



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS – GRADUAÇÃO EM MEDICINA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CÂNDIDA REGINA DE OLIVEIRA VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DE NÍVEIS SÉRICOS DE
PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL
TRATADOS COM N-ACETIL-L-CISTEÍNA (NAC)
E ANTIMONIAL PENTAVALENTE**

**ARACAJU
2011**

CÂNDIDA REGINA DE OLIVEIRA VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DE NÍVEIS SÉRICOS DE
PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL
TRATADOS COM N-ACETIL-L-CISTEÍNA (NAC)
E ANTIMONIAL PENTAVALENTE**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe - UFS, como um dos pré-requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida

**Aracaju
2011**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

V331a Vasconcelos, Cândida Regina de Oliveira
Avaliação de níveis séricos de pacientes com leishmaniose visceral tratados com N-Acetil-L-Cisteína (NAC) e antimonial pentavalente / Cândida Regina de Oliveira Vasconcelos. – Aracaju, 2012.

00 f. : il.

Orientador (a): Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Núcleo de Pós-Graduação em Medicina.

1. Leishmaniose visceral 2. Níveis séricos 3. Imunologia I. Título

CDU 616.993.161

CÂNDIDA REGINA DE OLIVEIRA VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DE NÍVEIS SÉRICOS DE
PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL
TRATADOS COM N-ACETIL-L-CISTEÍNA (NAC)
E ANTIMONIAL PENTAVALENTE**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Núcleo de Pós-Graduação em
Medicina da Universidade Federal de
Sergipe, para obtenção do grau de
Mestre em Ciências da Saúde.

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADOR: PROF. DR. ROQUE PACHECO DE ALMEIDA - UFS

1ª EXAMINADORA: PROF.^a DR.^a ÂNGELA MARIA DA SILVA

2º EXAMINADORA: PROF.^a DR.^a TATIANA RODRIGUES DE MOURA

PARECER

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo;

À minha família pelo incentivo e compreensão;

Aos meus colegas dos laboratórios de Análises Clínicas e de Biologia Molecular, pelo estímulo, pelo apoio e por torcerem pelo meu sucesso;

A Flávia Oliveira Costa, por acreditar em mim e sempre me incentivar no meu crescimento profissional e pessoal.

À professora Tatitana Moura, sempre prestativa com seus conhecimentos inestimáveis em Imunologia e experimentos laboratoriais imunológicos.

Ao Dr. Roque Pacheco de Almeida, meu orientador, pela oportunidade e paciência;

À Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus, pelas palavras encorajadoras.

À Priscila Lima, pela total doação, me amparando quando eu mesma não tinha mais forças para me sustentar.

A todos, profissionais e pacientes, que de alguma forma contribuíram para a realização dessa pesquisa.

RESUMO

Para que a quimioterapia possa resultar em cura, é importante que o sistema imune tenha condições e estímulos necessários ao desenvolvimento do perfil de citocinas adequado à resistência à doença e ao combate do agente etiológico. Estudos demonstram que o N-acetil-L-cisteína (NAC), uma substância antioxidante, contribui para a imunoregulação de determinadas doenças. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis séricos dos pacientes quanto à ação adjuvante do N-acetil-L-cisteína (NAC) na quimioterapia da leishmaniose visceral humana, feita com antimônio pentavalente. A partir de um estudo de intervenção, tipo ensaio clínico, cego, randomizado, foram investigados 60 pacientes do Hospital Universitário com diagnóstico positivo para leishmaniose visceral aguda. Esses pacientes foram distribuídos em dois grupos de 30: Grupo Estudo – que fez uso do antimônio pentavalente dose padrão complementado com o N-acetil-L-cisteína (NAC) e o Grupo Controle - que fez uso apenas do antimônio dose padrão. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFS sob número CAAE 0151.0.107.000-07. Os pacientes selecionados e randomizados foram avaliados quanto aos parâmetros laboratoriais. Para avaliar as taxas de citocinas dos pacientes, foram realizadas dosagens dos níveis séricos de IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-12p40 e IL-12p70, sendo também dosada a molécula sCD40L antes, durante e após o tratamento, com uso do analisador LUMINEX 100. Os resultados sugerem que a adição do NAC ao tratamento convencional melhora as taxas das citocinas dos pacientes, sobretudo a diminuição dos níveis séricos de IL-10, IL-12p40 e na elevação de sCD40L. Este estudo mostrou que, apesar de ambos os grupos apresentarem-se curados no último dia do tratamento, o grupo estudo desenvolveu uma resposta indicativa de cura mais precocemente, sugerindo que o NAC tenha atuado de forma adjuvante ao antimônio pentavalente, sendo proposto ainda o uso da molécula sCD40L como um marcador prognóstico para a leishmaniose visceral.

Palavras-chave: leishmaniose visceral; NAC; níveis séricos.

ABSTRACT

The leishmaniase is a serious public health problem in the world, demanding effective measures for its control and treatment. The patient's immune response in visceral leishmaniasis has a fundamental role in the prognosis of this infection inflammation, which can be fatal if untreated. So that chemotherapy can result in healing, it is important that the immune system is able and necessary stimulus to the development of appropriate cytokine profile and disease resistance to fighting agent. Thus, the purpose of this study was to evaluate the levels serum of patients on the adjuvant action of N-acetyl-L-cysteine (NAC) in the chemotherapy of human visceral leishmaniasis, made with pentavalent antimony. From an intervention study, clinical trial, blinded, randomized, 60 patients were investigated at the University Hospital with the diagnosis of visceral leishmaniasis. These patients were divided into two groups of 30: Study Group - which made use of pentavalent antimony standard dose supplemented with N-acetyl-L-cysteine (NAC) and the control group - which only used a standard dose of antimony. This study was approved by the ethics committee in search of UFS under CAAE 0151.0.107.000-07 number. The patients selected randomly and were assessed for clinical and laboratory parameters. To evaluate the rate of the patients were performed serum levels of cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-12p40 and of molecule sCD40L before, during and after treatment using the Luminex 100 analyzer. The results suggest that the addition of NAC to conventional therapy improves the immune response of patients, especially in lowering serum levels of IL-10, IL-12p40 and elevated sCD40L. This study showed that although both groups had healed up on the last day of treatment, the study group developed a response indicative of early healing, suggesting that the NAC has acted in a manner adjunct to pentavalent antimony, being also proposed the use of the sCD40L molecule as a prognostic marker for visceral leishmaniasis.

KeyWords: visceral leishmaniasis, NAC; levels serum.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS – *Acquired Immune Deficiency Syndrome*

CMSP – Células Mononucleares do Sangue Periférico

DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano

DTH – *Delayed Type Hypersensitivity Response*

ELISA – Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima

GSH – γ -glutamil-cisteinil-glicina

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

IFI – Imunofluorescência Indireta

IFN – Interferon

Ig – Imunoglobulina

IGF – Fator de Crescimento do tipo Insulina

IL – Interleucina

LC – Leishmaniose Cutânea

LCM – Leishmaniose Cutaneomucosa

LPS – Lipopolissacarídeo

LV – Leishmaniose Visceral

NAC – N-acetil-L-cisteína

NK – *Natural Killer*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

sCD40L – Ligante CD40 solúvel

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF – Fator de Transformação de Crescimento

Th-1 – *T helper* tipo 1

Th-2 – *T helper* tipo 2

TNF - Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico da Leishmaniose Visceral.....	17
--	-----------

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Níveis de IFN- γ em soro de pacientes alocados no Grupo Sb ^V e no Grupo NAC+ Sb ^V nos diferentes períodos analisados	46
Gráfico 2. Níveis de IL-12p70 em soro de pacientes alocados no Grupo Sb ^V e no Grupo NAC+ Sb ^V nos diferentes períodos analisados	46
Gráfico 3 – Níveis de TNF- α em soro de pacientes alocados no Grupo Sb ^V e no Grupo NAC+ Sb ^V nos diferentes períodos analisados	47
Gráfico 4 – Níveis de IL-10 em soro de pacientes alocados no Grupo Sb ^V e no Grupo NAC+ Sb ^V nos diferentes períodos analisados	48
Gráfico 5 – Níveis de IL-12p40 em soro de pacientes alocados no Grupo Sb ^V e no Grupo NAC+ Sb ^V nos diferentes períodos analisados	49
Gráfico 6 – Níveis de sCD40L em soro de pacientes alocados no Grupo Sb ^V e no Grupo NAC+ Sb ^V nos diferentes períodos analisados	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização dos pacientes com diagnóstico de Leishmaniose Visceral segundo dados clínicos e laboratoriais antes do tratamento	44
Tabela 2 – Distribuição dos níveis de significância das co-variáveis idade e gênero em relação às citocinas avaliadas.....	44
Tabela 3 – Distribuição dos níveis de citocinas dos pacientes do grupo Sb ^V e do grupo NAC+ Sb ^V	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral	14
2.2 Ciclo Biológico.....	16
2.3 Quadro Clínico.....	19
2.4 Diagnóstico.....	21
2.5 Tratamento.....	22
2.6 Profilaxia.....	23
2.7 Imunopatogenia.....	24
2.8 Glutathiona e NAC	31
3. JUSTIFICATIVA.....	34
4. OBJETIVOS.....	36
4.1 Objetivo Geral	37
4.2 Objetivos Específicos	37
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	38
5.1 Seleção de Pacientes	39
5.2 Coleta de Soro	40
5.3 Dosagens de Citocinas	40
5.4 Análise Estatística	40
6. RESULTADOS	42
6.1 Caracterização dos Pacientes com Leishmaniose Visceral Aguda	43
6.2 Níveis Séricos da Resposta Celular (Resposta Th1)	45
6.3 Níveis Séricos da Resposta Humoral (Resposta Th2).....	47
6.4 Níveis Séricos da Molécula sCD40L.....	49
7. DISCUSSÃO.....	51
8. CONCLUSÕES.....	58
9. REFERÊNCIAS.....	60
10. APÊNDICE.....	65

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é um grave problema de saúde pública no mundo, demandando medidas eficazes no seu controle e tratamento, como preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Essa doença é endêmica em regiões marcadas por baixos índices de desenvolvimento humano, principalmente em países da África, Ásia e América do Sul. No Brasil, a Região Nordeste apresenta os maiores índices (DESJEUX *et al.*, 1992).

O perfil imunológico adequado para que sejam desenvolvidas resistência e cura da leishmaniose visceral é a resposta tipo Th1, representada principalmente pelas citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-12. Indivíduos cujo sistema imunológico desenvolve resposta Th2, na qual ocorre elevação dos níveis de IL-10 com produção de anticorpos diante da infecção pela *L. chagasi*, tornam-se susceptíveis, manifestando-se assim a doença (PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2005).

A resposta imunológica do paciente na leishmaniose visceral tem papel fundamental no prognóstico desta infecção inflamatória. Para que a quimioterapia possa resultar na cura, é importante que o sistema imune tenha condições e estímulos necessários ao desenvolvimento do perfil de citocinas adequado à resistência à doença e ao combate do agente etiológico. Assim, o incremento do tratamento convencional com substâncias que possam interagir de forma positiva e direta na resposta imune, possibilitará resultados mais eficientes e significativos no processo de cura (ROBERTS, 2006).

Estudos em humanos e animais evidenciam que a glutatona (GSH) tem ação sobre o sistema imune, tornando-o mais eficiente. Também foi observado que ao ser incrementada a disponibilidade dos seus precursores no organismo, dentre eles o N-aceil-L-cisteína (NAC), a GSH tem sua concentração aumentada. Assim o NAC já vem sendo utilizado de forma complementar no tratamento de doenças, a exemplo da fibrose cística, tendo-se constatado o seu efeito modulador sob o sistema imunológico, o que tem contribuído para melhores resultados no tratamento (TIROUVANZIAM *et al.*, 2006; TOWNSEND; TEW; TAPIERO, 2003; WU *et al.*, 2004).

Ao acometer o indivíduo, a leishmaniose visceral não só o debilita, como também o torna susceptível a infecções secundárias, e ainda, se não for tratada pode ser fatal. Faz-se então primordial a administração de um tratamento efetivo e o mais eficiente possível, e que não produza efeitos colaterais indesejáveis no paciente. Diante de tais fatos, é importante que conhecimentos quanto ao desenvolvimento da melhor resposta imune sejam adquiridos e utilizados como ferramenta para avaliação, prognóstico, condução e acompanhamento do tratamento e constatação de cura dessa doença. Portanto, o presente trabalho tem como hipótese o fato de que o uso do NAC associado ao antimonial pentavalente pode ser benéfico para o tratamento da leishmaniose visceral, melhorando os níveis séricos de determinadas citocinas e moléculas e diminuindo o tempo de cura dos pacientes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral

Endêmica em 65 países, estimativas indicam que em todo o mundo, ao ano, a incidência da leishmaniose visceral seja de 500.000 casos e o número de mortes esteja entre 50.000 a 60.000, fazendo desta a nona na lista de doenças infecciosas. Apesar da sua disseminação geográfica pelos cinco continentes, as maiores concentrações dos casos de leishmaniose visceral delimitam-se a determinadas áreas, sendo que Nepal, Índia, Bangladesh, Sudão, Etiópia e Brasil somam mais de 90% da ocorrência desta doença (ELKHOURY, 2005; WHO, 2010).

Desde o início dos anos 80, a leishmaniose visceral (LV) no Brasil tem apresentado mudanças em seu perfil de ocorrência e em sua incidência. Essa doença, antes tida como típica de zonas rurais e silvestres, e de relativamente baixa incidência, atualmente tem se manifestado mais comumente e em números continuamente crescentes em várias cidades do país, desenvolvendo assim um amplo e intenso processo de urbanização e distribuição geográfica. Cidades das regiões Norte (a exemplo de Boa Vista e Santarém), Sudeste (entre elas Belo Horizonte e Montes Claros), Centro Oeste (citando-se Cuiabá e Campo Grande) e Nordeste (como São Luís, Natal e Aracaju) têm sido foco da LV (GONTIJO; MELO, 2004).

Essa urbanização da doença é resultante da rápida e intensa migração de moradores da zona rural para as cidades. Esse alto contingente, aliado às alterações ambientais, feitas pelo próprio homem, habitações inadequadas e sem saneamento, facilitam tanto a emergência quanto a reemergência de diversas doenças, como é o caso da leishmaniose visceral (GONTIJO; MELO, 2004).

A LV é endêmica em 20 Estados brasileiros. De 1990 a 2007, 53.480 casos foram notificados no Brasil, sendo que entre os anos de 1996 e 2005 a média anual foi de 3.095 notificações, com incidência de 2,1 casos por 100.000 habitantes. MAIA-ELKHOURY *et al* (2008) apresentam dados nos quais durante o período de 2001 a 2005, crianças com até 10 anos de idade representavam 56,7% dos casos, enquanto que as menores de 5 anos representavam 43,4% das ocorrências. Somente no ano de 2007, foram registrados no país 2.897 casos, dos quais 62,1% ocorreram

em menores de 10 anos de idade e 74% dos indivíduos eram do gênero masculino. Quanto à letalidade, a taxa foi de 6,3%, com número de 183 óbitos. Um ponto ainda não esclarecido é a verificação, quanto ao gênero, de uma maior incidência entre os homens, mostrando que esses são mais susceptíveis a essa doença (ALVES, 2009).

