



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

ISABEL PAIVA DIAS MENDES CARNEIRO

**DIFERENÇAS NA EXPRESSÃO DO RECEPTOR PARA COMPLEMENTO TIPO 1
(CR1/CD35) EM HEMÁCIAS E LEUCÓCITOS DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL, ANTES E APÓS O TRATAMENTO.**

FORTALEZA

2015

ISABEL PAIVA DIAS MENDES CARNEIRO

**DIFERENÇAS NA EXPRESSÃO DO RECEPTOR PARA COMPLEMENTO TIPO 1
(CR1/CD35) EM HEMÁCIAS E LEUCÓCITOS DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL, ANTES E APÓS O TRATAMENTO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Lília Maria Carneiro Câmara

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C288d Carneiro, Isabel Paiva Dias Mendes.

Diferenças da expressão do receptor para complemento tipo 1 (CR1/CD35) em hemácias e leucócitos de pacientes com leishmaniose visceral, antes e após o tratamento / Isabel Paiva Dias Mendes Carneiro. – 2015.
111 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2015.
Orientação: Profa. Dra. Lília Maria Carneiro Câmara.

1. Receptor para complemento tipo 1. 2. Leishmaniose visceral. I. Título.

CDD 616.9

ISABEL PAIVA DIAS MENDES CARNEIRO

**DIFERENÇAS NA EXPRESSÃO DO RECEPTOR PARA COMPLEMENTO TIPO 1
(CR1/CD35) EM HEMÁCIAS E LEUCÓCITOS DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL, ANTES E APÓS O TRATAMENTO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Aprovada em: 30/07/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anastácio de Queiróz Sousa

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr^a. Maria Fátima da Silva Teixeira

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

À minha mãe, por todo amor e força que recebo todos os dia

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Deus, que me permitiu viver mais uma etapa do meu crescimento profissional e por ser estar comigo me fortalecendo, protegendo em todos os momentos e me conduzindo sempre a uma vida vitoriosa.

À minha mãe Fátima Paiva, meu pai Orley Carneiro, minhas irmãs Priscila e Catarina Paiva, meus sobrinhos José e Miguel, meu cunhado José Terceiro e meu namorado Wendel, por encherem meu coração de amor, incentivo e apoio, fazendo-me persistir e ter forças.

À minha orientadora Lília Câmara, que me abriu as portas no momento certo. Obrigada por todo o aprendizado, paciência, compreensão, generosidade, por só me dar exemplos de competência, dedicação e por me fazer superar meus limites.

A Fabíola Fernandes Herédia e Suellen Alves da Silva, por estarem ao meu lado desde a minha seleção até a conclusão do mestrado. Obrigada por terem sido vocês as presentes nesta etapa da minha vida e por contribuírem com tanta generosidade, amizade, paciência, acolhimento, aprendizado e companheirismo. Gratidão eterna!

A Eliane Nunes, Camila Fernandes e Edgesy Aguiar, pela amizade e por estarem presentes me apoiando e ajudando sempre que necessário.

Ao Doutor Guilherme Henn, médico infectologista do Hospital São José de Doenças Infecciosas, por toda constante atenção e colaboração, essencial contribuição no projeto e auxílio de todas as horas na etapa de retorno dos pacientes participantes e na banca de qualificação.

Às professoras doutoras Maria Jânia Teixeira e Aparecida Tiemi Nagao-Dias por suas disponibilidades e presenças na banca de qualificação e suas valiosas contribuições dadas para a dissertação;

Aos profissionais do Hospital Universitário Walter Cantídio: dosetor de Coleta de Sangue, Francisca Mifran Lima e Janecélia; e do setor de Hematologia, Neide, Nilda, Vanda Cláudia, Glaírta, Conceição e Tereza, pelo apoio técnico necessário para os meus experimentos.

A todos os profissionais do Hospital São José de Doenças Infecciosas que, direta ou indiretamente, colaboraram de alguma forma na coleta de pacientes para o projeto. Minha sincera e especial gratidão aos técnicos Francisco Antônio Coelho Neto, Vera Lúcia Ferreira, Maria Djanira Soares, Érica Sousa, Arislene Costa e Eriane Martinspor todo apoio, colaboração, carinho, acolhimento e ajuda; aos farmacêuticos-bioquímicos Pedro, Márcia Oriá, Darcielle Bruna Dias Elias, e seus estagiários Edwin e Jamille; aos funcionários do SAME, responsáveis pelos prontuários; aos recepcionistas Naiara e José; aos demais funcionários do laboratório por todo acolhimento no dia a dia, Marise Lima Lopes, Ruth, Maria dos Anjos, Rafaela Fontenele, Alana, Ângela.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação Sânia Brilhante, Cibelle Barreto, André Jalles, Danielle Macêdo, Tereza Bandeira, Fernanda Edna por abrirem as janelas do conhecimento com suas aulas e por me mostrarem o quão longe eu sempre posso ir.

À secretaria da pós-graduação Carolinda Vilma Soares de Oliveira, por toda atenção, cuidado, acolhimento e amizade desde muito antes de eu tentar a seleção, durante os momentos difíceis e até a conclusão do mestrado.

Aos meus colegas de mestrado que, com sua amizade, apoio e incentivo, deixavam meus dias sempre mais alegres e leves: Francisco Eliclécio, João Batista Andrade, Anderson Ramos, Daniel Domingues, Jamila Ricarte, Giovanna Riello, Cecília Leite e Crister Ocadaque.

Aos pacientes que aceitaram participar do projeto, que me permitiram, além da busca pelo conhecimento científico, estar ao lado deles oferecendo palavras de conforto, esperança e auxiliando-os durante e após o tratamento.

À Funcap, pelo apoio financeiro.

“O Senhor firmou os meus passos. Sobre
uma rocha me fez subir,
me deu força e coragem pra vence

Salmo 40

RESUMO

A Leishmaniose Visceral ou Calazar é uma doença crônica sistêmica, endêmica na região nordeste do Brasil, causada pelo protozoário parasita *Leishmania infantum chagasi* e

transmitida pela picada do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. Ao quadro de pancitopenia associa-se a ativação policlonal de linfócitos B, com altos níveis de imunocomplexos circulantes (ICC). O receptor para complemento tipo 1 (CR1/CD35) nos eritrócitos (CR1/E) e nos neutrófilos (CR1/N) faz a retirada de ICC. A expressão do CR1 nas células é modulada durante as doenças e tende a se normalizar após um período de remissão. A redução do CR1/E foi observada em doenças autoimunes e em patologias infecciosas crônicas, sendo correlacionada com níveis aumentados de ICC e com a gravidade do quadro clínico. Também já foi observada a redução do CR1/N em doenças autoimunes. Este estudo teve como objetivo investigar em indivíduos com Calazar, antes e após o tratamento, a expressão do CR1 em eritrócitos e leucócitos, por citometria de fluxo e dosar a quantidade de ICC, por ensaio imunoenzimático. No momento do diagnóstico, os pacientes, quando comparados com o grupo controle saudável, apresentaram uma redução na expressão do CR1/E, assim como na frequência de eritrócitos CD35⁺. Também ocorreu redução na expressão do CR1/N, sem redução da frequência de neutrófilos CD35⁺, enquanto nos linfócitos e monócitos ocorreu um aumento da expressão do CR1. Após o tempo médio de 24 dias de tratamento, as expressões do CR1/E e do CR1/N aumentaram significativamente, mostrando uma tendência à recuperação após o tratamento. A expressão do CR1 dos monócitos diminuiu e, a dos linfócitos mostrou uma tendência à normalização em relação aos controles. Antes do tratamento, em 66% dos pacientes, os níveis de ICC estavam aproximadamente nove vezes mais elevados e sem correlação com os valores de CR1/E. Após o tratamento, foi observada uma redução nos níveis de ICC nesses pacientes, contudo ainda mantendo-se acima do normal. Os resultados sugerem que as diferenças na expressão do número de CR1 nas populações celulares investigadas podem ser consideradas um fenômeno adquirido com a patologia, contudo sem correlação com os níveis de imunocomplexos circulantes.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral, eritrócitos, leucócitos, receptor para complemento tipo 1.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis or Kala-azar is a chronic systemic disease, endemic in northeastern Brazil, caused by the parasite *Leishmania infantum chagasi* and transmitted by the bite of the

sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Laboratory findings of pancytopenia are associated with polyclonal activation of B cells, with high levels of circulating immune complexes (CIC). The receptors for complement type 1 (CR1/CD35) in erythrocytes (CR1/E) and in neutrophils (CR1/N) have the function of CIC clearance. The expression of CR1 is modulated during diseases and tends to normalize after a period of remission. Reducing the CR1/E was observed in autoimmune diseases and chronic infectious diseases, being correlated with increased levels of CIC and the severity of symptoms. It has also been observed a reduction in the CR1/N in autoimmune diseases. This study aimed to investigate in patients with Kala-azar, before and after treatment, the expression of CR1 on erythrocytes and leukocytes by flow cytometry and measuring circulating immune complexes by enzyme immunoassay. At the moment of diagnosis, patients compared with the healthy control group showed a reduction in the expression of CR1/E, as well as the frequency of erythrocytes CD35⁺. There was also a reduction in the expression of CR1/N without reducing the frequency of neutrophils CD35⁺, while in lymphocytes and monocytes there was an increase in CR1 expression. After 24 days of treatment, the expression of CR1/E and CR1/N increased significantly, showing a tendency to recover after treatment. CR1 expression in monocyte decreased and CR1 expression in lymphocyte showed a tendency to normalization. Before treatment, 66% of patients, CIC levels were approximately nine times higher and no correlation with the expression of CR1/E. After treatment, a reduction in CIC was observed but the levels yet still remaining above the normal. The results suggest that differences in expression of the CR1 in erythrocytes and leukocytes may be considered a phenomenon acquired with pathology, but no correlation with the levels of circulating immune complexes.

Keywords: Visceral Leishmaniasis, erythrocytes, leukocytes, complement receptor type 1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –Situação de endemicidade da Leishmaniose Visceral pelo mundo, 2012.....	22
Figura 2 –Número de casos de Leishmaniose Visceral no Brasil, em 2012 e de incidência no Ceará, em 2013.....	22
Figura3 –Flebotomíneo transmissor da Leishmaniose Visceral (<i>Lutzomyia longipalpis</i>).....	24
Figura 4 –Formas amastigotas e promastigotas do parasita <i>Leishmania infantum chagasi</i>	25
Figura 5 –Ciclo de vida da <i>Leishmania sp.</i>	26
Figura 6 –Modelo de infecção experimental pela <i>Leishmania</i> no sangue humano.....	29
Figura 7 –Regulação da infecção da Leishmania pelas células dendríticas e macrófagos	31
Figura 8 –Esquema simplificado da ativação das três vias do Sistema Complemento.....	33
Figura 9 –Representação esquemática do CR1.....	36
Figura 10 –Esquema representativo das funções do receptor para complemento tipo 1 (CR1)	39
Figura 11 –Citograma e histogramas representativos da expressão do CR1/CD35 nos eritrócitos	51
Figura 12 –Gráficos de pontos representativos da expressão do CR1/CD35 nos eritrócitos	53
Figura 13 –Histogramas e gráficos de pontos representativos da expressão de CD59 nos eritrócitos	61
Figura 14 –Citograma mostrando a distribuição das populações leucocitárias por tamanho e granulosidade (FSC x SSC)	64
Figura 15 –Histogramas e gráficos de pontos representativos da expressão do CR1/CD35 nos linfócitos	66
Figura 16 –Histogramas e gráficos de pontos representativos da expressão do CR1/CD35 nos monócitos	70
Figura 17 –Histogramas e gráficos de pontos representativos da expressão do CR1/CD35 nos neutrófilos	74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –Distribuição das médias e desvios-padrões da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) do CR1/CD35 nos eritrócitos dos pacientes, antes e depois do tratamento, e do grupo de controle saudáveis.....	52
Gráfico 2 –Distribuição das médias e desvios-padrões da frequência do CR1/CD35 nos eritrócitos dos pacientes, antes e depois do tratamento, e do grupo de controles saudáveis.....	54
Gráfico 3 –Distribuição das médias e desvios-padrões das dosagens séricas de imunocomplexos circulantes nos pacientes antes e depois do tratamento	56
Gráfico 4 –Correlações entre a concentração de imunocomplexos antes e depois do tratamento e a mediana de intensidade de fluorescência do CR1/CD35 nos eritrócitos	57
Gráfico 5 –Correlações entre a concentração de imunocomplexos antes e depois do tratamento e a mediana de intensidade de fluorescência do CR1/CD35 nos neutrófilos	58
Gráfico 6 –Distribuição das médias e desvios-padrões da mediana de intensidade de fluorescência do CD59 nos eritrócitos dos pacientes, antes e depois do tratamento, e do grupo de controle saudáveis.....	62
Gráfico 7 –Distribuição das médias e desvios-padrões da frequência de eritrócitos positivos para o CD59 dos pacientes, antes e depois do tratamento, e do grupo de controles saudáveis.....	63
Gráfico 8 –Distribuição das médias e desvios-padrões da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) do CR1/CD35 nos linfócitos de pacientes, antes e depois do tratamento, e do grupo de controles saudáveis.....	67
Gráfico 9 –Distribuição das médias e desvios-padrões da frequência do CR1/CD35 nos	

Gráfico 10 – Distribuição das médias e desvios-padrões da mediana de intensidade de fluorescência do CR1/CD35 nos monócitos de pacientes, antes e depois do tratamento, e do grupo de controles saudáveis 71

Gráfico 11 –Distribuição das médias e desvios-padrões da frequência de monócitos positivos para o CR1/CD35 entre os pacientes antes e depois do tratamento e o grupo de controles saudáveis..... 72

Gráfico 12 –Distribuição das médias e desvios-padrões da mediana de intensidade de fluorescência do CR1/CD35 nos neutrófilos entre pacientes antes e depois do tratamento com o grupo de controles saudáveis..... 75

Gráfico 13 –Distribuição das médias e desvios-padrões da frequência de neutrófilospositivos para o CR1/CD35 entre os pacientes antes e depois do tratamento e o grupo de controles saudáveis..... 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Receptores para proteínas do sistema complemento	34
Tabela 2 –	Distribuição das frequências dos principais sinais e sintomas no momento da admissão dos pacientes	49
Tabela 3 –	Perfil hematológico dos pacientes antes e após o tratamento.....	50
Tabela 4 –	Distribuição das médias e desvios padrões dos pacientes quanto às dosagens de imunocomplexos circulantes, à mediana de intensidade de fluorescência do CR1/E, à frequência do CR1/E e ao número de eritrócitos, antes e depois do tratamento	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CR	Receptor para Complemento
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
FSC	<i>Forward scatter</i> (dispersão frontal)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Adquirida)
ICC	Imunocomplexos circulantes
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LHR	<i>Long Homologous Repeats</i>
MIF	Mediana de intensidade de fluorescência
NK	<i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PE	<i>Phycoerythrin</i> (Ficoeritrina)
PMN	Polimorfonucleares
SESA	Secretaria de Saúde
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida (<i>AIDS</i>)
SSC	<i>Side scatter</i> (dispersão lateral)
T reg	Célula T regulatória
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th	T <i>helper(auxiliar)</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 As Leishmanioses.....	20
2.1.1A Leishmaniose visceral	20
2.1.2 Epidemiologia.....	21
2.1.3 Vetor e Agente Etiológico.....	24
2.1.4 Sintomas, Diagnóstico e Tratamento	26
2.1.5 Resposta Imunológica na Leishmaniose Visceral	27
3.1 Os receptores de membrana para o componente C3 do Sistema Complemento.....	33
4.1 O receptor para complemento tipo 1 (CR1).....	35
4.1.1 Distribuição, Estrutura e Polimorfismo.....	35
4.1.2 Funções do receptor para complemento tipo 1.....	37
4.1.2.1 Regulação da cascata do Complemento	37
4.1.2.2 Eliminação de Imunocomplexos	37
4.1.2.3 Receptor para Fagocitose	38
4.1.2.4 Regulação das respostas das células B e T	38
4.1.3 O receptor para complemento tipo 1 em doenças humanas.....	39
5 HIPÓTESES.....	42
6 OBJETIVO GERAL.....	43
6.1 Objetivos Específicos.....	43
7 METODOLOGIA.....	44
7.1 Descrição do estudo.....	44
7.1.1 Tipo de estudo.....	44
7.1.2 População	44
7.1.2.1 Grupo de estudo	44

7.1.2.2 Grupo controle	44
7.1.3 Critérios de Inclusão.....	44
7.1.4 Critérios de Exclusão.....	44
7.1.5 Aspectos Éticos.....	45
7.1.6 Material Clínico e coleta de dados.....	45
7.1.7 Coleta de amostras.....	45
7.2 Delineamento Experimental.....	46
7.2.1 Processamento das amostras.....	46
7.2.1.1 Processamento dos eritrócitos.....	46
7.2.1.2 Processamento dos leucócitos	46
7.3 Quantificação do número de CR1 nas populações celulares por citometria de fluxo.....	47
7.3.1 Ensaio de citometria de fluxo	47
7.4 Dosagens Plasmáticas.....	47
7.4.1 Dosagem de imunocomplexos circulantes por ensaio imunoenzimático.....	47
7.5 Análises Estatísticas	48
8 RESULTADOS.....	49
8.1. Pacientes, Controles, Evolução Clínica	49
8.2 Expressão e distribuição da frequência do CR1/CD35 na membrana dos eritrócitos.....	50
8.3 Dosagem de Imunocomplexos Circulantes.....	55
8.4Características clínicas dos pacientes pós-tratamento e análise da dosagem de imunocomplexos relacionada à expressão do CR1 dos eritrócitos e ao número de eritrócitos no sangue circulante.....	59

8.5 Expressão e distribuição da frequência do CD59 na membrana dos eritrócitos.....	60
8.6 Expressão e distribuição da frequência do CR1/CD35 na membrana d leucócitos.....	61
8.6.1.	<i>Linfócitos</i>
.....	65
8.6.2. Monócitos.....	69
8.6.3. Polimorfonucleares – Neutrófilos.....	73
9 DISCUSSÃO	78
10 CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniosevisceral (LV) ou Calazar é uma zoonose que pode acometer o homem quando ele entra no ciclo de transmissão do parasita causador, a *Leishmania infantum chagasi*. É uma doença tropical, negligenciada e que está amplamente distribuída pelo mundo. Apresenta alta incidência e pode ser fatal, principalmente em crianças desnutridas e em indivíduos não tratados. OCalazar apresenta uma expansão no seu comportamento epidemiológico, onde há uma tendência crescente por conta da urbanização e das condições higiênico- sanitárias- nutricionais inadequadas.

A *Leishmania infantum chagasi* é um parasita intracelular obrigatório que possui como alvo as células do sistema monocítico fagocitário, principalmente os macrófagos do baço, da medula óssea e do fígado. Após a picada do flebotomíneo infectado (*Lutzomyia longipalpis*) ocorre a transmissão das promastigotas. Os neutrófilos recrutados são as primeiras células a interagirem com as promastigotas e a se infectarem. Ocorre, então, a ligação de anticorpos anti-*Leishmania* IgM na superfície do parasita e a ativação da via clássica do complemento com deposição do componente protéico C3b. Esses eventos ativam o mecanismo de imuno-adesão entre as promastigotas opsonizadas e o receptor para complemento tipo 1 (CR1) presente na membrana dos eritrócitos. Os eritrócitos, por sua vez, irão transferir o parasita para granulócitos, monócitos e macrófagos.

O desenvolvimento da doença pode depender de diversos fatores, como as características genéticas do hospedeiro, a virulência da espécie infectante, o meio ambiente, os padrões imunológicos, nutricionais e clínicos dos pacientes. Pacientes com susceptibilidade à Leishmaniose visceral apresentam uma tendência à resposta imune celular do tipo Th2, com elevados níveis das citocinas IL-4 e IL-10, que levam à ativação policlonal das células B, à hipergamaglobulinemia e à formação de elevados títulos de imunocomplexos circulantes (ICC).

O CR1 medeia a adesão dos ICC associados ao complemento com os eritrócitos e os leucócitos.Diversas doenças infecciosas e autoimunes têm sido correlacionadas com a redução da expressão do CR1 nos eritrócitos, ao polimorfismo genético da molécula, ao aumento dos ICC e à gravidade da doença, mostrando ser uma perda adquirida por diversos mecanismos ainda não elucidados.Foi investigada a expressão dessa molécula nos eritrócitos e leucócitos de pacientes com Calazar, antes e após o tratamento, bem como correlacionamos os resultados com os níveis de imunocomplexos encontrados nesses dois momentos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AS LEISHMANIOSES

A leishmaniose é uma das doenças tropicais mais negligenciadas do mundo. Atinge, em sua maioria, a população mais pobre nos países em desenvolvimento (WHO, 2010). Segundo o Programa Regional das Leishmanioses da Organização Panamericana da Saúde, da Organização Mundial da Saúde (OPAS-OMS), mais de 12 milhões de pessoas estão infectadas com algum tipo de leishmaniose e 350 milhões estão em áreas de risco (WHO, 2014).

As leishmanioses apresentam-se como um espectro de quatro manifestações clínicas, de lesões cutâneas à leishmaniose visceral sistêmica, onde essa distinção está associada a diferentes graus de disseminação do parasita: cutânea (LC), mucocutânea (LMC), visceral (LV) e leishmaniose cutânea pós-calazar (PKDL) (CHAPPUIS *et al.*, 2007; Mc CALL *et al.*, 2013).

A respeito do papel da *Leishmania* na infecção e a diversidade das manifestações é conhecido que cada espécie possui seu próprio tropismo e formas clínicas específicas. Diversos estudos têm relacionado o polimorfismo genético da *Leishmania* ao tropismo observado no parasita ou à evasão ao sistema imune. Tais genes podem codificar proteínas envolvidas na interação patógeno-hospedeiro e na sobrevivência do patógeno nos macrófagos. Esses genes podem ser também bons candidatos para a análise funcional do seu papel no estabelecimento da infecção ou nas manifestações específicas da doença. A predisposição genética, os estados nutricionais e imunofisiológicos do hospedeiro também são fatores importantes para o desenvolvimento da doença e suas diversas manifestações clínicas. Como a *Leishmania* causa a doença e o porquê dessas manifestações não está totalmente claro ainda (BAÑUS *et al.*, 2011).

2.1.1. A Leishmaniose visceral

Dependendo das características da transmissão, podem existir três formas de Leishmaniose visceral: a forma zoonótica, com os cães como reservatório principal; a forma antroponótica, com a transmissão homem-homem, através do inseto vetor, sem reservatório

animal; e a antropozoonótica, quando o homem entra no complexo ciclo de transmissão entre o vetor e o cão (VAN GRIENSVEN e DIRO, 2012).

O primeiro registro de Leishmaniose visceral no Brasil foi em 1913, quando Migone, no Paraguai, descreveu o caso de um paciente oriundo de Mato Grosso. Outros 41 casos positivos para *Leishmania* foram identificados no mesmo período a partir de lâminas de viscerotomias de pacientes falecidos em outras regiões do Brasil (BRASIL, 2014).

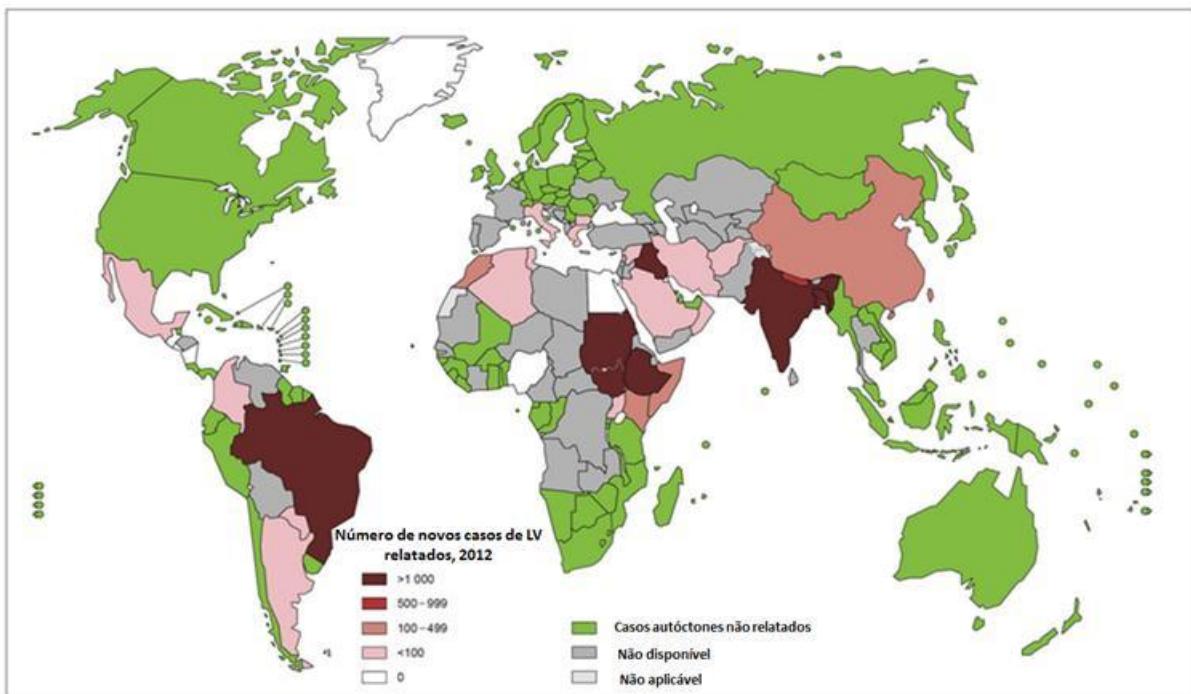
A doença era considerada predominantemente rural. No entanto, devido aos intensos processos de urbanização e desmatamento, atinge, hoje, os médios e grandes centros, tornando-se um grave problema de saúde pública, levando a uma considerável morbidade e mortalidade (CAVALCANTE, 2014). Percebe-se que as regiões mais pobres e com poucas condições higiênico-sanitárias são as mais propícias para a ocorrência da doença(BRASIL, 2014).

2.1.2 Epidemiologia

O Brasil é um dos seis países que concentram 90% dos casos encontrados de Leishmaniose visceral, onde fazem parte também países como a Etiópia, Índia, Bangladesh, Sudão do Sul e Sudão (Figura 1). Anualmente, são diagnosticados em média 4 mil casos, com índice de mortalidade de 7% (WHO, 2014).Segundo a Organização Mundial de Saúde, 310 milhões de pessoas no mundo estão em risco de infecção pela doença, com uma estimativa de 200 a 400 mil novos casos por ano (WHO, 2015).

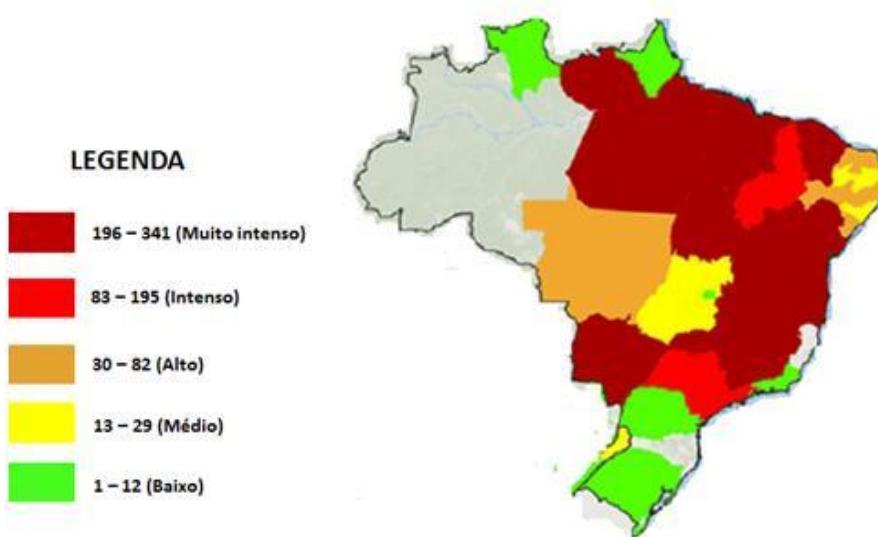
No Brasil, em 2013, foram registrados casos autóctones em 21 estados, sendo que há uma maior prevalência de casos na região nordeste e um menor número de casos na região sul. Nesse ano, a taxa de letalidade foi de 7,1%. No Ceará, os primeiros casos datam da década de 30 e, após a década de 1980, houve uma continuidade dos casos relatados. Em 2014, foram registrados 204 casos confirmados de Calazar, em 62 municípios, com 13 óbitos (Figura 2). Os municípios que registraram o maior número de casos foram Fortaleza, Sobral, Caucaia, Maracanaú, Uruoca, Maranguape e Eusébio (SESA-CE, 2014).

Figura 1 - Situação de endemicidade da Leishmaniose Visceral pelo mundo, 2012.

