrição é consequência da infecção são que a LV é uma síndrome consumptiva, resultando na perda de gordura corporal (Harrison e cols, 1986), provavelmente por meio da produção de citocinas catabólicas, como a IL-1 e o FNT /caquetina (Pearson e cols, 1990; 1992).

É possível que ambas as hipóteses sejam verdadeiras na dependência de vários fatores, tanto do parasita, como virulência e tamanho do inóculo, e do hospedeiro, como aspectos genéticos e sócio-culturais.

A relação entre a capacidade microbicida dos fagócitos e o estado nutricional pelo escore z da estatura para a idade foi analisada neste trabalho e verificamos que quanto menor o escore z da estatura para a idade, menor foi a capacidade de redução do NBT, ou seja menor foi a produção de ânions superóxido. Isto sugere que os fagócitos das crianças desnutridas com

leishmaniose visceral têm menor capacidade microbicida. De fato a desnutrição tem sido considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da forma sintomática da doença (Badaró e cols, 1986) e está relacionada com alto risco de morte (Searman e cols, 1996). Provavelmente o menor poder microbicida dos fagócitos destes pacientes facilita a disseminação da leishmânia e determina uma maior susceptibilidade às infecções bacterianas, o que também é um fator de risco para morte nas crianças com leishmaniose visceral.

As manifestações clínicas e laboratoriais por nós observadas antes do tratamento foram semelhantes às encontradas na literatura. Em nossa amostra, a febre na admissão estava presente em todos os casos (100%), dados semelhantes aos encontrados por Kafetzis e cols (2002) (95%), Pastorino e cols (2002) (96,1%), Pedrosa e cols (2004) (96,8%), Queiroz e cols (2004) (95,6%), Rey e cols (2005) (96%) e Oliveira e cols (2006) (97,3%). Além da febre, o aumento do volume abdominal (74%) e a apatia (52%) foram os sintomas mais freqüentes em nossa amostra, seguidos de emagrecimento (48%), tosse (39%), vômito (26%), dor abdominal (26%) e diarréia (17%). Estes sintomas também foram relatados em outras séries (Campos Jr e cols, 1995; Pastorino e cols, 2002; Pedrosa e cols, 2004; Queiroz e cols, 2004; Rey e cols, 2005; Oliveira e cols, 2006).

Os sinais mais freqüentes evidenciados em nossa amostra foram o aumento do fígado e baço (100%) e palidez cutânea (100%), seguidos por taquipnéia (26%), edema (17%), icterícia (9%) e petéquias (9%). Freqüência semelhante destes sinais foram relatados em outras séries (Campos Jr e cols,

1995; Pastorino e cols, 2002; Pedrosa e cols, 2004; Queiroz e cols, 2004; Rey e cols, 2005). A mediana do tamanho do fígado e baço apresentou valores semelhantes aos observados por Pastorino e cols, 2002; Pedrosa e cols, 2004; Rey e cols, 2005; e quase sempre, o tamanho do baço predominou sobre o do fígado.

Observamos relação inversa entre o tamanho do baço e a concentração de hemoglobina, como também entre o tamanho do baço e a capacidade fagocitária de monócitos das crianças portadoras de leishmaniose visceral, antes do tratamento. A presença de hiperesplenismo pode estar contribuindo para a anemia como também para a pancitopenia. É possível que a menor capacidade fagocitária dos monócitos nos indivíduos com tamanho do baço maior deva-se à presença na circulação sangüínea de fagócitos imaturos, pelo aumento da hematopoiese. É possível que os fagócitos imaturos tenham menor capacidade fagocitária em relação às células maduras, como também, o baço de maior tamanho sugere maior grau de infecção pela leishmânia e o estímulo excessivo dos fagócitos pode resultar em depressão das funções destas células.

O padrão laboratorial refletiu a pancitopenia periférica e a inversão no perfil protéico característicos desta doença. A anemia, leucopenia e plaquetopenia estiveram presentes em 100%, 78% e 78% dos casos, respectivamente, e as medianas de seus valores foram semelhantes aos encontrados por Campos Jr, 1995; Cascio A e cols, 2002; Pastorino e cols, 2002; Queiroz e cols, 2004 e Rey e cols, 2005. A avaliação do perfil das proteínas no calazar assume importância no diagnóstico desta doença

principalmente naqueles casos em que o encontro do parasita está ausente (Bouree, 2000). Há uma relação inversa entre os valores de albumina e globulina, conforme verificado em nossa amostra.

Já a análise das enzimas hepáticas evidenciou que os valores de TGO e TGP encontravam-se elevadas em 74% dos casos. O fato de que os nossos pacientes ainda não tinham usado o glucantime, sugere que este aumento foi relacionado à ação da leishmânia no fígado, causando hepatite (Jerônimo e cols, 1994; Queiroz e cols, 2004). Além da hepatite aguda (Khaldi e cols, 1990), as manifestações hepáticas podem cursar com insuficiência hepática (Rodrigues e cols, 1958) e em nossa série um paciente evoluiu com insuficiência hepática, possivelmente causada pela leishmânia, desde que a criança era virgem de tratamento com o glucantime. A insuficiência hepática foi a causa de três óbitos em Fortaleza (Rey e cols, 2005); dois óbitos no Mato Grosso do Sul (Oliveira e cols, 2006) e 14 óbitos em Pernambuco (Queiroz e cols, 2004), sugerindo que o comprometimento hepático não deve ser um acometimento raro, principalmente quando associado ao glucantime, que é hepatotóxico. De fato, 13% dos nossos pacientes tiveram esta alteração, embora não possamos distinguir se as alterações foram devidas a infecção pela leishmânia ou a toxicidade do antimonial.

Com a introdução do glucantime observamos melhora dos padrões clínicos e laboratoriais. A febre em 61% dos nossos casos já havia desaparecido no sétimo dia de tratamento, dados semelhantes ao que tem sido observado, de um tempo médio para desaparecimento da febre variando nos diversos trabalhos de 5 a 8 dias (Campos Jr, 1995; Ito e cols, 2002; Pedrosa e

cols, 2004). O acompanhamento da visceromegalia durante a internação mostrou que na segunda semana de tratamento já havia redução de 55% na mediana do baço e de 54% na do fígado, sendo que a velocidade de redução foi maior para o baço do que para o fígado, e os dados são concordantes com a literatura (Pedrosa e cols, 2004). A importância da redução da visceromegalia está no fato de que pode ser um marcador indireto da cura clínica, sendo necessário uma redução de 40% ou mais para ser considerada como um parâmetro de cura clínica (Ministério da Saúde, 2006).

Observamos recuperação da pancitopenia após a introdução do glucantime, com aumento de 20% na mediana da concentração da hemoglobina, de 46% nos glóbulos brancos e 67% nas plaquetas já na segunda semana do tratamento, dado compatível com a literatura que mostra a recuperação destes parâmetros geralmente após 2 semanas de tratamento (Kafetizs, 2002).

A evolução das enzimas hepáticas durante o tratamento apresentou tendência à diminuição de seus valores, mas sem significância estatística, provavelmente pela flutuação dos níveis séricos em alguns pacientes, em que houve aumento das enzimas, não sendo possível esclarecer se foram devidas à ação da própria leishmânia ou pela hepatotoxicidade do glucantime (Jerônimo e cols, 1994).

Observamos neutropenia em 30% dos casos, sendo a mediana do número total de neutrófilos semelhante às encontradas por Campos Jr, 1995; Cascio e cols, 2002; Pastorino e cols, 2002; Queiroz e cols, 2004 e Rey e cols, 2005. Observamos recuperação do número absoluto dos neutrófilos em 49%

dos pacientes na segunda semana de tratamento. A neutropenia no calazar aumenta a susceptibilidade às infecções, sendo a frequência e a gravidade das infecções inversamente proporcionais ao número absoluto dos neutrófilos (Bodey e cols, 1996; Lucas e cols, 1996). De fato, em nossa amostra, dos 8 pacientes que apresentaram neutropenia, 62,5% (5/8) apresentaram infecção bacteriana associada, confirmando a importância da alteração quantitativa de neutrófilos. Esta deficiência numérica, associada à alteração funcional destas células, como a diminuição do poder microbicida dos fagócitos observada por nós, propiciam o desenvolvimento da infecção, que é a maior causa de óbito nesta infecção parasitária (Peter, 2000). De fato, observamos infecção bacteriana em 35% dos pacientes analisados, sendo o pulmão o local mais freqüente de infecção (75%). Sugerindo a gravidade da infecção neste local, uma das nossas crianças foi à óbito por complicação da infecção pulmonar, que evoluiu com septicemia e insuficiência respiratória. O pulmão tem sido relatado como o local mais freqüente de infecção por vários autores: Guerreiro e cols, 1985; Campos Jr, 1995; Carvalho, 1995; Pastorino e cols, 2002; Pedrosa e cols, 2004; Queiroz e cols, 2004; Rey e cols, 2005; Oliveira e cols, 2006, e tem sido o local de infecção mais frequentemente relacionado com o óbito (Carvalho, 1995; Queiroz e cols, 2004; Rey e cols, 2005).