De acordo com dados do Ministério da Saúde no ano de 2009 foram registrados 3.693 casos de leishmaniose visceral no Brasil, sendo que destes, 47,5% (1.754) ocorreram na região Nordeste, 19,2% (709) na Norte, 17,4% (641) na Sudeste, 7,4% (274) na Centro-Oeste e 0,2% (8) na Sul. Quanto aos óbitos neste mesmo ano foram notificados 216 em todo o país.

A região Nordeste, que até os anos 90 respondia por 90% dos casos brasileiros, atualmente conta com 56%, baixa que se deve à disseminação da infecção para as regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste (ALVES, 2009). Oliveira *et al* (2006) citam que em 1998, a incidência de LV no Nordeste brasileiro foi de 1977 casos, sendo que em 2002 esse número havia se elevado para 3102, estando as maiores incidências nos estados do Piauí, Maranhão, Ceará e Bahia. Em Sergipe, a média da incidência anual por 100.000 habitantes foi de 1,96 registros na década de 70, passando para 3,37 na de 80 e atingindo 7,6 nos anos 90 (TAVARES; TAVARES, 1999). Segundo o Ministério da Saúde, em 2009 foram registrados 39 casos de LV com três óbitos em Sergipe.

Outro ponto importante a ser lembrado diz respeito ao registro dos casos. Apesar de ser uma doença de notificação compulsória, a leishmaniose visceral tem seus dados subnotificados, especialmente por ser comum, principalmente em regiões endêmicas, indivíduos assintomáticos ou com formas subclínicas desta infecção e que assim, passam despercebidos na quantificação dos casos. De acordo com Nascimento *et al*, (2008), indivíduos assintomáticos com presença de anticorpos para a leishmaniose visceral chegam a representar 24,6% da população de Natal (Rio Grande do Norte), indicando que os casos sintomáticos dessa infecção são menos frequentes em comparação aos assintomáticos.

2.2 Ciclo Biológico

A *Leishmania* pertence à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, sendo que as espécies são divididas em dois grupos principais: do Velho Mundo: *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. major* e o complexo *donovani* (*L. donovani*, *L. infantum*); e do Novo Mundo: *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. chagasi* e o complexo *Viannia* (como exemplos, *L. brasiliensis* e *L. guyanensis*) (ROBERTS, 2006). A LV no Brasil é causada principalmente pela *L. chagasi* (GOTO; LINDOSO, 2004; SAHA *et al.*, 2006).

Durante seu ciclo de vida, como pode ser observado na figura 1, o parasita alterna a morfologia entre duas variações: a forma promastigota, a qual se dá em seu vetor, o mosquito, e a forma amastigota, que ocorre quando o agente etiológico se encontra parasitando seu hospedeiro mamífero. A promastigota é flagelada, o que lhe confere motilidade, além de ser extracelular e de morfologia alongada, com desenvolvimento e multiplicação dentro do trato alimentar da fêmea do flebotomíneo, ocorrendo a transmissão por inoculação durante o repasto sanguíneo deste vetor nos mamíferos (ROBERTS, 2006; SAHA *et al.*, 2006).

Numa típica inoculação são introduzidas de 100 a 1000 promastigotas. Já dentro do hospedeiro mamífero, o protozoário infecta o tecido retículo-endotelial, sendo englobado por neutrófilos, células dendríticas e principalmente macrófagos, os quais possuem papel primordial de defesa, atuando na ativação e regulação da resposta imune do hospedeiro. Estando então no interior das células do retículo-endotelial, o parasita diferencia-se na forma amastigota, sendo esta intracelular, imóvel, com formato ovóide e cuja multiplicação ocorre dentro dos vacúolos fagossomais. O flebotomo então se contamina com o parasita ao picar esse hospedeiro infectado, aspirando os macrófagos parasitados ou mesmo as formas amastigotas livres no sangue ou em outros tecidos, o que torna esses insetos aptos a transmitirem o parasita ao outro ser humano e a outros mamíferos, reiniciando assim, todo o ciclo biológico da leishmaniose visceral (RATH, *et al.*, 2003; ROBERTS, 2006; SAHA *et al.*, 2006).

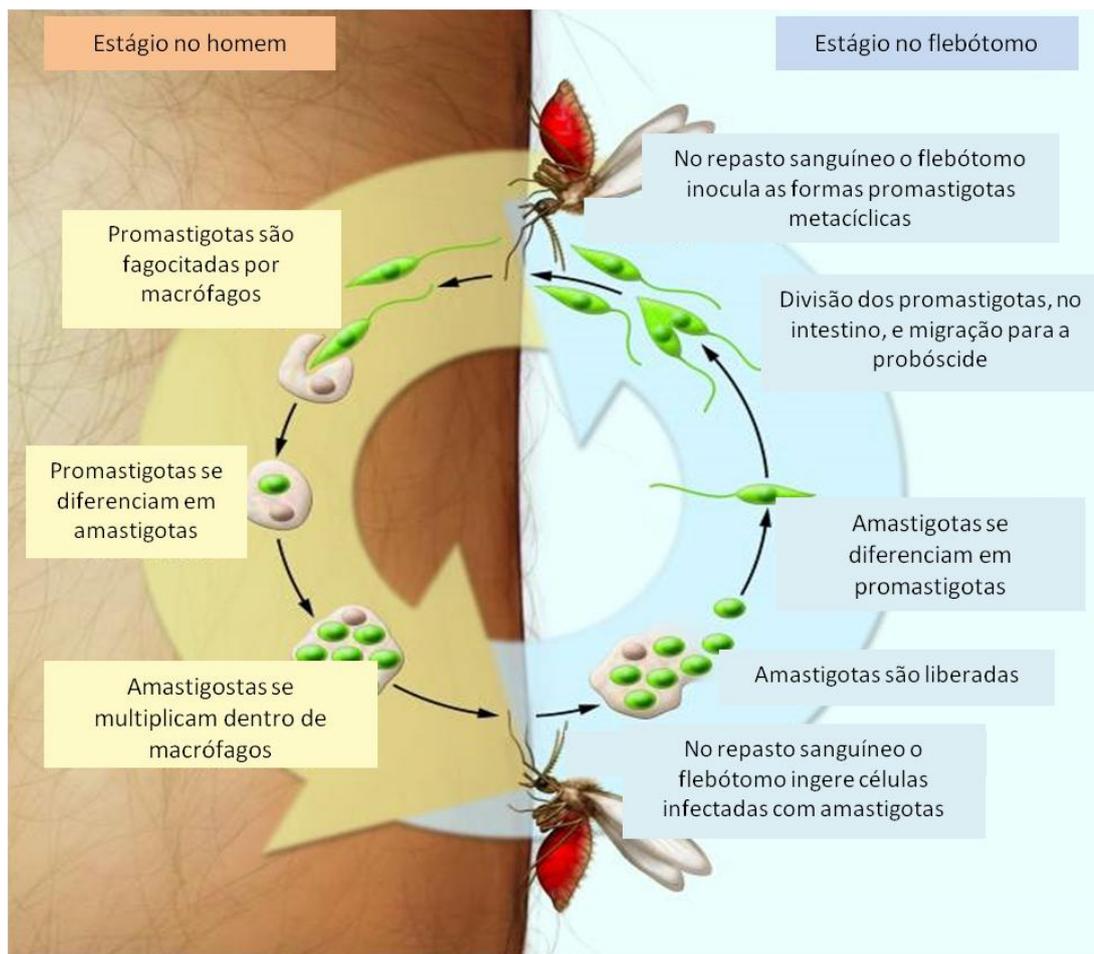


Figura 1: Ciclo biológico da Leishmaniose Visceral. STUART, K. *et al.* Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest.* v.1, p.1301–1310. 2008

Os dípteros pertencentes à família Psychodidae são os vetores da leishmania, amplamente distribuídos nas regiões tanto de clima quente quanto de temperado, sendo que no Velho Mundo estão os do gênero *Phlebotomus* enquanto que no Novo Mundo são encontrados os do gênero *Lutzomyia*. Pelo dia, fazem de refúgio os locais úmidos, sombrios e que sejam bem protegidos dos ventos, tais como ocos de bambu, tocas de animais silvestres e buracos de pau, deixando para desenvolver sua atividade durante o período crepuscular e pós-crepuscular. (RATH, *et al.*, 2003).

A *Leishmania* é uma zoonose com importante reservatório animal, especialmente representado pelo cão doméstico. Outros mamíferos portadores dessa infecção são animais silvestres como a raposa, que também atua como importante

reservatório da infecção para o homem, o tamanduá, a preguiça e roedores. Dantas-Torres e Brandão-Filho (2006) alertam para o fato de algumas evidências mostrarem que o próprio ser humano, quando infectado, atua como reservatório, servindo assim ele mesmo como fonte de infecção para o vetor *L. Longipalpis*, o que se reflete na amplificação do ciclo de transmissão da doença.

Nos cães a leishmaniose visceral também é uma doença crônica e pode ser fatal. Por ser fonte de infecção para os flebotomíneos, devido à sua elevada suscetibilidade e ao elevado parasitismo em sua pele, considera-se que esses animais têm atuação significativa na transmissão, fato que o torna um dos alvos nas estratégias de controle da doença, sendo a eutanásia dos cães infectados uma medida frequente, apesar de controversa (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

Indivíduos que vivem em áreas endêmicas podem desenvolver infecção subclínica ou mesmo assintomática, com produção de anticorpos específicos e/ou resposta celular aos antígenos da *Leishmania*, o que sugere a existência de uma imunidade natural adquirida (SAHA *et al.*, 2006).

Além da forma natural de transmissão da leishmaniose visceral, na qual o vetor é o mosquito no ciclo zoonótico, um ciclo antroponótico artificial de disseminação se instala a partir do compartilhamento de agulhas contaminadas, prática de risco comumente executada por viciados em drogas, sendo então a LV mais uma doença à qual tal grupo se expõe. Os hemoderivados, ou seja, produtos derivados do sangue, quando se encontram contaminados, também podem atuar como fonte de contágio da leishmaniose visceral (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; SAHA *et al.*, 2006). Ainda como via alternativa de disseminação, e levando-se em conta que ao se alimentar do sangue de um cão infectado o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* comumente ingere o parasito da LV, pesquisas têm sido realizadas para avaliar atuação deste artropode como possível vetor dessa infecção entre os cães de forma natural, visto que em ambiente laboratorial, tal fato já foi observado (DANTAS-TORRES, 2011).

2.4 Quadro Clínico

As manifestações clínicas da leishmaniose visceral variam amplamente, desde a forma assintomática, até as formas oligossintomática e progressiva da doença, com severas manifestações como febre, caquexia, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia, pancitopenia (com conseqüente anemia e hemorragias), taquicardia, e ainda, em alguns casos, são encontradas tosse e diarreia. A desnutrição que se desenvolve com o transcorrer da doença, além da perda de peso, leva à formação de edemas periféricos, alterações de pele e unhas, além de queda de cabelos. A leishmaniose visceral pode ser fatal se não tratada (PASTORINO *et al.*, 2002; GOTO; LINDOSO, 2004; PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2005).

Na infecção assintomática, também referida como inaparente, não há manifestação clínica da doença e o diagnóstico é dado usando-se o teste de Montenegro, que nesses casos apresenta intradermorreação reativa, ou por meio de exames sorológicos, com pesquisa de anticorpos, cujos títulos na maioria dos casos encontram-se baixos, e a sua positividade pode ser mantida por um longo tempo. Casos da infecção assintomática são comumente encontrados em moradores de áreas endêmicas, as quais apresentam evidência epidemiológica e imunológica da leishmaniose visceral. Nesse grau de infecção o tratamento não é indicado por ser desnecessário, sendo que tais indivíduos apresentam imunidade protetora, representada pela predominância da resposta imune celular tipo Th1 (PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2005).

A infecção oligossintomática também costuma acometer moradores de áreas endêmicas. Nesses casos o quadro clínico é discreto, durando cerca de 15 dias, sendo caracterizada por pequena hepatoesplenomegalia, febre baixa, hiperglobulinemia e velocidade de hemossedimentação elevada, podendo ainda serem encontrados palidez cutâneo-mucosa leve, diarreia e tosse não produtiva. Em geral a infecção evolui espontaneamente para a cura. Esse quadro clínico facilmente leva à confusão com outras infecções de natureza benigna. O exame parasitológico a partir da punção aspirativa de medula óssea pode ou não ser positivo para o achado da *Leishmania* na amostra, avaliação que a princípio não é recomendada em tais

casos. Já a sorologia apresenta-se reagente, ao passo que a intradermorreação pode estar positiva (Ministério da Saúde, 2006).

Na doença aguda, além da disseminação do parasita pelo organismo do paciente, migrando especialmente para o fígado, baço, linfonodos e medula óssea, ocorre também febre irregular, emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa aumentada, hepatoesplenomegalia, produção elevada de anticorpos e a diminuição da resposta imune tipo 1 mediada pelas células T, com uma baixa nos níveis de IFN- γ e IL-2 em concomitância ao aumento das interleucinas 4 e 10 (PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2005). Esse quadro clínico comumente dura mais que dois meses, estando geralmente associado ao comprometimento do estado geral do paciente. Os exames laboratoriais mostram pancitopenia, inversão da relação albumina/globulina e aumento das taxas das aminotransferases, bilirrubinas e, de forma menos acentuada, de uréia e creatinina. A intradermorreação está negativa ao passo que os títulos de anticorpos específicos estão altos. Já a pesquisa do parasita, seja em aspirado de medula óssea, fígado, linfonodos ou baço, mostra-se positiva para o achado da *Leishmania* (Ministério da Saúde, 2006).

Não sendo tratada, a forma aguda da leishmaniose progride com febre contínua e comprometimento em grau mais elevado do estado geral do paciente, instalando-se a desnutrição, o que conseqüentemente deixa os cabelos quebradiços, a pele seca e os cílios alongados, além de levar à formação de edema nos membros inferiores podendo se estender para o resto do corpo. Também podem se manifestar icterícia, ascite e hemorragias (petéquias, epistaxe e gengivorragia), em geral secundárias à plaquetopenia. O óbito comumente é devido a infecções bacterianas secundárias e/ou sangramentos (Ministério da Saúde, 2006).

No Sudão e na Índia, é comum após a cura os pacientes desenvolverem a chamada leishmaniose dérmica pós-calazar, que é a forma dermatrópica da LV causada pela *L. donovani*, espécie encontrada na região (SAHA *et al.*, 2006).