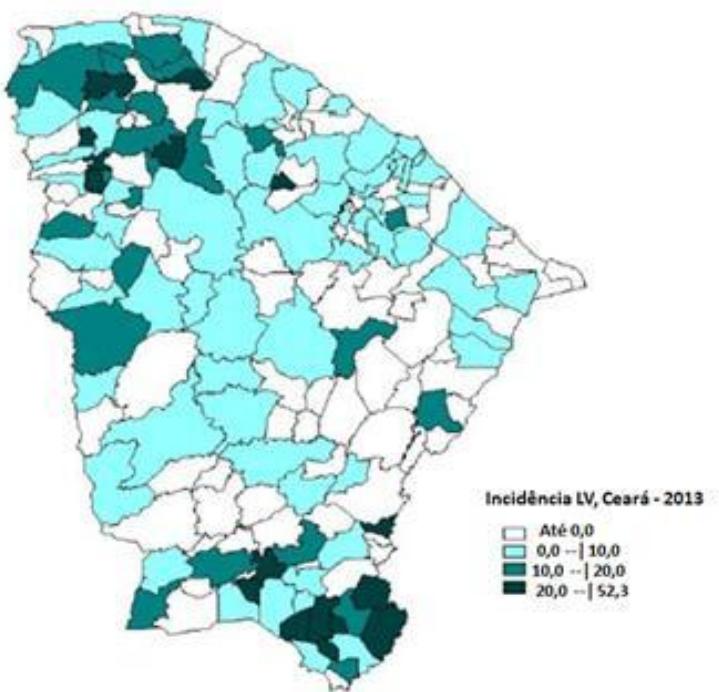


Fonte:http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_VL_2013.png?ua=1

Figura 2–Número de casos de Leishmaniose Visceral no Brasil, em 2012 e de incidência no Ceará, em 2013.



Fonte: OPAS/OMS. SisLeish: Dados reportados pelos Programas Nacionais.



Fonte: SESA. Atualizado em 31/07/2014

A doença é mais frequente em crianças, fato relacionado ao estado nutricional, que, se insuficiente, pode prejudicar a imunidade inata e as funções das células T (HUGHES e KELLY, 2006); em adultos jovens do sexo masculino, uma vez que mudanças hormonais após a puberdade predispõe a uma susceptibilidade maior à Leishmaniose visceral (NYLÉN e SACKS, 2007); em idosos e em pacientes com coinfecções, como o HIV (WHO, 2015; BRASIL, 2014).

Esforços têm sido feitos com o objetivo de controlar os casos de leishmaniose pelo mundo. As medidas ainda se limitam à identificação e eliminação dos reservatórios infectados, principalmente o cão; a aplicação de inseticidas para o inseto vetor; o diagnóstico e o tratamento dos pacientes. Essas são estratégias ainda pouco eficientes e novos caminhos devem ser tomados a fim de diminuir as mortes e os casos pelo mundo.

Uma compreensão dos fatores que desencadeiam a Leishmaniose visceral poderá ajudar a identificar os melhores alvos para novos medicamentos, imunomoduladores, marcadores epidemiológicos para virulência e potenciais vacinas. Essas estratégias juntas ajudarão a eliminar a doença e isso terá um impacto significante nas regiões mais pobres dos países endêmicos (McCALL, 2013).

2.1.3 Vetor e Agente Etiológico

O vetor primário da Leishmaniose visceral é a fêmea do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Figura 3), que transmite o agente etiológico, a *Leishmania infantum chagasi*, ao fazer o repasto sanguíneo. O flebotomíneo adulto, que mede de 2 a 4 mm, possui hábitos noturnos e o corpo revestido por pelos claros. Há indícios de que ocorre uma maior transmissão da doença após um período de chuvas, devido ao aumento populacional de flebotomíneos (BRASIL, 2014). Cães domésticos, gambás, preguiças e raposas estão na lista dos demais reservatórios mamíferos (PIGOTT *et al.*, 2014). Transmissões raras já foram relatadas, como uso de drogas intravenosas, transfusão sanguínea, transplante de órgãos e acidentes laboratoriais (revisto em GRIENSVEN, 2012). A possibilidade de transmissão transplacentária ainda é um pouco controversa (BRASIL, 2009).

O flebotomíneo lacera os vasos sanguíneos durante a sua alimentação, introduzindo os parasitas intradermicamente (BATES, 2007). A saliva do vetor também tem um importante papel na transmissão da *Leishmania*, uma vez que ela é rica em componentes vasodilatadores, que aumentam o fluxo sanguíneo no local da picada e imunossupressores, que de alguma forma, modulam o desenvolvimento da doença (WARBURG *et al.*, 1994).

Figura 3 – Flebotomíneo transmissor da Leishmaniose visceral (*Lutzomyia longipalpis*).

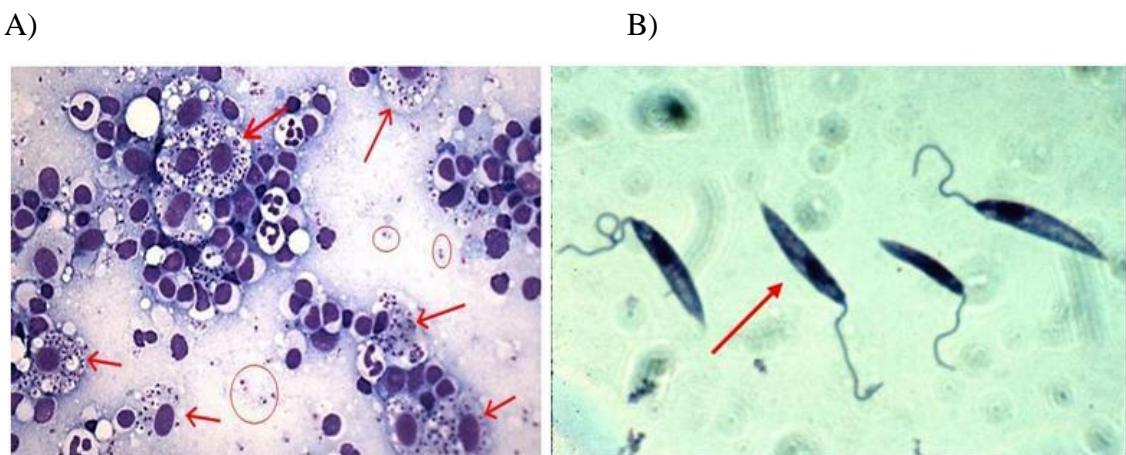


Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/Lutzomyia>

A *Leishmania* possui um ciclo de vida dimórfico, ou seja, são possíveis duas morfologias diferentes de acordo com o hospedeiro: a forma infectante promastigota (forma alongada, delgada, com um flagelo livre), encontrada no vetor; e a forma amastigota (forma

oval, sem flagelos externos), que se desenvolve no hospedeiro mamífero(Figura 4) (MURRAY, 2005).

Figura 4 - Formas amastigotas e promastigotas do parasita *Leishmania infantum chagasi*.



Fonte: Universidade Federal de Minas Gerais

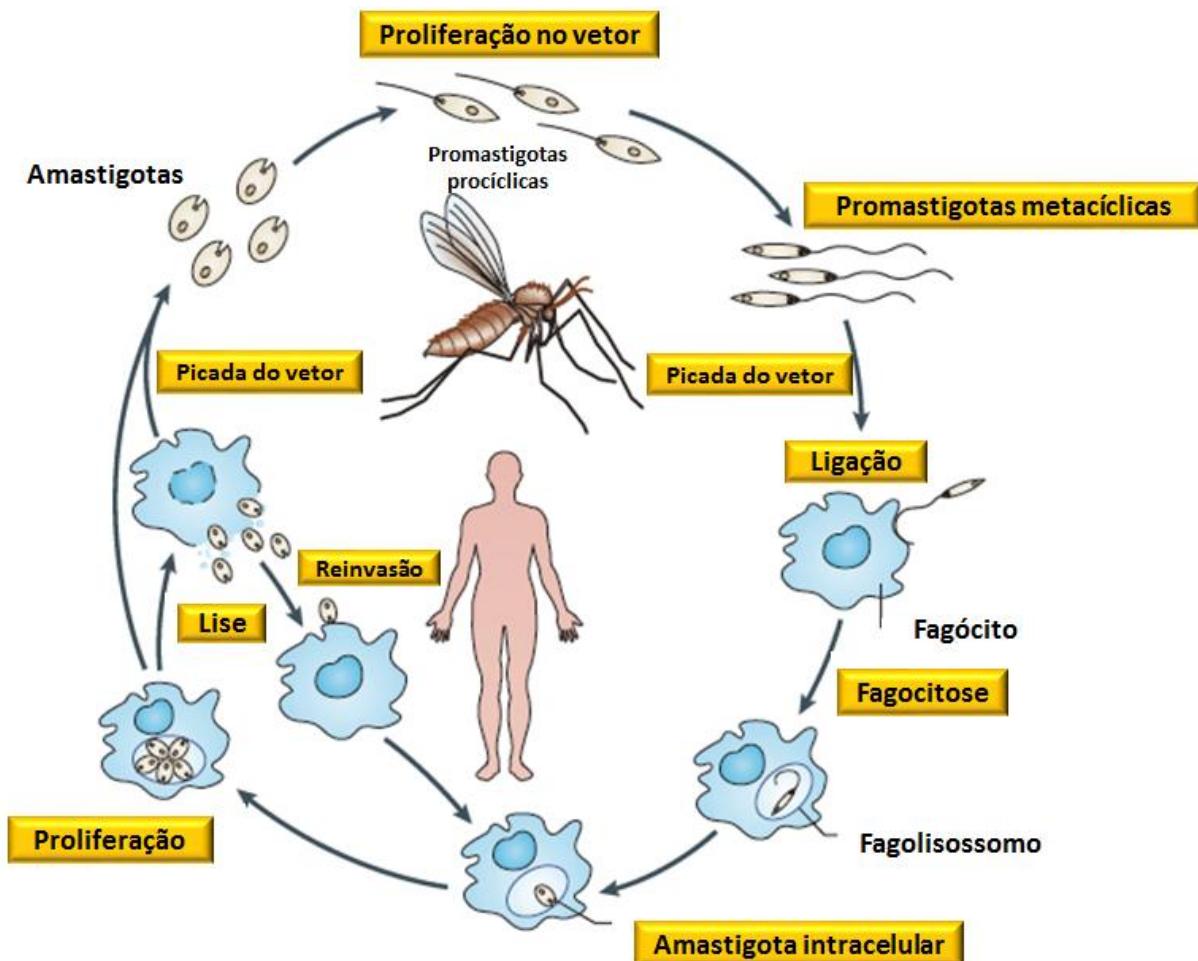
Na figura A: esfregaço de medula óssea corado por Giemsa evidenciando macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania* (setas vermelhas). Em B, cultura de medula óssea com promastigotas livres (seta vermelha).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas se alimentam de sangue de mamíferos infectados. As formas amastigotas encontram-se dentro dos macrófagos e, no trato digestivo anterior do inseto, são liberadas após o rompimento dessas células. As amastigotas reproduzem-se por divisão binária, transformando-se em promastigotas. Estas formas permanecem na faringe do vetor, onde se diferenciam em promastigotas metacíclicas, as formas infectantes.

A infecção no homem inicia-se quando ocorre a inoculação das promastigotas através da picada do flebotomíneo ao fazer um novo repasto sanguíneo, juntamente com a saliva do inseto. As promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos, onde se diferenciam em amastigotas e se multiplicam dentro do fagolisossomo. Amudança de promastigota para amastigota é uma estratégia de evasão à ação do sistema imune do hospedeiro. No interior do vacúolo parasítóforo, as formas amastigotas multiplicam-se intensamente até o rompimento dos macrófagos, ocorrendo, então a disseminação hematogênica e a infecção de outras células.

fagocitárias em outros tecidos, como o fígado, o baço, os linfonodos e a medula óssea (MURRAY, 2010; VAN GRIESVEN 2012; BRASIL, 2014) (Figura 5).

Figura 5 - Ciclo de vida da *Leishmania sp.*



Fonte: Adaptado de Kaye (2007).

2.1.4. Sintomas, Diagnóstico e Tratamento

O período de incubação da Leishmaniose visceral pode variar de 2 a 6 meses. Durante esta fase, a doença pode tornar-se assintomática, com possível cura espontânea, ou apresentar uma sintomatologia discreta que aos poucos pode evoluir quanto à intensidade e à gravidade.

A evolução da doença está relacionada ao tempo de busca por tratamento, ocasionando o aparecimento de sinais e sintomas como a febre intermitente e/ou irregular, perdas de peso e

de apetite, anemia, adinamia, hipergamaglobulinemia, pancitopenia, palidez cutâneo – mucosa, hepatoesplenomegalia com distensão abdominal, alterações ou não nas enzimas hepáticas, diarreia devido à parasitização e ulceração dos intestinos, tosse não produtiva, hemorragias relacionadas à trombocitopenia (epistaxe, petequias, gengivorragia), edema de membros inferiores, infecções bacterianas, complicações renais, sepse e morte (BRASIL, 2014; KUMAR *et al*, 2012).

O método padrão-ouro para o diagnóstico da Leishmaniose visceral é a demonstração do parasita (forma amastigota) em aspirado de medula ou do baço através de exames parasitológicos direto (esfregaços) ou indireto (cultura). O diagnóstico pode ser também imunológico através da imunofluorescência indireta (RIFI), do ensaio imunoenzimático (ELISA), do *imunoblotting*; e do molecular, como a reação em cadeia de polimerase. Nos últimos anos, tornou-se popular o teste imunocromatográfico com o antígeno recombinante K39 (rK39) para a detecção de anticorpos IgG anti-K39. É um teste mais barato, mais rápido, e de fácil execução e disponibilidade (SRIVASTANA *et al*, 2011; KAYE *et al*, 2011; GRIENSVEN *et al*, 2012; BRASIL, 2014). Independente do método utilizado, sempre se faz necessário avaliar as questões epidemiológicas e clínicas do paciente para que o correto diagnóstico seja realizado.

A maioria dos casos de Calazar são tratáveis. No tratamento devem ser administrados drogas leishmanicidas, além de utilizar estratégias para combater qualquer infecção bacteriana, a anemia, a hipovolemia e a desnutrição. As drogas mais utilizadas são os antimoniais pentavalentes, sendo as disponíveis no Brasil o Glucantime®, a Anfotericina B desoxicolato e a Anfotericina B lipossomal, sendo esta última considerada a droga mais potente e com menor toxicidade (CHAPPUIS *et al*, 2007; BRASIL, 2014). A escolha de qual droga será administrada em um paciente está relacionada com a gravidade da doença, a idade, a presença de gravidez, de comorbidades e o perfil de toxicidade da droga (BRASIL, 2011).

2.1.5 Resposta Imunológica na Leishmaniose visceral

A maioria das pessoas que são infectadas pela *Leishmania* não desenvolve a doença e as razões que influenciam a susceptibilidade giram em torno de fatores genéticos, tanto do hospedeiro quanto do parasita, e ambientais. Muitos modelos experimentais que já foram utilizados para avaliar a resposta imune na Leishmaniose visceral mostraram que há uma elevação dos níveis de citocinas dosadas (ANSARI *et al*, 2006; NYLÉN *et al*, 2007), o que

indica que o sistema imune responde efetivamente à infecção. A resposta imunológica do hospedeiro para combater a infecção pela *Leishmania* se mostra bastante complexa, com o envolvimento de diversas células e produção de citocinas que direcionam à resistência ou à suscetibilidade ao parasita.

Para compreender o processo de infecção da *Leishmania*, é necessário caracterizar os eventos pós inoculação até a entrada final nos macrófagos. Essas etapas foram caracterizadas em diversos estudos *ex vivo*, com sangue humano, e *in vivo*, através de modelos animais.

A membrana da forma metacíclica da promastigota é constituída de um glicocálix importante para a sua sobrevivência e para a patogenia, incluindo o lipofosfoglicano, a metaloproteinase gp63, o proteofosfoglicano e lipídios glicofosfatidilinositol que agem como proteases no hospedeiro (FRANCO, 2012).

O mecanismo pelo qual as promastigotas são opsonizadas ainda é um pouco controverso, pois alguns dados indicam que a ativação do sistema complemento se dá pela Via Clássica, mas outros ensaios indicam que seja anticorpo-independente (DOMÍNGUEZ, 2002). A ativação do complemento seria mediada por proteases das promastigotas, LPG e gp63, que levariam à geração das opsoninas C3b, convertidas em seguida em iC3b, e que se depositariam na superfície do parasita. Posteriormente, a C5 convertase seria gerada, para dar início à formação do complexo de ataque à membrana do parasita (revisto em DOMÍNGUEZ *et al*, 1999; FRANCO, 2012). A presença dos componentes quimiotáticos C3a e C5a promoveria uma inflamação, atraindo neutrófilos e monócitos/macrófagos para o local da infecção (GONÇALVES *et al*, 2011).

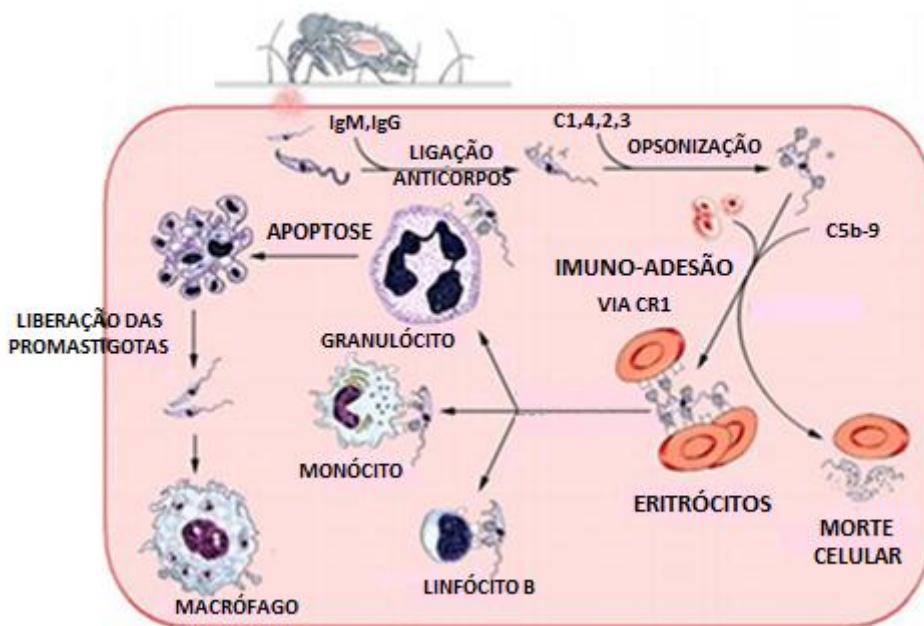
Segundo Moreno, anticorpos IgM anti-*Leishmania* opsonizam a promastigota imediatamente após a interação com o sangue do hospedeiro, ativando a via clássica (MORENO *et al*, 2010). Quando o complemento é ativado, a destruição massiva dos parasitas extracelulares aparentemente ocorre nos primeiros estágios da infecção. Entretanto, esses mesmos componentes atuam na opsonização do parasita e na sua interação com os macrófagos, contribuindo fortemente para a evasão e a progressão do processo infeccioso (GOTO *et al*, 2013).

O mecanismo de infecção desse parasita foi determinado através de análises de um modelo de infecção *ex vivo* pela *Leishmania* em sangue humano, antes da fagocitose propriamente dita pelos macrófagos. As promastigotas opsonizadas pelo C3b ligam-se ao receptor para complemento tipo 1 (CR1) dos eritrócitos por um mecanismo denominado imuno-adesão (DOMÍNGUEZ *et al*, 1999).

Para a *Leishmania*, sua ligação à IgM é um pré-requisito para a opsonização. A promastigota ligada ao C3b é o complexo-ligante envolvido na adesão aos eritrócitos que, consequentemente, facilita a transferência do parasita para granulócitos, monócitos e linfócitos B, causando a infecção primária dessas células. Além das promastigotas, as formas amastigotas de *Leishmania* opsonizadas também se ligam aos eritrócitos, sugerindo que a imuno-adesão facilita a disseminação do parasita no hospedeiro. A infecção pode ser também disseminada quando granulócitos parasitados tornam-se apoptóticos, liberando as promastigotas que serão fagocitadas por outros macrófagos recrutados (DOMÍNGUEZ *et al*, 1999; MORENO *et al*, 2010).

Segundo esse modelo experimental de infecção, o CR1 é considerado um fator primordial na invasão do parasita, bem como ficou provado que, sob condições fisiológicas, na infecção pela *Leishmania*, as promastigotas ativam o sistema complemento apenas através da via Clássica(FIGURA 6).

Figura 6 – Modelo de infecção experimental pela *Leishmania* no sangue humano.



Fonte: Moreno (2010 - adaptado).

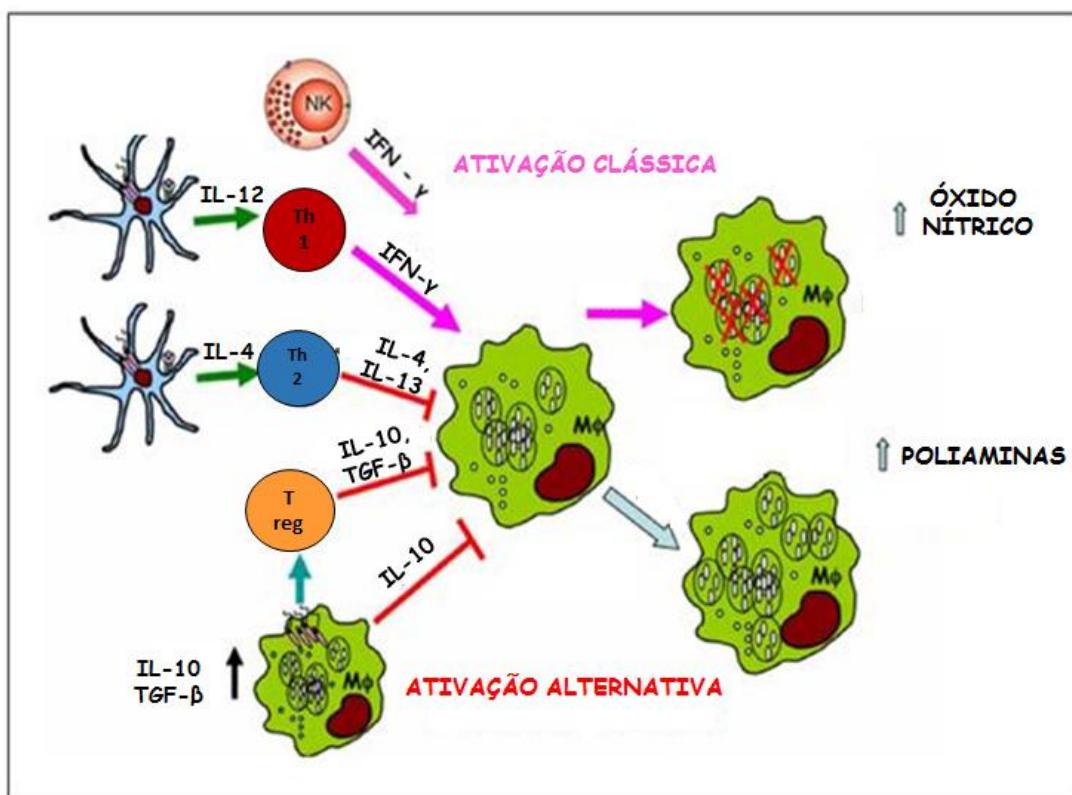
A ligação das promastigotas opsonizadas permite que as células B apresentem os抗ígenos para monócitos e macrófagos via receptor para complemento tipo 2 (CR2) (LINDORFER *et al.*, 2003). As promastigotas são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos e os neutrófilos. Uma vez que os neutrófilos têm um ciclo de vida curto, os macrófagos recrutados fagocitam os parasitas livres e neutrófilos infetados/apoptóticos.

Os macrófagos tornam-se as células definitivas para a replicação do parasita, bem como as células responsáveis pela sua destruição. A promastigota necessita do receptor para complemento tipo 1(CR1)para mediar a sua ligação aos macrófagos (DA SILVA *et al.*, 1989) e, também, do receptor tipo 3 (CR3),para a fagocitose (KANE *et al.*, 2001), além de contarem com a colaboração dos lipofoglicanos da sua superfície e a gp63 (YAO *et al.*, 2003).

A destruição dos parasitas fagocitados pelos macrófagos depende de dois mecanismos de ativação dessas células: as ativações clássica e alternativa. A primeira é mediada pelos produtos das células Th1 e *natural killer* (NK), como o interferon-gama (IFN- γ). O IFN- γ estimula os macrófagos a produzirem iNOS, uma enzima que catalisa a L-arginina para gerar óxido nítrico (NO), tóxico para a *Leishmania* (LIEW *et al.*, 1990).

A segunda via é induzida pelos produtos das células Th2, a IL-4 e a IL-13. A IL-4 induz a biossíntese de poliamina, que favorece a sobrevivência do parasita nos macrófagos (GORDON, 2003; KROPF *et al.*, 2005). Dessa forma, como resultado, as defesas dos macrófagos, como o dano oxidativo, a apresentação de抗ígenos, a ativação imune e a apoptose são comprometidas(PODINOVSKAIA *et al.*, 2015). Células T regulatórias (Treg) e macrófagos infectados também produzem citocinas regulatórias, como a IL-10 e o TGF- β , que desativam os macrófagos, levando à sobrevivência do parasita (revisto por LIU *et al.*, 2012) (Figura 7).

Figura 7 – Regulação da infecção da *Leishmania* pelas células dendríticas e macrófagos.



Fonte: Liu (2012- adaptada).

No complexo mecanismo de defesa contra a *Leishmania* está bem definido que os macrófagos e as células dendríticas desempenham o papel de iniciação, desenvolvimento e manutenção da imunidade protetora. A produção de IL-12 pelas células dendríticas inicia a polarização das células Th0 no subtipo Th1e consequente produção de IL-12. Essa citocina gera uma resposta protetora pela indução das atividades das células NK, células que conectam as respostas imunes inata e adaptativa através da produção de IFN- γ e TNF- α (LIESE et al, 2007; VON STEBULT et al, 1998).

Macrófagos ativados na presença de imunocomplexos e/ou infectados por *Leishmania* regulam positivamente a secreção de IL-10 (SUTTERWALA, 1998), não secretam IL-12 (SUTTERWALA, 1997), e, consequentemente, tornam-se incapazes de estimular a resposta

antígeno-específica para as células CD4⁺ Th1 (KIMA *et al.*, 1996). O mecanismo exato que direcionaria a diferenciação de células T CD4⁺ virgem Th1 (resistência) ou Th2 (susceptibilidade) não está bastante claro, mas pode estar direcionada às citocinas transcritas nas primeiras horas após a infecção (SOKOL *et al.*, 2008). Os resultados clínicos desfavoráveis em um paciente não estão relacionados a uma resposta Th2 dominante ou a um defeito na resposta Th1, mas que algum mecanismo imunossupressor ou estratégias de evasão do sistema imune utilizadas pelo parasita contribuem para a patogênese (NYLÉN *et al.*, 2007).

Pacientes com Leishmaniose visceral ativa possuem elevados níveis de IL-10 no soro, bem como uma aprimorada expressão de mRNA para essa citocina. A IL-10 pode ser secretada por diferentes células durante a infecção pela *Leishmania*, como as células Treg, células B, células Th1, células T CD8⁺, NK, macrófagos e neutrófilos. Os altos níveis de IL-10 podem diminuir os danos tissulares, ao mesmo tempo que promovem a replicação, a disseminação do parasita e a progressão da doença (ANDREANI *et al.*, 2015).

As principais atividades da IL-10 que justificam seu papel de promover a doença são sua capacidade de afetar a ativação da via clássica dos macrófagos, por torná-los insensíveis aos sinais do IFN- γ , inibições da explosão respiratória e a regulação negativa de citocinas inflamatórias, como o TNF- α e o NO, essenciais para a morte do parasita (revisto em NYLÉN *et al.*, 2007).

A IL-10 também pode suprimir a apresentação de抗ígenos das células dendríticas e dos macrófagos, diminuir a expressão de moléculas MHC II e co-estimulatórias e, principalmente, inibir a produção de IL-12, que inibirá a geração e/ou a manutenção das células Th1 antígeno-específicas.

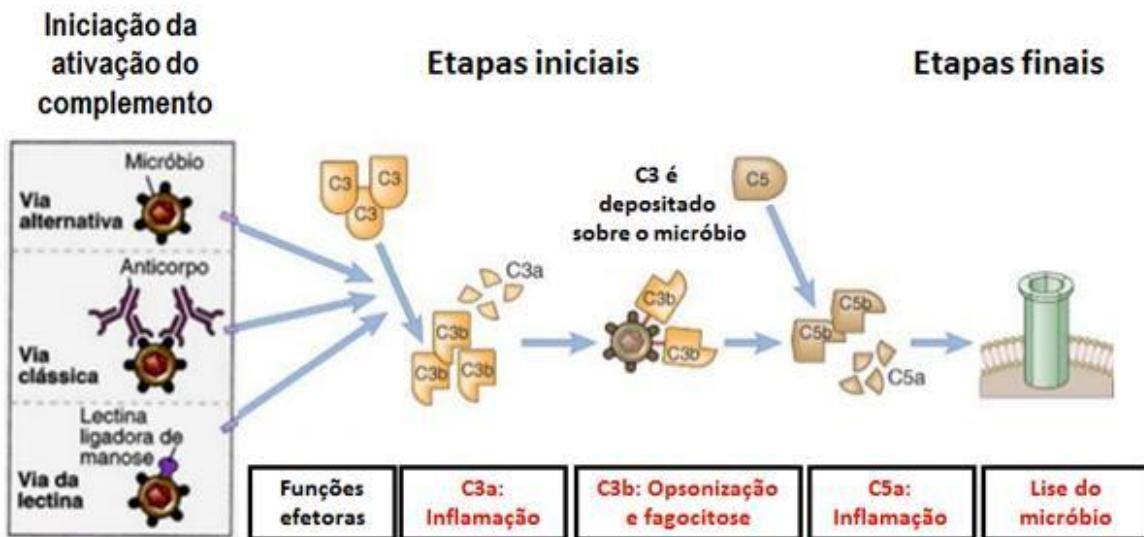
Ativação policlonal das células B, com consequente hipergamaglobulinemia de IgM e IgG, e altos níveis de imunocomplexos circulantes (ICC) que contêm抗ígenos de *Leishmania* ligados a auto-anticorpos características marcantes da Leishmaniose visceral e podem causar dano tecidual (revisto em SINGH *et al.*, 2014; FALEIRO *et al.*, 2014). Esses ICC podem estimular os macrófagos e monócitos a produzirem mais IL-10 e TNF- α , uma regulação que gerará mais imunocomplexos e mais IL-10 (ELSHAFIE *et al.*, 2007; NYLÉN *et al.*, 2007).