A maior susceptibilidade às infecções é uma característica da doença e foi bem estabelecida por Andrade e cols (1990) que verificou intercorrência de infecção 4,8 vezes maior em doentes de calazar quando comparadas com crianças controles desnutridas internadas. Tem sido considerado que o aumento das infecções nos pacientes com leishmaniose visceral é multifatorial,

podendo estar relacionada com a desnutrição, as alterações hematológicas encontradas (anemia, leucopenia e neutropenia), as alterações do sistema imunitário dependente dos linfócitos T, e como nossos dados sugerem, podem também estar relacionadas com a alteração da função do sistema de fagócitos, pelo comprometimento da capacidade microbicida.

A infecção bacteriana além de ser um fator relacionado com mortalidade, pois se associa a um curso fatal em cerca de 50% dos casos (Campos JR, 1995; Andrade, 1990) e aumenta o risco de morte em 3,34 vezes (Rey e cols, 2005), pode ser um fator preditivo de falha terapêutica, pois pacientes com co-infecção apresentaram risco 7,1 vezes maior de falha terapêutica com o glucantime. A co-infecção bacteriana esta relacionada à imunodepressão causada pela LV, pois quanto menor for a resposta celular do paciente, menor será a resposta à terapêutica específica e maior será o surgimento de microorganismos oportunistas (Santos e cols, 2002). De fato, dos nossos 3 pacientes que tiveram necessidade de prolongar a terapêutica específica com o glucantime para 30 dias, todos apresentavam infecção bacteriana associada com necessidade de antibioticoterapia, e um deles apresentava desnutrição grave pelo escore z do peso para a idade e da estatura para a idade, confirmando a influência da deficiência da resposta imune pela própria doença ou pela desnutrição no surgimento de complicações infecciosas, como a possível influência da infecção na resposta terapêutica.

A capacidade funcional dos fagócitos na leishmaniose visceral foi avaliada pela comparação da capacidade fagocitária e microbicida entre as crianças com leishmaniose visceral e controles. Nossos resultados mostraram

aumento da capacidade fagocitária dos monócitos e neutrófilos nas crianças com leishmaniose visceral em relação às crianças controle, devido ao aumento da média de leveduras ingeridas por fagócito, quando analisada pelos receptores para os componentes do sistema do complemento. Esta diferença entre os grupos não foi observada quando a fagocitose foi avaliada pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos. O fato de o aumento da capacidade fagocitária ter ocorrido pelo aumento do número de leveduras ingeridas por fagócito sugere que houve aumento da expressão destes receptores na superfície dos fagócitos estimulados pela própria infecção parasitária.

Não estão esclarecidos os mecanismos pelos quais poderia ocorrer aumento da expressão de receptores na superfície dos fagócitos durante a infecção pela leishmânia, entretanto uma possível explicação para isto estaria relacionada à aumentada produção de fator de necrose tumoral- $\alpha$  que pode ocorrer em pacientes com leishmaniose visceral (Salomão e cols, 1996). De fato tem sido demonstrado que esta citocina pode aumentar a expressão de receptores na superfície dos monócitos (Georgiev e Albright, 1993; Muniz-Junqueira e cols, 2001), como também tem sido demonstrado que a ligação do FNT ao seu receptor na superfície da célula pode modular as vias de sinalização de outros receptores da mesma célula (Kwiatkowska e Sobota, 1999).

Observamos também que a produção de ânion superóxido estava menor nas crianças com leishmaniose visceral, o que sugere que o poder microbicida dos fagócitos está deficiente nesta infecção, o que pode estar dificultando os

mecanismos de defesa antiparasitários e facilitando a persistência da infecção no hospedeiro. De fato, tem sido observado que a fagocitose via receptores para o complemento CR3 está relacionada com a inibição da explosão respiratória e produção de IL-12 (Bradonísio e cols, 2000), inibindo, portanto, a imunidade celular e contribuindo para o escape do parasita dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Cunningham, 2002; Mosser e cols, 1997).

Os mecanismos pelos quais ocorre a diminuição da produção de ânion superóxido não estão esclarecidos, porém algumas possibilidades podem ser sugeridas. Quando a fagocitose é mediada pelos receptores para porção Fc da IgG e CR3 dos fagócitos ocorre ativação da proteína cinase C (PCC) que funciona como uma via de transdução dos sinais após a ativação dos receptores (Kwiatkowska e Sobota, 1999) e a sua fosforilação está relacionada com a ativação da NADPH oxidase (Oliver e cols, 1992). Tem sido sugerido que na leishmaniose um dos mecanismos de escape do parasita é a inibição desta via, que pode levar à diminuição da explosão respiratória pela não ativação da NADPH oxidase, podendo propiciar a perpetuação da leishmânia no hospedeiro (Oliver e cols, 1992; Cunningham, 2002). De fato, Kumar e cols (2001) mostraram que a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio por monócitos de adultos com leishmaniose visceral em atividade estava diminuída nos pacientes sem tratamento, e após o tratamento com anfotericina-B houve aumento da produção destes radicais de oxigênio, peróxido de hidrogênio e ânion superóxido. Observaram também diminuição das enzimas NADH oxidase, NADPH oxidase e mieloperoxidase envolvidas nos mecanismos

microbicidas dos monócitos e sugeriram que isto poderia facilitar a persistência das leishmânias nos macrófagos (Kumar e cols, 2002).

Nossos dados foram diferentes dos observados por Martins-Papa (2007) em indivíduos com leishmaniose tegumentar americana, os quais mostraram deficiente capacidade fagocitária de monócitos e aumentada produção de peróxido de hidrogênio e fator de necrose tumoral- $\alpha$ , possivelmente pelo diferente tipo de relação hospedeiro-parasita que ocorre nas duas formas clínicas da leishmaniose.

Observamos uma relação inversa entre a capacidade fagocitária e a microbicida. Embora a capacidade fagocitária estivesse aumentada, havia diminuição da produção de ânions superóxido, sugerindo que além do poder microbicida dos fagócitos das crianças com leishmaniose visceral estar comprometido, o fato de a fagocitose estar aumentada pode estar também propiciando o escape das leishmânias dos outros mecanismos de defesa do organismo não relacionados aos macrófagos, pelo fato dos parasitas permanecerem no meio intracelular de um fagócito incapaz de destruir o parasita.

Pelo tratamento com o glucantime observamos aumento na capacidade dos fagócitos produzirem radicais oxidativos. Este aumento do poder microbicida, portanto, deve estar se contrapondo aos mecanismos de escape do parasita.

A ação moduladora do glucantime sobre a capacidade fagocitária e microbicida não foi observada após 48 horas, sendo evidente apenas ao final do tratamento, com o retorno das funções dos fagócitos aos valores

semelhantes aos observados nas crianças controles. Possivelmente há necessidade de algum tempo para que ocorra a recuperação das vias metabólicas alteradas pela infecção.

Coelho (2003) observou que o tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com o glucantime induziu aumento da capacidade fagocitária dos monócitos e neutrófilos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos e componentes do complemento, como também induziu aumento da capacidade microbicida dos fagócitos. Diferentemente, observamos em crianças com leishmaniose visceral que a capacidade fagocitária destas células estava aumentada antes do tratamento e que a utilização do antimonial modulou negativamente a fagocitose, em direção aos valores observados nos indivíduos normais. Esta diminuição da capacidade fagocitária deveu-se a diminuição do número de partículas fagocitadas, o que sugere que isto ocorreu pela diminuição na expressão dos receptores para componentes do complemento e/ou fração Fc da IgG. Resultado oposto ocorreu com o mecanismo microbicida dos fagócitos que sofreu um incremento pelo tratamento com o antimonial. É possível que o glucantime tenha estimulado a produção de citocinas pelos fagócitos ativados.