2.5 Diagnóstico

A presença de sintomas como febre e disfunções hepáticas e esplênicas, comuns a outras infecções, dentre elas malária e tuberculose, possibilita a confusão no diagnóstico dos pacientes sintomáticos da leishmaniose visceral. Dados epidemiológicos em conjunto com achados clínicos e exames laboratoriais devem direcionar para a suspeita de LV. O método padrão de diagnóstico é o exame parasitológico a partir de aspirado do tecido afetado, o que é feito pela punção de linfonodos, baço, fígado ou, principalmente, medula óssea, sendo o material examinado em lâminas coradas, obtendo-se uma taxa de positividade por volta de 80%. Ainda para o diagnóstico parasitológico esse material colhido por punção pode ser cultivado em meios apropriados ou inoculado em hamster (PASTORINO *et al.*, 2002; RATH, *et al.*, 2003; SAHA *et al.*, 2006).

Pesquisas constataam que o diagnóstico precoce como medida de controle da LV ainda não tem sido alcançado. A elevada taxa de indivíduos já apresentando emagrecimento, queda de cabelo, palidez e protrusão abdominal devida à hipertrofia do baço e do fígado, denota o significativo período decorrido entre a manifestação dos primeiros sinais e sintomas e o diagnóstico da infecção, sendo que em alguns locais tem sido observado que essa demora chega a uma média de 60 dias (SILVA, 2008).

A inerente resposta humoral da leishmaniose visceral vem sendo aproveitada no desenvolvimento de exames diagnósticos mais específicos para esta infecção. Para tanto, anticorpos contra os antígenos das formas promastigota e amastigota, assim como suas frações e mesmo antígenos recombinantes são utilizados em testes imunológicos a exemplo do ELISA (ensaio imunoabsorvente ligado à enzima), hemoaglutinação, imunofluorescência indireta (IFI) e, destacando-se, o teste de aglutinação direta, que usa diferentes antígenos, e o strip test, que detecta a presença de IgG contra o antígeno recombinante K39 (rK39) e que pode ser utilizado no diagnóstico de leishmaniose visceral causada por *L. donovani*, *L. chagasi* ou *L. infantum* (SAHA *et al.*, 2006). Ainda assim, os testes sorológicos apresentam limitações como sensibilidade inadequada, alto custo, resultado falso

negativo em presença de imunodeficiência, e reações cruzadas com outros parasitos, a exemplo de *Plasmodium*, *Mycobacterium*, *Trypanosoma* e *Schistosoma*. Ainda quanto ao rK39, outro fator limitante ao seu uso é a produção de IgG anti-K39 em indivíduos saudáveis habitantes de áreas endêmicas e também, por um longo período (em alguns casos até dois anos), nos pacientes que se curaram após tratamento (PASTORINO *et al.*, 2002; ROBERTS, 2006; SAHA *et al.*, 2006).

Mesmo a pesquisa de antígenos da leishmania usando-se a técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a qual apresenta alta sensibilidade e alta especificidade, tem sua limitação quanto ao uso em pacientes de áreas endêmicas, devido à elevada exposição antigênica a que essas pessoas estão submetidas em tais regiões (PASTORINO *et al.*, 2002).

2.6 Tratamento

Quanto ao tratamento da leishmaniose visceral têm sido usados compostos à base de antimônio pentavalente, sendo que no Brasil a primeira escolha é o antimoniato de metilglucamina, comercializado como antimoniato de meglumina ou Glucantime[®], que age eficientemente sobre a leishmaniose, fazendo cessar as manifestações clínicas e hematológicas desta infecção, levando também à esterilização do parasita. Os antimoniais são administrados via intramuscular ou intravenosa, diariamente, durante 28 dias. A Organização Mundial de Saúde (OMS) determina que a dose máxima não deve exceder o limite de 20 mg/kg/dia, não indo além de 850 mg de antimônio, por causa da alta toxicidade deste medicamento. Dentre os efeitos colaterais de tais drogas estão dores abdominais, arritmias, mialgias, pancreatites e disfunção hepática. Na Índia, devido à crescente resistência que o parasita vem apresentando, a taxa de cura pelo uso dos antimoniais tem declinado ao baixo índice de 35% (RATH *et al.*, 2003; ROBERTS, 2006).

Como alternativas de quimioterapia, podem ser utilizados outros fármacos, a exemplo do desoxicolato de anfotericina B, pentamidina, miltefosine e paromomicina (RATH *et al.*, 2003). Na Europa e em países desenvolvidos,

anfotericina lipossomal tem sido o tratamento de escolha, com alta taxa de cura variando de 90 a 100%, além dos reduzidos efeitos colaterais e da abreviação no tempo de internamento dos pacientes. Entretanto, o custo deste agente restringe seu uso de forma abrangente. Por outro lado, alternativas como anfotericina convencional (desoxicolato de anfotericina B), pentamidina e paromomicina, apesar de serem eficazes, requerem administração parenteral e possuem significativos efeitos colaterais. Atentando-se para o desenvolvimento de resistência, têm sido propostas combinações de drogas para a terapia (ROBERTS, 2006). Não obstante aos grandes avanços obtidos nos campos da biologia celular e da imunologia sobre a leishmaniose, a quimioterapia para essa infecção ainda não atingiu evolução equivalente, tendo sido bem discreta a contribuição da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos medicamentos (RATH *et al.*, 2003).

2.7 Profilaxia

A prevenção da leishmaniose visceral envolve o controle do vetor e dos animais que atuam como reservatório do protozoário, além da elaboração de uma vacina efetiva, visto que, com a cura dessa doença, é normalmente observado o desenvolvimento de uma imunidade consistente, a qual previne re-infecções. (ROBERTS, 2006; SAHA *et al.*, 2006).

Para o controle do vetor, têm sido utilizadas medidas como uso de repelentes, telagem de portas, janelas e canis, inseticidas, como DDT (Dicloro-difenil-tricloroetano), e mosquiteiros impregnados com o composto químico piretroide, proteção essa que por si só tem reduzido o número de picadas de 64 a 100%. Por se tratar de uma doença zoonótica, cujo principal reservatório é o cão doméstico, o uso de coleiras impregnadas com deltametrina tem promovido uma proteção de até 80% nestes animais nas épocas de maior transmissão (ELKHOURY, 2005; ROBERTS, 2006).

Esforços para o desenvolvimento de uma vacina incluem pesquisas com diferentes antígenos, estudo dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro e

ainda, a análise dos antígenos candidatos à vacina, sendo eles avaliados tanto sob sua forma bruta quanto sob a recombinante (ROBERTS, 2006).

Além da redução da população de flebotomíneos, as medidas a serem tomadas para o controle da doença envolvem o monitoramento e eutanásia dos cães sororreagentes, o diagnóstico precoce e o respectivo tratamento dos pacientes, e ainda, atividades educativas em saúde (ELKHOURI, 2006).

Apesar de todos esses esforços, as variedades das situações epidemiológicas, os diversos fatores que influenciam a transmissão dessa doença e, além disso, a existência de várias questões ainda a serem esclarecidas sobre a biologia do parasita, do seu vetor e dos seus reservatórios, dificultam o controle da leishmaniose visceral (ROBERTS, 2006). Ainda somando-se a tais fatos estão as dificuldades técnico-operacionais existentes, especialmente nas áreas urbanas, que denotam a carência de maiores investimentos técnico-científicos que se reflitam na efetividade da vigilância epidemiológica da leishmaniose visceral e do seu controle.

2.8 Imunopatogenia

Dentro do fagossomos, a *Leishmania* é submetida a um ambiente que lhe é hostil, desenvolvendo aí uma complexa interação com a célula hospedeira, eventualmente conseguindo escapar, fato resultante de um mecanismo microbicida debilitado (SAHA *et al.*, 2006). Além da importante atuação da resposta imune celular na leishmaniose visceral, também mostra-se presente de forma marcante a resposta humoral, evidenciada pela elevada produção de anticorpos específicos já no início da infecção, antes mesmo do desenvolvimento da resposta imune celular. Entretanto, a atuação desses anticorpos na cura e na proteção contra a leishmaniose ainda é pouco conhecida (SAHA *et al.*, 2006).

O desenvolvimento da LV e sua apresentação clínica são decisivamente influenciados pela atuação da resposta imunológica do hospedeiro. Pacientes com

predomínio da resposta imune tipo Th1, representada especialmente pela maior indução de interferon-gama (IFN- γ), interleucinas 2 (IL-2) e 12 (IL-12) e de resposta imune celular adaptativa, mostram-se resistentes ao desenvolvimento da doença. Do contrário, após um período de incubação que pode variar de 1 um mês a 2 anos, havendo a sobreposição da resposta Th2, principalmente pela elevação das interleucinas 4 (IL-4) e 10 (IL-10), o resultado será a disseminação sistêmica do parasita e a elevação dos anticorpos circulantes, estabelecendo-se assim a doença (PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2005; ROBERTS, 2006; SAHA *et al.*, 2006).

Por ser susceptível à infecção por *L. donovani* e por *L. chagasi*, e assim desenvolver a doença progressiva ao longo de duas semanas, o camundongo da linhagem BALB/c tem sido amplamente utilizado como modelo para o estudo da leishmaniose visceral, sendo que após a doença se instalar, a resposta imune desse hospedeiro acaba controlando a infecção. Foi observado que camundongos BAL/c nude, os quais não produzem IFN- γ , ao receberem a forma humana recombinante dessa citocina restabelecem a capacidade de controlar a infecção causada por *L. donovani*, o que comprova a importante atuação do IFN- γ na proteção contra a leishmaniose visceral (GOTO; LINDOSO, 2004).

De acordo com Saha *et al.* (2006), as células Natural Killer além de produzirem IFN- γ são estimuladas por esta citocina, especialmente no início da infecção, fato que tem importância na ação da resposta imune inata para a ativação dos macrófagos, restando ainda ser compreendido o que leva à diminuição dessa secreção resultando na fase aguda da doença. Experimentos mostram que Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) de pacientes com leishmaniose visceral são incapazes de produzir IFN- γ e IL-2 em resposta ao antígeno solúvel da *Leishmania* (SLA) obtido de *L. chagasi*, mas após o tratamento essa função é restabelecida. Evidências apontam para a fundamental atuação da resposta imune inata na resistência do hospedeiro às infecções por parasitas intracelulares tais como a *Leishmania*, controlando tanto o crescimento do microrganismo na fase inicial da infecção, como também direcionando a produção das citocinas por células T parasito-específicas no microambiente celular (PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2005).

Esses mesmos experimentos aos serem feitos com CMSP de indivíduos residentes em áreas endêmicas e que apresentam infecção subclínica ou assintomática, mostram produção de níveis significativos de IFN- γ , sendo esse produzido desde os momentos iniciais da exposição ao parasito, o mesmo sendo percebido em pacientes soroconvertidos. Em regiões endêmicas, infecções assintomáticas são comuns, sendo observada nesses indivíduos uma proteção imunológica com predominância da resposta Th1 (BACELLAR *et al.*, 1991).

Análises feitas com CMSP de pessoas saudáveis e que nunca foram expostas à *Leishmania* demonstram que tais indivíduos possuem uma reatividade natural aos antígenos deste parasita, a qual se dá pela produção de IFN- γ e de IL-4, e também pela multiplicação das células mononucleares periféricas. É possível que essa característica seja devida a uma ativação cruzada por outros microrganismos ou mesmo por ativação cruzada de antígenos (MAASHO; AKUFFO, 1992).

A IL-10 é uma citocina que, em geral, age protegendo os tecidos de danos que podem ser causados por uma resposta inflamatória excessiva, contribuindo assim para o equilíbrio imunológico. É secretada por diversos tipos de células, como macrófagos e as células dendríticas, as epiteliais, as B e as T. Na LV tem efeito regulatório quanto ao desenvolvimento dessa patologia, atuando de forma antagônica ao IFN- γ por suprimir a atividade microbicida dos macrófagos, tanto por torná-los insensíveis aos sinais de ativação quanto pela baixa que causa na produção de TNF- α e de óxido nítrico. Sendo assim, a persistência de altos níveis da IL-10 nas células do hospedeiro torna-se benéfica para a sobrevivência do parasita e para o desenvolvimento da patologia. Pesquisas a partir de culturas de CMSP sob estímulo de antígeno da *L. chagasi*, colhidas de pacientes com infecção aguda da leishmaniose visceral mostraram elevada produção de IL-10 em comparação ao mesmo experimento realizado a partir de pacientes curados, ao passo que em indivíduos assintomáticos e com teste intradérmico positivo não foi detectada produção dessa citocina. A IL-10 atua de forma determinante à suscetibilidade à leishmaniose visceral por proporcionar a supressão da resposta Th1, principal causa do desenvolvimento da forma aguda desta infecção (SAHA *et al.*, 2006). Em pacientes com leishmaniose visceral aguda, a ação dessa citocina reduz a proliferação dos

linfócitos, a produção de IFN- γ e a atividade citotóxica da resposta imune das CMSP humanas. Por outro lado, a neutralização da IL-10 contribui para o restabelecimento destas funções celulares nos mesmos pacientes (BARRAL-NETTO *et al.*, 1998; NYLÉN; SACKS, 2007).

Células Mononucleares do Sangue Periférico obtidas de pacientes com a leishmaniose visceral aguda apresentaram proliferação e produção de INF- γ prejudicadas quando colocadas sob o estímulo do antígeno específico da *L. donovani in vitro*, sendo que ao serem expostas a anticorpos anti-IL-10R, a resposta das citocinas foi reestabelecida, comprovando assim a ação supressora da IL-10. Essa citocina tem como possíveis fontes as células Th2 da mesma linhagem produtora da IL-4, células CD4⁺ T regulatórias, macrófagos e células dendríticas (GHALIB *et al.*, 1993; ROBERTS, 2006).

Outra citocina, envolvida por sua vez na resposta Th1, é a IL-12p70, também conhecida como IL-12p75 e comumente referida apenas como IL-12. Esta interleucina atua na indução e manutenção da imunidade celular, além de atuar na maturação dos linfócitos citotóxicos (BROMBACHER, F.; KASTELEIN, R. A.; ALBER, G., 2003; SAHA *et al.*, 2006). A influência da IL-12 para esse tipo de resposta Th foi comprovada a partir de experimentos nos quais camundongos naturalmente resistentes, ao sofrerem depleção na produção dessa citocina tornaram-se conseqüentemente susceptíveis, ao passo que, camundongos BALB/c, naturalmente susceptíveis, ao serem tratados com essa mesma interleucina, tornaram-se resistentes à infecção pela *L. donovani*, cuja carga parasitária foi significativamente reduzida, fato no qual também tiveram atuação as células T e NK, além das citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Por outro lado, camundongos IL-12^{-/-} demonstraram aumento na produção de TGF- β , sendo essa elevação ainda maior naqueles com knock-out para IL-2 e IFN- γ , prejudicando assim a resposta Th1 (GOTO; LINDOSO, 2004; PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2005; ROBERTS, 2006). A IL-12p70 tem como antagonista a IL-12p40, uma citocina solúvel pertencente à mesma família e que atua inibindo a resposta tipo Th1 ao competir pelo seu receptor (BROMBACHER.; KASTELEIN; ALBER, 2003).