3.1 Os receptores de membrana para o componente C3 do Sistema Complemento

O Sistema Complemento representa um grupo de mais de 30 proteínas plasmáticas e de receptores de membrana que atuam, primordialmente, na resposta imune inespecífica (revisto por DUNKELBERGER, 2010). Essas proteínas são organizadas em cascatas proteolíticas e ativadas com o reconhecimento de algum patógeno. A partir deste evento, surgem as funções inatas desse sistema, que são a geração de componentes inflamatórios (anafilatoxinas), a inflamação, a opsonização, a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) para a destruição do patógeno e o desenvolvimento da imunidade adaptativa (revisto por DUNKELBERGER *et al*, 2010; CARROL, 2008).

O C3b é a molécula mais importante do Sistema Complemento, uma vez que interliga as três vias de ativação desse sistema: Clássica, Alternativa e das Lectinas. Essas 3 vias formam a sua respectiva C3 convertase, que quebra o C3 em C3a (fator quimiotático) e C3b (opsonina), e é o momento em que todas as vias de ativação do complemento convergem (revisto em GOTO *et al*, 2013). Quando o C3 é clivado em C3b, a ligação interna tioéster fica exposta, permitindo a ligação covalente estável do C3b ao grupo hidroxil de carboidratos e proteínas próximos. Essa atividade está na base de todo o Sistema Complemento e que gera os eventos subsequentes necessários para a destruição do patógeno e ou a ativação da imunidade adaptativa (VOLANAKIS *et al*, 1998) (Figura 8).

Figura 8 – Esquema simplificado da ativação das três vias do Sistema Complemento.



Fonte: Abbas, et al, 2008.

O complemento é considerado o fator chave responsável pela coordenação dos eventos durante a resposta imune, facilitando a identificação e a localização do antígeno. Através das interações dos produtos ativados pelos componentes do complemento e seus respectivos receptores, ocorre o direcionamento dos leucócitos para o local da inflamação pela liberação de quimiocinas; promoção da fagocitose; eliminação de imunocomplexos da circulação; a indução da resposta primária e ativação das células B aos antígenos; proliferação; apoptose e memória imunológica, sendo, então uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa (COLE *et al*, 2003).

O grupo de receptores do Sistema Complemento pode ser dividido em três categorias: os reconhecedores das anafilatoxinas (C3a e C5a); os que se ligam ao fragmento C3 ativado (C3b) e seus produtos de degradação (iC3b, C3dg) e os receptores para o componente C1q (revisto por LESLIE, 2001). Quatro receptores para complemento já foram descritos (Tabela 1).

Tabela 1 – Receptores para proteínas do sistema complemento.

RECEPTOR	LIGANTE	DISTRIBUIÇÃO	FUNÇÕES
CR1	C3b, C4b, iC3b	Eritrócitos, células fagocíticas, células B, alguns linfócitos T	Promoção da fagocitose, eliminação de ICC, co-fator para o Fator I, regulação da ativação do SC.
CR2	C3d, iC3b, C3dg	Linfócitos B maduros, células dendríticas foliculares	Co-receptor de ativação das células B, regulação da ativação do SC.

CR3/CR4	iC3b	Células fagocíticas profissionais	Mediar a fagocitose, promover a ativação de células T e aumentar a apresentação de抗ígenos.
---------	------	-----------------------------------	--

Fonte: revisto por Liu *et al*, (2009);Leslie (2009).

A cascata do complemento é regulada por proteínas plasmáticas e por receptores de membrana a fim de evitar o ataque autólogo e possíveis danos ao organismo. Essas funções são desempenhadas a nível da ativação das convertases, tanto na montagem e na atividade dessas enzimas quanto na montagem do complexo de ataque à membrana (CAM) (LISZEWSKI *et al*, 1996). Esses fatores incluem a proteína cofatora de membrana (*membrane cofactor protein* = MCP ou CD46), o fator acelerador de decaimento (*decay accelerating factor* = DAF ou CD55), inibidor da formação do CAM(CD59), fator H e o receptor para complemento tipo 1 (CR1)(revisto por STOUTE, 2011). CD55, CD59 e o CR1 são encontrados na membrana dos eritrócitos e são responsáveis pelas propriedades reguladoras dessas células (revisto por STOUTE, 2005).

4.1 O receptor para complemento tipo 1 (CR1)

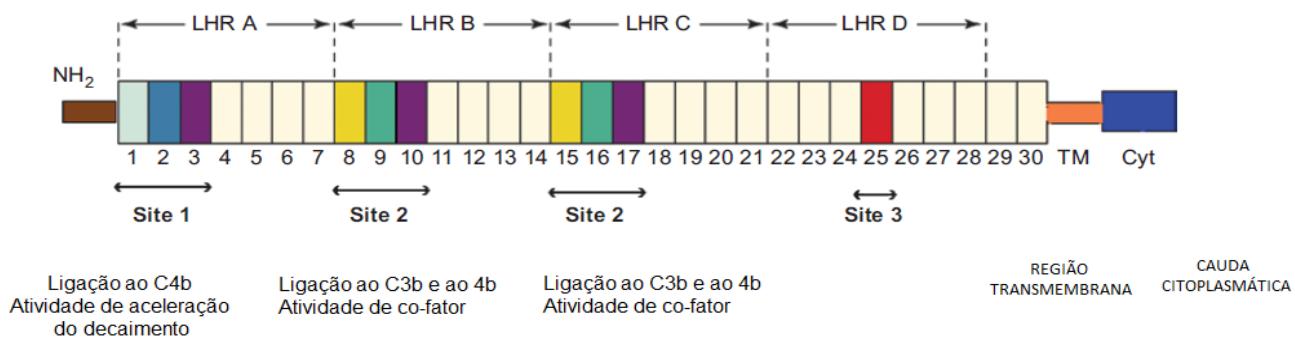
O receptor para complemento tipo 1, também chamado de CD35, é uma glicoproteína de membranamultifuncional,que pertence à família das proteínas reguladoras da atividade do sistema complemento (revisto em LIU *et al*, 2009). A primeira descrição do CR1 aconteceu em 1973, quando Fearon identificou e caracterizou o primeiro receptor para complemento após dar continuidade aos estudos de 1953, realizados por Nelson, de imuno-adesão, fenômeno que envivia os eritrócitos e microrganismos (revisto em LINDORFER *et al*, 2001).

4.1.1 Distribuição, Estrutura e Polimorfismo

O CR1 está expresso na membrana plasmática de uma grande variedade de células, como os eritrócitos, neutrófilos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, linfócitos B, algumas subpopulações de linfócitos T, células de Langerhans da pele, podócitos glomerulares e células dendríticas (revisto por KHERA, 2009).

A molécula do CR1 é uma ampla glicoproteína de membrana de 200 kDa, com cadeia simples, uma pequena cauda citoplasmática e codificada na banda q32 do cromossomo 1. A porção extramembranar é composta de 30 *short consensus repeats* (CCPs), com aproximadamente 60 aminoácidos cada. As primeiras 28 são organizadas baseadas no grau de homologia em quatro repetições homólogas longas (LHRs), LHR-A a LHR-D. Os domínios funcionais do CR1 são distribuídos entre os diferentes LHRs. LHR-A liga-se principalmente ao C4b. LHR-B e LHR-C ligam-se ao C3b/C4b; LHR-D liga-se a lectinas (revisto por BIRMINGHANet al, 2003; KHERA, 2009; LIU, 2009) (Figura 9).

Figura 9– Representação esquemática do CR1.



Fonte: Liu, *et al*, 2009.

A variante de tamanho mais comum do receptor para complemento tipo 1. Cada caixa representa um curto domínio regulador do complemento (SCR). Caixas de cores iguais representam identidades semelhantes de SCR - 3, 10 e 17 com diferenças de 1 a 3 aminoácidos.

O polimorfismo presente no CR1 tem sido alvo de estudos devido ao fato de alterar a densidade da molécula na membrana dos eritrócitos. Os níveis de expressão constitutivas do CR1 nos eritrócitos (CR1/E) variam em cerca de 10 vezes entre indivíduos normais saudáveis devido à sua composição genotípica específica, diferentemente dos leucócitos que não apresentam essa variabilidade (revisto por KHERA *et al*, 2009).

O número de CR1 nos eritrócitos é determinado por um sistema bialélico autossômico co-dominante, correlacionado com o polimorfismo de restrição Hind III RFLP, que corresponde a um único polimorfismo no íntron 27 do gene do CR1. O fragmento genômico de 7,4 kb está associado à alta expressão do alelo H (*high*); e o fragmento de 6,9 kb à baixa expressão do alelo L (*low*).

O fenótipo homozigoto de alta expressão (HH) expressa aproximadamente 1000 moléculas de CR1 por célula; já o fenótipo homozigoto de baixa expressão com uma média de 100 moléculas por célula; e fenótipo heterozigoto (HL) em torno de 500 moléculas por eritrócito (XIANG *et al.*, 1999).

4.1.2 Funções do receptor para complemento tipo 1

O CR1 possui múltiplas funções que o definem como uma molécula de grande interesse para a pesquisa. Suas funções biológicas variam de acordo com a população celular em que é expresso (FURTADO *et al.*, 2008).

4.1.2.1 Regulação da Cascata do Complemento

Como já dito, o CR1 é uma proteína reguladora do complemento, pois modula a ativação da cascata desse sistema pela ligação reversível ao C3b/C4b e inativação da C3 e C5 convertases das vias Clássica e Alternativa, levando ao decaimento desses componentes.

O CR1 dos leucócitos, ao interagir com microrganismos opsonizados com C3b e C4b, leva à quebra proteolítica dessas opsoninas pelo Fator I em iC3b e iC4b e, em seguida, em C3d e C4d, ligantes para os demais receptores (CR2, CR3 e CR4). Dessa forma, o CR1 age como co-fator para a quebra do Fator I, regulando mais uma vez a via Alternativa (revisto por LIU *et al.*, 2009; KHERA *et al.*, 2009). O resultado global dessas duas atividades do CR1 leva à regulação negativa das três vias de ativação do complemento e a um direcionamento da resposta imune contra o antígeno para as células apropriadas e aos seus respectivos receptores (FURTADO *et al.*, 2008).

4.1.2.2 Eliminação de Imunocomplexos

O CR1 dos eritrócitos é o principal local de ligação para imunocomplexos circulantes (ICC) opsonizados com C3b/C4b. Imunocomplexos são formados quando os anticorpos encontram os抗ígenos alvos na circulação, que podem ser auto-antígenos ou derivados de algum agente infeccioso. Esses ICC, presos ao CR1, são transportados para os macrófagos do fígado e do baço para posterior processamento (CRAIG *et al*, 2002). A adesão aos ICC é diretamente proporcional ao número de CR1/E e requer uma interação multivalente entre o C3b e o receptor. O número de CR1 e seus alelos podem ambos, portanto, determinar a eficiência da imuno-adesão (MADI *et al*, 2008). Essa ligação é multivalente, então, para que ela aconteça eficientemente, o CR1 deve estar agrupado na membrana e deve haver uma fixação ótima de C3b no imunocomplexo (revisto em MADI *et al*, 2008).

Considerando que há um número maior de eritrócitos no sangue do que de leucócitos, é notável que a ligação aos ICC ocorra predominantemente via CR1 dos eritrócitos, entretanto, um número menor de ICC e partículas opsonizadas podem ser reconhecidos pelas moléculas de CR1 presentes nos neutrófilos e monócitos, mesmo essas células possuindo um número muito maior de moléculas de CR1. Acredita-se que a menor quantidade de ligações dos ICC aos PMN em relação aos eritrócitos seja por conta do estado não agrupado do CR1 naquelas células (PACCAUD *et al*, 1990).

4.1.2.3 Receptor para fagocitose

Monócitos e neutrófilos expressam uma média de 5000 moléculas de CR1 por célula, a maioria intracelularmente, dentro de vesículas secretórias. Após um estímulo para a ativação dessas células com agentes quimiotáticos (como o C5a), essas vesículas se translocam para a membrana plasmática, aumentando de 5 a 10 vezes a expressão de CR1 (SENGELOV *et al*, 1994; ROTHER *et al*, 1997). Dessa forma, o CR1 em monócitos, macrófagos e neutrófilos reconhecem ICC e partículas opsonizadas por imunoglobulinas/C3b, mediando a fagocitose através do sinergismo entre a molécula e os receptores Fcγ. As partículas são internalizadas e, em seguida, destruídas nos lisossomos (revisto por KHERA *et al*, 2009).

4.1.2.4 Regulação das respostas das células B e T

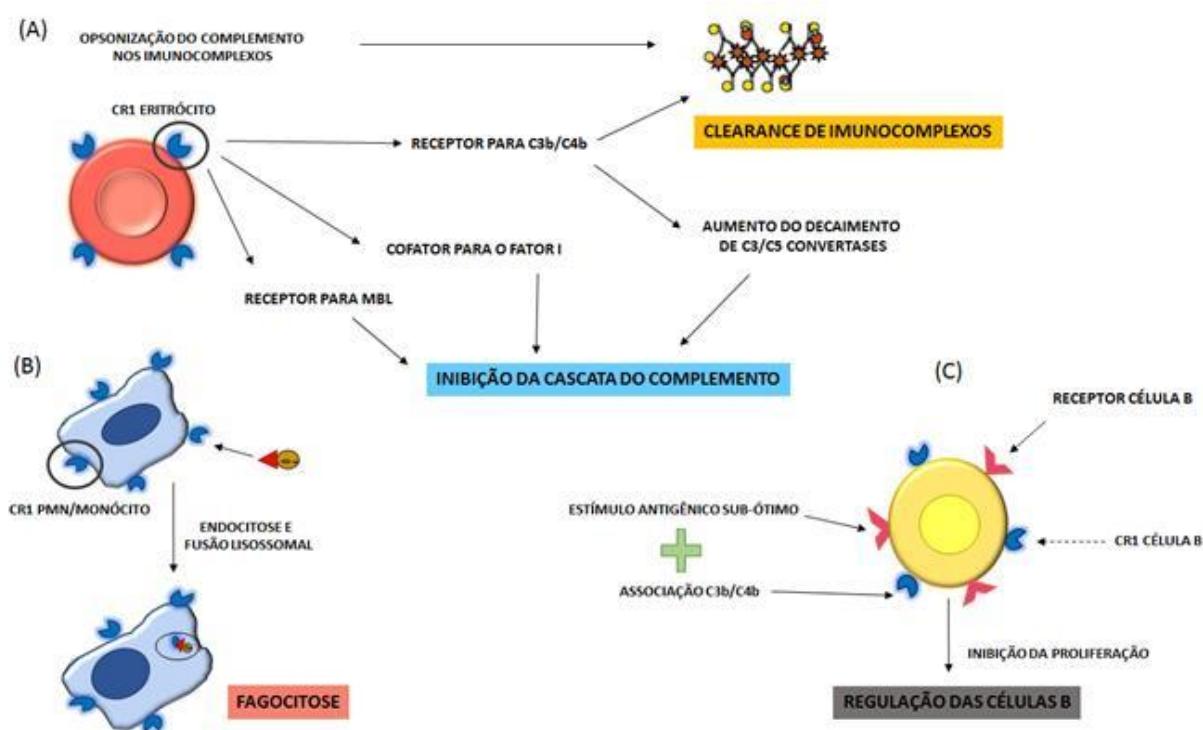
A formação de imunocomplexos é um processo fisiológico e que faz parte dos mecanismos de defesa do sistema imune. Esses ICC são rapidamente removidos da circulação

e, através da interação dos receptores Fc γ dos anticorpos com os receptores para complemento, ocorre o envio de sinais para uma grande variedade de células. É necessário que haja um equilíbrio entre a ativação das células B através do seu receptor (BCR), os receptores Fc γ e os receptores para complemento ligados aos ICC (revisto por ERDEI *et al*, 2009).

Muito pouco é conhecido sobre o papel exato do CR1 nos linfócitos B, mas alguns estudos apontam que essa molécula possui uma função de controlar a proliferação dessas células, mediando sinais inibitórios (JOZSI *et al*, 2002). O significado fisiológico dessa função seria a inibição da ativação das células B por estímulos抗igenicos fracos evocados por auto-antígenos (revisto por ERDEI *et al*, 2009).

Apesar de já ter sido comprovada a presença do CR1 nos linfócitos T, sua função ainda não foi estabelecida. No entanto, acredita-se que o CR1 também transmita sinais inibitórios para a proliferação das células T (WAGNER *et al*, 2005) (Figura 10).

Figura 10 – Esquema representativo das funções do receptor para complemento tipo 1 (CR1).



Fonte: KHERA (2009 - adaptado).

(A) Regulação da cascata do complemento e retirada de imunocomplexos pelo CR1 dos eritrócitos; (B) fagocitose envolvendo o CR1 dos monócitos e PMN; (C) regulação das células B envolvendo o CR1 das células B.

4.1.3 O receptor para complemento tipo 1 em doenças humanas

A expressão do CR1 nos eritrócitos e nos leucócitos pode ser influenciada por diversos fatores. Nos eritrócitos, como dito anteriormente, a habilidade do polimorfismo em alterar a densidade do CR1 na membrana pode gerar diferenças entre os fenótipos exibidos por indivíduos saudáveis. No entanto, a expressão do CR1 pode sofrer efeitos do envelhecimento dos eritrócitos (RIPOCHE *et al*, 1986) e as condições clínicas do indivíduo (revisto em ODERA *et al*, 2011).

Os níveis de CR1 são modulados nas infecções e sua expressão é dependente de fatores genéticos e adquiridos. Diversos estudos já relataram a redução do número de CR1 nos eritrócitos em doenças infecciosas e autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico (BIRMINGHAM *et al*, 2006); tuberculose (SENBAGAVALLI *et al*, 2008); hanseníase (TAUSK *et al*, 1986); paracoccidioidomicose (TEIXEIRA *et al*, 2001) e SIDA (KAZATCHKINE *et al*, 1987). Essa variabilidade na expressão do CR1 nos eritrócitos sugere que haja consequências em doenças mediadas pelo aumento de ICC, uma vez que pode comprometer a sua remoção da circulação, promovendo o depósito deles nos tecidos e gerando uma resposta inflamatória (revisto por ODERA *et al*, 2011).

No lúpus, a redução do CR1/E está associada a fatores adquiridos relacionados à atividade da doença e não pela sua gravidade (DE CARVALHO-LIN *et al*, 2004). Em pacientes com tuberculose, os resultados mostraram que os níveis de CR1/E reduzidos estariam relacionados à maior carga bacilar associada à gravidade da doença, demonstrando que se trata de um fenômeno adquirido e relacionado com a doença e não herdado (SENBAGAVALLI *et al*, 2008).

Partindo do princípio de que os mecanismos de expressão e modulação do CR1 sejam diferentes em células nucleadas do que aqueles nos eritrócitos, a expressão do CR1 nos leucócitos está relacionada com o padrão de citocinas transcritas e seus efeitos durante as doenças. Tais efeitos são variáveis de acordo com o tipo de célula (LIMB *et al*, 1991). Dessa

forma, condições inflamatórias locais ou sistêmicas podem regular positiva ou negativamente a expressão do CR1 nos leucócitos (ISAAK *et al*, 2008).

Pacientes infectados com *Leishmania* possuem elevados níveis de ICC, com antígenos de *Leishmaniae* auto-antígenos (TUNCANN *et al*, 2012). A redução do número de CR1/E poderia ser considerada a justificativa do aumento dos níveis de ICC. Estes ICC podem afetar a progressão e o desenvolvimento da doença através da indução de citocinas pró ou anti-inflamatórias, que, consequentemente modulariam a resposta imune (revisto por ELSHAFIE *et al*, 2007).

Em estudos anteriores avaliando pacientes com o Calazar foi evidenciada uma redução significativa de 50% no número de moléculas de CR1 em eritrócitos de pacientes com Leishmaniose Visceral sem tratamento, em relação ao grupo controle. Nos indivíduos dos quais foram obtidas amostras pós-tratamento, foi observado que houve a recuperação dos níveis de CR1/E, contudo não pode ser realizada inferência estatística pela reduzida casuística estudada (CÂMARA *et al*, 1997).

Dessa forma, considerando que há uma relação próxima entre a fisiopatologia, a gravidade de diversas doenças e a recuperação dessa expressão após o tratamento, os objetivos do nosso estudo foram quantificar a expressão do CR1 nos eritrócitos e leucócitos (linfócitos, monócitos e neutrófilos), do CD59 nos eritrócitos e os níveis de imunocomplexos circulantes e após o tratamento de pacientes com Leishmaniose Visceral.

5 HIPÓTESES

- ✓ Na Leishmaniose Visceral ocorre a redução da expressão do receptor para complemento tipo 1 da membrana dos eritrócitos (CR1/E) no paciente não tratado, em relação ao grupo de controles saudáveis, e reverte com o tratamento;
- ✓ Na Leishmaniose Visceral a expressão do CR1 nos linfócitos, monócitos e neutrófilos pode ser alterada tanto para mais como para menos;
- ✓ Durante a doença pode ocorrer ou não variação na expressão de outras moléculas reguladoras do complemento, como a molécula CD59;
- ✓ Os níveis de imunocomplexos circulantes aumentam nos pacientes antes do tratamento, reverte com o tratamento e estão relacionados com a alteração da expressão de CR1 em eritrócitos e neutrófilos.

6OBJETIVO GERAL

Analisara dinâmica do receptor para complemento tipo 1(CR1) presente nos eritrócitos e leucócitos dos pacientes com Leishmaniose Visceral (Calazar)e determinar sua relação com os níveis de imunocomplexos circulantes antes e após o tratamento.

6.1 Objetivos Específicos

1. Quantificar o CR1 nos eritrócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilosde pacientes com Leishmaniose Visceral,antes e depois do tratamento, e dos controles saudáveis;
2. Quantificar a expressão do CD59 na membrana de eritrócitos dos pacientes antes e depois do tratamento e dos controles saudáveis;
3. Analisar a existência da associação entre o número de CR1 por eritrócito e por neutrófilo nos pacientes com os níveis plasmáticos de imunocomplexos circulantes.

7 METODOLOGIA

7.1 Descrição do estudo

7.1.1 *Tipo de estudo*

Estudo experimental, prospectivo, realizado de abril de 2014 a julho de 2015.

7.1.2 *População*

7.1.2.1 *Grupo de estudo*

Trinta pacientes atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ), referência no tratamento de Calazar no Ceará, com diagnóstico confirmado através de dados clínico-epidemiológicos pelo teste imunocromatográfico K39.

7.1.2.2 *Grupo controle*

Trinta indivíduos saudáveis, composto por doadores de sangue, atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), e indivíduos oriundos do quadro de pós-graduandos da instituição onde os ensaios foram realizados.

7.1.3 *Critérios de Inclusão*

Pacientes acima de 2 anos de idade, de ambos os sexos, com diagnóstico confirmado para Leishmaniose Visceral que não tenham iniciado o tratamento.

7.1.4 *Critérios de Exclusão*

Pacientes:

- com 2^a infecção de Leishmaniose Visceral recente;
- com sorologia positiva para HIV;
- com Calazar associado a outra doença infecto-parasitária, salvo as infecções bacterianas como intercorrência clínica ao quadro;
- que receberam transfusão sanguínea até 120 dias antes do diagnóstico.

7.1.5 Aspectos Éticos

Este estudo recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (PROPESQ) em 31 de março de 2014 (CAAE 20297113.5.0000.5054- Anexo A); e do Comitê de Ética em Pesquisa, do Hospital São José de Doenças Infecciosas, em 25 de abril de 2014 (CAAE: 20297113.5.3001.5044 - Anexo B).

7.1.6 Material Clínico e coleta de dados

As coletas de dados e do material clínico foram realizadas através de busca ativa pelos pacientes nos setores de emergência, laboratório de coleta de sangue e enfermarias do HSJ.

A ficha epidemiológica (Apêndice A) foi preenchida pelo pesquisador ao entrevistar o paciente. Antes da coleta do material clínico o paciente(e/ou seu responsável) e o indivíduo participante do grupo controle foram esclarecidos a respeito do estudo, procedimentos, riscos e finalidades através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), autorizando a continuidade do processo ao assiná-lo(ApêndiceB).

Os demais dados relevantes para a pesquisa como resultados dos exames realizados e tratamento instituído foram obtidos da folha de atendimento ou do prontuário do paciente, nos casos de internamento. As informações obtidas eram arquivadas em planilhas do Excel (versão 2013), formando um banco de dados (Apêndice C).

As coletas de dados clínicos e das amostras foram realizadas em dois momentos: no momento do diagnóstico, pré-tratamento, e, para a segunda amostra, na primeira consulta ambulatorial após o término do tratamento.

7.1.7 Coleta de amostras

A coleta de material clínico foi realizada por profissionais capacitados do laboratório do HSJ e transportada sob refrigeração para o processamento no Laboratório de Imunologia Médica, da Universidade Federal do Ceará.

De cada paciente foram coletados 10 mL de sangue venoso periférico, sendo 5 mL em tubo *Vacutainer*[®] com EDTA, para o ensaio com os eritrócitos e leucócitos; e 5 mL em tubo *Vacutainer*[®] com gel separador, para a obtenção do soro, antes e após o tratamento. As amostras de soro foram armazenadas a -80°C para posterior dosagem de imunocomplexos.

7.2 Delineamento Experimental

7.2.1 Processamento das amostras

7.2.1.1 Processamento dos eritrócitos

Um mililitro de sangue total foi centrifugado a 460 g, por 5 minutos, em 3 mL de tampão fosfato salino (PBS) com azida sódica, por três vezes, para a remoção das camadas de leucócitos e de plasma a cada lavagem. Cem microlitros do precipitado de eritrócitos foram ressuspensos em 900 μ L de PBS-azida, de onde foi feita a contagem de hemácias utilizando o hemocitômetro. Uma ressuspensão dos eritrócitos foi preparada ajustando a solução em 1×10^8 células/mL.

Uma alíquota de 10 μ L da suspensão de 1×10^8 células de eritrócitos foi incubada a 4°C, por 45 minutos, no escuro, com o anticorpo monoclonal de camundongo anti-CR1 humano marcado com fluoresceína tiocianato (FITC) (anti-CR1-FITC, clone E11, BD Pharmigen®) ou com seu controle isotipo IgG1, κ de camundongo (FITC) (BD Pharmigen®).

Para marcar a molécula CD59 presente na membrana dos eritrócitos foi utilizada uma solução do anticorpo anti-CD59 marcado com ficoeritrina (PE) (clone p282 H19, Biolegend®) e seu isotipo IgG2a, κ de camundongo marcado com PE (clone MOPC-173, Biolegend®), diluídos a 1:20. Além dos tubos marcados com anticorpos, um tubo com células não marcadas foi utilizado. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com 2 mL de tampão de lavagem (PBS, soro fetal bovino 2%) e ressuspensas em 500 μ L de PBS-azida para serem analisadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur- Becton Dickinson®).

7.2.1.2 Processamento dos leucócitos

Quinhentos microlitros de sangue total foram incubados por 15 minutos, à temperatura ambiente, com uma solução de tampão de lise (BD). Após a incubação, a amostra foi centrifugada por 5 minutos, 460 g e lavada duas vezes com solução de PBS e soro fetal bovino a 2% (Cultilab®). A camada de creme leucocitário obtida foi incubada com anti-CR1-FITC ou seu isotipo, a 4°C, por 45 minutos, no escuro. Em seguida, as células foram centrifugadas a 460 g, por 5 minutos, em temperatura ambiente, por duas vezes com tampão de lavagem (2 mL de PBS, soro fetal bovino 2%).

Além dos tubos marcados com anticorpos, um tubo com células não marcadas foi utilizado. Os sobrenadantes foram descartados e o precipitado de leucócitos foi ressuspensido em 500 µL de tampão de fixação com paraformaldeído a 1% (Sigma®) para serem analisados no citômetro de fluxo (FACSCalibur- Becton Dickinson®).

7.3 Quantificação do número de CR1 nas populações celulares por citometria de fluxo

7.3.1 Ensaio de citometria de fluxo

Os tubos com células marcadas com os fluorocromos foram utilizados para o ajuste das compensações das fluorescências, enquanto que o tubo não marcado foi utilizado para os ajustes das voltagens e do ponto de corte (*threshold*). A definição de células positivas e negativas foi dada pelo controle isotípico, a fim de fixar as *gates* e distinguir entre células coradas positivamente, autofluorescência e ligações inespecíficas.