De fato, a produção de citocinas pelos macrófagos ativados relaciona-se com o clareamento da infecção (Holaday e cols, 1993). A produção de citocinas pró-inflamatórias resulta na síntese do óxido nítrico e de radicais de oxigênio (Brunet e cols, 2001), e as citocinas produzidas pelo macrófago ativado, como FNT- $\alpha$ , IL-12 e IFN- $\gamma$ , participam do controle da infecção. Dessa forma as

citocinas contribuem para a produção dos radicais intermediários de nitrogênio, que associado aos radicais oxidativos têm potente poder microbicida.

Tem sido demonstrada a importância dos mecanismos imunológicos na resposta terapêutica ao antimônio (Berger e cols, 1992). As citocinas inflamatórias estão envolvidas no processo de clareamento da infecção após o tratamento com antimoniais (Murray e cols 1989; Roberts e cols, 1993, Kocyigit e cols, 2002), e o IFN- $\gamma$  parece amplificar a eficácia do antimônio (Croft e cols, 2003; Salomão e cols, 1996). Rais e cols, 2000 demonstraram que antimoniato pentavalente (pentostam) potencializa a ativação dos mecanismos oxidativos em fagócitos murinos e humanos *in vitro*. Basu e cols, 2006 demonstraram que o pentostam induz a ativação de radicais de oxigênio e de óxido nítrico via a ativação PCC *in vitro*.

Não foi possível avaliar a capacidade fagocitária e os mecanismos microbicidas como fatores de risco ou de pior prognóstico pelo pequeno tamanho da amostra, mas dos dois pacientes que foram à óbito, em um deles o índice fagocitário dos monócitos foi um dos menores, não sendo possível avaliar a capacidade fagocitária dos neutrófilos devido a intensa neutropenia da criança, e na outra criança houve diminuição da porcentagem de redução NBT após 48 horas de tratamento. Em nossa amostra os parâmetros de pior prognóstico isoladamente não se mostraram suficientes como preditivo de gravidade.

Em conclusão, nossos dados mostraram pela primeira vez que a capacidade fagocitária dos monócitos e neutrófilos pelos receptores para componentes do complemento e fração Fc da IgG de crianças com

leishmaniose visceral estava aumentada e o tratamento com o glucantime tornou a fagocitose semelhante ao valores das crianças controle. Entretanto, a capacidade microbicida de produção de ânions superóxido por estas células estava diminuída e foi estimulada após o tratamento com o glucantime. O glucantime melhorou os parâmetros clínicos e laboratoriais e foi capaz de aumentar a capacidade microbicida dos fagócitos. Mostramos a ação desta droga como moduladora da resposta do sistema de fagócitos. A aumentada capacidade fagocitária associada com a diminuída produção de moléculas microbicidas pode fazer parte dos mecanismos de escape do parasita da resposta imune do hospedeiro e o tratamento com o antimonial possivelmente está atuando como um mecanismo de contra-escape, aumentando a competência microbicida destas células.

## **6. CONCLUSÕES**

1. As crianças com leishmaniose visceral estavam mais desnutridas, observado pela menor estatura para idade pelo escore z. Entre as manifestações clínicas, a febre (100%) e o aumento do volume abdominal (74%) foram as queixas mais freqüentes e a palidez (100%) e hepatoesplenomegalia (100%) foram os sinais mais freqüentemente encontrados. A febre estava presente em todos os casos na admissão e desapareceu em mais da metade dos casos (61%) na primeira semana de tratamento. O aumento do fígado e do baço estava presente em todos os pacientes na admissão e apresentou redução do tamanho em 54% e 55%, respectivamente, na segunda semana de tratamento. Acometimento hepático estava presente em 74% das crianças, com manifestações de hepatite e de insuficiência hepática, sendo que após o tratamento com glucantime houve diminuição das enzimas hepáticas. Das complicações, a infecção bacteriana com o acometimento pulmonar foi a mais freqüente. Distúrbio hematológico estava presente em 13% das crianças. Hepatotxicidade em 13% das crianças foi observada como possível efeito colateral do glucantime.
2. O índice fagocitário dos monócitos e neutrófilos das crianças com leishmaniose visceral foi maior do que a das crianças normais, quando analisado pelos receptores para componentes do complemento devido ao aumento da média de leveduras ingeridas por fagócito. Entretanto, a capacidade microbicida dos fagócitos das crianças com leishmaniose visceral foi menor do que a das crianças normais.

3. Após o tratamento com glucantime das crianças com leishmaniose visceral observou-se aumento da capacidade microbicida dos fagócitos e diminuição da capacidade fagocitária pela diminuição do índice fagocitário dos monócitos e neutrófilos, devido a diminuição da média de leveduras ingeridas por fagócitos, quando avaliada pelos receptores para componentes do complemento.
4. Observou-se relação inversa entre o índice fagocitário dos monócitos e a concentração de hemoglobina em relação ao tamanho do baço das crianças com leishmaniose visceral. Observamos relação inversa entre o índice fagocitário e a porcentagem de redução do NBT e também relação direta entre estado nutricional (escore z E/I) e a porcentagem de redução do NBT.
5. Estes dados sugerem que os fagócitos das crianças com leishmaniose visceral têm maior capacidade de ingerir microorganismos, entretanto, a produção de radicais de oxigênio microbicidas para o parasita está deficiente. Isto pode facilitar o escape do parasita aos mecanismos de defesa do organismo. O tratamento com o glucantime foi capaz de aumentar a produção de radicais do oxigênio, possivelmente como um mecanismo de contra-escape ao mecanismo de escape do parasita.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abbas AK, Lichtman AH. Imunidade Inata. *Imunologia Celular e Molecular* 5ª ed. 2005; p. 294-96.

Afonso LC, Scharon TM, Vieira LQ, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. The adjuvant effect of interleucin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* 1994; **263**:235-7.

Andrade TM, Carvalho EM, Rocha H. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1990; **162**: 1354-9.

Ashford RW. The leishmaniasis as model zoonoses. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; **91**:693-01.

Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell CA, Liew FY. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur J Immunol* 1994; **24**:672-6.

Badaró R, Jones TC, Carvalho M, *et al.* New perspectives on subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1986; **154**:1003-11.

Balaña-Fouce R, Reguera RM, Cubría JC, Ordóñez D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmac* 1998; **30**: 435-43.

---

A citação bibliográfica no texto seguiu o sistema de Harvard e a estruturação das referências na listagem das referências bibliográficas seguiu o estilo de Vancouver. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *BMJ* 1991; 302:338-341. Halsey MJ. References. In Hall GM, ed. *How to write a paper*. London: BMJ; 1994: 49-50.

Barata RA, França-Silva JC, Costa RT, Fortes-Dias CL, Silva JC, Paulo EV, et al. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; **99**: 481-7.

Barral-Neto M, Barral A, Brownell C, Sheiky Y, Twardizsk D, Reed S. Transforming growth factor  $\beta$  in leishmanial infection. Science 1992; **257**:545-48.

Basu JM, Mookerjee A, Sen P, Bhaumik S, Sen P, Banerjee S, Naskar K, Choudhuri KS. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. Antimicrob Agents Chemother 2006; **50**: 1788-97.

Berger LR, Fairlamb AH. Interactions between immunity and chemotherapy in the treatment of trypanosomiasis and leishmaniasis. Parasitol 1992; **105**: 71-8.

Berman JD, Gallaler JV, Best JM. Sodium stibogluconate (Pentostan) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in amastigotes. Biochem Pharmacol 1987; **36**: 197-01.

Berman JD, Waddell D, Hanson BD. Biochemical mechanism of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. Antimicrob Agents Chemother 1985; **27**: 916-20.

Berman JD. Human leishmaniasis: Clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin infect Dis 1997; **24**:684-03.

Bodey GP, Buckley M, Sathe YS, Freireich EJ. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med* 1966; **64**: 328-40.

Bogdan C, Rollinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 1998; **28**:121-34.