Ao analisar *in vitro* a produção de citocinas por CMSP expostas a *Staphylococcus aureus*, D'ANDREA *et al.* (1993) observaram que a IL-12p70 ao ser produzida por monócitos/macrófagos e células B, age sobre as células T e NK, estimulando-as à proliferação e à produção de citocinas, principalmente do IFN- γ , além do aumento da citotoxicidade de tais células. Ainda na mesma pesquisa, ao serem colocadas sob a ação de anticorpos neutralizantes de IL-12, as CMSP apresentaram significativa inibição da produção de IFN- γ , fato que sugere que a primeira citocina é requerida para a produção desta última.

Pelo que se tem observado, a ação inibitória da IL-10 sobre a produção do IFN- γ pelas CMSP resulta da supressão que aquela citocina exerce sobre a síntese da IL-12 realizada por células acessórias tais como as células B e detriticas e os macrófagos, daí o fato de que a elevação dos níveis de IL-10 leva à repressão da resposta Th1 e ao estabelecimento da Th2, efetivando-se assim a leishmaniose visceral aguda (SAHA *et al.*, 2006). Ao agir sobre a função dos monócitos/macrófagos, a IL-10 inibe nessas células a produção do óxido nítrico, a toxicidade, a capacidade de apresentação de antígeno e a produção de citocinas inflamatórias, entre elas o TNF- α , importante cofator de indução para a produção de IFN- γ (D'ANDREA *et al.*, 1993; KARP *et al.*, 1993).

Além do IFN- γ , o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), este último produzido também pelas células NK, também norteia as funções dos macrófagos e a resposta imune celular adaptativa. Foi observado que células sanguíneas mononucleares de pacientes curados da leishmaniose visceral produzem ambas citocinas, IL-12 e IFN- γ , o que não ocorre nos indivíduos com a doença ativa (PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2005).

A partir de experimentos em camundongos com leishmaniose cutânea, Liew *et al.* (1990) comprovaram que TNF- α ativa a ação leishmanicida dos macrófagos, induzindo-os assim a eliminação dos parasitos. As células NK atuam de forma marcante ao longo da infecção, vinculando a resposta imune inata ao desenvolvimento de uma resposta imune celular adaptativa, o que conseguem principalmente através da produção das citocinas TNF- α e IFN- γ , as quais exercem

sua ação sobre as funções dos macrófagos e orientando o desenvolvimento da resposta Th1 (PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2005).

A leishmaniose visceral resulta da supressão da resposta imune celular, o que é comprovado pelo resultado negativo do teste de Montenegro, o qual avalia a reação de hipersensibilidade do tipo tardia (delayed type hypersensitivity response, DTH) a antígenos da *Leishmania* injetados de forma intradérmica. (SAHA *et al.*, 2006).

A proteção e o controle da LV são dependes do IFN- γ produzido tanto pela resposta imune inata quanto pela resposta imune celular, o qual induz a morte intracelular do parasito nos macrófagos ativos (SAHA *et al.*, 2006). Portanto, a importância dessa citocina é verificada no mecanismo de resistência à infecção, pelo fato dela ser uma eficiente ativadora da ação microbicida dos macrófagos, induzindo-os à síntese de óxido nítrico, um mediador da morte intracelular do parasita, além de direcionar a diferenciação das células T helper indiferenciadas para T helper 1, com a participação da IL-2 e das células natural killer (NK) (GOTO; LINDOSO, 2004; ROCHA-VIEIRA *et al.*, 2003).

Tal importância crítica do IFN- γ no controle da leishmaniose foi comprovada a partir de experimentos realizados com camundongos nocauteados para essa citocina, os quais não obtiveram cura. Por outro lado, camundongos geneticamente resistentes à *L. major* desenvolveram resposta Th1 caracterizada pela produção do IFN- γ , enquanto que murinos susceptíveis à infecção desenvolveram resposta Th2 distinguida pela secreção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (ROBERTS, 2006).

Outro experimento que também comprovou o papel do INF- γ na ativação dos macrófagos foi realizado expondo linfocinas pré-tratadas com anticorpo neutralizante de IFN- γ humano, o que resultou na completa supressão da capacidade dessas linfocinas em aumentar nos macrófagos a liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e induzi-los à atividade leishmanicida. Tais resultados sugerem que o IFN- γ tem papel-chave na ativação dos macrófagos, indicando também que essa linfocina

pode aumenar os mecanismos anti-prozoários oxigênio-dependente e oxigênio-independente nas células mononucleares fagocíticas humanas. Essas constatações reforçam observações de estudos anteriores que também avaliaram preparações com IFN- γ , nos quais pode-se demonstrar que essa linfocina aumenta a atividade microbicida de diversas populações celulares contra patógenos intracelulares (MURRAY; RUBIN; ROTHERMEL, 1983).

A resposta imune também é regulada pelo receptor CD40, uma proteína de superfície expressa pelas células B e pelas células apresentadoras de antígenos, e seu ligante CD40L (gp39). Tal receptor e sua porção solúvel (sCD40L) atuam na modulação dessas células, induzindo-as à proliferação e diferenciação, além de participar da produção da resposta humoral e da geração de células B de memória. O sCD40L ainda tem atividade sobre a indução de citocinas, seja levando as próprias células B à expressão de IL-6 e IL-8, ou mesmo sinalizando, junto às citocinas GM-CSF, IL-3 ou IFN- γ , para que os monócitos produzam TNF- α e IL-6. Tais fatos demonstram a importante atuação do CD40 como sinalizador molecular (OCHS; HOLLENBAUGH; ARUFFO, 1994; NOELLE, 1995). Tem sido demonstrado seu importante papel no controle da infecção parasita intracelular. Experimentos com camundongos knockout (CD40^{-/-} e CD40L^{-/-}) mostram por parte deles maior suscetibilidade à infecção por *Leishmania*. Por outro lado, existem evidências de que CD40 também exerce imunidade protetiva contra parasitos extracelulares, o que está associado à resposta Th2. Sendo assim, a interação CD40 e CD40L pode induzir tanto à resposta imune Th1 quanto à Th2 (MATHUR.; AWASTHI; SAHA, 2006).

A interação do CD40, nas células B ativadas, com seu ligante sCD40L ajuda a ativação da resposta imune nas infecções por fungos, bactérias, parasitos e vírus. Ao mesmo tempo que o CD40 induz à produção de citocinas inflamatórias, as quais protegem contra infecções intracelulares, a exemplo da leishmaniose, esse receptor também ativa a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, IL-4, IL-3 e TGF- β , as quais são requeridas para evitar que a atuação do IFN- γ cause danos aos tecidos, sendo que essas mesmas citocinas anti-inflamatórias atuam na resposta Th2, protetora contra parasitos extracelulares. (MATHUR.; AWASTHI; SAHA, 2006)..

A maior parte dos moradores de áreas endêmicas para a leishmaniose visceral não desenvolve a infecção nem manifesta nenhum sintoma ou sinal da doença, apesar de apresentarem altos níveis de anticorpos e mesmo, em muitos casos, resposta celular aos antígenos da *Leishmania*. Além disso, os pacientes curados da leishmaniose visceral comumente mostram-se imunes a re-infecção. Tais fatos apontam para a possibilidade de que os antígenos deste parasita estimulem alguma resposta imune permanente (SAHA *et al.*, 2006).

A resposta Th1 possui dois indicadores da sua ação protetora, os quais representam diferentes aspectos da imunidade celular: a produção inicial de IFN- γ pelas células menos diferenciadas ou pelas NK, que decresce com o passar do tempo, e a positividade do teste intradérmico para leishmaniose, resultado da ação de células T diferenciadas e mais especializadas que promovem a resposta inflamatória através de mediadores quimiotáticos (SAHA *et al.*, 2006).

Embora seja evidente o papel crucial da resposta imune celular na suscetibilidade e resistência, e também na profilaxia e resposta à quimioterapia, a atuação da resposta imune humoral não pode ser ignorada, haja vista os altos níveis de anticorpos específicos para *Leishmania* que são evidenciados já no início da infecção, antes mesmo das alterações da resposta celular. Porém, a função de tal resposta humoral ainda não está bem esclarecida (SAHA *et al.*, 2006).

2.9 Glutathiona e NAC

A glutathiona, (γ -glutamil-cisteinil-glicina; GSH), tripeptídeo formado pelos aminoácidos glutamina, cisteína e glicina, é reconhecido como um tiol (potente agente redutor) antioxidante hidrossolúvel e de baixo peso molecular (0,5 a 1,0 mmol/L) predominando nas células animais. Estudos em humanos e animais indicam que, entre outras funções, a glutathiona atua na regulação de diversos eventos celulares, dentre os quais a resposta imune e a produção de citocinas, também sendo observado que tal substância desempenha papel essencial para a ativação dos linfócitos T, assim como para a proliferação dos leucócitos polimorfonucleares, fatos

esses que contribuem para o desenvolvimento de uma resposta imunológica mais eficiente, estando na adequada nutrição protéica a fonte para a manutenção da homeostase da GSH. Em estados como estresse oxidativo, má nutrição protéica e várias condições patológicas a concentração celular de GSH mostra-se marcadamente diminuída (WU *et al.*, 2004). Por outro lado, aumentando-se o fornecimento dos precursores do GSH, seja por via oral ou por via intravenosa, aumenta a sua síntese, além de prevenir a carência da sua formação sob diversos estados nutricionais e patológicos, tanto no organismo animal quanto no humano (TOWNSEND; TEW; TAPIERO, 2003).

Em consequência de tais resultados, o N-acetil-L-cisteína (NAC), uma substância antioxidante que é convertida pelo corpo em metabólitos capazes de estimular a síntese da glutathiona agindo, portanto, como precursor desta, por muitos anos tem sido usado no tratamento de diversas doenças, inclusive nas respiratórias, nas quais age como mucolítico. Em experimento realizado por Rocha-Vieira *et al.* (2003), os resultados obtidos com a administração via oral do NAC aos camundongos da linhagem BALB/c, infectados com a *Leishmania major*, causadora de severas lesões cutâneas nesses animais, mostraram o efeito modulador imunológico da glutathiona sobre essa infecção nos murinos, atuando na melhoria da histopatologia das lesões, caracterizada por um infiltrado inflamatório organizado e delimitado com menor destruição tecidual e reduzida carga parasitária, e também na melhoria da resposta celular, aumentando a produção da IL-4, do IFN- γ e do TNF- α , tendo assim o NAC se mostrado como um imunomodulador, provocando alterações na produção das citocinas do microambiente de forma a possibilitar maior controle da proliferação parasitária e ainda reprimindo o avanço da doença. Diante dessas observações, faz-se notar o potencial papel de coadjuvante que o NAC pode desempenhar no tratamento da leishmaniose em seres humanos (ROCHA-VIEIRA *et al.*, 2003). Leva-se em consideração ainda que o N-acetil-L-cisteína tem se mostrado seguro quando administrado em seres humanos durante o tratamento de doenças crônicas inflamatórias, bem como tem sido mínima sua interação com outras drogas. Em estudo realizado em pacientes com fibrose cística, a administração oral do NAC contribuiu para a diminuição do desequilíbrio inflamatório nas vias aéreas, característico desta patologia (TIROUVANZAM *et al.*, 2006).

Infecções experimentais com *Leishmania major* realizadas em camundongos previamente tratados com NAC, demonstraram que os níveis intracelulares da glutatona nas células apresentadoras de antígeno interferem na diferenciação do perfil de citocinas da imunidade celular, direcionando a resposta imune para o tipo Th1. Em contrapartida, a redução da glutatona causa a inibição da produção das citocinas relacionadas com essa mesma resposta Th1, o que leva ao favorecimento da resposta Th2. A reposição da glutatona pelo uso do NAC, por sua vez, levou ao restabelecimento da resposta Th1 nesses mesmos camundongos (ROCHA-VIEIRA *et al.*, 2003).

A utilização do NAC no tratamento de leishmaniose visceral em humanos ainda não tem sido abordada por estudos. Diante das constatações já obtidas com o uso do N-acetil-L-cisteína em pesquisas experimentais e em humanos com patologias a exemplo da fibrose cística, a possibilidade de resultados que contribuam de forma positiva no tratamento da LV a partir do uso desse composto de forma complementar ao tratamento dessa infecção compele ao desenvolvimento de pesquisas neste sentido.

Com base nesses fatos e ainda considerando a ausência de relatos na literatura científica quanto ao uso do NAC no tratamento da LV em humanos, a presente pesquisa, a partir dos seus resultados, aborda conhecimentos iniciais a esse respeito.

3. JUSTIFICATIVA

A resposta imunológica do paciente na leishmaniose visceral tem papel fundamental no prognóstico desta infecção crônica inflamatória, a qual pode ser fatal se não tratada. Para que a quimioterapia possa resultar na cura, é importante que o sistema imune tenha condições e estímulos necessários ao desenvolvimento do perfil de citocinas adequado à resistência a doença e ao combate do agente etiológico. Assim, o incremento do tratamento convencional com substâncias que possam interagir de forma positiva e direta na resposta imune, possibilitará resultados mais eficientes e significativos no processo de cura.

Lembrando ainda que a leishmaniose visceral é uma doença endêmica em diversas partes do mundo incluindo o Brasil, estando na região Nordeste deste país as maiores incidências, inovações no tratamento dessa infecção mostram-se relevantes para a Saúde Pública.

Por proporcionar atendimento a pacientes com leishmaniose visceral, o Hospital Universitário, da Universidade Federal de Sergipe, mostrou-se apropriado para a realização da avaliação do desempenho do N-acetil-L-cisteína (NAC), junto ao tratamento da leishmaniose visceral.

Portanto, a presente pesquisa teve como hipótese o fato de que o uso do NAC associado ao antimônio pentavalente pode ser benéfico para o tratamento da leishmaniose visceral, melhorando o nível sérico das citocinas e diminuindo o tempo de cura dos pacientes.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar pelos níveis séricos das citocinas e da molécula sCD40L dos pacientes, a ação adjuvante do N-acetil-L-cisteína (NAC) na quimioterapia da leishmaniose visceral humana feita com antimônio pentavalente.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Caracterizar o nível sérico das citocinas IFN- γ , IL-12p70 e TNF- α , representantes da resposta imune celular (resposta Th1), apresentado por pacientes com leishmaniose visceral, antes, durante e depois do tratamento feito com antimônio pentavalente com a adição do NAC, em comparação com o nível sérico destas mesmas citocinas apresentado pelos pacientes submetidos apenas ao tratamento padrão.