A mediana de intensidade de fluorescência (MIF) foi utilizada para identificar as células e quantificar os níveis de expressão de CR1 nos eritrócitos e leucócitos e de CD59 nos eritrócitos. A análise por histograma foi utilizada para a quantificação da MIF por célula, e a análise utilizando gráfico de pontos (*dot plot*) forneceu a frequência de células positivas na *gate* para essas duas moléculas nas populações-alvo.

Durante a aquisição dos eritrócitos, de cada tubo, foram obtidos 10.000 eventos na *gate* através da detecção das dispersões das luzes frontal (FSC) e lateral (SSC). Para os leucócitos, os números de eventos na *gate* foi de 5.000 para linfócitos e polimorfonucleares-neutrófilos e de 4.000 para monócitos.

7.4 Dosagens Plasmáticas

7.4.1 Dosagem de imunocomplexos circulantes por ensaio imunoenzimático

A dosagem de imunocomplexos circulantes do soro dos pacientes antes e após o tratamento foi terceirizada, sendo realizada pelo LabPasteur através do kit Quanta Lite®C1q CIC ELISA.

O ensaio tem como princípio a utilização de poços da microplaca revestidos com C1q de cabra purificado na fase sólida para a captura do imunocomplexo. Os reagentes utilizados (calibradores, controles) e as amostras diluídas dos pacientes são pipetados nos poços e o complexo de ligação de C1q liga-se ao C1q durante a primeira incubação. Após a lavagem

dos poços, para a remoção das proteínas que não se ligaram, é adicionado o conjugado purificado de cabra anti-IgG marcado com peroxidase para ligação no imunocomplexo. Após a adição do substrato 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina (TMB) forma-se um produto de cor azul, cuja intensidade é proporcional à concentração de CIC na amostra. Posteriormente é adicionado a solução de parada (ácido sulfúrico) em cada poço produzindo uma cor amarela.

A leitura da absorbância com comprimento de onda de 450nmé realizada em espectrofotômetro. A concentração de CIC na amostra é obtida diretamente da curva de calibração, sendo os resultados expressos como equivalentes de IgG humana agregada por mL ($\mu\text{g Eq/mL}$).

7.4 Análises Estatísticas

A análise das células marcadas foi feita através do software CellQuest (BD). Os dados obtidos de cada paciente foram organizados em planilhas do software Microsoft Excel® 2013 e, posteriormente, no programa estatístico Graph Pad Prism versão 5.0.

Nas análise dos dados entre os pacientes, antes e após o tratamento, foram utilizados testes pareados: teste t (paramétrico) para a análise do CR1/CD35 e do CD59 dos eritrócitos e teste de Wilcoxon (não-paramétrico) para a análise do CR1 dos leucócitos e para a análise das dosagens dos imunocomplexos circulantes.

Nas análise dos dados entre os pacientes e controles foram utilizados testes não-pareados: teste t (paramétrico) para a análise do CR1/CD35 e do CD59 dos eritrócitos e teste de Mann-Whitney (não-paramétrico) para a análise do CR1 dos leucócitos.

8 RESULTADOS

8.1. Pacientes, Controles, Evolução Clínica

Foram obtidas amostras de 30 pacientes atendidos com diagnóstico para Leishmaniose visceral, sendo 9 do sexo feminino e 21 do sexo masculino, com mediana de idade ± DP de $16,50 \pm 16,10$ anos (var. mín. 3 e máx. 62). O grupo controle foi composto de 30 indivíduos adultos com mediana de idade ± DP de $35,00 \pm 11,64$ anos (var. mín. 20 e máx. 62 anos); sendo 9 mulheres e 21 homens.

O tempo médio de início dos sintomas dos pacientes até a busca do atendimento médico no HSJ foi de 33 ± 28 dias, variando de 5 a 120 dias. A tabela 2 mostra uma distribuição dos principais sinais e sintomas apresentados pelos pacientes obtidos através dos dados de prontuário.

Tabela 2–Distribuição das frequências dos principais sinais e sintomas no momento da admissão dos pacientes.

SINAIS E SINTOMAS NA ADMISSÃO	PACIENTES (%)
FEBRE	100
PALIDEZ	100
FALTA DE APETITE	80
PERDA DE PESO	71
HEPATOMEGLIA	71
ESPLENOMEGLIA	61
AUMENTO DO VOLUME ABDOMINAL	47
DIARREIA	38
TOSSE	28
ADINAMIA	19
NÁUSEAS/ VÔMITOS	9
MANIFESTAÇÕES HEMORRÁGICAS	4

Fonte: Elaborada pela autora.

A droga de escolha para a maioria dos pacientes foi o Glucantime®, exceto para 4 pacientes mais graves, que receberam a Anfotericina B lipossomal. O tempo médio de tratamento dos pacientes foi de $28,0 \pm 8,5$ dias, para aqueles tratados com o Glucantime® (variando de 20

a 40 dias) e, para os pacientes tratados com a Anfotericina B lipossomal, foi de $7,0 \pm 1,5$ dias (variando de 4 a 7 dias).

Os pacientes apresentaram características significantes e frequentes da doença, tais como anemia e trombocitopenia. A melhora significante dos dados hematológicos foi observada no momento da coleta da segunda amostra pós-tratamento, com mediana do tempo para essa segunda coleta de $50 \pm 21,1$ dias, variando de 29 a 112 dias. A tabela 3 mostra o perfil hematológico dos pacientes antes e após o tratamento.

Tabela 3 - Perfil hematológico dos pacientes antes e após o tratamento.

<i>PARÂMETROS</i>	<i>PERFIL HEMATOLÓGICO</i>	
	<i>ANTES DO TRATAMENTO</i>	<i>DEPOIS DO TRATAMENTO</i>
	Média ± DP (mín - máx)	Média ± DP (mín - máx)
Eritrócitos ($n^o \times 10^6$ céls/mm 3) ^a	$3,63 \pm 0,54$ (2,35 – 4,50)	$4,76 \pm 0,71$ (2,92 – 5,81)
Hemoglobina (g/dl) ^a	$7,36 \pm 1,23$ (6,0 – 11,3)	$10,0 \pm 1,73$ (7,50 – 14,9)
Hematócrito (%) ^a	$27,0 \pm 4,58$ (18,4 – 34,4)	$36,0 \pm 4,82$ (24,4 – 42,6)
Plaquetas ($n^o \times 10^3$ céls/mm 3) ^a	$98,0 \pm 36,0$ (55,0 – 186,6)	$252,0 \pm 76,0$ (69,0 – 365,0)
Linfócitos (n^o céls/mm 3) ^a	1497 ± 718 (392 – 2900)	2897 ± 1650 (610 – 7000)
Monócitos (n^o céls/mm 3) ^b	387 ± 195 (123 – 885)	537 ± 209 (269 – 967)
Neutrófilos (n^o céls/mm 3) ^a	1321 ± 674 (604 – 3064)	4107 ± 1716 (1705 – 9036)

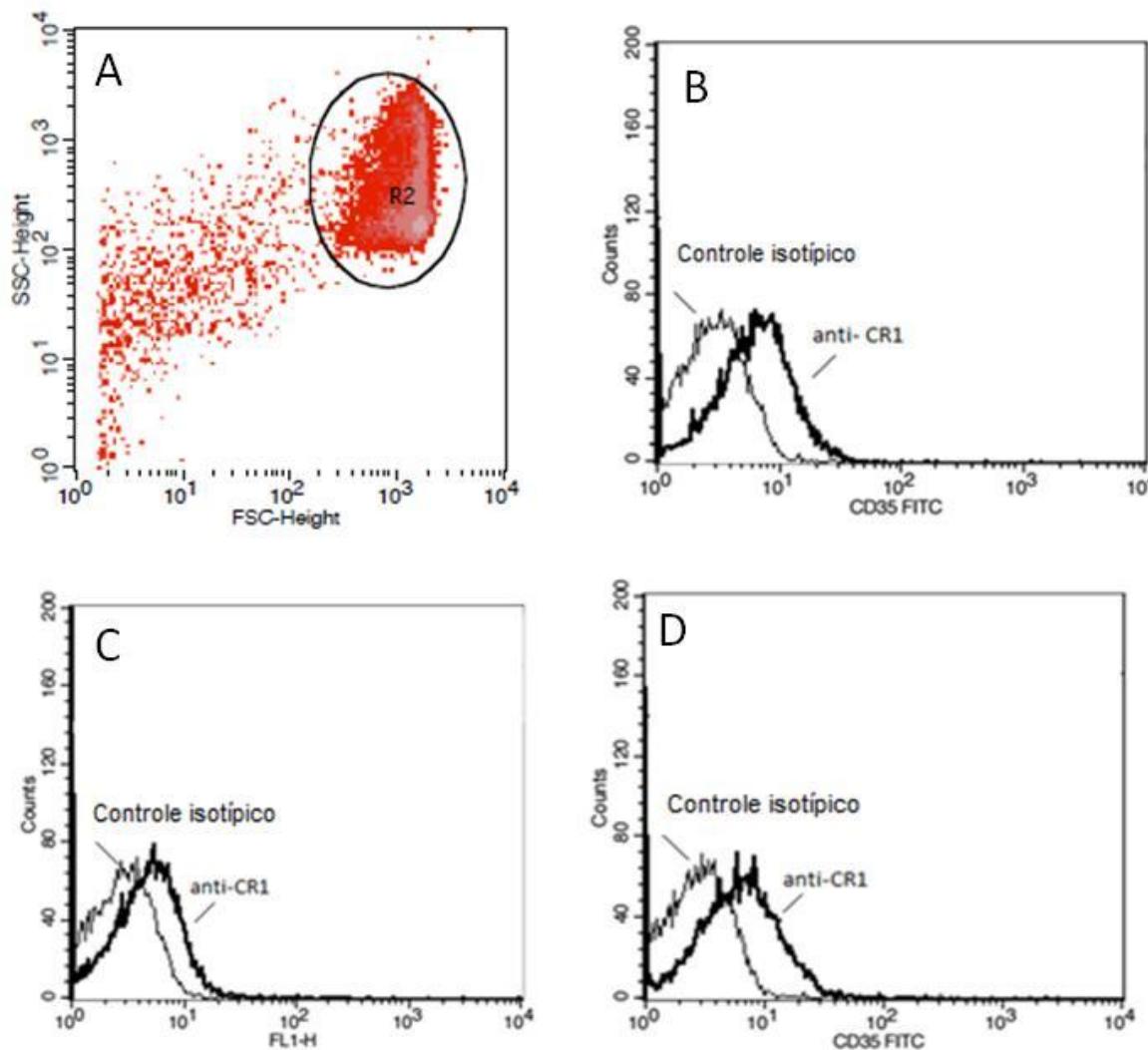
Fonte: Elaborada pela autora. Teste Mann-Whitney para linfócitos, monócitos, neutrófilos. Teste t de Student para hemácias, hemoglobina e hematócrito. a: $p < 0,0001$; b: $p = 0,0158$.

8.2 Expressão e distribuição da frequência do CR1/CD35 na membrana dos eritrócitos

Para a análise da expressão do CR1/CD35 foi utilizada mediana de intensidade de fluorescência (MIF) do CR1 nos eritrócitos. Esta foi obtida através da subtração do valor

encontrado no controle isotípico e o valor apresentado pelo anticorpo CD35. A figura 11 mostra a *gate* de aquisiçãootamanho versus granulosidade (FSC x SSC)da população de eritrócitos(A) e os histogramas representativos da MIF do indivíduo controle saudável (B), do paciente antes do tratamento (C) e depois do tratamento (D).

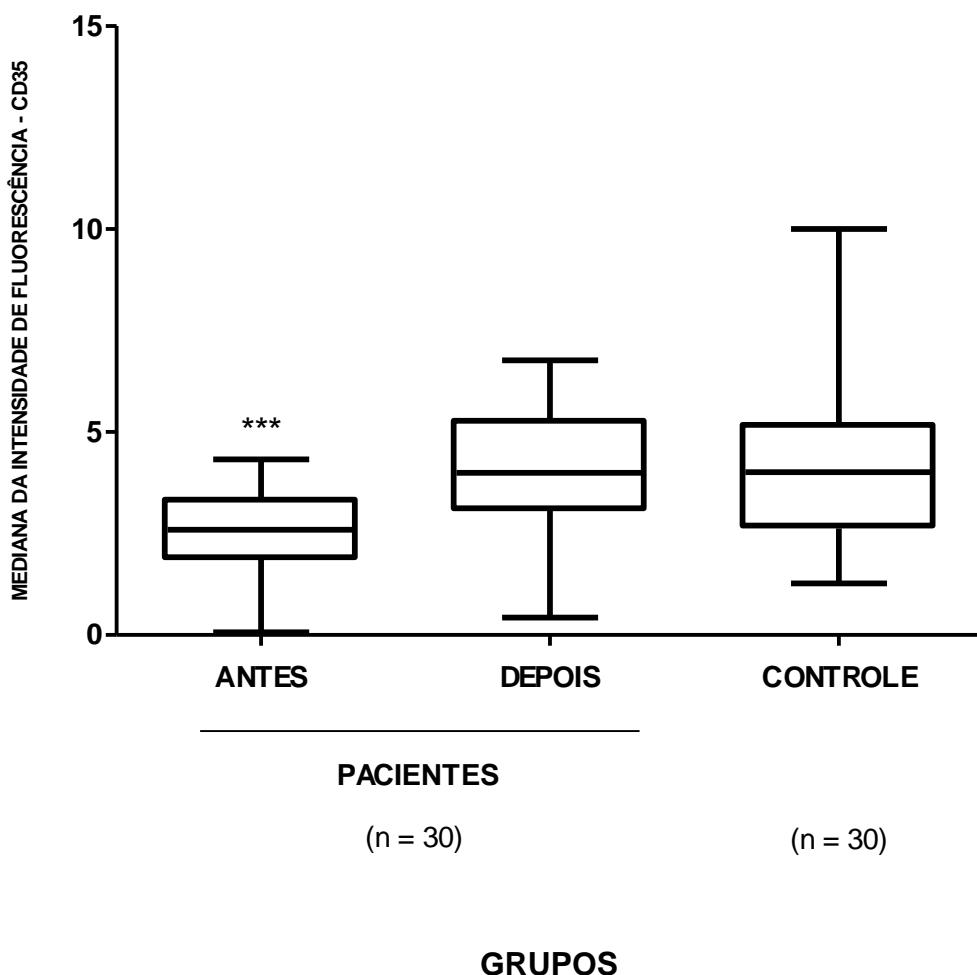
Figura 11 -Citograma e histogramas representativos da expressão do CR1/CD35 nos eritrócitos.



Gate da população de eritrócitos (A). Dois picos fluorescentes representam as células marcadas com o anticorpoisotipo irrelevante associado com as células marcadas com o anticorpo anti-CR1/FITC (CD35 FITC ou FL1-H) de indivíduo controle saudável (B), do paciente antes do tratamento (C) e do paciente depois do tratamento (D).

A média da MIF em indivíduos saudáveis foi de $4,32 \pm 2,01$. Em pacientes com Leishmaniose visceral, antes do tratamento, a média foi de $2,30 \pm 1,08$, mostrando uma significante diminuição na expressão do CR1 na membrana dos eritrócitos em relação ao grupo controle e ao grupo de tratados ($p < 0,0001$). Nos pacientes depois do tratamento, a média da MIF foi de $3,93 \pm 1,48$, um valor que demonstra tendência a uma aproximação ao valor do grupo controle saudável ($p = 0,6252$)(Gráfico 1).

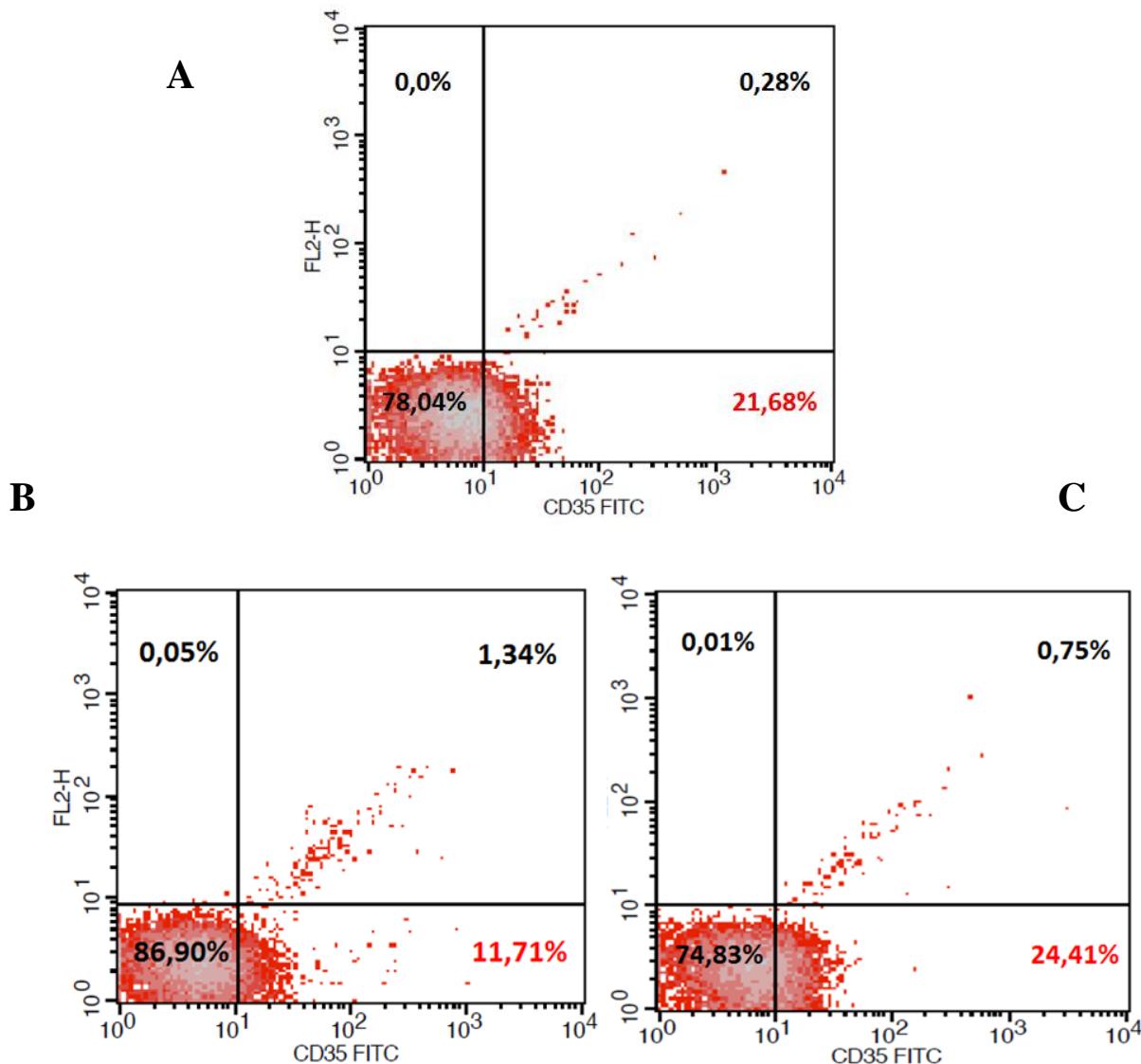
Gráfico 1- Distribuição das médias e desvios-padrões da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) do CR1/CD35 nos eritrócitos dos pacientes, antes e depois do tratamento, e do grupo de controle saudáveis.



Fonte: Elaborada pela autora. *** $p < 0,0001$, teste t pareado: pacientes antes vs depois do tratamento; teste t não-pareado: pacientes antes vs grupo controle.

A figura 12 mostra os gráficos de pontos representativos da população de eritrócitos CR1/CD35 positivos do indivíduo controle saudável (A), do paciente antes do tratamento (B) depois do tratamento (C), de onde foram obtidos os dados da distribuição da frequência de eritrócitos positivos para CR1/CD35.

Figura 12–Gráficos de pontos representativos da expressão do CR1/CD35 nos eritrócitos.

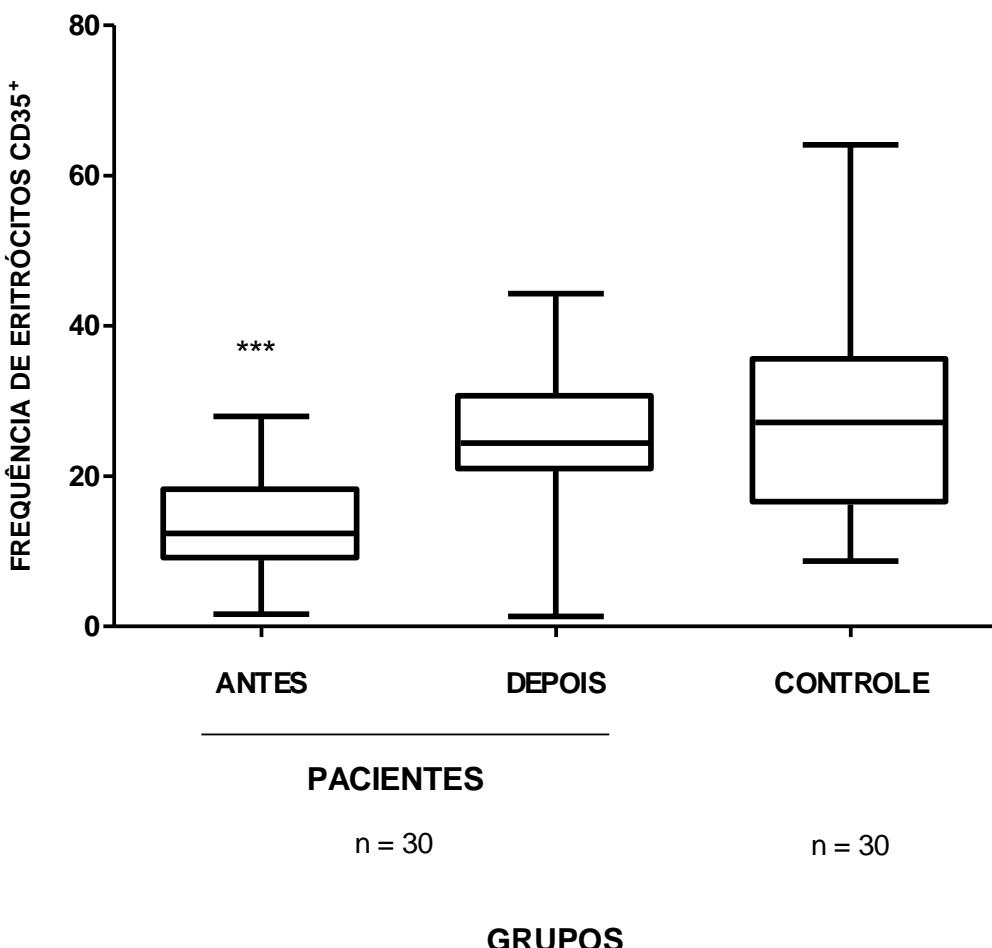


Fonte: Elaborada pela autora. Indivíduo controle saudável (A); Paciente antes do tratamento (B); Paciente depois do tratamento (C). Gráficos de pontos correspondendo à frequência de eritrócitos $CD35^+$ expressos no quadrante inferior direito detectados pelo canal de fluorescência 1 (CD35 FITC) versus canal de fluorescência 2 (FL2-H).

A análise da frequência de eritrócitos positivos para CR1/CD35 mostrou que, nos pacientes antes do tratamento, a média percentual foi de $12,86 \pm 6,86$. Nos pacientes depois

do tratamento, a média das células positivas foi de $25,47 \pm 10,01$, valores que se aproximam da média encontrada nos controles saudáveis, que foi de $28,34 \pm 13,76$. Dessa forma, houve um aumento significativo no grupo de pacientes após o tratamento ($p < 0,0001$). Nesse mesmo período ocorreu a recuperação dos valores da frequência de eritrócitos positivos para CR1/CD35, pois não houve diferença estatística significante destes com os controles ($p = 0,4197$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Distribuição das médias e desvios-padrões da frequência do CR1/CD35 nos eritrócitos dos pacientes, antes e depois do tratamento, e do grupo de controles saudáveis.



Fonte: Elaborada pela autora. *** $p < 0,0001$; Teste t pareado: pacientes antes vs depois do tratamento; teste t não-pareado: pacientes antes vs grupo controle.

Quando o grupo de pacientes foi dividido entre crianças e adultos, foi observado o mesmo resultado, ou seja, uma redução significativa da expressão do CR1 antes do tratamento com relação ao grupo controle saudável e um aumento significante da expressão do CR1 após o tratamento nos dois grupos quando comparados a eles mesmos antes do tratamento. Antes do tratamento, não houve diferença estatística na expressão do CR1 dos eritrócitos entre crianças e adultos. Também não foi encontrada diferença estatística entre os adultos e as crianças depois do tratamento.

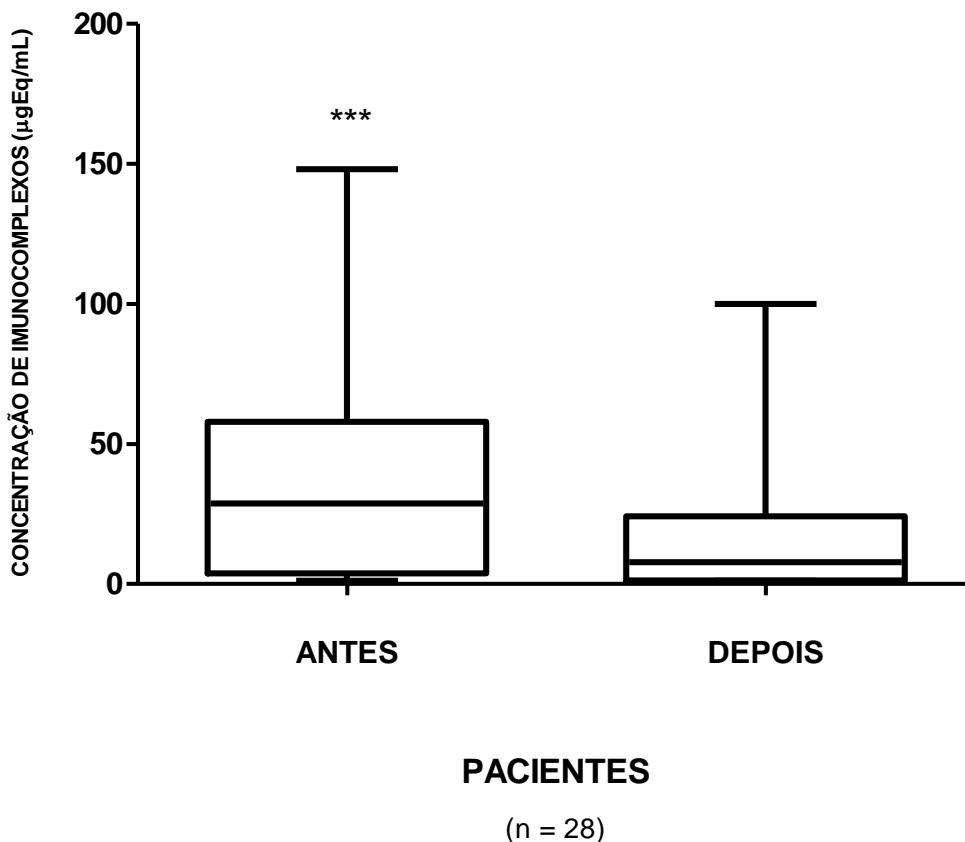
A análise da frequência de eritrócitos positivos para CR1/CD35 nos subgrupos de crianças e adultos comparados ao grupo controle saudável, mostrou que houve uma diminuição das células positivas em ambos os subgrupos antes do tratamento. Entretanto, antes do tratamento, não houve diferença estatística entre crianças e adultos.

Após o tratamento, houve uma recuperação na frequência de eritrócitos positivos dentrodos dois subgrupos, sendo que nos adultos a recuperação foi estatisticamente maior que nas crianças. Em relação ao controle, tanto as crianças como os adultos não apresentaram diferença estatística significante.

8.3 Dosagem de Imunocomplexos Circulantes

A dosagem de imunocomplexos circulantes nosoro de 28 pacientes com Leishmaniose Visceral mostrou que, antes do tratamento, a média encontrada foi de $39,34 \pm 43,76$ e, após o tratamento, foi de $19,69 \pm 29,75$. Houve, então, uma diferença estatística significante, com $p = 0,0005$ (Gráfico 3).

Gráfico 3– Distribuição das médias e desvios-padrões das dosagens séricas de imunocomplexos circulantes nos pacientes antes e depois do tratamento.