Bogdan C; Moll H, Solbach W, Rollinghoff. Tumor necrosis factor- $\alpha$  in combination with interferon- $\gamma$ , but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigote. *Eur J Immunol* 1990; **20**:1131-35.

Bouree P. Study of protein profile in visceral leishmaniasis. *J Egypt Soc Parasitol* 2000; **30**: 885-93.

Bradonísio O, Panaro MA, Sisto M, Acquafredda A, Fumarola L, Leogrande D. Interactions between *Leishmania* parasites and host cells. *Parassitologia* 2000; **42**:183-90.

Bradonísio O, Panunzio M, Falieiro MS, Ceci L, Fasanella A, Puccini V. Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Vet Immunol Immunopathol*; **53**:95-03.

Brandi MCAC, Padronização de um método de obtenção de fagócitos do sangue periférico para avaliação funcional. Tese de Mestrado. Brasília, 1993.

Brunet LR. Nitric oxide in parasitic infections. *Int Immunopharmacol* 2001; **1**:1457-67.

Campbell DE, Douglas SD. Phagocytic cell functions. I. Oxidation and chemotaxis. In Rose NR, Macario EC, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM.

Manual of Clinical Laboratory Immunology. American Society for Microbiology Press. Washington. 1997; 320-28.

Campos Jr D. Características clínico-epidemiológicas do calazar na criança. Estudo de 75 casos. J Pediatr 1995; **71**: 261-65.

Carrió J, Colmenares M, Riera C, Galego M, Arboix M, Portús M. *Leishmania infantum*: stage-specific activity of pentavalent antimony related with the assay conditions. Exp Parasitol 2000; **95**: 209-14.

Carvalho EM, Barral A, Pedral-Sampaio D, Barral-Neto M, Badaró R, Rocha H. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. J infect Dis 1992; **165**:535-40.

Carvalho ES. Leishmaniose visceral (calazar). J Pediatr 1995; **71**: 238-40.

Cascio A, Colomba C, Antinori S, Orobello M. Pediatric visceral leishmaniasis in western Sicily, Italy: a retrospective analysis of 111 cases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; **21**: 277-82.

Chang KP. Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. Am J Trop Med Hyg 1981; **30**:322-33.

Coelho V. Influência do tratamento, *in vitro*, de fagócitos humanos e murinos com antimoniato de meglumina sobre a fagocitose, produção de radicais de oxigênio e nitrogênio e fator de necrose tumoral  $\alpha$ . Tese de Mestrado. Brasília, 2003.

Collin S, Davidson R, Ritmeijer K, Keus K, Melaku Y, Kipngetch S, Davies C. Conflict and Kala-azar: Determinants of adverse outcomes of Kala-azar among patients in southern Sudan. Clin Infect Dis 2004; **38**: 612-9.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb, AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev 2006; **19**: 114-18.

Cunningham AC. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. Exp Mol Pathol 2002; **72**: 132-41.

De Oliveira ALL, Paniago AMM, Dorval MEC, Oshiro ET, Leal CR, Sanches M, Cunha RV, Bóia MN. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. Rev Soc Bras Med Trop 2006; **39**: 446-50.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immun Microbio. Infect Dis 2004; **27**:305-18

Desjeux P. Leishmaniasis: public health aspects and control. Clin Dermatol 1996; **14**:417-23

Diefenbach A, Schindler H, Donhauser N, Lorenz E, Laskay J. Type 1 interferon (IFN  $\alpha/\beta$ ) and type 2 nitric oxide synthase regulated the innate immune response to a protozoan parasite. Immunity 1998; **8**:77-8

Ding AH, Nathan CF, Stuhr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of acting cytokines and evidence for independent production. J Immunol 1988; **141**: 2407-12.

Ding W, Thiel B, Tannenbaum CS, Hamilton TA, Stuehr DJ. Synergistic cooperation between T cell lymphokines for induction of nitric oxide synthase gene in murine peritoneal macrophages. J Immunol **151**:322-9.

Duarte MI. Interstitial pneumonitis in human visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989; **83**: 73-76.

Frezard F, Demicheli C, Ferreira CS, Costa MA. Glutathione-induced conversion of 3-pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemoter* 2001; **45**: 913-16.

Gagnaire MH, Galambrun C, St,phan LJ. Hemophagocytic Syndrome: A Misleading Complication of Visceral Leishmaniasis in Children- A series of 12 cases. *Pediatrics* 2000; **106**: 1-6.

Gangneux JP, Sulahian A, Honore S, Meneceur P, Deuroin F, Garin, IJF. Evidence for determining parasitic factors in addition to host genetics and immune status in the outcome of murine *Leishmania infantum* visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2000; **22**: 515-19.

Gantt RK, Goldman TL, McCormick LM, Miller AM, Jeronimo SMB, Nascimento ET, Britigan BE, Wilson ME. Oxidative Responses of Human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J Immunol* 2001; **167**:893-01.

Ghalib H, Piuvezam M, Skeily Y. Interleukin-10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infection. *J Clin Invest* 1993; **92**:324-29.

Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 2002; **111**:927-30.

Guerreiro J, Ribeiro S, Carvalho EM, Badaró R, Rocha H. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1985; **80**: 447-52.

Gurgueira GL in. Insuficiência hepática fulminante. Emergência e Terapia Intensiva Pediátrica. 2ª edição, 2004.

Hall R, Titus RG, Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. J Immunol 1995; **155**:3501-6.

Harrison LH, Naidu TG, Drew JS, de Alencar JE, Pearson RD. Reciprocal relationships between undernutrition and the parasitic disease visceral leishmaniasis. Rev Infect Dis 1986; **8**: 447-53.

Herwaldt B L. Leishmaniasis. Lancet. 1999; **354**:1191-99.

Hoffman in. Disorders of the respiratory burst pathway. Hematology: Basic Principles and Practice, 4ª edição, 2005.

Holaday BJ, Pompeu M, Evans T, et al. Correlates of *Leishmania*-specific immunity in the clinical spectrum of infection with *Leishmania chagasi*. J Infect Dis 1993; **167**: 411-17.

Homell, M. Visceral Leishmaniasis: Biology of the Parasite. J Infect. 1999; **39**:101-11.

Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, Bow EJ, Brow AE, Calandra T, Feld R, Pizzo PA. 2002 guidelines for the use of antimicrobial Agents Neutropenic patients With cancer. Clin Infect Dis 2002; **34** 23-32.

Jeronimo SM, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, Luz KG, Fernandes MZ, Jernigan J, Pearson RD. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1994; **88**: 386-88.

Kafetzis DA, Maltezou HC. Visceral leishmaniasis in paediatrics. *Current Opin Infect Dis* 2002; **15**:289-294.

Kafetzis DA. An overview of paediatric leishmaniasis. *J Postgrad Med* 2003; **49**: 31-8.

Kamhawi S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect* 2000; **2**:1765-73.

Khaldi F, Bennaouer B, Ben Othman H, Achouri E, Ayachi R, Regaieg R. Severe forms of liver involvement in visceral leishmaniasis. Apropos of 7 cases. *Arch Fr Pediatr*. 1990; **47**:257-60.

Kocyigit A, Gur S, Gurel MS, Bulut V, Ulukanligil M. Antimonial therapy induces circulating proinflammatory cytokines in patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect and Immun* 2002; **70**: 6589-91.

Kuhlman M, Joiner K, Ezekowitz AR. The human mannosebinding protein function as an opsonin. *J Exp Med* 1989; **169**; 1733-45.

Kumar P, Pai K, Pandey PH, Sundar S. NADH-oxidase, NADPH-oxidase and myeloperoxidase activity of visceral leishmaniasis patients. *J Med Microbiol* 2002; **51**:832-36.

Kumar R, Pai K, Sundar S. Reactive oxygen intermediates, nitrite, and IFN- $\gamma$  in Indian visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 2001; **124**:262-65.

Kwiatkowska K, Sobota A. Signaling pathways in phagocytosis. *Bioessays* 1999; **21**:422-31.

Lauff H, Muller K, Fleisher J, Reiling N, Jahnke, Jensenius J, Solbach W, Laskay T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun* 2002; **70**: 826-35.

Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RMJ, Moncada S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 1990; **144**: 4794.

Lito G, Davachi F, Sulcebe G, Bregu H, Basha M. Pediatric visceral leishmaniasis in Albania. *Int J Infect Dis* 2002; **6**: 66-68.