4.2.2 Caracterizar o nível sérico das citocinas IL-10 e IL-12p40, representantes da resposta imune humoral (resposta Th2), apresentado por pacientes com leishmaniose visceral, antes, durante e depois do tratamento feito com antimônio pentavalente com a adição do NAC, em comparação com o nível sérico destas mesmas citocinas apresentado pelos pacientes submetidos apenas ao tratamento padrão.

3.2.3 Caracaterizar o nível sérico da molécula ligante sCD40L apresentado por pacientes com leishmaniose visceral, antes, durante e depois do tratamento feito com antimônio pentavalente com a adição do NAC, em comparação com o nível sérico desta mesma molécula apresentado pelos pacientes submetidos apenas ao tratamento padrão.

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1 Seleção de Pacientes

A partir de um estudo de intervenção, tipo ensaio clínico, cego, randomizado, foram investigados 60 pacientes do Hospital Universitário com diagnóstico positivo para leishmaniose visceral. Esses pacientes foram distribuídos em dois grupos de 30: Grupo Estudo – que fez uso do antimônio pentavalente dose padrão (20mg/kg/dia durante 28 dias) complementado com o N-acetil-L-cisteína (NAC) 600mg, na forma de comprimidos efervescentes, administrados via oral, três vezes ao dia; e o Grupo Controle - que fez uso apenas do antimônio dose padrão.

Como critérios de seleção para a realização desse estudo, além de serem pacientes com a leishmaniose já comprovada, foram incluídos apenas indivíduos com idade de 2 a 50 anos, que não sofriam de outras patologias associadas (independente destas serem agudas ou crônicas, a exemplo da AIDS), que não estavam em uso de imunossuppressores e que também não apresentavam história de alergia nem ao antimônio pentavalente nem ao NAC. Para a realização desta pesquisa foi obtido o prévio consentimento por escrito de todos os pacientes com idade a partir de 18 anos e dos responsáveis por aqueles que eram menores que essa idade.

A presente pesquisa faz parte do Estudo Clínico, Cego, Randomizado, para Tratamento de Pacientes com Leishmaniose Visceral com N-acetil-L-cisteína Associado ao Antimonial Pentavalente, coordenado pelo Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida, cujo projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFS, e obteve sua aprovação (CAAE 0151.0.107.000-07).

A randomização dos pacientes entre os grupos controle (uso apenas do tratamento padrão) e teste (uso do tratamento padrão complementado pelo NAC) foi realizada em computador, a partir do programa Random Allocation Software.

5.2 Coleta de Soro

Para obtenção do soro, sangue periférico dos pacientes tratados e não tratados com NAC foi coletado em tubo sem anticoagulante e com gel separador. Após coagulação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13000 rpm em temperatura ambiente. O soro obtido foi armazenado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para dosagem das citocinas. As coletas foram realizadas antes do tratamento (D0), para avaliar o estado prévio do paciente, e com 15 (D15, no qual o paciente se encontra no meio do tratamento), e 28 (D28) dias após seu início (último dia do tratamento) e ainda entre o 45° e o 65° dias, para acompanhar o restabelecimento.

5.3 Dosagem de Citocinas

A quantificação dos níveis séricos das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-12p40 e IL-12p70 e da molécula sCD40L foi realizada no Instituto de Pesquisa em Doenças Infecciosas (IDRI-USA), nos Estados Unidos, usando-se o analisador LUMINEX, cujo sistema baseia-se na dosagem simultânea de diversos analitos num único poço de reação em microplaca. Anticorpos de captura específicos para cada molécula pesquisada estão imobilizados em microesferas de poliestireno através de ligações covalentes não reversíveis, e se ligam ao respectivo analito, dando-se então a detecção por um marcador fluorescente, a Estreptavidina-Ficoeritrina (PE) ligada ao anticorpo de detecção. No aparelho Luminex então, tais esferas são movimentadas em uma única fila passando por feixes de dois lasers diferentes num citômetro de fluxo, para que um faça a classificação da microesfera de acordo com a sua cor, enquanto o outro quantifica o sinal gerado por cada uma delas.

5.4 Análise Estatística

Para comparação de diferenças e distribuição entre médias ou medianas entre grupos, foram empregados os testes t de Student e Mann-Whitney,

respectivamente, além do Quiquadrado. Os dados foram gerenciados no *software* EXCEL e analisados no GRAPHPAD PRISMA e versão Trial do SPSS v. 17.0.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterização dos Pacientes com Leishmaniose Visceral Aguda

Na presente pesquisa foi avaliada a resposta imune de 60 pacientes com leishmaniose visceral aguda antes, durante e depois do tratamento padrão com antimonial pentavalente e com o N-acetil cisteína (NAC) como complemento. Foram dosadas as citocinas IL-10, IL-12p40, sCD40L e TNF- α , em amostras de soro adquiridas a partir do sangue periférico desses pacientes colhido antes da intervenção terapêutica e com 15 e 28 dias do tratamento. Também foram dosadas as citocinas INF- γ e IL-p70 do soro obtido da mesma forma antes do tratamento e entre o 45° e o 65° dias deste nos mesmos pacientes. A partir dessas dosagens foi possível caracterizar a produção de citocinas da leishmaniose visceral na doença aguda e ao longo da sua evolução para a cura, evidenciando-se assim a interação entre a resposta imune tipo Th1 e Th2 nessa infecção, cujo resultado se manifesta nos aspectos clínicos e laboratoriais dos pacientes. Essas informações poderão ajudar no entendimento da modulação da resposta imune e do papel de cada interleucina durante a evolução para a cura da leishmaniose visceral aguda.

Os pacientes com diagnóstico de leishmaniose visceral aguda, apresentando além da sorologia positiva para rK-39, cultura e/ou mielograma com positividade na pesquisa do parasito, foram alocados randomicamente nos grupos controle (Grupo Sb^V) e NAC (NAC+ Sb^V). Cada grupo foi composto por 30 pacientes, com distribuição de idade e gênero conforme exposta na Tabela 1.

De acordo com os dados clínicos e laboratoriais apresentados na Tabela 1, os grupos não diferiam significativamente quanto à manifestação da leishmaniose visceral aguda antes de ser iniciado o tratamento. Não houve interferência das variáveis idade e gênero sobre os principais parâmetros clínicos e laboratoriais da infecção ao longo do tempo. O grupo controle foi formado por 16 homens e 14 mulheres, enquanto que o grupo NAC possuía 19 homens e 11 mulheres, sendo o $P = 0,43$. Observando-se as diversas medianas, percebe-se que o tamanho do fígado e do baço foram semelhantes em ambos os grupos. A mesma homogeneidade pôde ser verificada no hemograma de todos os pacientes inseridos na pesquisa, estando a

dosagem de hemoglobina e a contagem de plaquetas e células sanguíneas equivalentes. Albumina e globulina também apresentaram-se de forma similar.

Tabela 1: Caracterização dos pacientes com diagnóstico de Leishmaniose Visceral segundo dados clínicos e laboratoriais antes do tratamento.

Variável	Grupo Sb ^V (n=30)	Grupo NAC+Sb ^V (n=30)	P
	n1(%)	n2(%)	
Mediana de Idade(P25;P75)	9,5 (3,8;18,5)	7,5 (3,0;22,3)	0,27
Gênero			
M (%)	16 (53,3)	19 (63,3)	0,43
F (%)	14 (46,7)	11 (36,7)	
Tamanho fígado (cm)	5,45 ± 3,16	5,63 ± 3,59	0,84
Tamanho Baço (cm)	7,86 ± 4,45	9,91 ± 4,65	0,10
Hb (g/dL)	8,71 ± 1,29	8,94 ± 1,70	0,55
Leucócitos (/mm³)	3.167,43 ± 1585,5	2.684,33 ± 1076,25	0,17
Neutrófilos (/mm³)	1.062,43 ± 754,56	861,17 ± 490,89	0,23
Linfócitos (/mm³)	1.632,30 ± 965,68	1.387,33 ± 788,78	0,29
Plaquetas (/mm³)	169.700,00 ± 626.52,38	174.272,67 ± 64.840,30	0,78
Albumina	2,61 ± 0,74	2,52 ± 0,52	0,57
Globulina	4,92 ± 1,07	5,24 ± 1,85	0,46

Teste t para dados independentes

Teste qui-quadrado

Não houve interferência das co-variáveis idade e gênero na resposta imunológica nos grupos em estudo. (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição dos níveis de significância das co-variáveis idade e gênero em relação às citocinas avaliadas.

	IDADE (P)	GÊNERO (P)
INF- γ	0,964	0,981
TNF- α	0,552	0,431
IL-12p40	0,780	0,254
IL-12p70	0,810	0,720
IL-10	0,681	0,296
sCD40L	0,824	0,155

Tabela 3: Distribuição dos níveis de citocinas dos pacientes do grupo Sb^V e do grupo NAC+ Sb^V

Variável	Grupo Sb^V Mediana(P25;P75) pg/ml	Grupo NAC+ Sb^V Mediana(P25;P75) pg/ml	P
INF- γ D0	720.5 (492.1;1232)	375.5 (47.69; 773.2)	0,29
INF- γ D45-60	264.5 (79.15; 1156)	184.7 (47.53; 467.1)	0,66
IL-12p70 D0	876.5 (145.8; 1093)	242.7 (23.05; 613.3)	0,13
IL-12p70 D45-60	62.36 (23.16; 609.2)	8.530 (4.060; 209.4)	0,12
IL-12p40 D0	171.2 (53.31; 576.0)	131.9 (47.48; 328.9)	0,84
IL-12p40 D15	17.15 (0.0; 126.2)	46.62 (18.05; 68.90)	0,55
IL-12p40 D28	3.945 (0.0; 33.88)	6.750 (0.0; 23.91)	0,94
TNF- α D0	109.0 (57.64; 236.3)	62.87 (39.45; 130.9)	0,05
TNF- α D15	32.21 (15.42; 87.58)	43.86 (21.77; 64.96)	0,82
TNF- α D28	16.63 (11.82; 45.98)	14.85 (12.50; 31.89)	0,89
IL-10 D0	363.6 (224.2; 805.8)	278.3 (160.4; 525.6)	0,27
IL-10 D15	35.15 (4.870; 99.24)	54.15 (23.41; 86.06)	0,38
IL-10 D28	8.920 (0.0; 26.22)	5.930 (0.0; 12.32)	0,40
sCD40 D0	1426 (710.3; 3756)	1523 (417.6; 3899)	0,56
sCD40 D15	4872 (1233; 14363)	5468 (1146; 10909)	0,72
sCD40 D28	11402 (1416; 13898)	18756 (783.1; 28437)	0,78

Teste Mann-Whitney para dados independentes

Teste qui-quadrado

6.2 Nível Sérico da Resposta Celular (Resposta Th1)

Para avaliar o nível sérico de citocinas da resposta Th1 dos pacientes alocados nos grupos NAC+ Sb^V e Sb^V, foram dosadas as seguintes citocinas: IFN- γ e IL-12p70, antes do início do tratamento (D0) e entre o 45° e o 65 ° dia após seu início, e TNF- α , no D0 e com 15 e 28 dias após o início do tratamento.

Foi observado que os níveis de IFN- γ estavam semelhantes entre os grupos estudados (Média Grupo Sb^V – D0: 969,5 pg/ml; D45-65: 540 pg/ml vs Média Grupo NAC+ Sb^V – D0: 722,9 pg/ml; D45-65: 405.1 pg/ml) (Gráfico 1). A análise dos percentis confirma a homogeneidade entre os eles (Grupo Sb^V – Mediana = 264.5 pg/ml; P25 = 79.15 pg/ml; P75 = 11556 pg/ml vs Grupo NAC+ Sb^V – Mediana = 184.7 pg/ml; P25 = 47.53 pg/ml; P75 = 467.1 pg/ml), como exposto na Tabela 3.

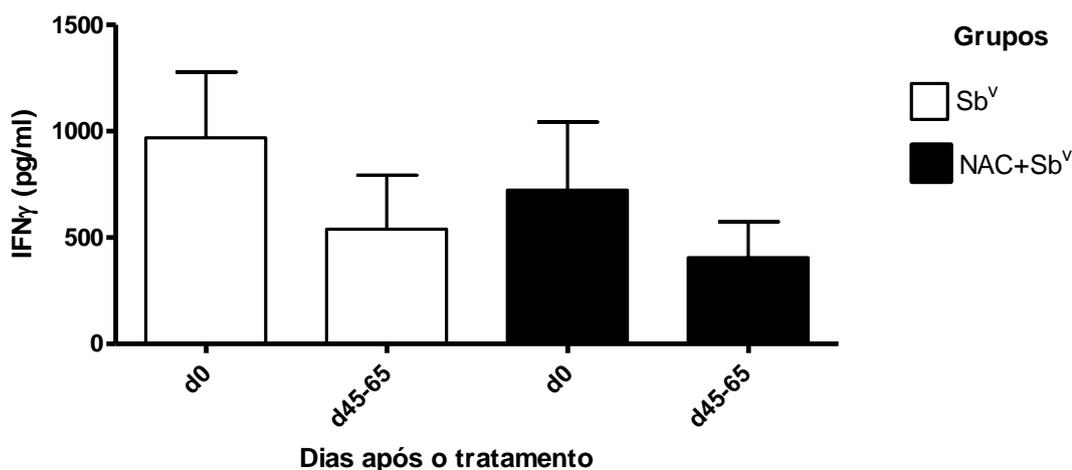


Gráfico 1 – Níveis de IFN- γ em soro de pacientes alocados no Grupo Sb^V e no Grupo NAC+ Sb^V nos diferentes períodos analisados.

Dosados os níveis séricos de IL-12p70 observamos que pacientes tratados apenas com Sb^V apresentaram maior diminuição da produção dessa citocina em relação aos pacientes tratados com NAC+ Sb^V (Média e Desvio Padrão Sb^V – D0: 1102 ± 1258 pg/ml; D45-65: 393.6 ± 826.7 pg/ml vs Média e Desvio Padrão NAC+ Sb^V – D0: 455.8 ± 584 pg/ml; D45-65: 227.3 ± 568.9 pg/ml) (Gráfico 2). Entretanto, a análise das medianas revelam maior concentração de IL-12p70 no grupo controle (Sb^V – D45-65: 62.36 pg/ml vs NAC+ Sb^V – D45-65: 8.530 pg/ml) (Tabela 3).