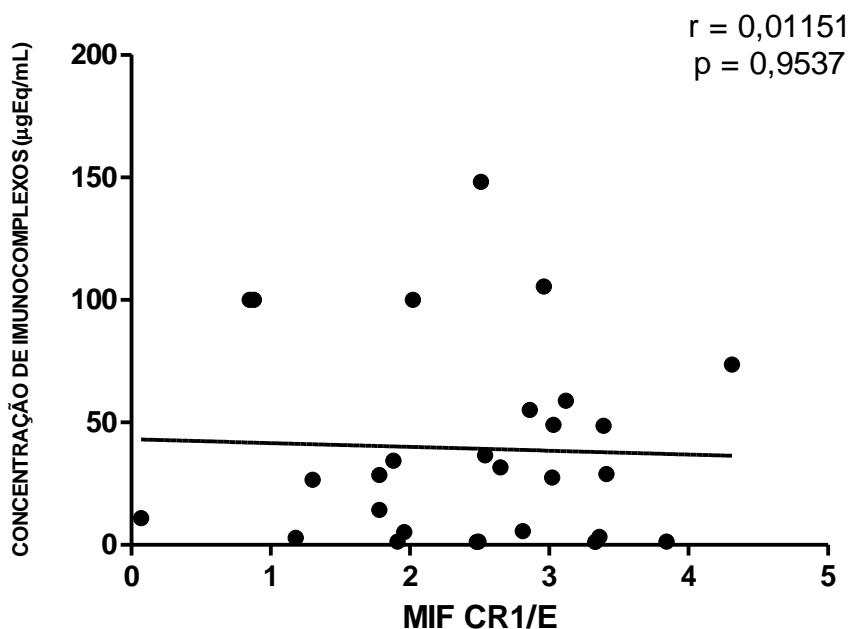


Fonte: Elaborada pela autora. *** p > 0,0005, teste de Wilcoxon; pacientes antes vs depois do tratamento.

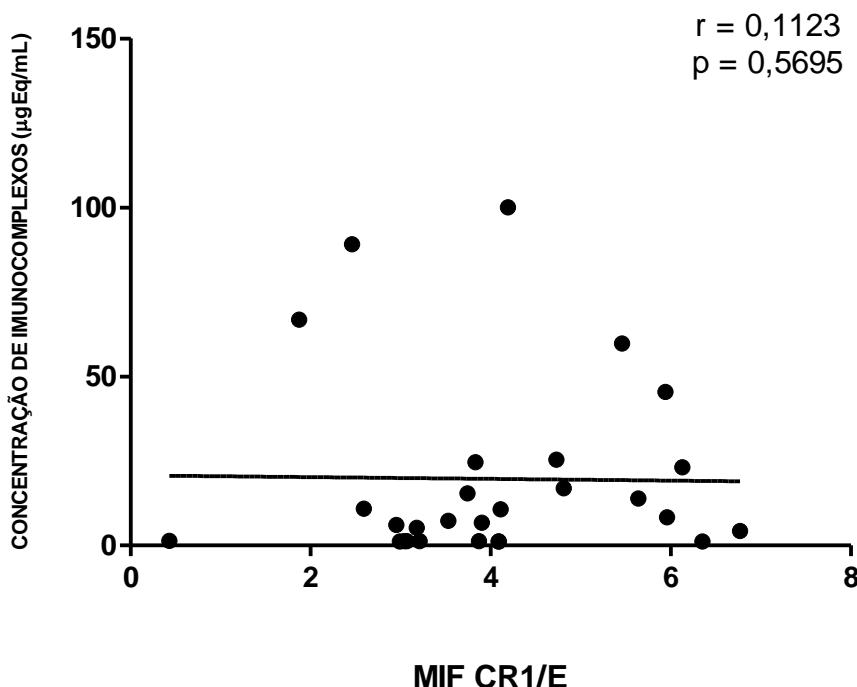
Não foi encontrada correlação entre as variações dos níveis de imunocomplexos circulantes com a mediana de intensidade de fluorescência do CR1/E, antes (Spearman $r = 0,01151$, $p = 0,9537$) e após o tratamento (Spearman $r = 0,1123$, $p = 0,5695$) (Gráfico 4); nem com a mediana da intensidade de fluorescência do CR1/N, antes (Spearman $r = -0,01709$, $p = 0,9463$) e após o tratamento (Spearman $r = -0,2994$; $p = 0,2275$) (Gráfico 5).

Gráfico 4 – Correlações entre a concentração de imunocomplexos antes e depois do tratamento e a mediana de intensidade de fluorescência do CR1/CD35 nos eritrócitos.

A

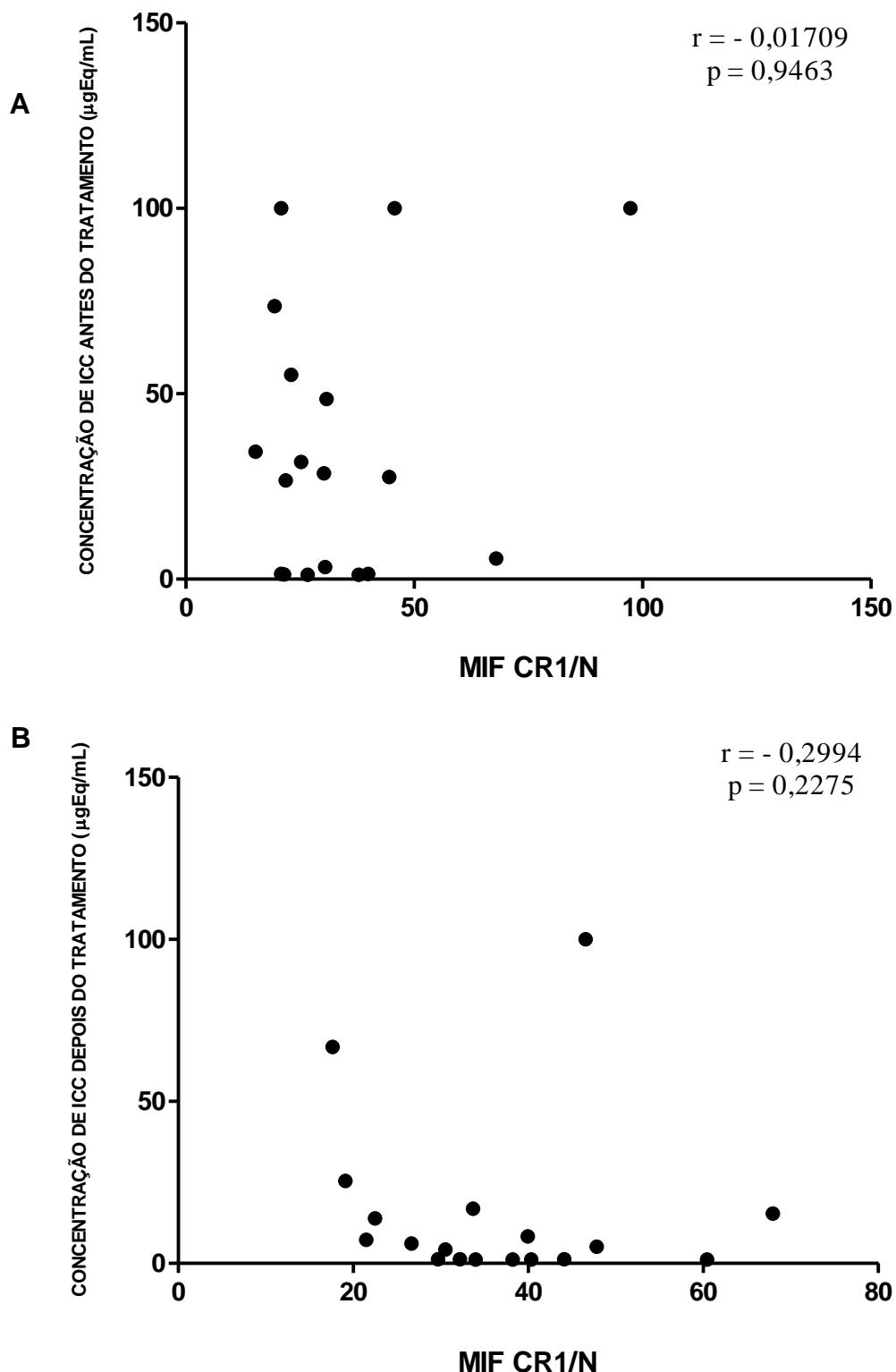


B



Fonte: Elaborada pela autora. Teste de correlação de Spearman. (A) correlação antes do tratamento; (B) correlação depois do tratamento.

Gráfico 5 – Correlações entre a concentração de imunocomplexos antes e depois do tratamento e a mediana de intensidade de fluorescência do CR1/CD35 nos neutrófilos.



Fonte: Elaborada pela autora. Teste de correlação de Spearman. (A) correlação antes do tratamento; (B) correlação depois do tratamento.

8.4Características clínicas dos pacientes pós-tratamento e análise da dosagem de imunocomplexos relacionada à expressão do CR1 dos eritrócitos ao número de eritrócitos no sangue circulante.

No momento da coleta da amostra pós-tratamento, na primeira consulta ambulatorial, os pacientes encontravam-se assintomáticos. Dos 30 pacientes avaliados, 2 apresentaram as seguintes intercorrências durante o tratamento: 1 paciente apresentou ascite, edema e hipertensão portal; e 1 paciente apresentou vasculite de membros inferiores e pneumonia. Após o tratamento, 1 paciente apresentou varicela; e 1 paciente apresentou infecção urinária e febre persistente. Nesses pacientes foi observado que não houve aumento da frequência e da MIF do CR1/E, nem melhora dos valores hematimétricos ou queda dos níveis de imunocomplexos circulantes. Devido ao número de pacientes com intercorrências não foi possível realizar análise estatística desses dados.

A análise dos parâmetros hematológicos mostrou que houve uma melhora significante após o tratamento. Essa melhora foi acompanhada pelo aumento do número de eritrócitos, da dosagem de hemoglobina, da MIF do CR1/E e da frequência de eritrócitos positivos para o CR1 (Tabela 4).

A relação dos níveis de ICC com a MIF do CR1 e com a quantidade de eritrócitos mostra que há uma recuperação da expressão da molécula após o tratamento, com uma queda significante nos níveis de ICC. No entanto, essa redução é relativa, uma vez que os níveis permanecem ainda elevados segundo os valores de referência adotados como valor normal (igual ou menor que 4 µgEq/mL) (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição das médias e desvios padrões dos pacientes quanto às dosagens de imunocomplexos circulantes, à mediana de intensidade de fluorescência (MIF) do CR1/E, à frequência do CR1/E e ao número de eritrócitos, antes e depois do tratamento.

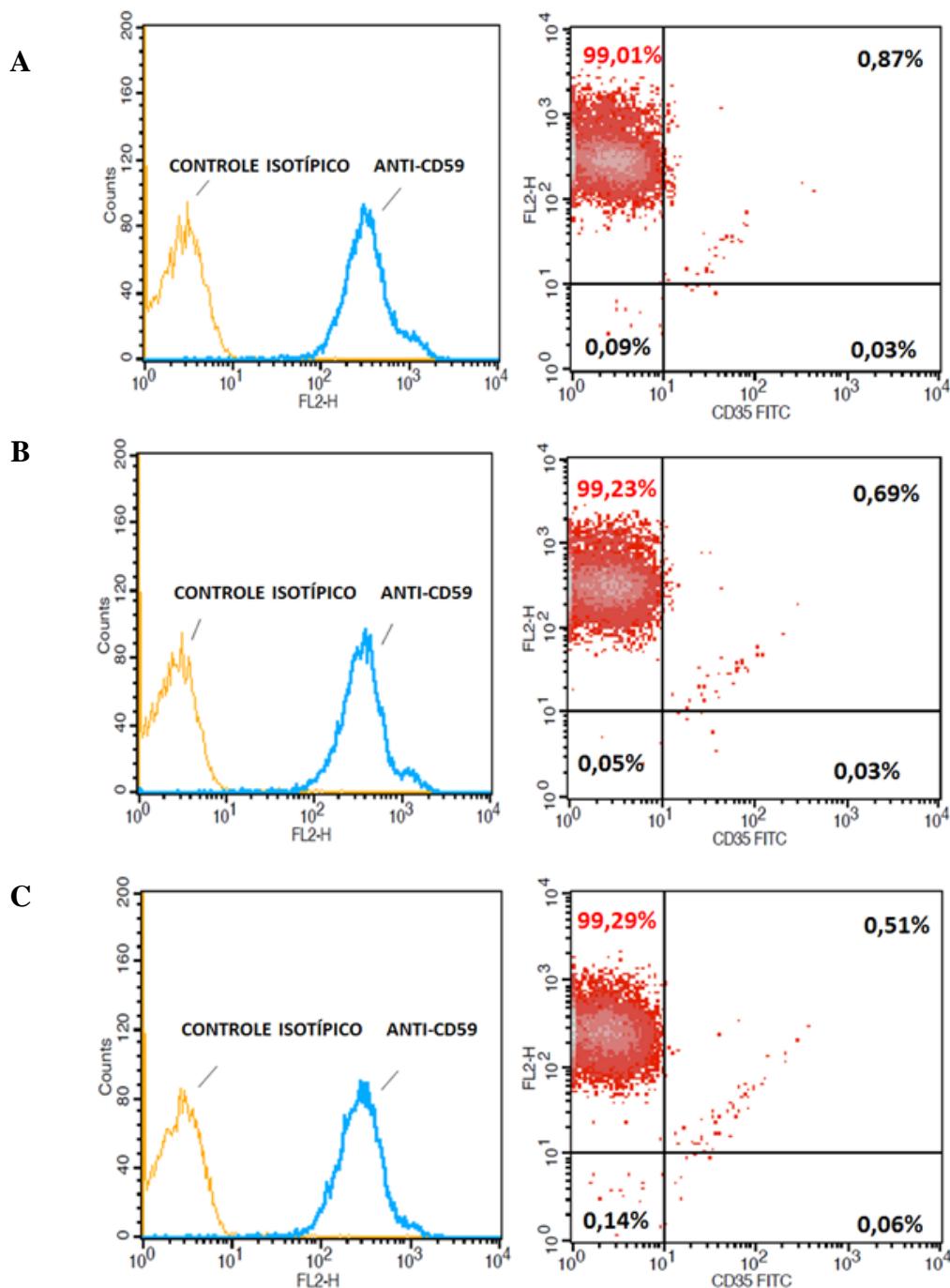
<i>PARÂMETROS</i>	TRATAMENTO	
	<i>ANTES</i> Média \pm DP (variação)	<i>DEPOIS</i> Média \pm DP (variação)
ICC ^a	39,34 \pm 43,76 (1,2 – 148,1)*	19,69 \pm 29,75 (1,2 – 100)*
MIF CR1/E ^b	2,30 \pm 1,08 (0,07 – 4,31)	3,93 \pm 1,48 (0,43 – 6,77)
% CR1/E ^b	12,86 \pm 6,86 (1,65–27,95)	25,47 \pm 10,01 (1,34 - 44,29)
Eritróцитos (nº x 10 ⁶ céls/ mm ³) ^b	3,63 \pm 0,54 (2,35 – 4,50)	4,76 \pm 0,71 (2,92 – 5,81)

Fonte: Elaborada pela autora.a:p > 0,0009; b: p < 0,0001 vs depois do tratamento. * N = 28.

8.5 Expressão e distribuição da frequência do CD59 na membrana dos eritrócitos

Em seis pacientes pareados foi analisado o nível de expressão (MIF) e a frequênciada molécula CD59 presente na membrana de eritrócitos para avaliar se ocorria a redução (perda) de uma outra proteína regulatória do sistema complemento durante a Leishmaniose Visceral. A figura 13 mostra os histogramas e os gráficos de pontos (*dot plot*) representativos da média de intensidade de fluorescência do controle saudável e dos pacientes antes e após o tratamento.

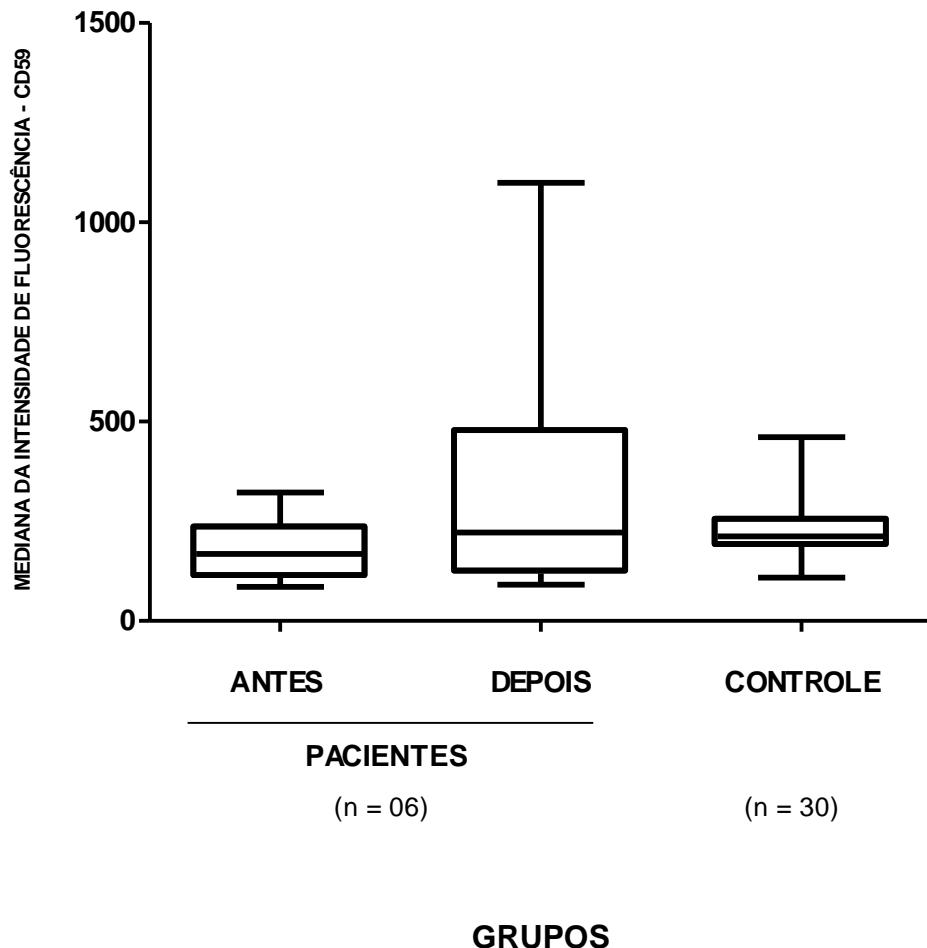
Figura 13 – Histogramas e gráficos de pontos representativos da expressão de CD59 nos eritrócitos.



Fonte: Elaborada pela autora. Indivíduo controle saudável (A); Paciente antes do tratamento (B); Paciente depois do tratamento (C). Nos histogramas, linhas amarelas representam o controle isotípico e linhas azuis representam as células marcadas com anti-CD59-PE. Gráficos de pontos correspondendo à frequência de eritrócitos $CD59^+$ expressos detectados pelo canal de fluorescência 2 (FL2-H) versus canal de fluorescência 1 (CD35-FITC).

A análise da MIF do CD59 mostrou que não houve diferença estatística significante nos pacientes antes e depois do tratamento ($p = 0,3715$), e nem com relação ao grupo controle (antes vs controle: $p = 0,1372$; depois vs controle: $p = 0,1421$). A média encontrada nos pacientes antes do tratamento foi de $185,24 \pm 92,29$, depois do tratamento foi de $190,68 \pm 77,20$ e do grupo de controles saudáveis foi de $230,58 \pm 75,51$ (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Distribuição das médias e desvios-padrões da mediana de intensidade de fluorescência do CD59 nos eritrócitos dos pacientes, antes e depois do tratamento, e do grupo de controle saudáveis.

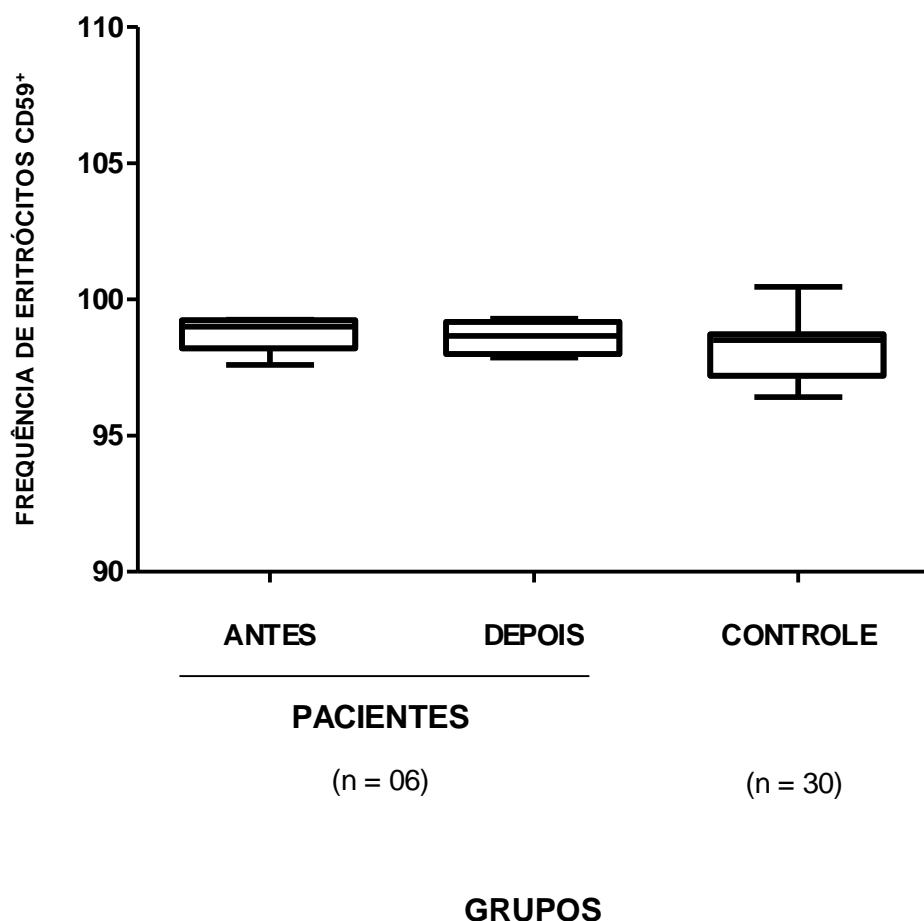


Fonte: Elaborada pela autora. Teste t; p – valor não significante.

A análise da frequência de eritrócitos positivos para o CD59 mostrou que a média encontrada nos pacientes antes do tratamento foi de $98,73 \pm 0,67$, após o tratamento foi de $84,15 \pm 35,21$ e dos controles saudáveis foi de $98,25 \pm 0,96$. Assim, não houve nenhuma

diferença estatística entre os pacientes não tratados ou tratados ($p = 0,4696$) nem com relação ao grupo controle (antes vs controle: $p = 0,1964$; depois vs controle: $p = 0,3374$) (Gráfico 7).

Gráfico 7- Distribuição das médias e desvios-padrões da frequência de eritrócitos positivos para o CD59 dos pacientes, antes e depois do tratamento, e do grupo de controles saudáveis.



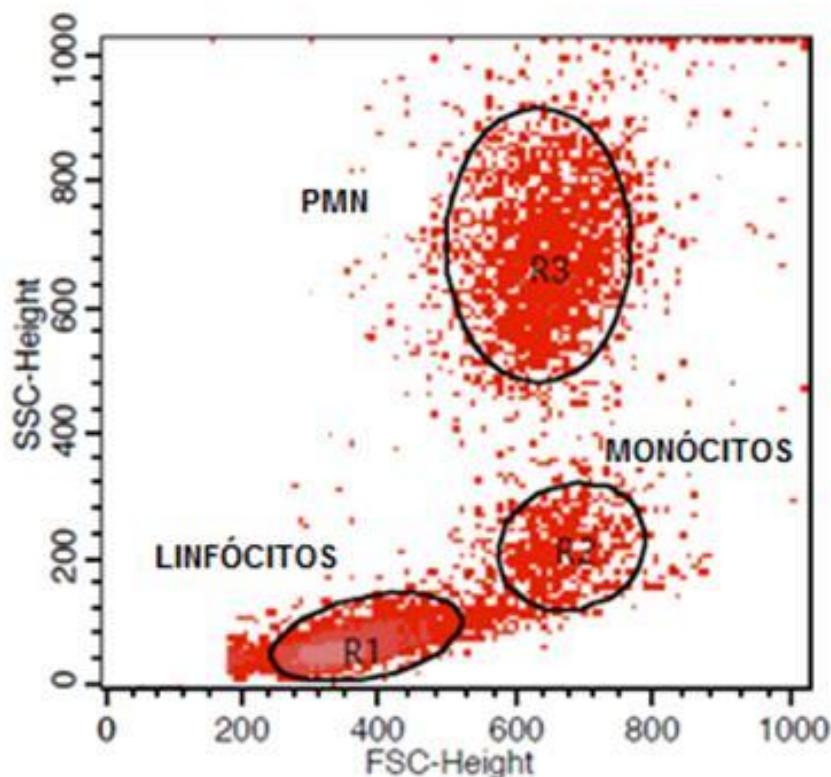
Fonte: Elaborada pela autora. Teste t; p – valor: não significante.

8.6 Expressão e distribuição da frequência do CR1/CD35 na membrana dos leucócitos

Em 18 pacientes, fizemos a análise da expressão do CR1/CD35, antes e depois do tratamento, nos leucócitos: linfócitos, monócitos e polimorfonucleares - neutrófilos. No ensaio utilizado, linfócitos, monócitos e neutrófilos possuem propriedades de dispersão da luz distintas de acordo com o tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC). Assim, cada célula foi definida pela medida da intensidade de fluorescência dada por FSC x SSC em uma escala linear. O valor das MIFs em todas as populações foi dado pela mediana dos histogramas, onde o valor do controle isotípico foi descontado da fluorescência do CD35.

A figura 14 mostra a definição das *gates* das populações de linfócitos, monócitos e polimorfonucleares-neutrófilos.

Figura 14 - Citograma mostrando a distribuição das populações leucocitárias por tamanho e granulosidade (FSC x SSC).

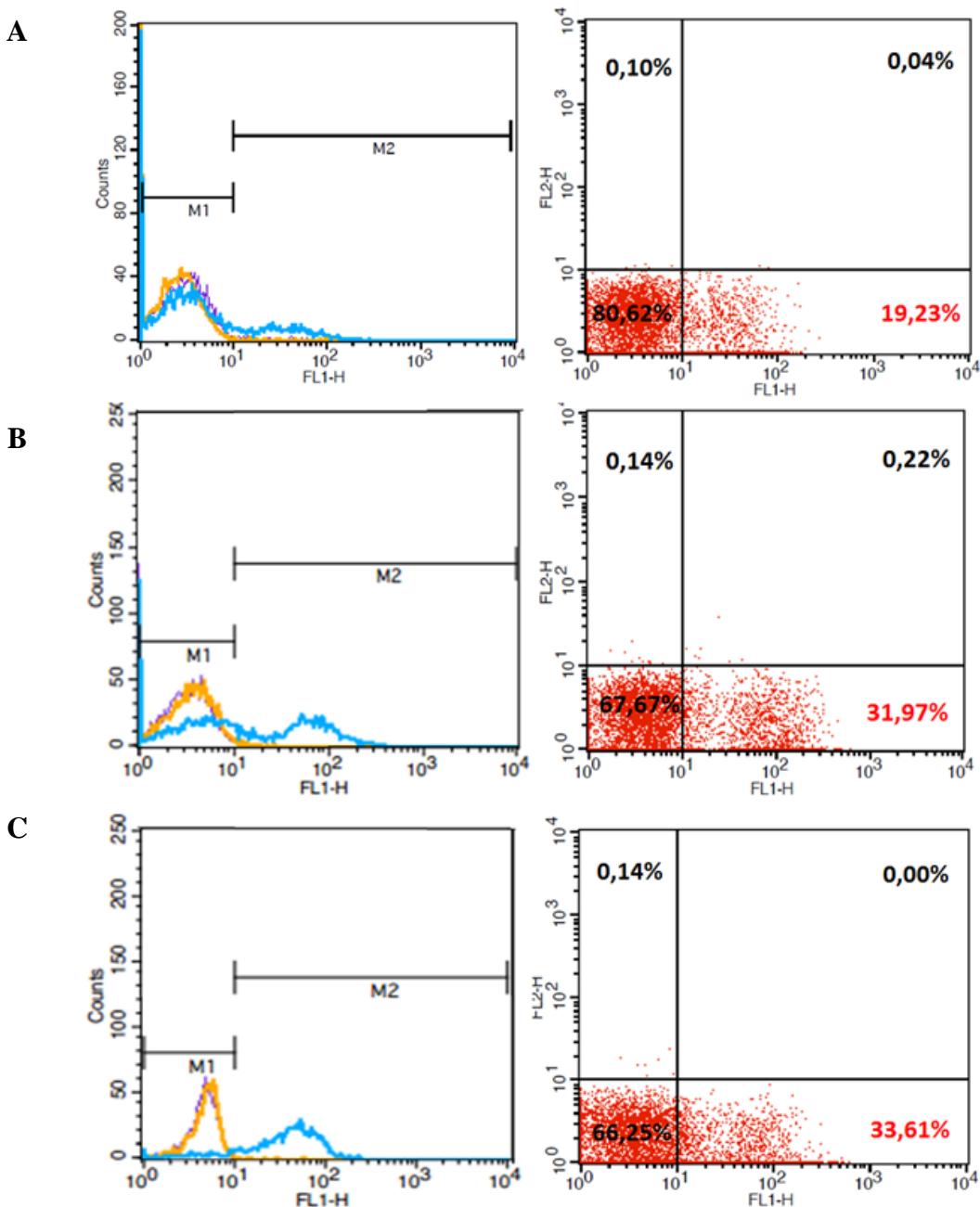


Fonte: Elaborada pela autora. *Gate R1*, linfócitos; *Gate R2*, monócitos; *Gate R3*, polimorfonucleares (PMN)-neutrófilos.