Lucas KG, Brown AE, Armstrong D. The identification of febrile, neutropenic children with neoplastic disease at low risk for bacteremia and complications of sepsis. *Cancer* 1996; **77**: 791-8.

Martins-Papa M. Avaliação da capacidade fagocitária, produção de peróxido de hidrogênio e fator de necrose tumoral por monócitos de pacientes de Leishmaniose Tegumentar Americana. Tese de Mestrado. Brasília, 2007.

Marzochi MCA, Marzochi KBF, Carvalho RW. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitol Today* 1994; **10**: 34-37.

Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral Grave. Normas e condutas. 1ª edição. Brasília – DF, 2006.

Ministério da Saúde. Manual de normas de assistência e controle das infecções respiratórias agudas. 4ª edição. Brasília-DF, 1994.

Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1ª edição. Brasília-DF, 2006.

Ministério da Saúde, Conselho Nacional de Saúde, resolução número 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Informe epidemiológico do SUS 1996, ano **V** (suppl3): 13-41.

McNeely TB, Turco SJ, Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. J Immunol 1990; **144**: 2745-50.

Meagher LC, Savill JS, Baker A, Fuller RW, Haslett C. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release tromboxane B2. J Leukoc Biol 1992; **52**:269-73.

Meller-Melloul C, Farnarier C, Dunan S. Evidence of subjects sensitized to *Leishmania infantum* on the French mediterranean coast: Differences in gama interferon production between this population and visceral patients. Parasite Immunol 1991; **13**: 531-36.

Miller M, Mcgowan ES, Gant M, Champion S, Novick S, Andersen AK, Bachi CJ, *et al.* Inducible resistance to oxidant stress in the protozoan *Leishmania chagasi*. J Biol Chem 2000; **275**: 338.

Mosser DM, Brittingham A. Leishmania, macrophages and complement: a tale of subersion and explotation. Parasitol 1997; **115**(suppl 1):S9-S23.

Muigai R, Shaunak S, Wozniak A, Bruceon ADM. Jejunal function and phatology in visceral leishmaniasis. Lancet 1993; **2**: 467-69.

Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modoell M. Murine macrophages secrete interferon gama upon combined stimulation with interleucine-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. J Exp Med 1998; **187**: 2103-8.

Muniz-Junqueira MI, Santos-Neto LLS, Tosta CE. Influence of tumor necrosis factor- $\alpha$  on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic *Plasmodium falciparum in vitro*. *Cel Immunol* 2001; **208**: 73-9.

Muniz-Junqueira MI, Peçanha LM, Silva-Filho VL, Cardoso MC, Tosta CE. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of phagocytosis function of neutrophils and monocytes. *Clin Diag Lab Immunol* 2003; **10**: 1096-02.

Murray HW, Berman JD, Davis CR, Saraiva NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005; **366**: 1561-77.

Murray HW, Hariprasad J, Coffman RL. Behavior of visceral *Leishmania donovani* in an experimentally-induced Th2 cell-associated response model. *J Exp Med* 1997; **185**: 867-74.

Murray HW, Mirallis GD, Stoeckler MY, McDermott DF. Hole in the effect of IL-2 in experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol* 1993; **151**: 929-38.

Murray HW, Montelibano C, Peterson R, Sypek JP. Interleucin-12 regulates the response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 2000; **182**: 1497-02.

Murray HW. Cell mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Immunol* 1982; **129**:351-57.

Murray HW. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1983; **72**:32-4.

Murray HW, Oca MJ, Granger AM, Schreiber RD. Requirement for T cells and effect of lymphokines in successful chemotherapy for intracellular infection. *Experimental visceral leishmaniasis*. *J Clin Invest* 1989; **83**:1253-57.

Nabors GS, Farrell JP. Depletion of interleukin-4 in BALB/c mice with established *Leishmania major* infections increases the efficacy of antimony therapy and promotes TH1-like responses. *Infect Immun* 1994; **62**: 5498-04.

Needman RD. Growth and development. In: Nelson WE, Behrman RE, Kliegman RM, Arvin AM *Textbook of pediatrics*. 15a edição 1996, p 30-67.

Nydegger EU, Anner RM, Gerebtzoff A, Lambert PH, Miescher PA. Polymorphonuclear stimulation by immune complexes. Assessment by nitroblue tetrazolium dye reduction. *Eur J Immunol* 1973; **3**: 465-70.

Ofek I, Goldhar J, Keisari Y, Sharon N. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu Rev Microbiol* 1995; **49**: 239-76.

Oliver M, Baimbrigde KG, Reiner NE. Stimulus-response coupling in monocytes infected with *Leishmania*: attenuation of calcium transients is related to defective agonist-induced accumulation of inositol phosphates. *J Immunol* 1992; **148**: 1188.

Oliver M, Brownsey RW, Reiner N. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase c. *Proc Natl Acad Sci* 1992; **89**: 7481.

Ortega, BE. *Visceral Leishmaniasis*. Long: principles and Practice of pediatric Infectious Diseases. 2a edição, 2003, p1284.

Ouelette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* 2004; **7**: 257-66.

Ozinsky A, Underhill DM. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Ann. Rev. Immunol.* 2002; **20**: 825-52.

Pastorino AC, Jacob CMA, Oselka G, Carneiro-Sampaio MMS. Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. *J Pediatr* 2002; **78**: 120-7.

Pearson RD, Cox G, Evans T, Smith DL, Weidel D, Castracane J. Wasting and macrophage production of tumor necrosis factor/cachectin and interleukin-1 in experimental visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1990; **43**: 640-9.

Pearson RD, Cox G, Jeronimo SM, Drew JS, Evans T, de Alencar JE. Visceral leishmaniasis: a model for infection-induced cachexia. *Am J Trop Med Hyg* 1992; **47**: 8-15.

Pearson RD, Steigbigel RT. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* human polymorphonuclear leucocytes. *J Immunol* 1981; **127**:1438-43.

Pedrosa CMS, Rocha LMM. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos procedentes de Alagoas, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; **37**: 300-304.

Peter CM. Leishmania. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB., Nelson Textbook of Pediatrics, 17a edição, 2004, p1132-34.

Pintado V, Martin-Rabadan P, Rivieira ML, et al. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine* 2001; **80**:54-3.

Pollack S, Nagler A, Liberman D, Oren I, Alroy G, Katz R, Schecheter YH. Immunological studies of pancytopenia in visceral leishmaniasis. *Isr J Med Sci* 1988; **24**: 70-4.

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

Rais S, Perianin A, Lenoir M, Sadak A, Rivollet D, Paul M, Deniau M. Sodium stibogluconate (Pentostan) potentiates oxidant production in murine visceral leishmaniasis and in human blood. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 2406-10.

Reiner SI, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 1995; **13**:151-77.

Revillard JP, Cozon G. Experimental models and mechanisms of immune deficiencies of nutritional origin. *Food Addit Contam* 1990; **7**: 82-6.

Rey, LE, Martins CV, Ribeiro HB, Lima AAM. American visceral leishmaniasis in hospitalized children from endemic area. *J Pediatr* 2005; **81**: 73-8.

Rodrigues SJ, Paola D. O problema das fibroses hepáticas na leishmaniose visceral. *Rev Ass Med Bras* 1958; **4**: 8-21.

Roberts WL, Rainey PM. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**:1842-46.

Rogers KA, Dekrey GK, Mbow ML, Gillespie RD, Brodsky CI, Titus RG. Type 1 and Type 2 responses to *Leishmania major*. Microbiol Lett 2002; **209**:1-7.

Rosseau D, Demartino S, Ferrua B, Mchiels JF, Anjuere F, Fragaki K, Kufar F, Fichoux LY. In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. BMC Microbiol 2001; **1**:17.

Sacks DL, Lal SL, Shivastava SN, Backwell J, Neva FA. An Analysis of T cell responsiveness in Indian Kala-azar. J Immunol 1987; **138**: 908-13.

Saha B, Awasthi A, Mathur R K. Immune response to *Leishmania* infection. Indian J Med Res. 2004; **119**: 238-58.

Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N. Immune responses in Kala-azar. Indian J Med Res. 2006; **123**: 245-66.