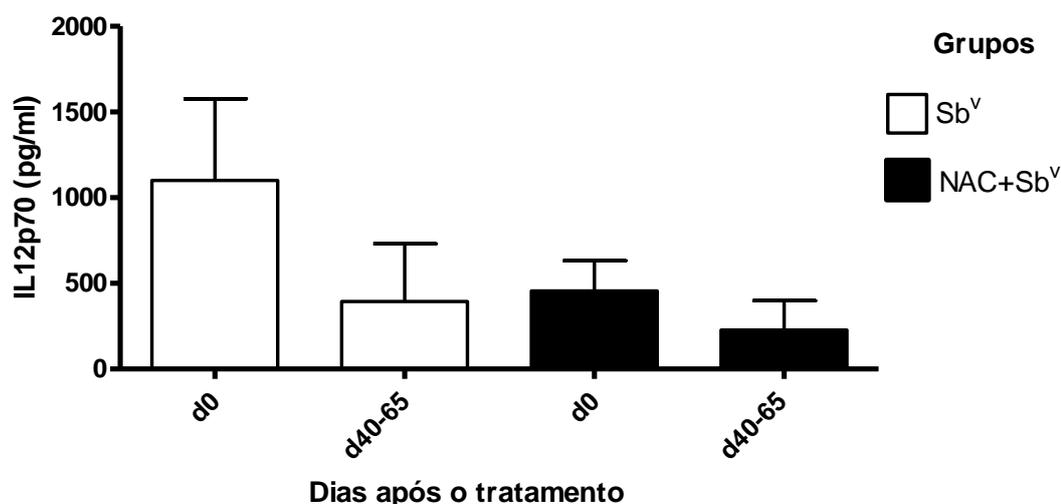


Gráfico 2 – Níveis de IL-12p70 em soro de pacientes alocados no Grupo Sb^V e no Grupo NAC+ Sb^V nos diferentes períodos analisados.

Analisando ainda o nível de citocinas pró-inflamatórias, comparamos as taxas séricas do TNF- α entre os grupos estudados e observamos que pacientes tratados apenas com Sb^v tiveram a produção desta citocina diminuída em aproximadamente 70% no D15 após a intervenção (Média e Desvio Padrão - D0: 138 \pm 95.3 pg/ml; D15: 50.4 \pm 44.8 pg/ml) (Gráfico 3). Quanto aos pacientes que receberam o Sb^v + NAC este decréscimo foi menos importante, 50% (Média e Desvio Padrão - D0: 87.3 \pm 64.6 pg/ml; D15: 46.2 \pm 31.3 pg/ml). A análise das medianas demonstra a manutenção com decréscimo contínuo até o fim do tratamento da produção de TNF- α nos pacientes que receberam o NAC (Sb^v - D0:109 pg/ml; D15: 32.21 pg/ml; D28: 16.63 pg/ml vs Sb^v + NAC - D0: 62.87 pg/ml; D15: 43.86 pg/ml; D28: 14.85 pg/ml) (Tabela 3).

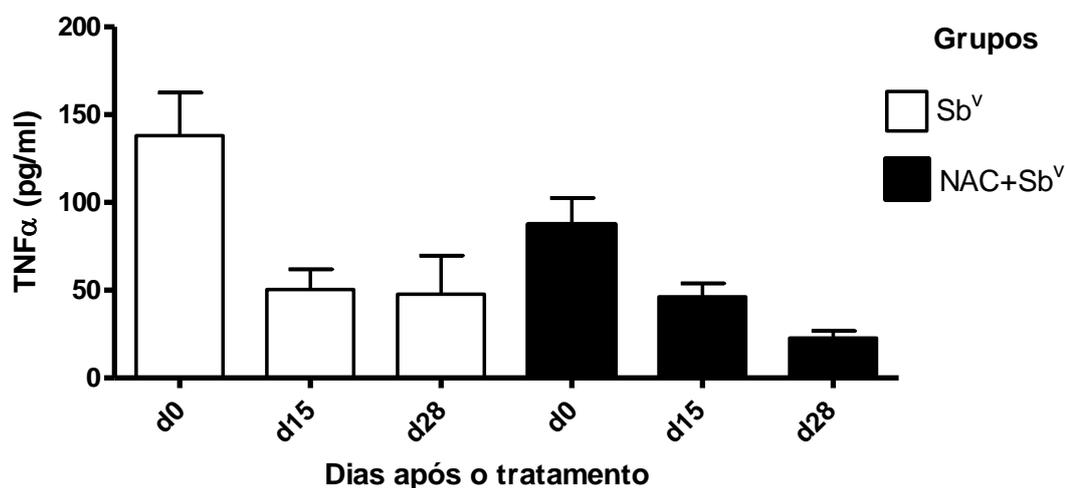


Gráfico 3 – Níveis de TNF- α em soros de pacientes alocados no Grupo Sb^v e no Grupo NAC+ Sb^v nos diferentes períodos analisados.

6.3 Nível Sérico da Resposta Humoral (Resposta Th2)

Para avaliar o nível de citocinas da resposta Th2 dos pacientes alocados nos grupos NAC+ Sb^v e Sb^v, foram dosadas as seguintes citocinas: IL-10 e IL-12p40, antes do início do tratamento (D0) e com 15 e 28 dias após.

Ao serem dosados os níveis séricos da IL-10 foi observado que ambos os tratamentos diminuiram expressivamente a produção dessa citocina (Gráfico 4), sendo que no D28 o grupo NAC+ Sb^V apresentou produção 4,5 vezes menor que o grupo controle (Média e Desvio Padrão Sb^V – D0: 472.8 ± 306 pg/ml; D15: 58.3± 64.3 pg/ml; D28:30.6 ± 56.7 pg/ml vs Média e Desvio Padrão NAC+ Sb^V – D0: 362.2 ± 247.4 pg/ml; D15: 84.1 ± 97.4 pg/ml; D28: 6.8 ± 6.7 pg/ml). A análise das medianas confirmam a diminuição mais evidente ntre os pacientes do grupo NAC+ Sb^V em relação ao grupo Sb^V (Sb^V – D0: 363.6 pg/ml; D15: 35.15 pg/ml; D28: 8.920 pg/ml vs NAC+ Sb^V – D0: 278.3; D15: 54.15 pg/ml ; D28: 5.930 pg/ml) (Tabela 3).

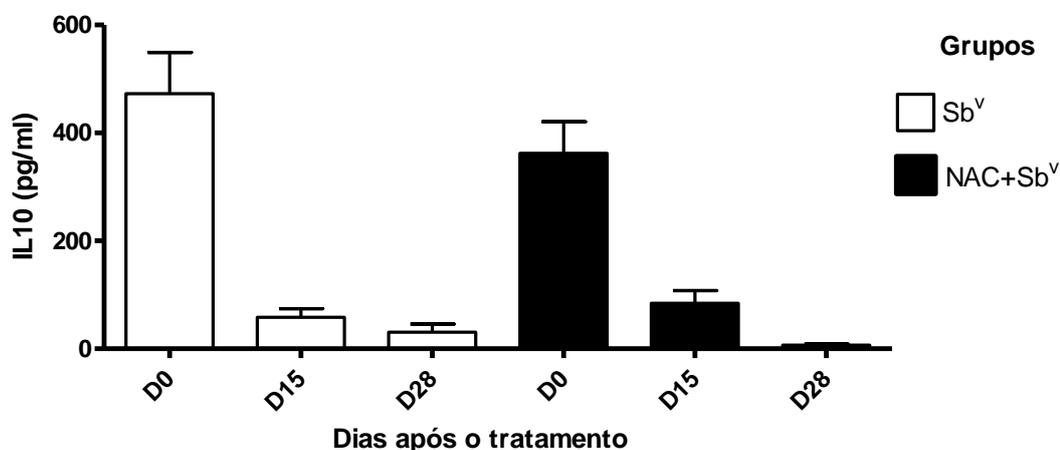


Gráfico 4 – Níveis de IL-10 em soro de pacientes alocados no Grupo Sb^V e no NAC+ Sb^V nos diferentes períodos analisados.

Analisando a porção 40 da IL-12, observamos que em ambos os grupos há diminuição dos níveis sérios da dessa citocina. O grupo Sb^V tende a manter a concentração entre os dias 15 e 28, enquanto que no grupo NAC+ Sb^V observa-se uma diminuição mais acentuada nesse mesmo período (Média e Desvio Padrão Sb^V – D15: 140 ± 281,4 pg/ml; D28: 136,8 ± 379,7 pg/ml vs Média e Desvio Padrão NAC+ Sb^V – D15: 138,6 ± 369,4 pg/ml; D28: 18,36 ± 28,75 pg/ml) (Gráfico 5).

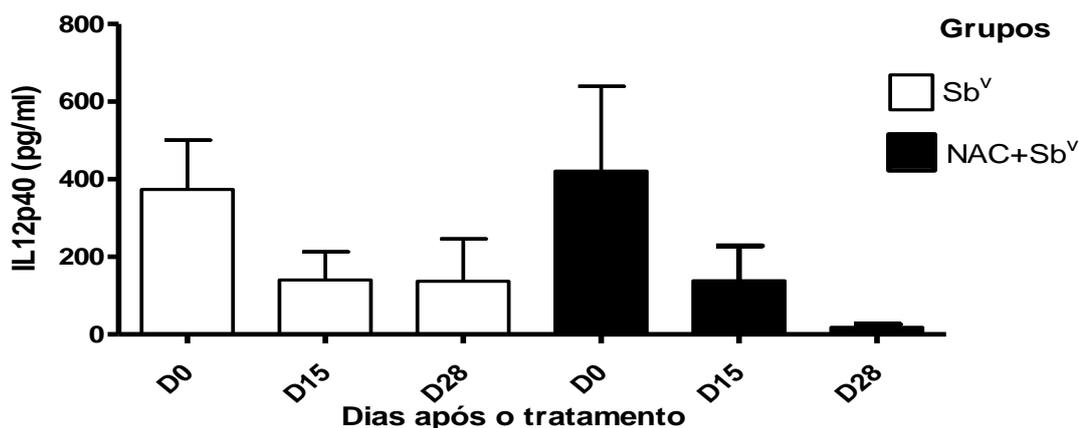


Gráfico 5 – Níveis de IL-12p40 em soros de pacientes alocados no Grupo Sb^v e no Grupo NAC+ Sb^v nos diferentes períodos analisados.

6.4 Nível Sérico da Molécula sCD40L

Quanto à sCD40L, foi observado que ambos os grupos apresentaram aumento da secreção desta molécula (Média e Desvio Padrão Sb^v – D0: 4271 ± 8581 pg/ml; D15: 10556 ± 12686 pg/ml; D28: 13817 ± 16613 pg/ml vs Média e Desvio Padrão Sb^v + NAC – D0: 2216 ± 1991 pg/ml; D15: 7201 ± 7548 pg/ml; D28 ± 15557 ± 13812 pg/ml) conforme Gráfico 6. Observamos ainda que, apesar de nos tempos iniciais do tratamento os pacientes tratados com NAC terem apresentado níveis mais baixos de sCD40L, após 28 dias esses valores se aproximaram aos produzidos pelo grupo controle (Gráfico 6). Comparando os percentis dos grupos em estudo, observamos que para metade dos pacientes a produção de sCD40L foi maior no grupo Sb^v + NAC já no D15 (Sb^v – D15: 4872; D28: 11402 vs Sb^v + NAC – D15: 5468; D28: 18756) (Tabela 3).

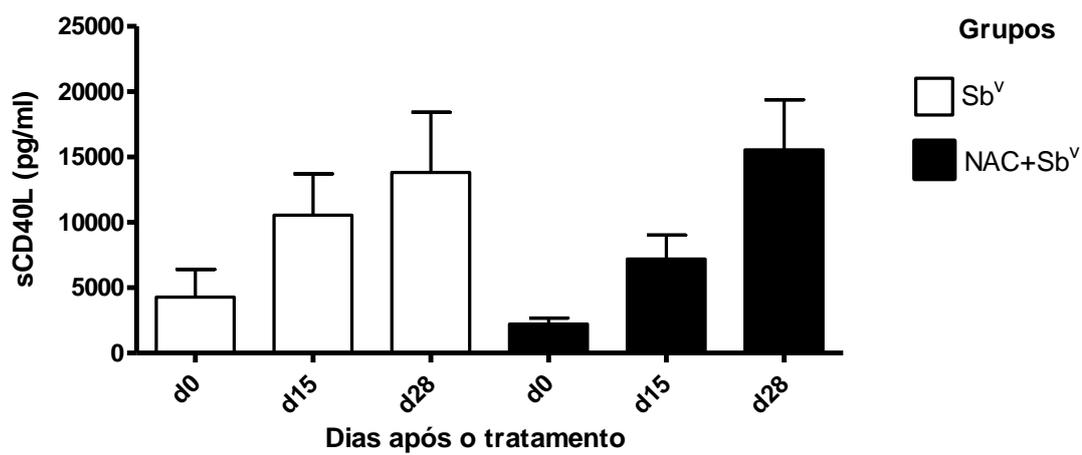


Gráfico 6 – Níveis de sCD40L em soro de pacientes alocados no Grupo Sb^V e no Grupo NAC+ Sb^V nos diferentes períodos analisados.

7. DISCUSSÃO

Na busca de maiores esclarecimentos quanto ao desenvolvimento e a cura da leishmaniose visceral para que tais conhecimentos possam ser utilizados no combate a essa infecção, estudos têm sido realizados principalmente a partir de experimentos em modelos murinos e em cães. As pesquisas com humanos, por outro lado, são mais restritas, obviamente por questões éticas. Portanto, a possibilidade de ser realizado um ensaio clínico que não contrarie normas éticas e que possa ser efetuado sem riscos para os seus participantes, podendo inclusive, trazer benefícios para eles, tornam pesquisas com essas características ainda mais relevantes, trazendo observações de maior importância com resultados melhor aplicáveis à saúde humana. Além de refletir esses aspectos, a presente pesquisa também apresenta a molécula sCD40L com um possível novo critério de cura a ser utilizado no acompanhamento do tratamento da leishmaniose visceral.

Como já evidenciado por outras pesquisas, a leishmaniose visceral (LV) na sua forma aguda leva ao aumento da produção de citocinas. A partir de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) expostas ao antígeno solúvel da *Leishmania* (*Soluble Leishmania Antigen* ou SLA), Peruhype-Magalhães *et al.* (2005), observaram que nos pacientes com leishmaniose visceral aguda, a resposta Th2 era dominante, com o aumento da produção de IL-10 por monócitos, ao mesmo tempo em que houve a diminuição tanto dos linfócitos produtores de IFN- γ , quanto dos monócitos produtores de TNF- α e IL-12. Ao investigar a produção das citocinas em pacientes curados, houve aumento de neutrófilos, eosinófilos e células NK que produziam IFN- γ , assim como de monócitos produtores de IL-12, o que faz acreditar que indivíduos curados de leishmaniose visceral ficam com uma resposta imune inata efetiva no combate a uma reinfecção, visto que um novo contato com o antígeno incita a pronta reação por parte dos neutrófilos, eosinófilos e das células NK, que levará à eliminação do parasito.