8.6.1. Linfócitos

Cinco mil eventos foram adquiridos na *gate* de linfócitos para cada paciente e controle. A mediana de intensidade de fluorescência (MIF) foi obtida de cada amostra. A figura 15 mostra os histogramas e gráficos tipo *dot plot* representativos da mediana de intensidade de fluorescência e da frequência de células CR1/CD35 positivas do controle saudável e de um paciente, antes e após o tratamento.

Figura 15 – Histogramas e gráficos de pontos representativos da expressão do CR1/CD35 nos linfócitos.

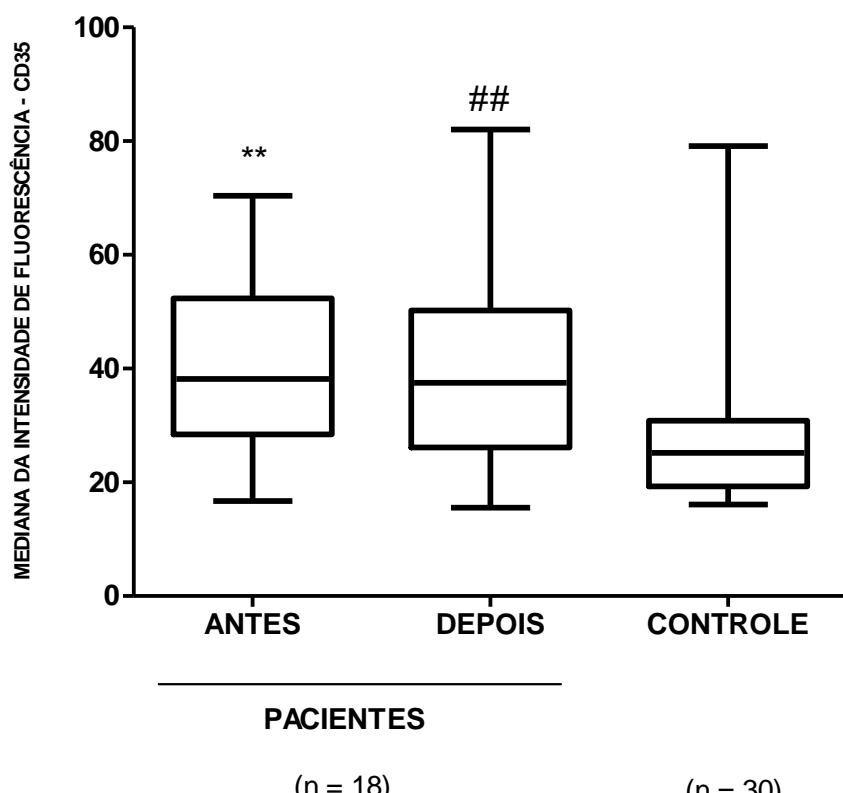


Fonte: Elaborada pela autora. Controle saudável (A); Paciente antes do tratamento (B); Paciente depois do tratamento (C). Nos histogramas, linhas roxas representam as células não marcadas, linhas amarelas representam o controle isotípico e linhas azuis representam a intensidade de fluorescência das células marcadas com anti-CR1-FITC (FL1-H) *versus* número de células. Gráficos de pontos correspondendo à frequência de linfócitos CD35⁺ expressos detectados pelo canal de fluorescência 1 (FL1-H) *versus* canal de fluorescência 2 (FL2-H).

A MIF do CR1/CD35 nos linfócitos em indivíduos saudáveis foi de $27,81 \pm 12,43$. Nos pacientes, antes do tratamento, a média foi de $38,04 \pm 14,76$, mostrando uma regulação positiva na expressão do CR1 na superfície dos linfócitos em relação ao grupo controle ($p = 0,0036$).

Após o tratamento, a média das MIFs encontradas foi de $38,22 \pm 17,46$, não apresentando, portanto, significância estatística entre os pacientes, antes e depois do tratamento ($p = 0,8977$). Comparando os pacientes pós-tratamento com o grupo de controles saudáveis observamos significância estatística ($p = 0,0075$) (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Distribuição das médias e desvios-padrões da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) do CR1/CD35 nos linfócitos de pacientes, antes e depois do tratamento, e do grupo de controles saudáveis.



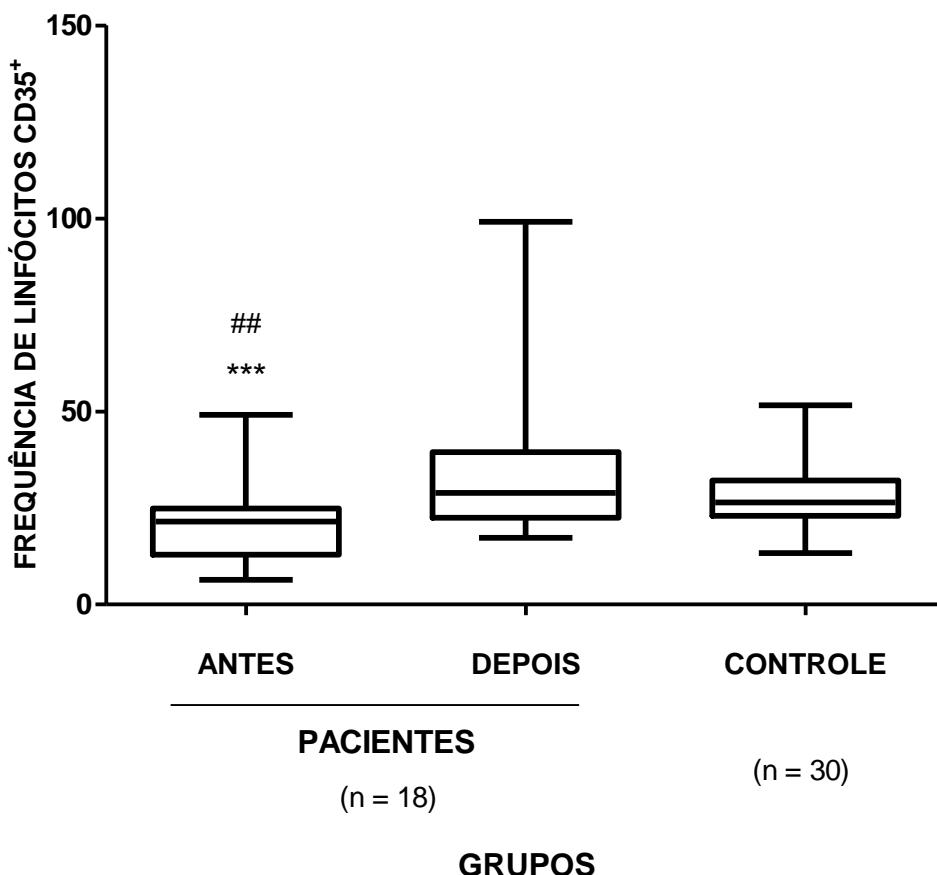
GRUPOS

Fonte: Elaborada pela autora. Teste Wilcoxon (antes vs depois); Teste Mann-Whitney (pacientes vs controle); ** $p = 0,0036$ vs grupo controle; ## $p = 0,0075$ vs grupo controle.

A análise da MIF do CR1/CD35 dos linfócitos de crianças *versus* adultos mostrou que houve um aumento com significância estatística nas crianças em relação aos adultos antes e após o tratamento. Entretanto, entre as crianças não houve diferença estatística significante antes e após o tratamento, bem como nessa mesma análise nos adultos.

A análise da frequência de linfócitos CD35⁺ utilizando o gráfico de pontos mostrou que a média encontrada nos pacientes antes do tratamento foi de $20,88 \pm 10,58$, após o tratamento foi de $34,47 \pm 19,77$; e dos controles saudáveis foi de $27,77 \pm 7,89$. Foi encontrada diferença com significância estatística na distribuição da frequência de linfócitos CD35⁺ nos pacientes antes do tratamento quando comparados a eles mesmos após o tratamento ($p = 0,0003$) e com o controle saudável ($p = 0,0040$). Não houve diferença estatística significante entre os pacientes após o tratamento e o grupo controle ($p = 0,4433$) (Gráfico 9).

Gráfico 9- Distribuição das médias e desvios-padrões da frequência do CR1/CD35 nos linfócitos dos pacientes, antes e depois do tratamento, e do grupo de controles saudáveis.



Fonte: Elaborada pela autora. Teste Wilcoxon (antes vs depois); Teste Mann-Whitney (pacientes vs controle); *** $p = 0,0003$ vs depois do tratamento; # $p = 0,0329$ vs grupo controle.

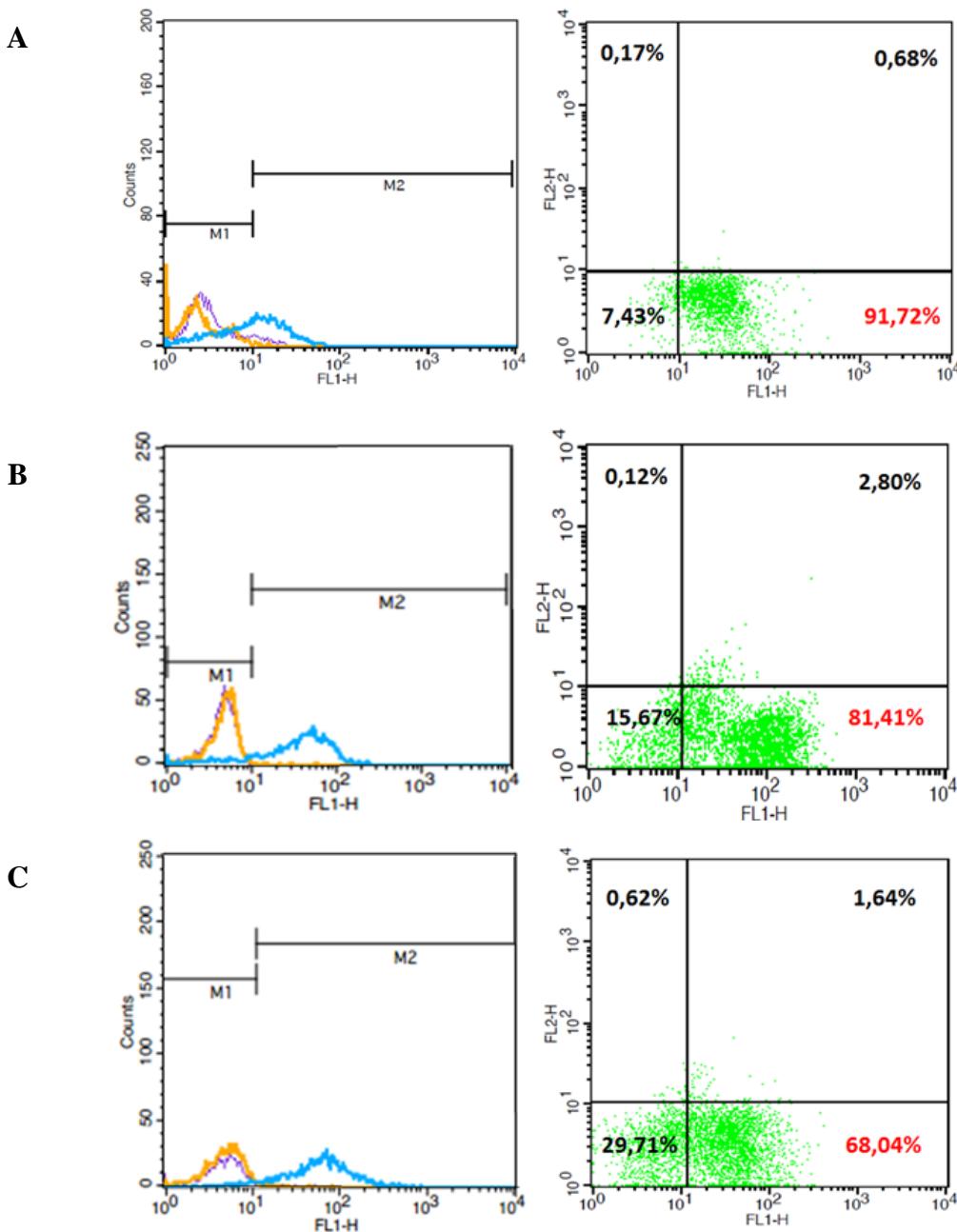
Comparando as crianças e os adultos, a análise da frequência de linfócitos CD35⁺ mostrou que houve uma diminuição com significância estatística tanto nas crianças como nos adultos, antes do tratamento em relação a depois do tratamento. As crianças apresentaram valores estatisticamente maiores de linfócitos CD35⁺ do que os adultos tanto antes do tratamento como depois do tratamento.

8.6.2. Monócitos

Na gate de monócitos foram adquiridos 4 mil eventos para cada paciente e/ou controle. A figura 16 mostra os histogramas e gráficos de pontos representativos da mediana de intensidade de fluorescência do controle saudável e dos pacientes antes e após o tratamento.

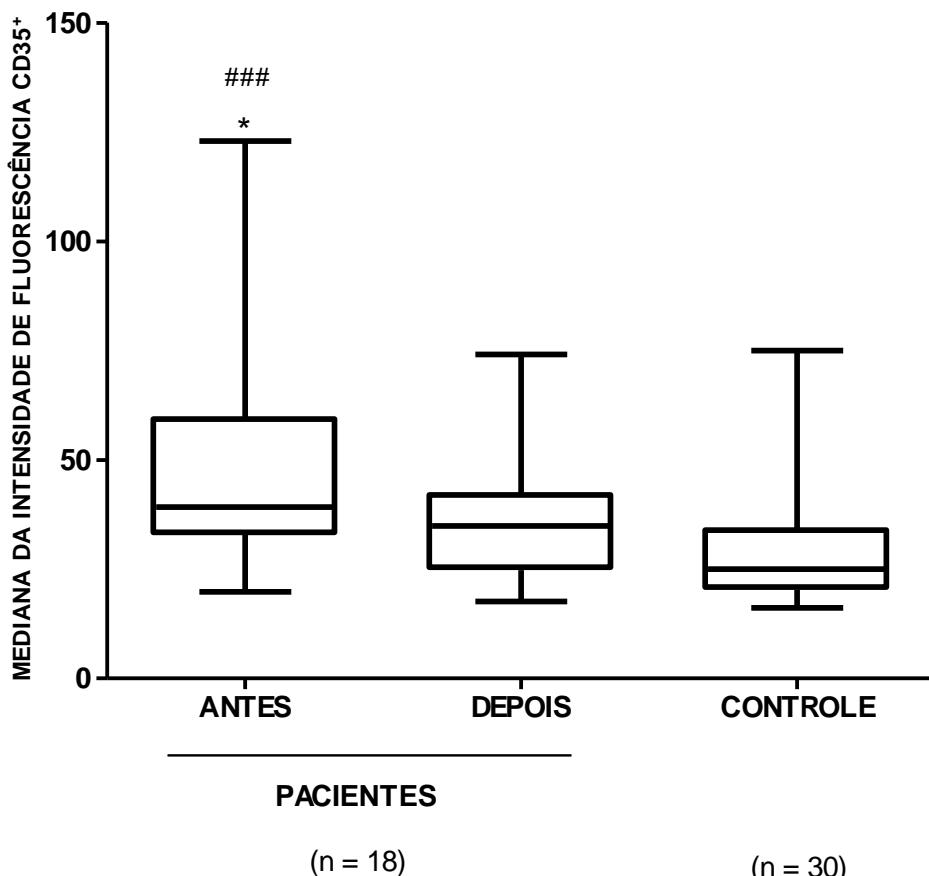
A média da MIF de monócitos CD35⁺ em indivíduos saudáveis foi de $28,63 \pm 12,58$. Em pacientes com Leishmaniose Visceral, antes do tratamento, a média foi de $45,63 \pm 24,14$, mostrando uma regulação positiva na expressão do CR1 na superfície dos monócitos em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$). Após o tratamento, a média das MIFs dos monócitos CD35⁺ encontrada foi de $33,64 \pm 14,77$, apresentando, portanto, uma diminuição com significância estatística entre os pacientes antes e depois do tratamento ($p = 0,0320$). Comparando os pacientes pós-tratamento com o grupo de controles saudáveis não houve significância estatística ($p = 0,0533$), mostrando uma aproximação com os valores encontrados nos indivíduos saudáveis (Gráfico 10).

Figura 16 - Histogramas e gráficos de pontos representativos da expressão do CR1/CD35 nos monócitos.



Fonte: Elaborada pela autora. Controle saudável (A); Paciente antes do tratamento (B); Paciente depois do tratamento (C). Nos histogramas, linhas roxas representam as células não marcadas, linhas amarelas representam o controle isotípico e linhas azuis representam a intensidade de fluorescência das células marcadas com anti-CR1-FITC (FL1-H) *versus* número de células. Gráficos de pontos correspondendo à frequência de monócitos CD35⁺ expressos detectados pelo canal de fluorescência 1 (FL1-H) *versus* canal de fluorescência 2 (FL2-H).

Gráfico 10 - Distribuição das médias e desvios-padrões da mediana de intensidade de fluorescência do CR1/CD35 nos monócitos de pacientes, antes e depois do tratamento, e do grupo de controles saudáveis.



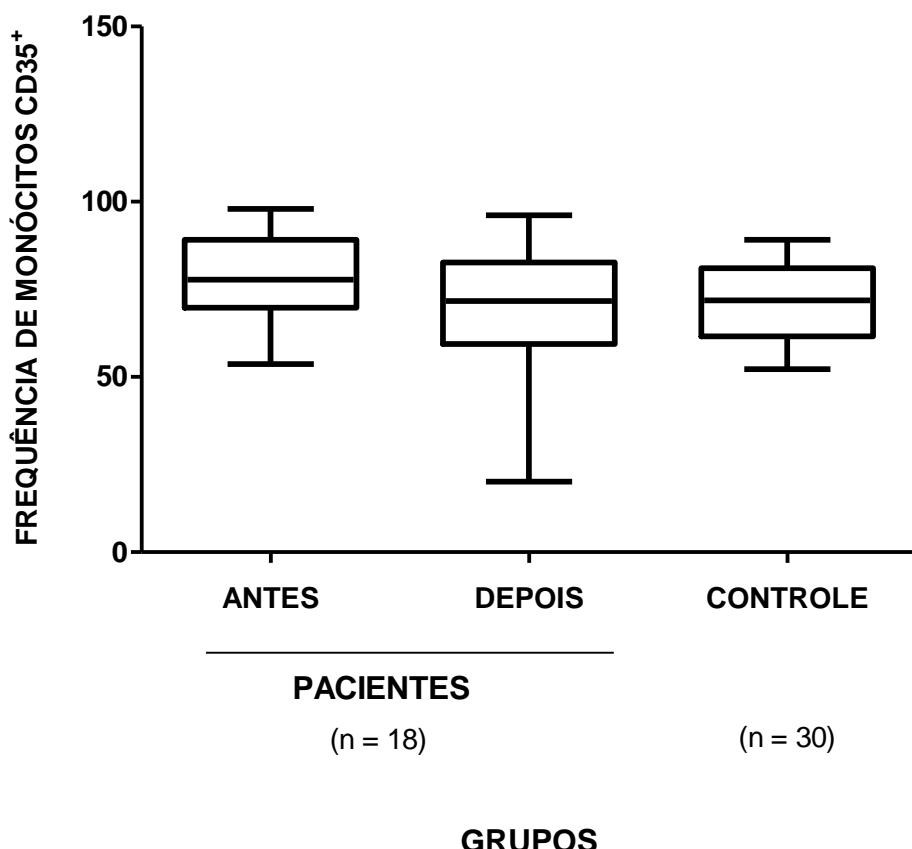
Fonte: Elaborada pela autora. Teste Wilcoxon (antes vs depois); Teste Mann-Whitney (pacientes vs controle); * p = 0,0320 vs depois do tratamento; *** p < 0,0001 vs controle.

A análise da MIF do monócitos $CD35^+$ dentro dos subgrupos crianças *versus* adultos, antes e depois do tratamento, mostrou que só houve significância estatística entre o grupo de controles saudáveis e as crianças e adultos antes do tratamento. Não houve diferença estatística significante nas seguintes comparações: crianças antes e depois do tratamento, adultos antes e depois do tratamento, crianças e adultos antes do tratamento ou

depois do tratamento. Após o tratamento os valores de MIF de monócitos CD35⁺ tanto das crianças como nos adultos não diferiram do grupo controle.

A análise da frequência de monócitos CD35⁺ mostrou que a média encontrada nos pacientes antes do tratamento foi de $78,21 \pm 11,84$, após o tratamento foi de $67,53 \pm 20,59$ e dos controles saudáveis foi de $71,34 \pm 11,13$. Mesmo não havendo diferença estatística significante, observou-se um aumento de monócitos positivos nos pacientes antes do tratamento quando comparados com o controle saudável ($p = 0,0580$). Também não houve diferença estatística entre os pacientes antes e depois do tratamento ($p = 0,0674$) e nem após o tratamento com o grupo controle ($p = 0,8731$) (Gráfico 11).

Gráfico 11- Distribuição das médias e desvios-padrões da frequência de monócitos positivos para o CR1/CD35 entre os pacientes antes e depois do tratamento eo grupo de controles saudáveis.



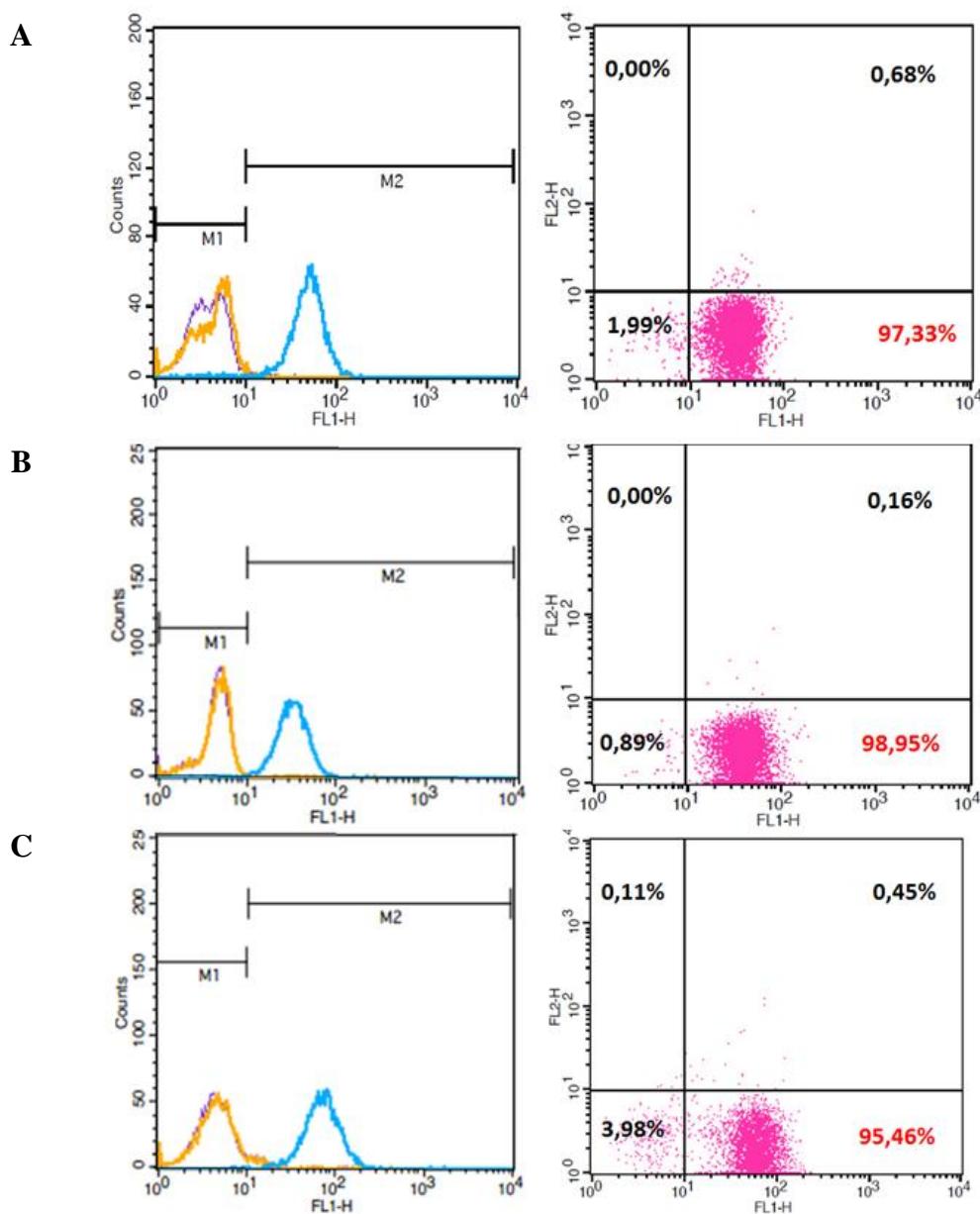
Fonte: Elaborada pela autora. Teste Wilcoxon (antes vs depois); Teste Mann-Whitney (pacientes vs controle).

Entre crianças e adultos, na análise da frequência de monócitos CD35⁺, apenas as crianças antes do tratamento mostraram um aumento na frequência de células positivas. Não houve diferença estatística nas demais comparações: crianças e adultos antes do tratamento; depois do tratamento; adultos antes e depois do tratamento.

8.6.3. Polimorfonucleares-Neutrófilos

Cinco mil eventos foram adquiridos na *gate* de neutrófilos para cada paciente ou controle. A figura 17 mostra os histogramas e gráficos de pontos representativos da mediana de intensidade de fluorescência do controle saudável e dos pacientes antes e após o tratamento.

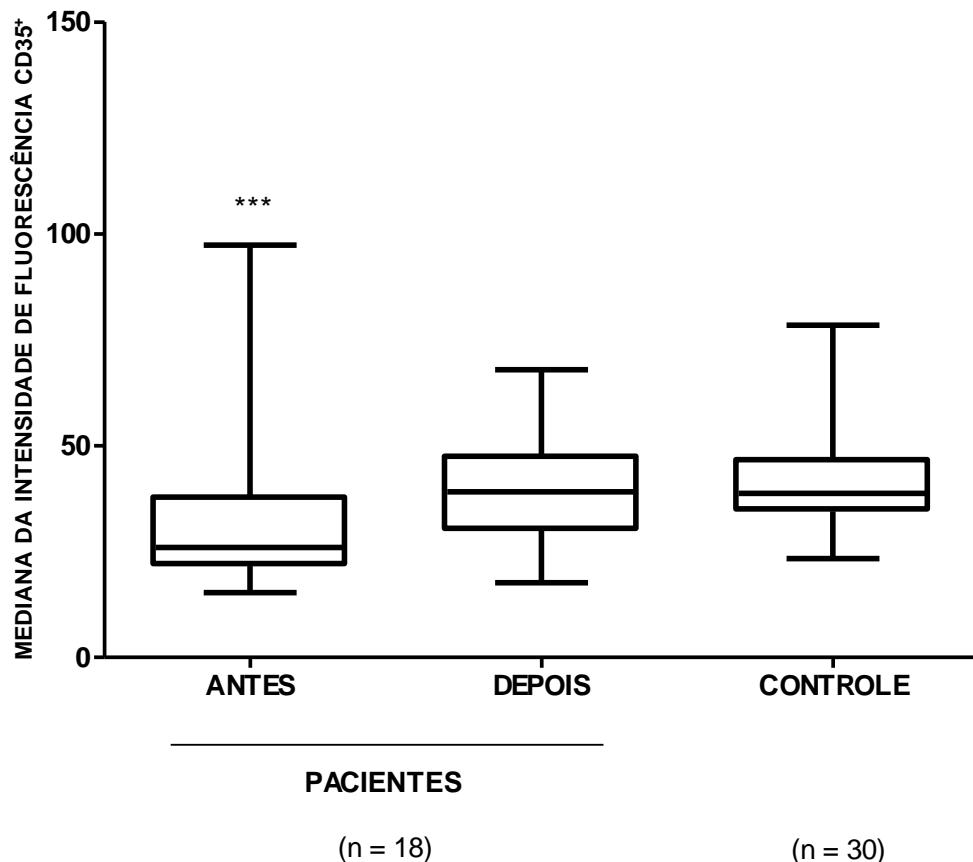
Figura 17- Histogramas e gráficos de pontos representativos da expressão do CR1/CD35 nos neutrófilos.



Fonte: Elaborada pela autora. Controle saudável (A); Paciente antes do tratamento (B); Paciente depois do tratamento (C). Nos histogramas, linhas roxas representam as células não marcadas, linhas amarelas representam o controle isotípico e linhas azuis representam a intensidade de fluorescência das células marcadas com anti-CR1-FITC (FL1-H) *versus* número de células. Gráficos de pontos correspondendo à frequência de neutrófilos CD35⁺ expressos detectados pelo canal de fluorescência 1 (FL1-H) *versus* canal de fluorescência 2 (FL2-H).

A média da MIF do CR1/CD35 nos neutrófilos em indivíduos saudáveis foi de $41,51 \pm 12,44$. Em pacientes com Leishmaniose Visceral, antes do tratamento, a média foi de $34,43 \pm 20,23$, mostrando uma redução na expressão do CR1 na superfície dos neutrófilos em relação ao grupo controle ($p < 0,0007$). Após o tratamento, a média das MIFs encontrada foi de $36,26 \pm 13,65$, não apresentando, portanto, significância estatística entre os pacientes antes e depois do tratamento ($p = 0,0890$), nem com o grupo de controles saudáveis ($p = 0,4753$). Mesmo não apresentando significância estatística, foi possível observar um aumento na MIF do CR1 após o tratamento (Gráfico 12).