Salgado Filho N, Ferreira AFT, Costa MLJ. Envolvimento da função renal em pacientes com leishmaniose visceral (calazar). Rev Soc Med Trop 2003; **36**:217-21.

Salomão R, Filho AD, Medeiros IM, Sicolo MA. Plasma levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  in patients with visceral leishmaniasis (Kala-azar). Association with activity of the disease and clinical remission following antimonial therapy. Rev Inst Med Trop São Paulo 1996; **38**: 113-18.

Santos MA, Marques RC, Farias CA, Vasconcelos DM, Stewart JM, Costa DL, Costa CHN. Indicadores de resposta insatisfatória ao antimônio pentavalente no tratamento da leishmaniose visceral americana. Rev Soc Bras Med Trop 2002; **35**: 629-33.

Searman J, Mercer AJ, Sondorp HE, Herwaldt BL. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. *Ann Intern Med* 1996; **124**: 664-72.

Shaked-Mishan P, Ulrich N, Ephros M, Zilberstein D. Novel intracellular Sb V reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 2001; **276**: 3971-6.

Shaw DR, Griffin FM Jr. Antibody dependent and antibody independent fagocytosis. In: Adams DO, Edelson PJ, Koren H. *Methods for studying mononuclear phagocytes*. New York: Academic press; 1981. p.511-27.

Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; **89**:471-78.

Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; **91**: 671-83.

Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brasil RP. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; **96**: 285-91.

Singh UK, Sinha RK, Sharma VK. Fulminant hepatitis in Kala-azar. *Indian J Pediatr*. 1995; **62**: 571-74.

Smelt SC, Conrrell SE, Engwerda CR, Kaye PM. B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *J Immunol* 2000; **164**: 3681-8.

Trinchieri G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN $\gamma$ ). *Curr Opin Immunol* 1997; **9**:17-23.

Werneck GL, Batista MSA, Gomes JRB, Costa DL, Costa CHN. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Infect* 2003; **31**: 174-77.

Wilson ME, Young BM, Davidson BI, Menta KA, McGowan SE. The importance of TGF $\beta$  in murine visceral leishmaniasis. *J Immunol* 1998; **161**: 6148-55.

World Medical Association. Declaration of Helsinki ethical principles for medical research involving human subjects. 2004. [http://www.rotrf.org/information/Helsinki\\_declaration.pdf](http://www.rotrf.org/information/Helsinki_declaration.pdf) (accessado em 25/03/2007)

Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 2004; **279**: 39925-32.

Zarley JH, Britigan BE, Wilson. Hydrogen peroxide mediated toxicity for *Leishmania donovani chagasi* promastigotes: role of hydroxyl radical and protection by heat shock. *J Clin Invest* 1991; **88**:1511.

## **8. ANEXOS**

## 8.1 Termo de consentimento livre e esclarecido

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA / FACULDADE DE MEDICINA  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA CELULAR

### PROJETO DE PESQUISA

Influência do N-metil glucamina sobre a função dos fagócitos, produção de citocinas e via de ativação do NFκB e imunoproteasoma na leishmaniose visceral

### RESPONSÁVEIS

Profa Dra Maria Imaculada Muniz Barbosa Junqueira  
Prof Dr Bruno Vaz da Costa, Dra Vanessa Viana Cardoso

### TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,....., .....anos,  
Pais ou responsáveis pelo menor.....,  
abaixo assinado, declaro ter lido ou ouvido o presente documento, e compreendido o seu significado, que informa o seguinte:

- 1- Estou permitindo a participação de meu filho(a), por minha livre vontade, de uma pesquisa que usa células do seu sangue para estudar como elas reagem ao tratamento com Glucantime, que é um remédio utilizado no tratamento da doença que ele (a) tem. Fui esclarecido (a) que as células do sangue dele (a) serão analisadas em laboratório para saber como o medicamento está ajudando a curar o meu (minha) filho (a). O remédio que está sendo usado pelo meu filho(a) faz parte da rotina do Hospital e é indicado pelo Ministério da Saúde.
2. O benefício que será obtido com este estudo é o melhor entendimento de como o remédio está agindo para melhorar a doença e propiciar um melhor tratamento para os doentes.
3. No local do braço de onde o sangue será retirado poderá ficar uma mancha roxa por alguns dias.
- 4- Concordo que seja retirado de 5 a 10 ml de sangue de uma veia do braço de meu filho(a), ao início, com 48 horas e ao término do tratamento, utilizando material estéril e descartável, para obtenção das células que serão estudadas.
5. A qualquer momento posso retirar meu filho(a) da pesquisa sem qualquer prejuízo para o seu tratamento ou acompanhamento.
- 6-Posteriormente, se eu desejar, poderei ser informado(a) sobre o resultado do exame que foi feito no sangue do meu (minha).
7. Não haverá nenhum benefício financeiro nem para o pesquisador nem para o paciente para a realização deste projeto.
- 8- Fui esclarecido que meu nome não será divulgado.

Brasília,.....de.....de.....

Nome do responsável pelo paciente:.....

Assinatura do responsável pelo paciente:.....

.....  
Pesquisador

.....  
Testemunha

Telefone da pesquisadora Dra Vanessa Viana Cardoso: 81162432 Telefone do comitê de ética em pesquisa CEP/SES: 33254955.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA / FACULDADE DE MEDICINA  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA CELULAR

PROJETO DE PESQUISA

Influência do N-metil glucamina sobre a função dos fagócitos, produção de citocinas e via de ativação do NFκB e imunoproteasoma na leishmaniose visceral

RESPONSÁVEIS

Profa Dra Maria Imaculada Muniz Barbosa Junqueira  
Prof Dr Bruno Vaz da Costa, Dra Vanessa Viana Cardoso

TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
(Controle normal)

EU,....., .....anos,  
Pais ou responsáveis pelo menor .....,  
abaixo assinado, declaro ter lido ou ouvido o presente documento, e compreendido o seu significado, que informa o seguinte:

- 1- Estou permitindo a participação de meu filho(a), por minha livre vontade, de uma pesquisa que usa células do seu sangue para estudar como elas reagem in vitro para serem posteriormente comparadas com as células de pacientes doentes com calazar. Fui esclarecido (a) que as células do sangue retiradas serão analisadas em laboratório.
2. O benefício que será obtido com este estudo é o melhor entendimento de como o remédio está agindo para melhorar a doença calazar e propiciar um melhor tratamento para os doentes.
3. No local do braço de onde o sangue será retirado poderá ficar uma mancha roxa por alguns dias.
- 4- Concordo que seja retirado de 5 a 10 ml de sangue de uma veia do braço de meu filho(a), uma única vez, utilizando material estéril e descartável, para obtenção das células que serão estudadas.
5. A qualquer momento posso retirar meu filho(a) da pesquisa sem qualquer prejuízo para ele (a).
- 6- Concordo que seja retirado de 5 a 10 ml de sangue de uma veia do braço de meu filho(a), uma única vez, utilizando material estéril e descartável, para obtenção das células que serão estudadas.
- 7-Posteriormente, se eu desejar, poderei ser informado(a) sobre o resultado do exame que foi feito no meu sangue.
8. Não haverá nenhum benefício financeiro nem para o pesquisador nem para o paciente para a realização deste projeto.
- 9- Fui esclarecido que meu nome não será divulgado.

Brasília,.....de.....de.....

Nome do responsável pelo paciente:.....

Assinatura do responsável pelo paciente.....

.....

.....

Pesquisador

Testemunha

Telefone da pesquisadora Dra Vanessa Viana Cardoso: 81162432/ Telefone do comitê de ética em pesquisa CEP/SES: 33254955.

## **8.2. Aprovação do projeto no comitê de ética em pesquisa CEP**

**– FM/UnB**



Universidade de Brasília – Faculdade de Medicina  
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-FM/UnB  
Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-900 – Brasília, DF  
Telefone: (61) 307-2520

Processo n.º .....  
Fls. n.º .....  
Rubrica .....

### ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do projeto: **CEP-FM 047/2005**

Título: **“Influência do N-metil glucamina sobre a função dos fagócitos, produção de citocinas e via de ativação do NFkB e imunoproteasoma na leishmaniose visceral”**

Pesquisador responsável: **Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira**

Documentos analisados: **Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo(s) do pesquisador(es)**

Data de entrada: **16/06/2005**

Proposição do(a) Relator(a):

**Aprovação**

Aprovação com pendências

Não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB: **29/06/2005**

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB: **25/08/2005**

### PARECER

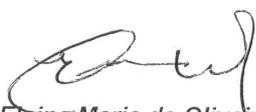
Com base na Resolução CNS/MS n.º 196/96, que regulamenta a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, a Coordenação do CEP-FM decidiu **APROVAR “ad referendum”**, de acordo com o parecer da Coordenação, o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

#### **Observação:**

1 - Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves.

2 - O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília-DF, 25 de agosto de 2005.

  
Dr.ª Elaine Maria de Oliveira Alves  
Coordenadora do CEP-FM/UnB

### **8.3. Aprovação do projeto de pesquisa no comitê em pesquisa SES/DF**



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL  
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



**PARECER Nº 131/2005**

**Processo Nº:** 114/05

**Projeto de Pesquisa:** Influência do N-metil-glucamina sobre a função dos fagócitos, produção de citocinas e avaliação de via de ativação do NFkB e imunoproteasoma na leishmaniose visceral em crianças

**Data de Entrada:** 13/7/2005

**Pesquisador Responsável:** Bruno Vaz da Costa

**Instituição Pesquisada:** SES/HRAS

**Área Temática Especial:** Grupo III (não Pertencente a área temática especial), Ciências da Saúde.

**Validade do Parecer:** 19/9/2007.

Tendo como base a Resolução 196/96 CNS/MS, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras em pesquisa envolvendo seres humanos, assim como as suas resoluções complementares, o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, após apreciação ética, manifestou-se pela **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa proposto.

Esclarecemos que o pesquisador deverá observar as responsabilidades que lhe são atribuídas na Resolução 196/96 CNS/MS, incisos IX.1 e IX.2, em relação ao desenvolvimento do projeto. **Ressaltamos a necessidade de encaminhar a este Comitê relatórios parciais e final, além de notificação de eventos adversos quando pertinentes.**

Brasília, 19 de setembro de 2005.

Maria Rita Carvalho Garbi Novaes  
Comitê de Ética em Pesquisa/SES-DF  
Coordenadora

Brasília – Patrimônio Cultural da Humanidade

Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde - SES  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Fone: 325-4955 - Fone/Fax: 326-0119 - e-mail: cepesedf@saude.df.gov.br  
SMHN - Q. 501 - Bloco "A" - Brasília - DF - CEP.: 70.710-904

## 8.4. Ficha de acompanhamento

IDENTIFICAÇÃO	
Paciente:	Reg.:
Sexo: <input type="checkbox"/> masculino <input type="checkbox"/> feminino	
Data de nascimento: / /	
Procedência:	
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS- Admissão	
Tempo de febre até a admissão:	
Tamanho do fígado – Início: cm	Término: cm
Tamanho do baço – Início: cm	Término: m
Peso:	Estatura:
Sintomas: <input type="checkbox"/> febre <input type="checkbox"/> apatia <input type="checkbox"/> emagrecimento <input type="checkbox"/> dor abdominal <input type="checkbox"/> diarreia <input type="checkbox"/> vômitos <input type="checkbox"/> tosse <input type="checkbox"/> Aumento do Volume abdominal	
Sinais: <input type="checkbox"/> palidez <input type="checkbox"/> icterícia <input type="checkbox"/> petéquia <input type="checkbox"/> taquipnéia <input type="checkbox"/> edema <input type="checkbox"/> viceromegalia	
Outros:	
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS – 48 horas	
Peso:	Estatura:
Sintomas: <input type="checkbox"/> febre <input type="checkbox"/> apatia <input type="checkbox"/> emagrecimento <input type="checkbox"/> dor abdominal <input type="checkbox"/> diarreia <input type="checkbox"/> vômitos <input type="checkbox"/> tosse <input type="checkbox"/> Aumento do Volume abdominal	
Sinais: <input type="checkbox"/> palidez <input type="checkbox"/> icterícia <input type="checkbox"/> petéquia <input type="checkbox"/> taquipnéia <input type="checkbox"/> edema <input type="checkbox"/> viceromegalia	
Outros:	
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS – 1ª semana	
Peso:	Estatura:
Sintomas: <input type="checkbox"/> febre <input type="checkbox"/> apatia <input type="checkbox"/> emagrecimento <input type="checkbox"/> dor abdominal <input type="checkbox"/> diarreia <input type="checkbox"/> vômitos <input type="checkbox"/> tosse <input type="checkbox"/> Aumento do Volume abdominal	
Sinais: <input type="checkbox"/> palidez <input type="checkbox"/> icterícia <input type="checkbox"/> petéquia <input type="checkbox"/> taquipnéia <input type="checkbox"/> edema <input type="checkbox"/> viceromegalia	
Outros:	
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS – 2ª semana	
Peso:	Estatura:
Sintomas: <input type="checkbox"/> febre <input type="checkbox"/> apatia <input type="checkbox"/> emagrecimento <input type="checkbox"/> dor abdominal <input type="checkbox"/> diarreia <input type="checkbox"/> vômitos <input type="checkbox"/> tosse <input type="checkbox"/> Aumento do Volume abdominal	
Sinais: <input type="checkbox"/> palidez <input type="checkbox"/> icterícia <input type="checkbox"/> petéquia <input type="checkbox"/> taquipnéia <input type="checkbox"/> edema <input type="checkbox"/> viceromegalia	
Outros:	

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS – Final			
Peso:		Estatura:	
Sintomas( ) febre ( ) apatia ( ) emagrecimento ( ) dor abdominal ( ) diarreia ( ) vômitos ( ) tosse ( ) Aumento do Volume abdominal			
Sinais ( ) palidez ( ) icterícia ( ) petéquias ( ) taquipnéia ( ) edema ( ) viceromegalia			
Outros:			
EXAMES COMPLEMENTARES			
* HEMOGRAMA	Admissão	2ª semana	3ª semana
Hemoglobina			
Leucócitos totais			
Neutrófilos			
Eosinófilo			
Linfócitos			
Plaquetas			
* ENZIMAS HEPÁTICAS			
TGO			
TGP			
Bilirrubinas totais			
Bilirrubina direta			
Bilirrubina indireta			
* ELETRÓLITOS			
Sódio			
Potássio			
Cálcio			
* PROTÉINAS TOTAIS/ FRAÇÕES			
Gamaglobulinas			
Albumina			
* EAS			
Proteínas			
Hemácias			
* VHS			
* TAP			
* ECG			
* SOROLOGIA LEISHMANIOSE	( ) Positiva	( ) Negativa	Data: / /
* PUNÇÃO ÓSSEA.	( ) Positiva	( ) Negativa	Data: / /
Outros:			

COMPLICAÇÕES	
Infecção Bacteriana associada	( ) sim ( ) não Foco: sepse: S/N
Distúrbio hematológico	( ) sim ( ) não ( ) hemorragia ( ) coagulopatia
Toxicidade ao Glucantime	( ) mialgia ( ) artralgia ( ) mal-estar ( ) cardiotoxicidade ( ) alt.enzimas hepáticas
Insuficiência cardíaca	( ) sim ( ) não

## 8.5. Tabelas – Análise clínica

**Tabela 4- Evolução do tamanho do baço e do fígado de crianças com calazar durante o tratamento clínico com o glucantime**

Tempo	n	Baço (cm) <sup>*a</sup>	Fígado (cm) <sup>*b</sup>
Dia zero	23	9 (2-13)	5,5 (3-9)
48 horas	22	9 (2-13)	5 (3-9)
1 semana	22	6,5 (1,5-12)	4 (0-7,5)
2 semana	22	5 (0-11)	3 (0-7)
Alta	21	3 (0-8)	2 (0-5)

\*valores expressos em mediana e extremos. Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos; <sup>a</sup> Dunn- Dia zero vs 2 semana/ Dia zero vs alta/ 48hs vs 2 semana/ 48hs vs alta/ 1 semana vs alta; p< 0,05 // <sup>b</sup> Dunn- Dia zero vs 2 semana/ Dia zero vs alta/ 48hs vs 2 semana/ 48hs vs alta; p<0,05.