No presente estudo a dosagem sérica de citocinas antes do início do tratamento, comprovou que todos os pacientes apresentavam o perfil de resposta predominante do tipo Th2, representado pela elevada produção de IL-10, condizente com a suscetibilidade à leishmaniose visceral. Kurkjian *et al.*, (2006) realizaram pesquisa na qual foram investigados 120 indivíduos de uma área endêmica de alta

prevalência para a leishmaniose visceral no distrito de Mymensingh, Bangladesh. Esse estudo epidemiológico visou identificar os fatores de risco para a leishmaniose visceral, tanto a infecção quanto a doença. De janeiro de 2002 a abril de 2004, entre outras avaliações, os participantes tiveram os níveis séricos dosados quanto a produção de diversas citocinas, entre elas IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α . Entre os indivíduos que apresentavam a forma aguda da leishmaniose visceral, destacaram-se o elevado nível sérico de IL-10 e o baixo de IL-12.

No Estado do Maranhão, Caldas *et al.* (2005) avaliaram 20 pacientes durante o tratamento da forma aguda da LV. Foram determinados os níveis plasmáticos de citocinas, o parâmetro clínico do fígado e do baço e ainda os níveis de anticorpos produzidos por esses pacientes. Essas mesmas avaliações também foram feitas em 19 voluntários saudáveis da mesma região, a qual é considerada endêmica para a leishmaniose visceral. Como resultados, a dosagem média da IL-10 durante a infecção ativa foi de 498,4 pg/ml, ocorrendo sua diminuição durante o tratamento, até que 30 dias após sua média foi de 127,2 pg/ml, ao passo que, nos indivíduos saudáveis investigados nessa mesma pesquisa, tal citocina era indetectável.

Por se tratar de um inibidor da ativação dos macrófagos, a produção elevada da IL-10 promove uma resposta inadequada do hospedeiro perante a invasão do parasito ao organismo, instalando-se assim a doença. Ao longo do tratamento, ocorre a diminuição dos níveis dessa citocina e o crescimento parasitário é controlado, o que assinala o importante papel dessa interleucina no desenvolvimento da infecção.

Esse comportamento foi comprovado na presente pesquisa, cujos pacientes de ambos os grupos apresentaram os maiores índices dessa citocina antes de ser administrado o tratamento. O declínio progressivo de IL-10 também foi constatado de forma expressiva à medida que a terapêutica era instituída e a doença evoluía para a cura, nos níveis séricos tanto dos pacientes tratados apenas com o Sb^V (Grupo Controle) quanto nos pacientes tratados com o NAC em adição ao Sb^V (Grupo Teste), indicando que funções celulares importantes para o combate ao desenvolvimento da LV, como a atividade microbicida dos macrófagos, a

proliferação dos linfócitos e a produção de IFN- γ , antes suprimidas pela ação sobreposta da IL-10, estavam sendo reestabelecidas, sendo que a dosagem média do Grupo Controle antes do tratamento foi de 472,8 pg/ml e a do Grupo Teste foi 362,2 pg/ml. O grupo NAC+ Sb^V destacou-se no 28º dia do tratamento, pois a média dos níveis de IL-10 foi 4,5 vezes menor que a do grupo Sb^V, o que sugere uma ação coadjuvante do NAC na recuperação dos pacientes.

Khoshdel *et al.*(2009) realizaram estudo dos níveis plasmáticos das citocinas IL-10, IL-12 e IFN- γ em moradores de área endêmica para a leishmaniose visceral no Iran, avaliando 32 pacientes com a infecção aguda, irmãos assintomáticos desses pacientes, os quais somavam 29 indivíduos, e ainda 27 outras pessoas assintomáticas da mesma região (Grupo Controle). Foram encontrados valores plasmáticos médios de IL-10 de 77,5 pg/ml nos pacientes com a infecção aguda, e nos indivíduos considerados controles (assintomáticos da área endêmica) o valor foi de 17,7 pg/ml.

Ao comparar a evolução do INF- γ sérico entre os grupos Sb^V e NAC+ Sb^V, foi verificado que ambos apresentaram-se de forma homogênea antes e após o tratamento na atual pesquisa (tabela 3), com diminuição dos valores ao longo do tempo, estando na média de 969,5 pg/ml no grupo Sb^V antes do tratamento e atingindo 540,0 pg/ml entre os 45 e 65 dias, enquanto que no grupo NAC+ Sb^V a evolução nesses mesmos momentos foi de 722,9 pg/ml para 405,1 pg/mL.

Apesar de apresentar valores elevados no início da infecção e do seu papel importante no desenvolvimento da resposta imune inata, nos pacientes com leishmaniose visceral aguda o IFN- γ parece não conseguir estimular atividade leishmanicida sobre os macrófagos. Ao mesmo tempo, a IL-10 em taxa elevada age de forma inibitória sobre a produção de IL-12, a qual tem ação estimuladora sobre a produção de IFN- γ . Por outro lado, a normalização das taxas de INF- γ é observada com a regressão da doença (KHOSHDEL *et al.*, 2009).

Caldas *et al.* (2005) encontraram níveis plasmáticos elevados de IFN- γ em pacientes com infecção aguda de leishmaniose visceral antes de começarem o

tratamento, os quais apresentavam em média taxa de 470,2 pg/ml, quando em pessoas saudáveis da respectiva área endêmica a dosagem média desta citocina foi de 15,4 pg/ml. Trinta dias após o tratamento, os pacientes tinham uma queda acentuada do IFN- γ , que nesta fase apresentava o nível médio de 155,0 pg/ml. Nos pacientes com leishmaniose aguda avaliados por Khoshdel *et al.* (2009) a dosagem média do IFN- γ plasmático foi de 37,6 pg/ml enquanto que no grupo controle, formado por indivíduos assintomáticos de área endêmica, a média dessa citocina foi de 0,18 pg/ml.

Diversos autores demonstraram que a IL-12p70 (mais comumente referida apenas como IL-12) sofre ação antagônica da sua própria subunidade solúvel livre, a IL12-p40. Assim, elevados níveis dessa subunidade comprometem a bioatividade da IL-12p70, o que resulta na diminuição não só da indução mas também da manutenção da resposta Th1 (GILLESEN *et al.*, 1995; HEINZEL *et al.*, 1997; LING *et al.*, 1995; MATNER *et al.*, 1993, 1997; YOSHIMOTO *et al.*, 1998). Gillesen *et al.* (1995) e Ling *et al.* (1995) observaram em modelos murinos e humanos que quando na forma de dímero (p40)₂ a ação inibidora da resposta Th1 se dá pela ligação da cadeia β 1 no receptor da IL-12p70.

Na atual pesquisa foi percebido que as taxas da IL-12p40, que inicialmente eram mais elevadas, sofreram diminuição ao longo do tempo nos grupos Sb^V e NAC+ Sb^V, o que conseqüentemente contribuiu para o estabelecimento da resposta Th1 nos pacientes, sendo que, enquanto do dia 15 ao 28 do tratamento o grupo controle apresentou uma diminuição mais discreta nos seus valores, no grupo NAC+ Sb^V essa queda foi mais acentuada (Gráfico 5), apesar de que, ao considerarmos os percentis dos grupos, percebemos que o NAC+ Sb^V estava composto por pacientes com maiores níveis da IL-12p40 tanto no dia 15 quanto no dia 28 (Sb^V – D15: 17,15 pg/ml; D28: 3,945 pg/ml vs NAC+ Sb^V – D15: 46,62 pg/ml; D28: 6.750 pg/ml). Ao dosarem a IL-12p40, Caldas *et al.* (2005) também constataram elevados níveis plasmáticos nos pacientes com infecção aguda da LV, sendo que esses valores diminuía de forma contínua com o passar do tempo.

Na presente pesquisa ao serem analisados os valores da citocina IL-12 (IL-12p70), imune reguladora da resposta Th1, foi verificado que, em comparação com os pacientes do grupo NAC+ Sb^V (Gráfico 2), os pacientes do grupo Sb^V apresentaram maior decréscimo (Média Sb^V – D0: 1102 pg/ml; D45-65: 393.6 pg/ml vs Média NAC+ Sb^V – D0: 455.8 pg/ml; D45-65: 227.3 pg/ml), apesar de estarem com as maiores concentrações dela. Ao ser avaliada a produção desta citocina, Khoshdel *et al.* (2009) encontraram taxas plasmáticas médias de 798,3 pg/ml em pacientes com a LV aguda, e de 216,9 pg/ml no grupo controle (assintomáticos de área endêmica).

A TNF- α , por sua vez, é descrita como uma citocina cujos valores se encontram elevados durante a LV aguda, sendo inclusive sugerido o seu uso como critério de cura, visto que sua dosagem cai de modo significativo após o tratamento. Ao ser feita a avaliação da TNF- α no atual estudo, no 15º dia do tratamento os pacientes do grupo Sb^V apresentavam uma diminuição mais significativa desta citocina que os do grupo Sb^V + NAC (Média Sb^V - D0: 138 pg/ml; D15: 50,4 pg/ml vs Sb^V + NAC – D0: 87,3 pg/ml; D15: 46,2 pg/ml). Porém, também foi percebido que o grupo teste manteve seus valores em contínua diminuição, sinalizando progresso para cura até o 28º dia, ao passo que o grupo controle quase estabilizou sua produção do dia 15 ao dia 28, o que demonstra a provável ação favorável do NAC na evolução para a recuperação dos pacientes.

Salomão *et al.* (1996), em pesquisa realizada em Natal entre agosto de 1991 e julho de 1992 em pacientes com leishmaniose visceral e 24 indivíduos saudáveis, observaram que os níveis plasmáticos de TNF- α nos pacientes com LV aguda estavam significativamente mais elevados que os encontrados em indivíduos saudáveis, sendo que tais níveis declinaram de forma marcante ao mesmo tempo em que as alterações clínicas e laboratoriais eram normalizadas, estando o decréscimo desses níveis linearmente associado ao tempo de tratamento e à recuperação clínica dos pacientes. Antes de iniciar o tratamento, a dosagem média dos pacientes foi de 124,7 pg/ml, no 14º dia a média encontrada foi de 36,8 pg/ml e no 21º foi de 13,9 pg/ml. Esse achado reforça idéia de que os índices do TNF- α podem ser utilizados como marcadores da resposta terapêutica, levando-se em conta ainda que, pacientes

com leishmaniose visceral aguda persistente apresentam níveis altos dessa interleucina de forma constantemente, como encontrado por Barral *et al.* (1991), cuja pesquisa demonstrou que os pacientes com leishmaniose visceral persistente por eles avaliados e que não respondiam ao tratamento, mantiveram os níveis médios de TNF- α em 276 pg/ml. Na mesma pesquisa, os valores elevados de 24 dos 28 pacientes com a infecção aguda, estavam na média de 142,9 pg/ml antes do tratamento, descendo rapidamente com a quimioterapia, atingindo o valor médio de 129 pg/ml já no décimo dia, sendo que os indivíduos saudáveis apresentavam taxas basais marcadamente inferiores, com média de 11,3 pg/ml.

Ainda na avaliação dos grupos Sb^V e Sb^V + NAC, também foi dosado o ligante solúvel do receptor do CD40, o sCD40L, o qual está associado tanto à resposta Th1 quanto à Th2. Diferente dos achados com os níveis de citocinas, foi observado que a taxas séricas de sCD40L aumentaram com a evolução do tratamento e cura da doença. Comparativamente, os pacientes do grupo Sb^V + NAC, embora apresentassem valores mais baixos antes do tratamento, no 28º dia deste seus valores já se aproximavam aos dos produzidos pelo grupo Sb^V (Média Sb^V – D0: 4271 pg/ml; D28: 13817 pg/ml vs Média Sb^V + NAC – D0: 2216 pg/ml; D28: 15557 pg/ml), e além disso, no 15º dia de tratamento, metade dos pacientes do grupo Sb^V + NAC já apresentava valores maiores que os do grupo Sb^V. Existem vários estudos avaliando o papel da interação CD40/CD40L em doenças trombóticas, sendo ainda limitado o conhecimento da real função dessas moléculas no controle de infecções por parasitas intracelulares. Sabe-se que o sinal do CD40 induz a produção de TNF- α e IL-12, favorecendo assim a resposta do tipo Th1 (MATHUR; AWASTHI; SAHA, 2006).

Pelo fato de seus níveis séricos elevarem-se à medida que os pacientes progredem para a cura, a dosagem da molécula do sCD40L mostra-se como um provável auxílio prognóstico para acompanhamento da leishmaniose visceral, podendo ser um novo indicador de cura para esta doença, o que pede uma maior atenção no estudo dessa molécula e no seu entendimento.

8. CONCLUSÕES

Ao caracterizar os níveis séricos das substâncias analisadas no presente estudo, pôde-se perceber que, apesar do IFN- γ não ter apresentando diferença significativa entre os grupos, as demais citocinas representantes da resposta Th1 manifestaram no grupo teste, ou seja, no grupo de pacientes cujo tratamento foi complementado com o NAC (Sb^v + NAC), índices sugestivos do desenvolvimento mais precoce desse tipo de resposta imune, a qual leva ao controle do parasita e à cura da doença. Tal fato que pode ser observado pelo decréscimo mais lento da IL-12p70 e pela diminuição contínua do TNF- α .

Outros dados que reforçam esse raciocínio são as taxas das citocinas representativas da resposta Th2, cuja sobreposição torna o indivíduo susceptível à infecção e ao desenvolvimento da leishmaniose visceral. Nesse estudo, o grupo Sb^v + NAC além de ter suas taxas de IL-12p40 diminuídas de forma mais acentuada ao longo de tratamento, ao final deste apresentou os valores mais baixos de IL-10.

Quanto à sCD40L, ao final do tratamento seus valores estavam maiores nos pacientes do grupo Sb^v + NAC. Essa molécula apresenta níveis ascendentes à medida que a leishmaniose visceral progride para a cura, característica que a torna uma provável indicadora desta evolução, podendo assim desempenhar um papel importante como instrumento para avaliação prognóstica desta doença.

Diante de tais observações pôde-se concluir que a inserção do N-acetil-L-cisteína no tratamento da leishmaniose visceral parece estimular mais precocemente a resposta Th1 favorecendo uma melhor resposta imunológica do paciente para conter a infecção pela *L. chagasi*.

9. REFERÊNCIAS

ALVES, W. A. Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 71, p. 25-29, 2009.

BACELLAR, O. et al. Gamma interferon production by lymphocytes from children infected with *L. chagasi*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.24, n. 8, p.791-795, 1991.

BARRAL-NETO, M. et al. Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 163, n. 4, p. 853-7, apr., 1991.

_____. Human_leishmaniasis@cytokines.bahia.br. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.31, p.149-155, 1998.

BROMBACHER, F.; KASTELEIN, R. A.; ALBER, G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th 1 responses. **Immunology**, v. 24, n. 4, apr., 2003.

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

D'ANDREA, A. et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon γ -production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 1041-1048, sep., 1993.

DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 4, p. 155-159, apr. 2011.

_____; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 151-156, 2006.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **World Health Stat Q**, v.45, p.267-275, 1992.

ELKHOURY, A. N. S. M. Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. **Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas**. p 24-26, 2006.