Gráfico 12 - Distribuição das médias e desvios-padrões da mediana de intensidade de fluorescência do CR1/CD35 nos neutrófilos entre pacientes antes e depois do tratamento com o grupo de controles saudáveis.



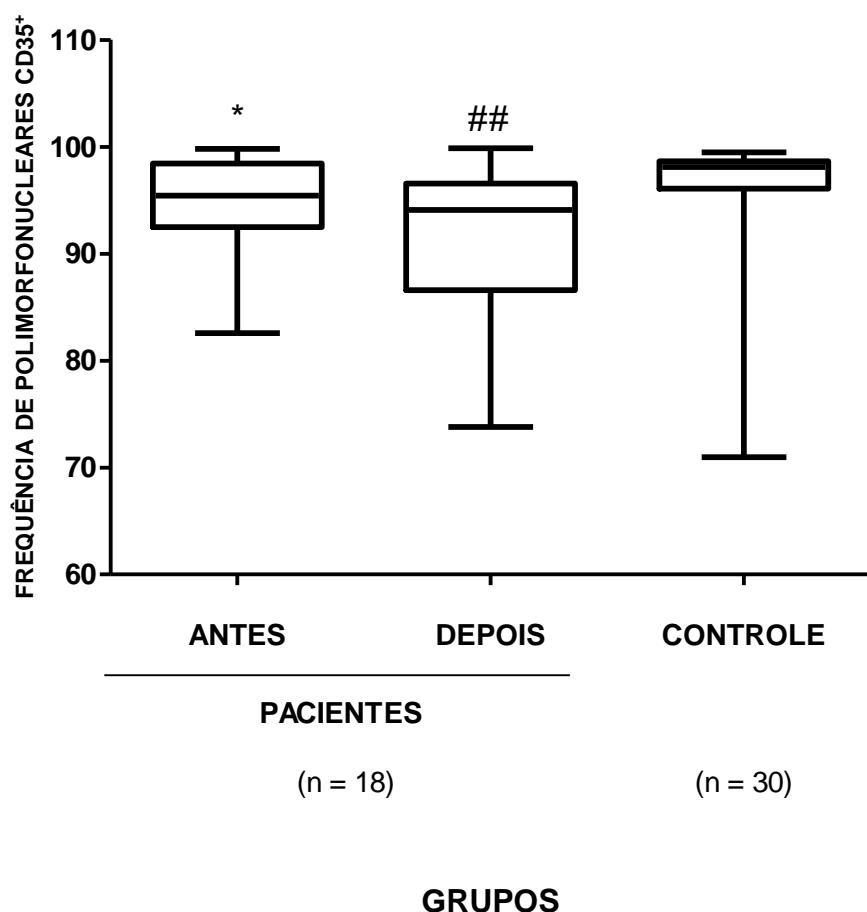
GRUPOS

Fonte: Elaborada pela autora. Teste Wilcoxon (antes vs depois); Teste Mann-Whitney (pacientes vs controle); *** $p = 0,0007$ vs controle.

As MIFs do CR1/CD35 dos neutrófilos de crianças e adultos, antes e depois do tratamento, não foram significantes.

A análise da frequência de neutrófilos CD35⁺ mostrou que a média encontrada nos pacientes antes do tratamento foi de $94,58 \pm 4,82$, após o tratamento foi de $91,54 \pm 6,99$ e dos controles saudáveis foi de $95,24 \pm 7,01$. Nos pacientes antes do tratamento houve um pequeno aumento em relação à frequência depois do tratamento ($p = 0,0407$). Após o tratamento encontramos uma diferença estatística ainda significante com relação ao grupo controle ($p = 0,0060$). Não houve diferença estatística entre o grupo controle e os pacientes antes do tratamento ($p = 0,2501$) (Gráfico 13).

Gráfico 13- Distribuição das médias e desvios-padrões da frequência de neutrófilos positivos para o CR1/CD35 entre os pacientes antes e depois do tratamento e o grupo de controles saudáveis.



Fonte: Elaborada pela autora. Teste Wilcoxon (antes vs depois); Teste Mann-Whitney (pacientes vs controle);

* $p = 0,0407$ vs depois do tratamento; ## $p = 0,0060$ vs depois do tratamento.

Entre crianças e adultos, na análise da frequência de polimorfonucleres CD35⁺, não foi encontrada diferença estatística nas comparações: crianças antes e depois do tratamento; adultos antes e depois do tratamento; crianças e adultos antes e depois do tratamento.

9 DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral ou calazar é uma doença endêmica, típica de países tropicais, ainda bastante negligenciada e acomete principalmente a população mais pobre. Uma vez no hospedeiro, as promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos (células-alvo), onde se reproduzem e transformam-se em amastigotas. Estas se replicam e invadem outras células, disseminando a infecção. A complexa interação parasita-hospedeiro determinará o desenvolvimento ou não da doença, onde o controle da infecção será mediado pela imunidade celular. A ação do sistema imune no combate à infecção é através das células Th1, que secretam IFN- γ para a ativação dos macrófagos levando à consequente ação leishmanicida dessas células (SAVIOA, 2015).

As características clínicas encontradas nos pacientes que foram estudados não diferem daquelas já reportadas em outros estudos (BRAGA *et al*, 2013; DIRO *et al*, 2015), com predomínio de febre, perda de peso associada à falta de apetite, distensão abdominal e a palidez. Os sintomas e o desenvolvimento da leishmaniose visceral são mais graves nas crianças. Ambos os性os são infectados, porém os meninos são mais atingidos do que as meninas, característica que também se manifestou neste estudo. Os adultos são igualmente infectados quanto ao gênero, no entanto, o número de homens em nosso estudo foi 4:1 em relação ao sexo feminino, diferença esta talvez determinada pelo pequeno número de casos estudados.

No calazar, o comprometimento hematológico é comum. A pancitopenia foi encontrada em todos os pacientes. As causas para essa anormalidade podem estar associadas à duração dos sintomas, a um maior tempo entre o início do quadro e o início do tratamento, à esplenomegalia e ao aumento da destruição periférica das células ao invés de uma falha na produção na medula óssea (revisto em HAMID, 2009).

Quanto à trombocitopenia, um achado característico da leishmaniose visceral, 92% dos pacientes apresentaram contagem de plaquetas inferior a 150 mil/ mm³. Um estudo feito por Marwaha *et al* (1991) mostrou que a média de duração da leishmaniose visceral foi maior nos pacientes trombocitopênicos do que naqueles não trombocitopênicos. Acredita-se que a trombocitopenia esteja associada ao hiperesplenismo, à baixa produção de plaquetas devido à carga parasitária na medula e também ao sequestro esplênico (MARWAHA *et al*, 1991; VARMA *et al*, 2010).

A leucopenia (linfopenia e neutropenia) é encontrada em grande frequência nos pacientes com leishmaniose visceral. Neste estudo 60% dos pacientes apresentaram linfopenia e 76% neutropenia. Relatos na literatura mostram que a piora da neutropenia está fortemente associada ao hiperesplenismo (revisto em HAMID, 2009), à hipoplasia ou depressão medular, ao sequestro esplênico (OLIVEIRA *et al*, 2010) e à leucofagocitose (AL-JURAYYAN *et al*, 1995).

O quadro de anemia grave é característico na leishmaniose visceral e pode determinar o curso da doença no indivíduo, sua evolução durante o tratamento e a sua recuperação. A anemia esteve presente em 67% dos pacientes. De acordo com os resultados obtidos, nos pacientes com calazar sem tratamento, houve uma redução na expressão do número de CR1 nos eritrócitos e na frequência de células positivas para a molécula em relação ao grupo controle saudável. Vários relatos já demonstraram que aquela redução em diversas doenças pode gerar prejuízos na remoção dos ICC, como os resultados encontrados em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (BIRMINGHAM *et al*, 2006), doenças hepáticas crônicas (MIYAIKE *et al*, 2002) e malária (STOUTE *et al*, 2003), sugerindo que a molécula de CR1 provavelmente participa da patogênese de doenças mediadas pelo acúmulo de ICC. Após o tratamento, foi observado uma recuperação tanto da expressão do CR1 quanto da quantidade de células positivas para essa molécula. Em pacientes com tuberculose foi relatado que o menor número de CR1 estava relacionado à gravidade da doença (SENBAGAVALLI *et al*, 2008). Já na hanseníase, as médias dos níveis de CR1 variaram conforme a manifestação clínica da doença, sendo menores nos indivíduos com as formas mais graves (TAUSK *et al*, 1985).

Diversos fatores podem estar relacionados com a redução na expressão do CR1 na membrana dos eritrócitos, mas aqueles que explicariam essa redução nas doenças ainda permanecem desconhecidos. Acredita-se que o polimorfismo do número da molécula em eritrócitos, que determina fenótipos de alta (HH), média (HL) e baixa expressão (LL), não se correlaciona com a perda do CR1. Em estudos com pacientes com LES, foi visto que o índice de perda da molécula foi semelhante em pacientes com genótipos HH e LL, mostrando que é um fenômeno adquirido e não hereditário (MOLDENHAUER *et al*, 1988). Dessa forma, fatores relacionados ao curso da progressão da doença podem estar relacionadas à expressão do CR1 nos eritrócitos. A recuperação da expressão da molécula encontrada nos pacientes deste

trabalho após o tratamento é um outro fator que sugere o caráter adquirido da perda da molécula.

Uma primeira hipótese sobre a origem da perda do CR1 seria um possível mascaramento do epítopo do CR1/E por imunocomplexos ou por autoantígenos contra o CR1 (WILSON *et al*, 1985), cuja produção no calazar é aumentada (SULTAN *et al*, 2014). Tal hipótese pode ser contestada pelo ensaio experimental realizado por Cosio *et al* (1990) que utilizaram o anticorpo anti-CR1 clone E11 (o mesmo utilizado neste estudo), que se liga aos CR1 agrupados dos eritrócitos, mesmo que estejam ligados à tríade Complemento-Anticorpo-Antígeno. O objetivo era mensurar o papel dos ICC na redução do CR1. Os resultados mostraram que a diminuição encontrada não foi atribuída à ocupação do CR1 pelos ICC, uma vez que a redução persistiu após o ICC ter sido removido do eritrócito. Assim, para os autores, a redução estaria associada aos altos níveis de ICC, à sobrecarga de transporte para as células fagocíticas do fígado e do baço, causando uma supersaturação da molécula e perda de parte do receptor, com os eritrócitos retornando à circulação dessa forma.

Outra hipótese para a perda do CR1 seria o intenso ambiente inflamatório encontrado em doenças malignas, inflamatórias ou infecciosas. Em um estudo onde foi avaliada a correlação entre esses dois aspectos *in vivo* mostrou-se que proteinases, incluindo a elastase, trombina e plasmina, estão fortemente relacionadas à redução do CR1 nos pacientes avaliados com artrite reumatoide e câncer de pulmão. Nos processos de degranulação ou destruição dos neutrófilos, muitas proteinases são liberadas e/ou ativadas, levando ao não funcionamento das proteinases inibidoras. Pacientes neutropênicos liberariam mais elastase devido à ligação de anticorpos nos neutrófilos e à ativação do complemento. Essa liberação de enzimas pelos neutrófilos no endotélio vascular não causaria a redução do CR1 devido à neutralização pelas proteínas plasmáticas inibidoras antes do contato com o eritrócito. Os locais mais propícios para essa proteólise seriam, então, a medula óssea e o baço. Assim, essa hipótese afirma que o CR1 poderia ser quebrado por enzimas granulares ou por proteinases ativadas no plasma (CURRIE *et al*, 1990).

Uma outra possível causa para a redução do CR1 poderia ser os elevados níveis de proteína C reativa no soro. Essa proteína ativa a cascata do complemento e se liga ao CR1 dos eritrócitos via fragmentos C3b. Em um estudo experimental, avaliando a ligação da proteína aos eritrócitos de pacientes com calazar, foi observado que a proteína C reativa glicosilada promove uma alteração na integridade da membrana eritrocitária, promovendo então a lise da

célula (ANSAR *et al*, 2013). Além disso, a *Leishmania* opsonizada via lipofosfoglicanos e ligada à proteína C, ocorre o aumento da fagocitose do parasito pelos macrófagos (BODMAN-SMITH *et al*, 2002). Elevados níveis de proteína C ligada ao C3b e ao CR1 são provavelmente transportados da circulação da mesma forma que os demais imunocomplexos. A redução do CR1 poderia estar também relacionada a esse fato (TEIXEIRA *et al*, 2000).

Também já foi reportado que um aumento na deposição de C3b nos eritrócitos pode contribuir com a redução do CR1, uma vez que os eritrócitos ligam-se às células fagocíticas e causam a degranulação dessas células (revisto em CURRIE *et al*, 1990). A liberação e a elevação dos níveis de proteínas hepáticas no sangue antes e durante o tratamento da leishmaniose visceral, como a fosfatase alcalina e as transaminases (EL HAG *et al*, 1994), assim como a regulação positiva de precursores das proteínas amiloide, tripsina, fibrinogênio e apolipoproteína (BAG *et al*, 2014) poderia estar também relacionada à proteólise do CR1.

A hipótese mais amplamente aceita é a perda do CR1 durante a transferência dos ICC, uma vez que o contato próximo entre os eritrócitos e as células fagocíticas poderiam facilitar a proteólise do CR1/E por proteases associadas aos macrófagos, que atuam na liberação do ICC preso ao CR1 para sua internalização (NARDIN *et al*, 1999). Essa perda seria dependente do tempo de contato entre os eritrócitos e os fagócitos (revisto em TAUSK *et al*, 1990).

Após o tratamento, os possíveis fatores que podem contribuir para a redução do CR1 começam a se normalizar, promovendo o aumento da expressão da molécula nos eritrócitos e da quantidade de células positivas. A ativação policlonal das células B pode ser crucial para a defesa inicial do hospedeiro, apesar de contribuir com a produção de anticorpos específicos para a *Leishmania* e, contrariamente, por ativar os mecanismos de escape dos microrganismos, diluindo os anticorpos específicos e aumentando os anticorpos irrelevantes. Além disso, essa ativação pode ser responsável pela manutenção das células B de memória sem a presença de estimulação de抗ígenos específicos (VESELY *et al*, 2012).

Os altos níveis de ICC encontrados nos pacientes com leishmaniose visceral são atribuídos à ativação policlonal das células B que geram uma hipergamaglobulinemia, elevada quantidade de anticorpos específicos anti-*Leishmania* e de auto-anticorpos (GALVÃO-CASTRO *et al*, 1984; revisto em Soares *et al*, 2006). Esses ICC ligados ao componente C1q do complemento contêm抗ígenos de *Leishmania* e podem influenciar a progressão e o resultado da doença através da indução de citocinas pró ou anti-inflamatórias, como a GM-CSF, que ativa a ação leishmanicida dos macrófagos. Há hipóteses de que, no início do tratamento, um grande

número de parasitas são destruídos, ocasionando a liberação de抗ígenos na circulação e o aumento da concentração de ICC formados com esses抗ígenos. Aqueles pacientes com a forma aguda da doença teriam uma carga parasitária maior do que os da forma sub-aguda (ELSHAFIE *et al*, 2007). A alta produção de IL-10 pelas células Th2 e pelas células T regulatórias também contribui para a produção elevada de ICC (revisto por ELSHAFIE *et al*, 2007).

Alguns relatos têm mostrado o papel dos ICC como imunomoduladores, agindo nas respostas imunes celulares por ativação ou a inibição de sinais através da ligação aos receptores Fc, receptores para抗ígenos e para complemento das células T e B (revisto em SENBAGAVALLI *et al*, 2012). Desta forma os ICC interligam a especificidade do sistema imune adaptativo às funções efetoras ativadas pelas células do sistema imune inato (NIMMERJAHN *et al*, 2008). Possíveis efeitos dos ICC na resposta imune são seu efeito supressor, seja por mascaramento ou por bloqueio, por se ligar ao receptores de抗ígenos nos linfócitos, ou os receptores para os anticorpos (FcR) Fc das células B (regulação isotípica), por induzir a liberação de fatores supressores, por estimular a proliferação das células B (levando a exaustão clonal) ou por bloqueio da interação entre células T e B. Os ICC também podem promover a inibição das reações citolíticas mediadas por células, do estímulo das células T *helper* e levar alteração do tráfego de linfócitos, dentre outras ações (revisto em THEOFILOPOULOS *et al*, 1980).

Em um estudo avaliando os fatores supressores presentes no soro de pacientes com leishmaniose visceral não foi encontrada correlação entre a concentração de ICC e as atividades imunossuppressoras previamente reportadas em outras parasitemias (SOARES *et al*, 2006). É importante enfatizar que a capacidade dos ICC de interferir com os mecanismos imunes e de ativar ou inibir as funções linfocitárias pode representar os seus mais importantes efeitos em algumas doenças.

Em doenças mediadas por ICC foi observada a elevação da concentração no soro dos pacientes antes do tratamento e com correlação negativa com a expressão do CR1/E, uma vez que o transporte de ICC fica comprometido com a redução dessa molécula. Em pacientes com tuberculose, a relação entre a média da concentração sanguínea dos ICC e a média dos níveis do grupo controle saudável foi de 2,08 (SENBAGAVALLI *et al*, 2008); em pacientes com paracoccidioidomicose foi de 2,04 e 1,05, antes e após o tratamento, respectivamente (TEIXEIRA *et al*, 2000); em pacientes antes do tratamento com malária de 1,49 (MIYAIKE

et al, 2002); em portadores de HIV de 2,24 (TAUSK *et al*, 1986); e, em um estudo com pacientes com a forma aguda da leishmaniose visceral, foi de 3,28 em relação ao controle (ELSHAFIE *et al*, 2007).

Neste estudo a relação entre a média da concentração sanguínea dos ICC nos pacientes com os valores de referência considerados negativos, antes do tratamento foi de 8,86, e, após o tratamento, de 4,43. Diferentemente do reportado nos estudos acima, não foi encontrada correlação com a expressão do CR1/E, do CR1/N e os níveis de ICC, nem antes nem depois do tratamento. Primeiro, houve flutuações dos níveis de ICC com poucas variações dos valores de MIF CR1/E. No pós-tratamento os níveis de ICC mantiverem-se elevados enquanto o CR1/E variou entre os pacientes (elevando-se na maioria deles). A dosagem de imunocomplexos, com a identificação de antígenos de *Leishmania* no soro dos pacientes com leishmaniose visceral pode ser utilizada como uma importante ferramenta de diagnóstico (CHAKRABORTI *et al*, 2003).

Para uma maior compreensão dos efeitos da leishmaniose visceral nas proteínas regulatórias do complemento presentes nos eritrócitos, foi avaliada a expressão da molécula CD59, que age interferindo na estruturação do complexo de ataque à membrana, prevenindo danos ao próprio organismo (PICCOLI *et al*, 2011). Não foi encontrada nos pacientes qualquer variação na expressão dessa molécula antes ou após o tratamento, diferentemente do reportado no estudo realizado em pacientes com LES, onde houve um aumento da expressão do CD59 como um mecanismo compensatório à perda do CR1/E (ARORA *et al*, 2000). Com a utilização de marcadores para essa molécula foi possível observar que a leishmaniose visceral reduz a expressão do CR1, único receptor para complemento no eritrócito atualmente conhecido relacionado à infecção.

Muito pouco se sabe sobre o papel do CR1 nos linfócitos. A formação e a montagem de uma resposta imune humoral apropriada dependem da ativação dos receptores das células B (BCR) e um equilíbrio nas sinalizações fornecidas pelos ICC ligados aos receptores CR1 e FcR. O CR1 nos linfócitos B medeia sinais inibitórios que controlam as funções e a proliferação dessas células (JÓZSI *et al*, 2002). Já nos linfócitos T, o CR1 parece regular positivamente a resposta imune (RODGAARD *et al*, 1995).

A imunossupressão da resposta celular, característica da leishmaniose visceral, vem da incapacidade das células apresentadoras de antígenos de processarem os antígenos provenientes da *Leishmania* e de os apresentarem via MHC classe II para o receptor das

células T (TCR). Assim, ocorre a geração de uma resposta não funcional durante a progressão da doença com diminuição da resposta Th1 e dos níveis de IFN- γ . A infecção está associada com a perda da imunidade celular mediada por antígeno específico, já demonstrada em experimentos de proliferação de linfócitos, como uma falha na resposta aos antígenos da *Leishmania* por células mononucleares do sangue periférico. A anergia dessa resposta em hospedeiros imunocompetentes durante a evolução da infecção é específica para esses antígenos e é generalizada (revisto em FLORA *et al*, 2014).

O CR1 é expresso entre 10 a 15% dos linfócitos T periféricos, onde estão presentes aproximadamente 3.000 cópias do CR1 por célula T. Sua expressão é regulada positivamente pela ativação das células T, dessa forma, podemos presumir que o CR1 é um receptor regulador (WAGNER *et al*, 2006). Rodgaard, avaliando a possível função do CR1 nos linfócitos T, observou uma tendência à regulação positiva dessa molécula quando essas células são ativadas com fitohemaglutinina, bem como quando estavam na presença de monócitos durante a estimulação (RODGAARD *et al*, 1995). Dessa forma, monócitos ativados e seus produtos durante a resposta imune podem justificar o aumento da expressão do CR1 nos linfócitos de pacientes com leishmaniose visceral.

Em um outro estudo experimental realizado por Wagner e colaboradores com a utilização de anticorpos anti-CR1 foi observado que esses anticorpos inibiam a proliferação induzida por ativação dos linfócitos T. O mesmo fato se repetia também na presença de IL-2. Essa expressão variava de acordo com as diferentes especificidades dos clones utilizados. A proliferação era inibida a nível de redução de síntese de DNA e/ou da divisão celular, deixando essas células presas na fase G1. Essa inibição seria por conta do anticorpo mimetizar os ligantes naturais e emitir sinais idênticos a eles. O CR1 bloquearia a ativação contínua, transmitindo, então, um sinal inibitório (WAGNER *et al*, 2006). Delibrias e colaboradores determinaram que o CR1 dos linfócitos T pode facilitar a infecção do vírus do HIV opsonizado (DELIBRIAS *et al*, 1993).

Acredita-se que a expressão anormal de receptores para ICC nas células B pode modular sinais suficientes para ativá-las, mas, em situações em que a concentração de ICC está elevada, ocorre uma falha na regulação positiva da inibição do CR1 (ERDEI *et al*, 2009). Os achados acima reportados podem, possivelmente, justificar o aumento da expressão do CR1 nos linfócitos de pacientes com leishmaniose visceral.

Ao final do tratamento dos pacientes a média da expressão do CR1 dos linfócitos encontrava-se ainda elevada, mas com uma tendência à normalização em relação aos valores encontrados

nos indivíduos controles saudáveis. Esse fato pode estar relacionado à uma persistência da estimulação antigênica e, ainda, aos elevados níveis de ICC. Uma redução mais acentuada na expressão do CR1 poderia ser encontrada se coletas posteriores fossem realizadas após um tempo maior do término do tratamento. A recuperação da frequência de linfócitos positivos para o CR1 pós tratamento demonstra dados já relatados de que a melhoria completa da resposta hematológica se dá com 4 a 6 semanas após o início do tratamento (revisto em VARMA *et al*, 2010).

Monócitos e neutrófilos possuem semelhanças quanto ao padrão de expressão do CR1 quando estão em repouso. O CR1 localiza-se, em sua maioria, intracelularmente e, também, na membrana plasmática de maneira esparsa. Os receptores não ficam disponíveis para ligações na membrana, no entanto, ocorre um rápido translocamento quando essas células são estimuladas (VAN FURTH, 1985). O estudo do CR1 em diversas doenças tem demonstrado que a expressão dessa molécula possui uma relação muito próxima com a fisiopatologia. Para as células nucleadas, a modulação da expressão é diferente da observada nos eritrócitos, onde as citocinas podem atuar originando efeitos diversos.

Nos monócitos dos pacientes antes do tratamento foi observado um aumento da expressão do CR1 e da frequência de células positivas. O padrão de resposta imune desenvolvido pelo hospedeiro durante a leishmaniose visceral determina o caminho da infecção. Assim, com a infecção sistêmica e a depressão da imunidade celular mediada pelas células T, ocorre tanto um decréscimo na produção do IFN- γ e da IL-12 quanto uma forte regulação positiva da transcrição de IL-4, IL-10 e TNF- α . Essas citocinas desempenham um importante papel na resposta à *Leishmania*, uma vez que induzem a produção de óxido nítrico.

Relatos na literatura mostram que o TNF- α , TNF- β e a IL-4 aumentam a expressão do CR1 nos monócitos, justificando, portanto, o achado desse estudo (revisto por LIU *et al*, 2009). Após o tratamento, um redução significativa dessas citocinas no soro dos pacientes já foi relatada, sugerindo que, após a cura da infecção, a resposta imune é efetiva no controle da doença, seguida do reestabelecimento dos mecanismos protetores semelhantes aos de pacientes assintomáticos (COSTA *et al*, 2012), da diminuição da média de expressão do CR1 e da frequência de monócitos positivos para o CR1. Resultados diferentes foram encontrados em pacientes com malária, onde foi encontrada uma redução da expressão do CR1 nos monócitos, causando um prejuízo no transporte de ICC (FERNANDEZ-ARIAS *et al*, 2013). Como já dito, a maior parte do CR1 dos neutrófilos em repouso, comprovadamente, está localizada em vesículas secretórias. Em ensaios *in vitro* foi observado o rápido

translocamento dessas vesículas para a membrana após a estimulação dessas células com mediadores inflamatórios (SENGELØV et al, 1994). O TNF- α liberado pelos monócitos nas primeiras reações inflamatórias aumenta a expressão do CR1 nos neutrófilos (BERGER *et al*, 1988). Esse aumento prepara os neutrófilos para a migração, fagocitose e, em uma escala menor do que a realizada pelos eritrócitos, o transporte de ICC, efeitos sistêmicos importantes para o combate às infecções. Há uma preferência dos ICC em depositarem-se no CR1 dos neutrófilos por estas células expressarem uma maior quantidade de CR1 na sua membrana do que os eritrócitos. No entanto, devido ao estado não agrupado da maioria dessas moléculas nos neutrófilos (75%), o transporte de ICC ocorre preferencialmente através dos eritrócitos (PACCAUD et al, 1990). Acredita-se que os eritrócitos agiriam como uma espécie de “tampão” a fim de impedir a inativação apropriada dos fagócitos (NIELSEN *et al*, 1997).

Não se sabe ao certo quais fatores estão envolvidos na regulação negativa da expressão do gene para o CR1. Diferentemente dos eritrócitos, o efeito da variância do gene do CR1 não pode ser aplicado nos leucócitos. Arora e colaboradores estudaram o gene de transcrição para o CR1 em pacientes com LES. Eles encontraram menores taxas de transcrição desse gene nos pacientes do que nos controles, concluindo que tratava-se de um fenômeno adquirido com a doença. Dessa forma, o RNAm, a expressão do CR1 na membrana plasmática e no citoplasma estavam significativamente reduzidos (ARORA *et al*, 2004).

Após essa conclusão, Arora continuou tentando elucidar os mecanismos que possivelmente agiriam na regulação negativa da transcrição do CR1. Como resultado, foi visto que a transcrição do CR1 foi aumentada nos neutrófilos tratados com IFN- γ , sugerindo que essa citocina é a responsável pela transcrição da molécula e que, pacientes em estágios ativos do LES, possuem elevados níveis no soro dessa citocina. Arora também concluiu que a alta concentração de ICC opsonizados nesses pacientes tinha um efeito imunossupressor no IFN- γ e, consequentemente, na modulação negativa da transcrição do CR1 (ARORA *et al*, 2007). Também já foi relatado que a IL-4 e a IL-10 suprimem os efeitos do IFN- γ na transcrição do CR1 (revisto por KHERA *et al*, 2009).

Os resultados deste estudo mostraram uma redução na expressão do CR1 nos neutrófilos (CR1/N) antes do tratamento e, após o tratamento, uma tendência à recuperação em relação aos indivíduos controles. Como relatado anteriormente, na leishmaniose visceral predominam como interleucinas características da doença a IL-4 e a IL-10. Dessa forma, nossas hipóteses para a redução do CR1/N estão baseadas nos efeitos supressores dessas citocinas na transcrição mediada pelo IFN- γ , além da excessiva concentração de ICC no soro dos

pacientes com leishmaniose visceral. Tais relações são corroboradas pelos estudos mencionados com pacientes portadores de LES. Essas citocinas atuariam na redução da transcrição da molécula, promovendo uma ação proteolítica ou uma defeito na fusão das vesículas com CR1 na membrana (ARORA *et al*, 2004; 2007).

Após o tratamento, foi observada uma diminuição da frequência de neutrófilos positivos para o CR1 e da densidade da molécula. Esses resultados podem ser justificados pelo aumento do *turnover* dessas células e pela regulação negativa do CR1, que atingiu os níveis esperados para a distribuição normal da molécula nos leucócitos.

O CR1 emerge como uma molécula de grande interesse para a pesquisa, uma vez que apresenta uma multifuncionalidade com variância estrutural e que interliga as imunidades inata e adaptativa. O receptor para complemento tipo 1 precisa ser avaliado quanto à sua contribuição para o desenvolvimento das doenças ou sua possível ação preventiva. Assim, com a real compreensão das suas funções e do seu papel biológico, a molécula agrega um valor promissor para pesquisas futuras, podendo ser um possível marcador de susceptibilidade de doenças, diagnóstico e prognóstico.