**Tabela 5- Evolução das alterações hematológicas de crianças com calazar durante o tratamento clínico com o glucantime**

Tempo	Valores hematológicos			
	Hemoglobina*	Leucócitos**	Neutrófilos**	Plaquetas**
Dia zero	7,4 <sup>a</sup> (4,5-11,1)	3000 <sup>a</sup> (1700-9600)	1344 <sup>a</sup> (360-4482)	74000 <sup>a</sup> (25000-270000)
1 semana	8,8 (4,5-10,3)	4500 (1200-10300)	2025 (504-7725)	135000 (18000-547000)
2 semana	9,3 (6,7-12)	5600 (1900-12600)	2640 (779-8062)	228000 (27000-471000)

\*Taxa hemoglobina(g/dl) \*\*Número absoluto. Valores expressos em mediana e extremos; Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos; <sup>a</sup> Dunn- Dia zero vs 2 semana; p< 0,05

**Tabela 6- Evolução das alterações das enzimas hepáticas de crianças com calazar durante o tratamento clínico com o glucantime**

Tempo	n	TGO(U/L)*	TGP(U/L)*
Dia zero	23	69 (15-1040)	45 (10-698)
1 semana	22	57 (24-508)	44 (2-507)
2 semana	21	46 (29-258)	33,6 (11-140)

\*Valores expressos em mediana e extremos.

## 8.6. Tabelas – Análise da função fagocitária

**Tabela 7– Mediana e extremos da média de leveduras fagocitadas por monócito, proporção de monócitos envolvidos na fagocitose e índice fagocitário dos monócitos utilizando  $6,25 \times 10^4$  *Saccharomyces cerevisiae* por escavação pelos receptores para complemento e para padrões moleculares de patógenos**

Grupos	Receptores para complemento			Receptores para patógeno		
	Média de leveduras/ monócito	% fagócitos envolvidos	Índice fagocitário	Média de levedura/ monócito	% fagócitos envolvidos	Índice fagocitário
Controle	1,8 <sup>a</sup> (1,3-2,7)	77 (31-90)	132 <sup>b</sup> (51-243)	1,5 (1-1,7)	4 (1-13)	7 (0-46)
Calazar antes do tratamento	2,7 (1,3-5,1)	73 (3-93)	199,5 <sup>b</sup> (4-475)	1,2 (1-1,8)	6,5 (3,5-9)	8 (2-40)
Calazar 48 horas do tratamento	2,6 (2,4-3,7)	62 (40-91)	199 (101-281)	1,4 (1-1,5)	4 (2,5-5,5)	5 (2-23)
Calazar final do tratamento	2,1 (1,4-3,2)	60,5 (29-81)	135,5 (54-254)	1,8 (1,1-2,3)	3,5 (1-11)	5,5 (0-48)
<i>p</i> value *	<0,001*	0,33*	0,01**	0,46*	0,72*	0,86*

\* Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos; <sup>a</sup> Dunn- controle vs início/ controle vs 48hs

\*\*Anova, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos; <sup>b</sup> Student-Newman-Keuls - controle vs início / início vs final; *p*<0,05

**Tabela 8– Mediana e extremos da média de leveduras fagocitadas por monócito, proporção de monócitos envolvidos na fagocitose e índice fagocitário de monócitos utilizando  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* por escavação pelos receptores para complemento e patógenos**

	Receptores para complemento			Receptores para patógeno		
	Média de leveduras/ monócito	% fagócitos envolvidos	Índice fagocitário	Média de levedura/ monócito	% fagócitos envolvidos	Índice fagocitário
Controle	2,7 <sup>a</sup> (1,7-3,4)	82 (58-93)	215 (111-273)	1,5 (1-2)	13 (1-36)	20 (1-72)
Calazar antes do tratamento	4 <sup>a</sup> (1,8-6,3)	76 (11-99)	272 (20-629)	1,6 (1-4)	12,5 (1-22)	15,5 (2-57)
Calazar 48 horas do tratamento	3,4 (2,3-5)	71 (35-96)	265 (81-411)	1,5 (1-3)	9 (5-15)	14 (5-45)
Calazar final do tratamento	2,7 (2-4,3)	75 (56-91)	215 (117-383)	1,6 (1-2,5)	12,5 (1-45)	24 (1-94)
<i>p</i> value *	0,003*	0,89*	0,04*	0,61*	0,74*	0,82*

\* Kruskal-Wallis test, seguido de Dunn para comparação entre os grupos; <sup>a</sup> Dunn- controle vs início / início vs final;

p<0,05

**Tabela 9– Mediana e extremos da média de leveduras fagocitadas por neutrófilo, proporção de neutrófilo envolvidos na fagocitose e índice fagocitário dos neutrófilos utilizando  $6,25 \times 10^4$  *Saccharomyces cerevisiae* por escavação pelos receptores para complemento e para padrões moleculares de patógenos**

	Receptores para complemento			Receptores para patógeno		
	Média de leveduras/ monócito	% fagócitos envolvidos	Índice fagocitário	Média de levedura/ monócito	% fagócitos envolvidos	Índice fagocitário
Controle	2 <sup>a</sup> (1,4-2,9)	76 (47-94)	151 <sup>b</sup> (67-266)	1 (0-2)	3 (0-16)	4 (0-30)
Calazar antes do tratamento	3,1 <sup>a</sup> (2,4-5,3)	82,5 (63-100)	261 <sup>b</sup> (186-538)	1 (0-2,5)	3,5 (0-16)	3,5 (0-41)
Calazar 48 horas do tratamento	3,3 <sup>a</sup> (2,7-4,5)	73 (55-98)	256 (153-355)	1,2 (1-2)	5 (1—11)	5 (1-23)
Calazar final do tratamento	2,1 (1,2-4,2)	75,5 (36-100)	180 (58-427)	1,2 (0-3)	4,5 (0-46)	7,5 (0-89)
<i>p</i> value *	<0,001*	0,25**	0,0006**	0,74*	0,85*	0,83*

\* Kruskal-Wallis test, seguido de Dunn para comparação entre os grupos; <sup>a</sup> Dunn-controle vs 48hs/ controle vs início/ início vs final/ 48hs vs final; *p*<0,05

\*\*Anova, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos; <sup>b</sup> Student-Newman-Keuls - controle vs início/ controle vs 48hs/ início vs final; *p*<0,05

**Tabela 10– Mediana e extremos da média de leveduras fagocitadas por neutrófilo, proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose e índice fagocitário de neutrófilos utilizando  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* por escavação pelos receptores para complemento e patógenos**

	Receptores para complemento			Receptores para patógeno		
	Média de leveduras/ monócito	% fagócitos envolvidos	Índice fagocitário	Média de levedura/ monócito	% fagócitos envolvidos	Índice fagocitário
Controle	2,9 <sup>b</sup> (1,7-3,8)	86 (44-100)	264 <sup>a</sup> (115-379)	1,2 (0-20)	3 (0-32)	3 (0-60)
Calazar antes do tratamento	3,7 <sup>b</sup> (2,1-6,3)	91 (80-100)	347,5 <sup>a</sup> (169-636)	1,1 (0-3,6)	5 (0-33)	6,5 (0-72)
Calazar 48 horas do tratamento	3,6 (2,7-5)	85 (41-98)	297 (175-494)	1 (1-1,7)	6 (1-25)	6 (1-38)
Calazar final do tratamento	3 (1,7-3,7)	88 (62-100)	263,5 (108-348)	1,3 (0-2,3)	6,5 (0-34)	10 (0-65)
<i>p</i> value *	0,001**	0,42*	0,012*	0,79*	0,52*	0,47*

\* Kruskal-Wallis test, seguido de Dunn para comparação entre os grupos <sup>a</sup> Dunn - controle vs início / início vs final  
p<0,05

\*\*Anova, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos <sup>b</sup> controle vs início/ início vs final; p<0,05

**Tabela 11- Mediana dos valores para capacidade microbicida basal e após estímulo**

	Porcentagem redução do NBT basal	Porcentagem redução do NBT após estímulo
Controle	100 (92-100)	100 <sup>a</sup> (97-100)
Calazar antes do tratamento	97 (92-100)	99 (96-100)
Calazar 48 horas do tratamento	97 (93-100)	98 (92-100)
Calazar final do tratamento	98,5 (92-100)	100 (95-100)
<i>p</i> value *	0,03*	0,01*

\*Kruskal-Wallis test, seguido de Dunn para comparação entre os grupos <sup>a</sup> Dunn - controle vs 48hs p<0,05