GAMA, M.E.A. et al. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.129-136, 2004.

GENESE. Tecnologia luminex xMAP & kitis miliplex. Disponível em: <<http://www.gendiag.com.br/conhecimento/informativos/tecnologia-xmap-kits-lincoplex>>. Acesso em: 08 maio 2011.

GHA, H. W. et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J. Clin. Invest**, vol. 92, p. 324-329, 1993.

GILLESSEN, S. et al. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. **Eur. J. Immunol.** 25, 200–206, 1995.

GONTIJO, C. M. F. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v.37, p.615-623, 2004.

HEINZEL, F.P. et al. In vivo production and function of IL-12p40 homodimers. **J. Immunol.** v. 158, p. 4381–4388, 1997.

KARP, C. L. et al., In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar – marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. **The Journal of Clinical Investigation.** v. 91, p. 1644-1648, apr., 1993.

KHOSHDEL, A. et al. Increased levels of IL-10, IL-12, and IFN- γ in patients with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v.13, n.1, p. 44-46, feb., 2009.

KURKJIAN, M. K. et al. Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. **International Society for Analytical Cytology. Cytometry Part A**, v. 69A, p. 353-358, may, 2006.

LIEW, F. Y. et al. Tumour necrosis factor (TNF α) in leishmaniasis. I. TNF α mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. **Immunology**, n. 69, p. 570-573, 1990.

LING, P. et al. Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. **J. Immunol.** n. 154, p. 116–127, 1995.

MAASHO, K.; AKUFFO, H. O. Cells from healthy non-exposed individuals produce cytokines to selected fractions of *Leishmania* promastigotes. **Scandinavian Journal of Immunology Supplement**, n. 11, p. 179-184, 1992.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MATHUR, R. K.; AWASTHI, A.; SAHA, B. The conundrum of CD40 function: host protection or disease promotion? **Parasitology**, v. 22, n. 3, mar., 2006.

MATTNER, F. et al. The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. **Eur. J. Immunol.** 23, 2202–2208, (1993).

_____. Treatment with homodimeric interleukin-12 (IL-12) p40 protects mice from IL-12-dependent shock but not from tumor necrosis factor α -dependent shock. **Infect. Immun.** V. 65, p. 4734–4737, (1997).

MILLS, K. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. **Eur. J. Immunol.**, v.38, p. 2636-2649, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação epidemiológica.**

<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561>.

Acesso em: 15 jun. 2011.

_____. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**, Brasília, 2006.

MURRAY, H. W.; RUBIN, B. Y.; ROTHERMEL, C. D. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes – evidence that interferon- γ is the activating lymphokine. **J. Clin. Invest.**, v. 72, p. 1506-1510, oct. 1983.

NASCIMENTO, E. L. T. et al. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Postscript: new challenges in the epidemiology of *Leishmania chagasi* infection. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2964-2967, 2008.

NOELLE, R. J. The role of gp39 (CD40L) in immunity. **Clinical Immunology and immunopathology**, v.76, n. 3, p. S203-S207, 1995.

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

OCHS, H. D.; HOLLENBAUGH, D.; ARUFFO, A. The role of CD40L (gp39)/CD40 in T/B cell interaction and primary immunodeficiency. **Immunology**, v. 6, p. 337-341, 1994.

OLIVEIRA, A. L. L. et al. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 446-450, 2006.

PASTORINO, A.C. et al. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de Pediatria**, v.78, p.120-127, 2002.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V. et al. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.62, p.487-495, 2005.

PRATA, A.; SILVA, L.A. Calazar. In: COURA, J.R. (Edit.). **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.713-732.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim. Nova**, v.26, p.550-555, 2003.

ROBERTS, M.T.M. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **British Medical Bulletin**, v.75, p.115-130, 2006.

ROCHA-VIEIRA, E. et al. Histopathological outcome of *Leishmania major*-infected BALB/c mice is improved by oral treatment with N-acetyl-L-cysteine. **Immunology**, v.108, p.401-408, 2003.

SAHA, S. et al. Immune responses in kala-azar. **Indian J Med Res**, v.123, p.245-266, 2006.

SALOMÃO, R. et al. Plasma levels of tumor necrosis factor- α in patients with visceral leishmaniasis (kala-azar). Association with activity of the disease and clinical remission following antimonial therapy. **Rev. Inst. Med. Tro.**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 113-118, 1996.

STUART, K., BRUN *et al.* Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J Clin Invest**. v.1, p.1301–1310. 2008

TAVARES, L. M. S. A.; TAVARES, E. D. Incidência, distribuição geográfica e aspectos ambientais das áreas endêmicas da leishmaniose visceral em Sergipe. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 1, p. 47-52, 1999.

TIROUVANZIAM, R. et al. High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione produg, modulates inflammation in cystic fibrosis. **PNAS**, v.103, p.4628-4633, 2006.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, p. 145-155, 2003.

WHO. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniases**. Geneva, 22-26 mar, 2010.

WU, G. et al. Glutathione metabolism and its implications for health. **JN The Journal of Nutrition**, v.134, p.489-492, 2004.

YOSHIMOTO, T. et al. (1998) Reduced T helper 1 responses in IL-12 p40transgenic mice. **J. Immunol.** 160, 588–594.

10. APÊNDICE

APÊNDICE 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

O TCLE, utilizado neste estudo, está impresso, na íntegra, nas folhas seguintes.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA
CAMPUS DA SAÚDE PROF. JOÃO CARDOSO NASCIMENTO JR.
Rua Cláudio Batista s/n, Didática V, Bairro Sanatório
CEP: 49060-100 Aracaju/SE
Fone: (79) 3218-1805
E-mail: cephu@ufs.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do Projeto: Marcadores Imunológicos e Moleculares Envolvidos na Gravidade Clínica da Leishmaniose Visceral Humana e Canina e Possíveis Implicações na Transmissão da Doença no Estado de Sergipe .

NOME DO PACIENTE:

Nº do Projeto: _____

Investigador Principal: Roque Pacheco de Almeida, Hospital Universitário da UFS, Aracaju-Sergipe-Brasil.

Este documento explica um estudo de pesquisa e pede a sua permissão para o(a) senhor(a) ou seu (sua) filho(a) participar desta pesquisa. Se o(a) senhor(a) for pai/mãe ou guardião de uma criança abaixo de 18 anos, que foi convidado a participar desta pesquisa, a palavra “você” neste documento se refere ao seu filho. Ao final da explicação, pediremos ao senhor(a) para assinar este documento, caso concorde em participar desta pesquisa.

Convite e Objetivo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é identificar pessoas que tem leishmaniose na medula óssea ou no baço para estudar a doença chamada calazar ou leishmaniose visceral. Após lhe ser explicado o que contém neste documento, você pode perguntar tudo sobre a pesquisa a seu médico. Todos os pacientes com leishmaniose visceral diagnosticados no Hospital Universitário serão convidados a participar do estudo. Caso decida participar do estudo, você será solicitado a assinar este consentimento. Aproximadamente 40 pessoas participarão deste estudo.

Participação voluntária:

Sua participação é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir da participação no estudo a qualquer momento. Sua recusa em participar ou desistir de participar do estudo não afetará de modo algum qualquer tratamento que você estiver recebendo no Hospital Universitário.

Finalidade do estudo: Este estudo visa determinar se o estudo da resposta imune do paciente ao parasita e identificar fatores envolvidos na resistência de alguns pacientes ao tratamento com antimonial (Glucantime®).

Procedimentos: Caso você aceite participar do estudo, um questionário será feito para saber onde você mora, sua ocupação e seus hábitos. Um médico o examinará para ver as características de sua doença. Você realizará os exames que já são utilizados de rotina para o diagnóstico da doença, como exame de sangue (sorológico), teste cutâneo e aspiração da medula óssea e/ou baço com seringa e agulha para cultura do parasito que causa a doença. Além disso, seu sangue será utilizada para avaliara a resposta imune frente a antígenos do parasita. A participação nesta pesquisa não impede você de participar de outra pesquisa, contanto que não mude o tratamento que vai receber.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial, sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe médica do Comitê de Ética do Hospital Universitário. Embora os resultados obtidos neste estudo sejam publicados, não haverá na apresentação destes resultados meios que possam identificar os participantes. Suas fichas clínicas e os resultados de seus exames poderão ser também vistos pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário. Fotos suas poderão ser mostradas em público sem identificar você e protegendo partes íntimas.

Análise de riscos e benefícios: Todos os exames coletados são partes da rotina utilizada para o diagnóstico de Leishmaniose, os quais você faria mesmo se não participasse do estudo, exceto o sangue obtido ao mesmo momento que será utilizado para os estudos da resposta imune, porém não trará novos riscos para você como os previstos para retirada de sangue em rotina normal. A retirada de sangue pode causar dor no local da punção com a agulha e raramente pode ocorrer sangramento ou formação de hematoma. O exame da medula óssea é também de rotina e não causam riscos iminentes. Porém, ocorrendo complicações, os médicos do projeto e do Hospital cuidarão de você. Após o diagnóstico da doença, você será tratado com antimônio (Glucantime®) Este tratamento será acompanhado no Hospital Universitário.

Retorno de benefício para o sujeito e para a sociedade: O melhor conhecimento sobre o tratamento da leishmaniose visceral e da resposta imune poderão contribuir no futuro para medidas de controle da doença.

Custos: Você não terá custos com a participação no estudo e, caso necessite de tratamento para leishmaniose, a medicação lhe será fornecida gratuitamente. Você não receberá nenhum pagamento para participar desta pesquisa. Poderemos apenas contribuir com o seu transporte para comparecer as visitas no ambulatório após a alta do hospital.

Esclarecimentos: Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode ligar para Dr. Roque Pacheco de Almeida (Tel.: (79)8823-7244) ou Dra. Amélia Ribeiro de Jesus (Tel: (79) 8823-7245). Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário, cujo endereço consta no início deste consentimento.

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. Uma cópia deste consentimento lhe será entregue. Favor assinalar um dos quadros abaixo para indicar se deseja ou não ter o parasito que causa esta doença armazenado para estudos futuros aprovados sobre leishmaniose.

ACEITO que o parasito que causa esta doença seja armazenado para estudos futuros aprovados sobre leishmaniose.

NÃO ACEITO que o parasito que causa esta doença seja armazenado para estudos futuros aprovados sobre leishmaniose.

Assinatura ou impressão do participante	Data	Hora
---	------	------

Nome/Assinatura do pesquisador	Data	Hora
--------------------------------	------	------

Nome/Assinatura da testemunha	Data	Hora
-------------------------------	------	------

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA MENORES DE IDADE
(MENORES DE 18)

Nome do Projeto: Marcadores Imunológicos e Moleculares Envolvidos na Gravidade Clínica da Leishmaniose Visceral Humana e Canina e Possíveis Implicações na Transmissão da Doença no Estado de Sergipe .

NOME DO

PACIENTE: _____

Nº do Projeto: _____

Investigador Principal: Roque Pacheco de Almeida, Hospital Universitário da UFS, Aracaju-Sergipe-Brasil.

Convite e Objetivo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é identificar pessoas que tem leishmaniose na medula óssea ou no baço para estudar a doença chamada calazar ou leishmaniose visceral . Após lhe ser explicado o que contém neste documento, você pode perguntar tudo sobre a pesquisa a seu médico. Todos os pacientes com leishmaniose visceral diagnosticados no Hospital Universitário serão convidados a participar do estudo. Caso decida participar do estudo, você será solicitado a assinar este consentimento. Aproximadamente 40 pessoas participarão deste estudo.

Nós perguntaremos a seus pais sobre sua saúde. Um médico lhe fará exames que não causarão dor. Então, nós tiraremos um pouco de sangue (cerca de 2 colheres de sopa) de seu braço, usando uma seringa e agulha. Algumas vezes, nós faremos um teste na pele, onde injetaremos uma pequena quantidade de líquido (duas gotas) no seu braço, usando uma agulha fina. Esperamos que a avaliação da resposta imune frente a

antígenos do parasita possa esclarecer mecanismos da doença e resistência ao tratamento que algumas pessoas apresentam. O tratamento com Glucantime® será instituído independente de você participar ou não do estudo.

Você pode ou não participar deste estudo. Se você quiser participar, por favor, assine ou coloque sua impressão digital abaixo.

Esclarecimentos: Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode ligar para Dr. Roque Pacheco de Almeida (Tel.: (79)8823-7244) ou Dra. Amélia Ribeiro de Jesus (Tel: (79) 8823-7245). Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho,

_____ Data _____ hora _____

Assinatura ou impressão do paciente

_____ Data _____ hora _____

Assinatura ou impressão do responsável

_____ Data _____ hora _____

Testemunha

_____ Data _____ hora _____

Investigador

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA MENORES DE IDADE
(MENORES DE 18)

Nome do Projeto: Marcadores Imunológicos e Moleculares Envolvidos na Gravidade Clínica da Leishmaniose Visceral Humana e Canina e Possíveis Implicações na Transmissão da Doença no Estado de Sergipe .

NOME DO

PACIENTE: _____

Nº do Projeto: _____

Investigador Principal: Roque Pacheco de Almeida, Hospital Universitário da UFS, Aracaju-Sergipe-Brasil.

Convite e Objetivo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é identificar pessoas que tem leishmaniose na medula óssea ou no baço para estudar a doença chamada calazar ou leishmaniose visceral . Após lhe ser explicado o que contém neste documento, você pode perguntar tudo sobre a pesquisa a seu médico. Todos os pacientes com leishmaniose visceral diagnosticados no Hospital Universitário serão convidados a participar do estudo. Caso decida participar do estudo, você será solicitado a assinar este consentimento. Aproximadamente 40 pessoas participarão deste estudo.

Nós perguntaremos a seus pais sobre sua saúde. Um médico lhe fará exames que não causarão dor. Então, nós tiraremos um pouco de sangue (cerca de 2 colheres de sopa) de seu braço, usando uma seringa e agulha. Algumas vezes, nós faremos um teste na pele, onde injetaremos uma pequena quantidade de líquido (duas gotas) no seu braço, usando uma agulha fina. Esperamos que a avaliação da resposta imune frente a

antígenos do parasita possa esclarecer mecanismos da doença e resistência ao tratamento que algumas pessoas apresentam. O tratamento com Glucantime® será instituído independente de você participar ou não do estudo.

Você pode ou não participar deste estudo. Se você quiser participar, por favor, assine ou coloque sua impressão digital abaixo.

Esclarecimentos: Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode ligar para Dr. Roque Pacheco de Almeida (Tel.: (79)8823-7244) ou Dra. Amélia Ribeiro de Jesus (Tel: (79) 8823-7245). Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho,

_____ Data _____ hora _____

Assinatura ou impressão do paciente

_____ Data _____ hora _____

Assinatura ou impressão do responsável

_____ Data _____ hora _____

Testemunha

_____ Data _____ hora _____

Investigador