10 CONCLUSÃO

- ✓ Na leishmaniose visceral ocorre uma redução da expressão do CR1/CD35 nos eritrócitos e na frequência de células CD35⁺, após o tratamento, esses níveis se normalizam, indicando uma redução adquirida com a doença.
- ✓ Durante a doença não ocorre perda de outras moléculas reguladoras do complemento na membrana dos eritrócitos, como o CD59, sugerindo que a perda do CR1 pode estar relacionada a algum fenômeno periférico.
- ✓ Os níveis séricos de imunocomplexos não se correlacionam com as reduções do CR1/E e do CR1/N devido às altas concentrações encontradas nos pacientes antes e depois do tratamento.
- ✓ A regulação positiva do CR1 dos leucócitos antes do tratamento pode estar relacionada à forte estimulação antigênica e aos níveis elevados de imunocomplexos, que podem levar a uma falha na regulação positiva da inibição do CR1.
- ✓ O aumento da densidade do CR1 nos monócitos e regulação negativa da expressão do CR1 dos neutrófilos encontrados nos pacientes possivelmente podem estar relacionadas ao processo inflamatório característico da leishmaniose visceral. Após o tratamento, tanto a densidade da molécula como a frequência das células CD35⁺ tendem a normalizar-se em relação aos controles saudáveis.
- ✓ Mais estudos são necessários para a determinação dos mecanismos responsáveis pelas alterações na expressão do CR1 dos eritrócitos e dos leucócitos.

- ✓ O papel biológico do CR1 e seu comportamento nas doenças podem intensificar futuras investigações em busca de novas estratégias terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- al-JURAYYAN, N.A.; al-NASSER, M.N.; al-FAWAZ, I.M.; al AYED, I.H.; al HERBISH, A.S.; al-MAZROU, A.M.; al SOHAIBANI, M.O. The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. **J Trop Pediatr.** V. 41, p. 143-148, 1995.
- ARESE, P.; TURRINI, F.; SCHWARZER, E. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. **Cell Physiol Biochem.** v. 16, p.133-146, 2005.
- ANDREANI, G.; OUELLET. M.; MENASRIA, R.; GOMEZ, A. M.; BARAT, C.; TREMBLAY, M.J. *Leishmania infantum* amastigotes trigger a subpopulation of human B cells with an immunoregulatory phenotype. **PLoS Negl Trop Dis.** v.9, 2015.
- ANSAR, W.; GHOSH, S. C-reactive protein and the biology of disease. **Immunol Res.** v.56, p.131–142, 2013.
- ANSARI, N. A.; SALUJA, S.; SALOTRA, P. Elevated levels of interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala-azar. **Clin Immunol.** v.119, p. 339-345, 2006.
- ARORA, M.; ARORA, R.; TIWARI, S.C.; DAS, N.; SRIVASTAVA, L.M. Expression of complement regulatory proteins in diffuse proliferative glomerulonephritis. **Lupus.** v.9, p.127-131, 2000.
- ARORA, V.; MONDAL, A.M.; GROVER, R.; KUMAR, A.; CHATTOPADHYAY, P.; DAS, N. Modulation of CR1 transcript in systemic lupus erythematosus (SLE) by IFN-gamma and immune complex. **Mol Immunol.** v. 44, p. 1722–1728, 2007.
- ARORA, V.; VERMA, J.; DUTTA, R.; MARWAH, V.; KUMAR, A.; DAS, N. Reduced complement receptor 1 (CR1, CD35) transcription in systemic lupus erythematosus. **Mol Immunol.** v.41, p. 449–456, 2004.
- BACK, D. Z.; KOSTOVA, E. B.; VAN KRAAIJ, M.; VAN DENBERG, T. K.; VAN BRUGGEN, R. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. **Front Physiol.** v.5, p.1-11, 2014.

BAG, A. K.; SAHA, S.; SUNDAR, S.; SAHA, B.; CHAKRABARTI, A.; MANDAL, C. Comparative proteomics and glycoproteomics of plasma proteins in Indian visceral leishmaniasis. **Proteom Scien.** v.12, p.48, 2014.

BAÑUS, A. L.; BASTIEN, P.; POMARES, C.; AREVALO, J.; FISA, R.; HIDE, M. Clinical pleiomorphism in human leishmaniases, with special mention of asymptomatic infection. **Clin Microbiol Infect.** v. 17, p.1451–1461, 2011.

BATES, P.A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int J Parasitol.** v.37, p. 1097–1106, 2007

BENNETT, V.; BAINES, A.J. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. **Physiol Rev.** v.81, p. 1353–1392, 2001.

BERGER, M.; WETZLER, E. M.; WALLIS, R. S. Tumor necrosis factor is the major monocyte product that increases complement receptor expression on mature human neutrophils. **Blood.** v.71, p. 151-158, 1988.

BIRMINGHAM, D.J.; GAVIT, K.F.; MCCARTY, S.M.; YU, C.Y.; ROVIN, B.H.; NAGARAJA, H.N.; HEBERT, L.A. Consumption of erythrocyte CR1 (CD35) is associated with protection against systemic lupus erythematosus renal flare. **Clin Exp Immunol.** v.143, p. 274–280, 2006.

BIRMINGHAM, D.J.; CHEN, W.; LIANG, G.; SCHMITT, H.C.; GAVIT, K.; NAGARAJA, H.N. A CR1 polymorphism associated with constitutive erythrocyte CR1 levels affects binding to C4b but not C3b. **Immunol.** v.108, p.531-538, 2003.

BODMAN-SMITH, K. B.; MBUCHI, M.; CULLEY, F. J.; BATES, P. A.; RAYNES J. G. C-reactive protein-mediated phagocytosis of Leishmania donovani promastigotes does not alter parasite survival or macrophage responses. **Parasit Immunol.** v.24, 447–454, 2002.

BRAGA, A. S. C.; TOLEDO, A. C. C. J.; RABELLO, A. Factors of poor prognosis of visceral leishmaniasis among children under 12 years of age. A retrospective monocentric study in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil, 2001-2005. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 46, p.55-59, 2013.

BRASIL. Leishmaniose visceral: Guia de Vigilância Epidemiológica. 7.ed. Brasília: **Ministério da Saúde**, p.31-64, 2009.

BRASIL. Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2011

BRASIL. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1.ed., Brasilia :**Ministério da Saúde**, 2014.

CÂMARA, L. M. C. Expressão do receptor para complemento tipo 1 (CR1) em eritrócitos de pacientes com Leishmaniose Visceral. 1998, 114f. Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.

- CARROLL, M. C. Complement and Humoral Immunity. **Vaccine**. v.26, s.8, I28–I33, 2008.
- CAVALCANTE, I.J.; VALE, M. R. Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Ceará in the period of 2007 to 2011. **Rev Bras Epidemiol**. v.17, p. 911-924, 2014.
- CHAKRABORTI, T.; SARKAR, D.; GHOSH, D.K. Immune complex antigens as a toll in serodiagnosis of kala-azar. **Mol Cell Biochem**. v.253, p. 191-198, 2003.
- CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis:what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**. v. 5, p. 873-882, 2007.
- COLE D.S.; MORGAN, B.P. Beyond lysis: how complement influences cell fate. **Clin Sci(Lond)** v.104, p.455–466,2003.
- COSIO, F.G.; SHEN, X.P.; BIRMINGHAM, D.J.; VAN AMAN, M.; HEBERT, L.A. Evaluation of the mechanisms responsible for the reduction in erythrocyte complement receptors when immune complexes form in vivo in primates. **J Immunol**. v. 145, p. 4198-4206, 1990.
- COSTA, A. S. A.; COSTA, G. C.; AQUINO, D. M. C.; MENDONÇA, V. R. R.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; CALDAS, A. J. M. Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 107, p. 735-739, 2012.
- CRAIG, M.L.; BANKOVICH, A.J.; TAYLOR, R.P. Visualization of the transfer reaction: Tracking immune complexes from erythrocyte complement receptor 1 to macrophages. **Clin Immunol**. v.105, p. 36–47, 2002.
- CURRIE, M. S.; VALA, M.; PISETSKY, D. S.; GREENBERG, C. S.; CRAWFORD, J.; COHEN, H. J. Correlation Between Erythrocyte CR1 Reduction and Other Blood Proteinase Markers in Patients With Malignant and Inflammatory Disorders. **Blood**. v.75, n. 8, p. 1699-1704, 1990.
- DA SILVA, R. P.; HALL, B. F.; JOINER, K. A.; SACKS, D.L. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. **J Immunol**. v.143, p. 617-622, 1989.
- DAS, N. K.; BISWAS, S.; SOLANKI, S.; MUKHOPADHYAY, C. K. Leishmania donovani depletes labile iron pool to exploit iron uptake capacity of macrophage for its intracellular growth. **Cell Microbiol**. v.11, p. 83–94, 2009.
- DE CARVALHO-LINS, C.E.; PEREIRA-CROTT, L.S.; TEIXEIRA, J.E.; BARBOSA, J.E. Reduced erythrocyte complement receptor type 1 in systemic lupus erythematosus is related to a disease activity index and not to the presence or severity of renal disease. **Lupus**. v.13, 517e21, 2004.

DELIBRIAS, C.C.; KAZATCHKINE, M.D.; FISCHER, E. Evidence for the role of CR1 (CD35), in addition to CR2 (CD21), in facilitating infection of human T cells with opsonized HIV. **Scand J Immunol.** v.38, p. 183–189, 1993.

DIRO, E.; LYNEN, L.; GEBREGZABIHER, B.; ASSEFA, A.; LAKEW, W.; BELEW, Z.; HAILU, A.; BOELAERT, M.; GRIENSVEN, J. V. Clinical aspects of paediatric visceral leishmaniasis in North-west Ethiopia. **TM & IH.** v. 20, n. 1, p. 8–16, 2015.

DOMÍNGUEZ, M.; TORAÑO, A. Immune Adherence-mediated Opsonophagocytosis: The mechanism of *Leishmania* infection. **J Exp Med.** V.189, p. 25-35, 1999.

DOMÍNGUEZ, M.; MORENO, I.; LÓPEZ-TRASCASA, M.; TORAÑO, A. Complement interaction with *Trypanosomatid* promastigotes in normal human serum. **J Exp Med.** v. 195, p. 451–459, 2002.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W. C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research.** v. 20, p. 34-50, 2010.

EL HAG, F. A.; HASHIM, I. A. EL TOUM; HOMEIDA, M.; EL KALIFA, M.; EL HASSAN, A. M. Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). **J Clin Pathol.** v. 47, p. 547-551, 1994.

ELSHAFIE, A. I.; ÅHLIN, E.; MATHSSON, L.; GEHAD, E.; RÖNNELID, J. Circulating immune complexes (IC) and IC-induced levels of GM-CSF are increased in sudanese patients with acute visceral *Leishmania donovani* infection undergoing sodium stibogluconate treatment: implications for disease pathogenesis. **J Immunol.** v.178, p. 5383-5389, 2007.

ERDEI, A.; ISAÁK, A.; TÖRÖK, K.; SÁNDOR, N.; KREMLITZKA, M.; PRECHL, J.; BAJTAY, Z.; Expression and role of CR1 and CR2 on B and T lymphocytes under physiological and autoimmune conditions. **Mol Immunol.** v. 46, p.2767–2773, 2009.

FALEIRO. R.J.; KUMAR, R.; HAFNER, L. M.; ENGWERDA, C. R. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis.** v.8, e2914, 2014.

FERNANDEZ-ARIAS, C.; LOPEZ, J. P.; HERNANDEZ-PEREZ, J. N.; BAUTISTA-OJEDA, M. D.; BRANCH, O.; RODRIGUEZ, A. Malaria inhibits surface expression of complement receptor 1 in monocytes/macrophages, causing decreased immune complex internalization. **J Immunol.** v.190, p. 3363-3372, 2013.

FERNANDEZ-BOYANAPALLI, R. F.; FRASCH, S. C.; McPHILLIPS, K.; VANDIVIER, R. W.; HARRY, B. L.; RICHES, D. W. H.; HENSON, P. M.; BRATTON, D. L. Impaired apoptotic cell clearance in CGD due to altered macrophage programming is reversed by phosphatidylserine-dependent production of IL-4. **Blood.** v.113, n. 9, p. 2047-2055, 2009.

FLORA, R.; AGHAZADEH-DIBAVAR, S.; BANDYOPADHYAY, M.; DASGUPTA S. Immunosuppression during *Leishmania donovani* infection: a potential target for the development of therapy. **Ann Parasitol.** v.60, p. 239–245, 2014.

FRANCO, L. H.; BEVERLEY, S.; ZAMBONI, D. S. Innate Immune Activation and Subversion of Mammalian Functions by *Leishmania* Lipophosphoglycan. **J Parasit Res.** v. 2012, 2012.

FURTADO,P.B.; HUANG, C.Y.; IHYEMBE, D.; HAMMOND, R.A.; MARSH, H.C.; PERKINS,S.J. The partly folded back solution structure arrangement of the 30 SCR domains in human complement receptor type 1 (CR1) permits acces to its C3b and C4b ligands. **J Mol Biol.** v. 375, p. 102-118, 2008.

GALVAO-CASTRO, B.; FERREIRA, J.A. S.; MARZOCHI, K.F.; MARZOCHI, M.C.; COUTINHO, S.G.; LAMBERT, P.H. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. **Clin Exp Immunol.**v.56, p.58–66, 1984.

GONÇALVES, R.; ZHANG, X.; COHEN, H.; DEBRABANT, A.; MOSSER, D. M. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania* major infection. **J Exp Med.** v. 208, p. 1253-1265, 2011.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol.** v.3, p.23–35, 2003.

GOTO, H.; SANCHEZ, M. C. A. Does the complement system work for or against the host during parasite infections? **Int Trends Immun.** v.1, p. 11-23, 2013.

HAMID, G. A.; GOBAH, G. A. Clinical and hematological manifestations of visceral leishmaniasis in Yemeni children. **Turk J Hematol.** v.26, p. 25-28, 2009.

HENTZE, M.W.; MUCKENTHALER, M.U.; GALY, B.; CAMASCELLA, C. Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. **Cell.** v.142, p.24, 2010.

HUGHES, S., KELLY, P. Interactions of malnutrition and imune impairment, with specific reference to immunity against parasites. **Parasite Immunol.** v.28, p. 577–588, 2006.
Indian J Hematol Blood Transfus. v. 26, p. 78–82, 2006.

ISAÁK, A.; GERGELY JR, P.; SZEKERES, Z.; PRECHL, J.; POÓR, G.; ERDEI, A.; GERGELY, J. Physiological up-regulation of inhibitory receptors FcgRII and CR1 on memory B cells is lacking in SLE patients. **Inter Immunol.** v. 20, n.2, p. 185–192, 2008.

JI, P.; MURATA-HORI, M.; LODISH, H. F. Formation of mammalian erythrocytes: chromatin condensation and enucleation. **Trends Cell Biol.** v.21, p. 409–415, 2011.

JÓZSI, M.; PRECHL, J.; BAJTAY, Z., ERDEI, A. Complement Receptor type 1 (CD35) mediates inhibitory signals in human B lymphocytes. **J Immunol.** v.168, p. 2782–2788, 2002.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Curr Opin Hematol.** v.7, p. 26–31, 2000.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **NatureRev Microbiol.** v.9, p. 604-615, 2011.

KAZATCHKINE, M.D.; JOUVIN, M.H.; WILSON, J.G.; FISCHER, E.; FISCHER, A. Human diseases associated with C3 receptor deficiency. **Immunol Lett.** v.14, p.191-195, 1987.

KHERA, R.; DAS, N. Complement Receptor 1: Disease associations and therapeutic implications. **Mol Immunol.** v.46, p.761–772, 2009.

KIMA, P.E.; SOONG, L.; CHICHARRO, C.; RUDDLE, N.H.; McMAHON-PRATT, D. *Leishmania*-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4⁺ T cells. **Eur J Immunol.** v.26, p. 3163–3169, 1996.

KROPF, P.; FUENTES, J.M.; FAHNREICH, E.; ARPA, L.; HERATH, S.; WEBER,V.; SOLER,G.; CELADA, A.; MODOLELL, M.; MULLER, I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis *in vivo*. **FASEBJ.** v.19, p. 1000–1002; 2005.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Front Immunol.** v.3, p. 251, 2012.

LANG, K. S.; LANG, P. A.; BAUER, C.; DURANTON, C.; WIEDER, T.; HUBER, S. M.; LANG, F. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. **Cell Physiol Biochem.** v.15, p.195-202, 2005.

LESLIE, QUINTON, R. G.; HANSEN; SØREN. Complement Receptors. Complement Receptors. **eLS.** 2001.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis. **Eur J Immunol.** v.37, p.3424–3434, 2007.

LIEW, F.Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from *L-arginine*. **Immunol.** v.71, p. 556–559, 1990.

LIMB, G.A.; HAMBLIN, A.S.; WOLSTENCROFT, R.A.; DUMONDE, D.C. Selective upregulation of human granulocyte integrins and complement receptor 1 by cytokines. **Immunol.** v.74, p. 696–702, 1991.

LINDORFER, M. A.; JINIVIZIAN, H. B.; FOLEY, P.L., KENNEDY, A. D.; SOLGA, M.D. Bcell complement receptor 2 transfer reaction. **J Immunol.** v. 70, p. 3671–3678, 2003.

LINDORFER, M.A.; HAHN, C.S; FOLEY, P.L.; TAYLOR, R.P. Heteropolymer-mediated clearance of immune complexes via erythrocyte CR1: mechanisms and applications. **Immunol Rev.** v.183, p.10-24, 2001.

LISZEWSKI, M.K.; FARRIES, T.C.; LUBLIN, D.M.; ROONEY, I.A.; ATKINSONJP. Control of the complement system. **Adv Immunol.** v. 61, p. 201-283, 1996.

LIU, D.; NIU, Z. X. The structure, genetic polymorphisms, expression and biological functions of complement receptor type 1 (CR1/CD35). **Immunopharmacol Immunotoxicol.** v. 31, p. 524–535, 2009.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cell sand its influence on the host imune response. **Front Cell Infect Microbiol.** v.2, n.83, 2012.

MADI, N.; PACCAUD, J-P.; STEIGER, G.; SCHIFFERLI, J. A. Immune complex binding efficiency of erythrocyte complemente receptor 1 (CR1). **Clin Exp Immunol.** v.84, p. 9-15, 1991.

MANDAL, D.; MOITRA, P.K.; SAHA, S.; BASU, J. Caspase3 regulates phosphati-dylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. **FEBS Lett.** v.513, p. 184–188, 2002.

MAROVICH, M. A.; McDOWELL, M.A.; THOMAS, E.K.; NUTMAN,T. B. IL-12p70 production by *Leishmania major* - harboring human dendritic cells is a CD40/CD40 ligand-dependent process. **J Immunol.** v. 164, p. 5858–5865, 2000.

MARWAHA, N.; SARODE, R.; GUPTA, R.K.; GAREWAL, G.; DASH, S. Clinico-hematological characteristics in patients with kala-azar, a study from North-West India. **Trop Geogr Med.** v.43, p.357–362, 1991.

McCALL, L-I.; ZHANG W-W.; MATLASHEWSKI, G. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. **PLoS Pathog.** v.9, 2013.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nat Rev Immunol.** v.5, p. 606–616, 2005.

MELHORN, M. I.; BRODSKY, A. S.; ESTANISLAU, J.; KHOORY, J. A.; ILLIGENS, B.; HAMACHI, I. CR1-mediated ATP release by human red blood cells promotes CR1 clustering and modulates the immune-transfer process. **J Biol Chem.** v. 288, p. 31139–31153, 2013.

MIYAIKE, J.; IWASAKI, Y.; TAKAHASHI, A.; SHIMOMURA, H.; TANIGUCHI, H.; KOIDE, N.; MATSUURA, K.; OGURA, T.; TOBE, K.; TSUJI, T. Regulation of circulating immune complexes by complement receptor type 1 on erythrocytes in chronic viral liver diseases. **Gut.** v.51, p. 591–596, 2002.

MOLDENHAUER, F.; BOTTO, M.; WALPORT, M. J. The rate of loss of CR1 from ageing erythrocytes in vivo in normal subjects and SLE patients: no correlation with structural or numerical polymorphisms. **Clin Exp Immunol.** v.72, p.74-78, 1988.

MORENO, I.; DOMÍNGUEZ, M.; CABANÉS, D.; AIZPURUA, C.; TORAÑO, A. Kinetic Analysis of Ex Vivo Human Blood Infection by *Leishmania*. **PLoS Negl Trop Dis.** v.4, e743, 2010.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet.** v. 366, p.1561-1577, 2005.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S. Microbiologia Médica. 6. ed. Elsevier, 2009.

NAIRZ, M.; SCHROLL, A.; DEMETZ, E.; TANCEVSKI, I.; THEURL, I.; WEISS, G. 'Ride on the ferrous wheel' – The cycle of iron in macrophages in health and disease. **Immunobiol.** v.220, 280–294, 2015.

NARDIN, A.; LINDORFER, M.A.; TAYLOR, R.P. How are immune complexes bound to the primate erythrocyte complement receptor transferred to acceptor phagocytic cells? **Mol Immunol.** v.36, p.827–835, 1999.

NEUPANE, D. P.; MAJHI, S.; CHANDRA, L.; RIJAL, S.; BARAL, N. Erythrocyte glutathione status in human visceral leishmaniasis. **I J Clin Biochem.** v.23, p.95-97, 2008.

NIELSEN, C. H.; MATTHIESSEN, S. H.; LYNG, I.; LESLIE, R. G. Q. The role of complement receptor type 1 (CR1, CD35) in determining the cellular distribution of opsonized immune complexes between whole blood cells:kinetic analysis of the buffering capacity of erythrocytes. **Immunol.** v.90, p. 129-137, 1997.

NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J.V. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. **Nat Rev Immunol.** v.8, p. 34–47, 2008.

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

ODERA, M.; OTIENO, W.; ADHIAMBO, C. Dual role of erythrocyte complement receptor type 1 in immune complex-mediated macrophage stimulation: implications for the pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria. **Clin Exp Immunol.** v.166, p. 201-207, 2011.

PACCAUD, J.P.; CARPENTIER, J.L.; SCHIFFERLI, J.A. Differences in the clustering of complement receptor type 1 (CR1) on polymorphonuclear leukocytes and erythrocytes: effect on imune adherence. **Eur J Immunol.** v.20, p. 283–289, 1990.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; MARTINS-FILHO, O. A.; PRATAZ, A.; SILVAZ, L. A.; RABELLO, A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; FIGUEIREDO, R. M.; GUIMARÃES-CARVALHO, S. F.; FERRARIYY, T. C. A.; CORREA-OLIVEIRA, R. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. **Scand J Immunol.** v.62, p. 487–495, 2005.

PICCOLI, A. K.; ALEGRETTI, A. P.; SCHNEIDER, L.; LORA, P. S.; XAVIER, R. M.Expression of complement regulatory proteins CD55, CD59, CD35, and CD46 in rheumatoid arthritis. **Rev Bras Reumatol.** v.51, p. 497-510, 2011.

PIGOTT, D. M.; BHATT, S.; GOLDING N.; DUDA, K. A.; BATTLE, K. E.; BRADY O. J.; MESSINA, J. P.; BALARD Y.; BASTIEN, P.; PRATLONG, F., BROWNSTEIN, J. S.; FREIFELD, C. C.; MEKARU, S. R.; GETHING, P. W.; GEORGE, D. B.; MYERS, M. F.; REITHINGER, R.; HAY S. I. Global distribution maps of the leishmaniases.**eLife.** v.3, 2014.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiol.** v. 10, p. 111-129, 2015.

RAMOS, P.; CASU, C.; GARDENGHI, S., BREDA, L.; CRIELAARD, B.J.; GUY, E. Macrophages support pathological erythropoiesis in polycythemia vera and beta-thalassemia. **Nat Med.** v.19, p.437–445, 2013.

RIPOCHE, J.; SIM, R.B. Loss of complement receptor type 1 (CR1) on ageing of erythrocytes. Studies of proteolytic release of the receptor. **Biochem J.** v. 235, p.815–21, 1986.

RODGARD, A.; THOMSEN, B.S.; BENDIXEN, G.; BENDTZEN, K. Increased expression of complement receptor type 1 (CR1, CD35) on human peripheral blood T lymphocytes after polyclonal activation in vitro. **Immunol Res.** v.14, p. 69–76, 1995.

ROTHER, K.; TILL, G.O.; HÄNSCH, G.M. The Complement System. **Springer**. 2. ed. 1997.

SAEED, A.M.; KHALIL, E. A.G.; ELHASSAN, A. M. A.; HASHIM, F. A.; ELHASSAN, A. M.; FANDREY, J.; JELKMANN, W. Serum erythropoietin concentration in anaemia of visceral leishmaniasis (kala-azar) before and during antimonial therapy. **Brit J Haematol.** v.100, p. 720-724, 1998.

SAMANTA, S.; GHOSHAL, A.; BHATTACHARYA, K.; SAHA, B.; WALDEN, P. Sialoglycosylation of RBC in visceral leishmaniasis leads to enhanced oxidative stress, calpain-induced fragmentation of spectrin and hemolysis. **PLoS ONE.** v.7, e42361, 2012.

SAMANTA, S.; DUTTA, D.; GHOSHAL, A.; MUKHOPADHYAY, S.; SAHA, B. Glycosylation of erythrocyte spectrin and its modification in visceral leishmaniasis. **PLoS ONE.** v.6, e28169, 2011.

SEN, G.; MUKHOPADHAYAY, R.; GHOSAL, J.; BISWAS, T. Oxidative damage of erythrocytes: a possible mechanism for premature hemolysis in experimental visceral leishmaniasis. **Ann Hematol.** v.80, p. 32–37, 2001.

SENBAGAVALLI, P.; GEETHA, S.T.; KARUNAKARAN, K.; BANU REKHA, V. V.; VENKATESAN, P.; RAMANATHAN, V.D. Reduced erythrocyte CR1 levels in patients with pulmonary tuberculosis is an acquired phenomenon. **Clin Immunol.** v.128, p.109–115, 2008.

SENBAGAVALLI, P.; HILDA, J. N.; RAMANATHAN, V. D.; KUMARASWAMI, V.; NUTMAN, T. B.; BABUA, S. Immune complexes isolated from patients with pulmonary tuberculosis modulate the activation and function of normal granulocytes. **Clin. Vaccine Immunol.** v.19, p. 1965–1971, 2012.

SENGELØV, H.; KJELDSEN, L.; KROEZE, W.; BERGER, M.; BORREGAARD, N. Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils. **J Immunol.** v. 153, p.804-810, 1994.

SESA. Informe Epidemiológico Leishmaniose. **Secretaria de Saúde do Ceará**. Disponível em: <http://www.saude.ce.gov.br/index.php/boletins>. Acesso em 13 de março de 2015.

SINGH, O. P.; SUNDAR, S. Whole blood assay and visceral leishmaniasis: Challenges and promises. **Immunobiol.** v. 219, p.323–328, 2014.

SOARES, N.M.; FERRAZ, T.P.L.; NASCIMENTO, E.G.; CARVALHO, E.M.; PONTES-DE-CARVALHO, L. The major circulating immunosuppressive activity in American visceral leishmaniasis patients is associated with a high-molecular weight fraction and is not mediated by IgG, IgG immune complexes or lipoproteins. **Microb Patho.** v.40, p.254–260, 2006.

SOKOL, C. L.; BARTON, G.M.; FARR, A. G.; MEDZHITOV, R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. **Nat Immunol.** v.9, p. 310–318, 2008.

SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA, S., SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v.105, p. 1–6, 2011.

STOUTE, J. A. Complement receptor 1 and malaria. **Cell. Microbiol.** v. 13, n. 10, p. 1441-1450, 2011.

STOUTE, J. A. Complement-regulatory proteins in severe malaria: too little or too much of a good thing? **Trends Parasitol.** v. 21, n. 5, p. 218-223, 2005.

STOUTE, J. A.; ODINDO, A.O., OWUOR, B.O.; MIBEI, E.K.; OPOLLO, M.O.; WAITUMBI, J. N. Loss of red blood cell-complement regulatory proteins and increased levels of circulating immune complexes are associated with severe malarial anemia. **J Infect Dis.** v.187, p.522–525, 2003.

SULTAN, B. A.; AKHTAR, K.; AL-ASADY, R. A.; AL-FAHAM, M. A.; ARA, A.; SHERWANI, R. K. Autoantibodies in visceral leishmaniasis- a comprehensive study. **Int J Curr Microbiol App Sci.** v.3, p. 635-640, 2014.

SUTTERWALA, F. S.; NOEL , G.J.; SALGAME, P.; MOSSER, D.M. Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fc-receptor type I. **J Exp Medv.** 188, p. 217–222, 1998.

SUTTERWALA, F.S.; NOEL, G.J.; CLYNES, R.; MOSSER, D.M. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. **J Exp Med.** v.185 p.1977–1985, 1997.

TAUSK, F.; GIGLI, I. The Human C3b receptor: function and role in human diseases. **J Invest Dermatol.** v.94, p. 141-145, 1990.

TAUSK, F.; HOFFMAN, T.; SCHREIBER, R.; GIGLI, I. Leprosy: altered complement receptors in disseminated disease. **J Invest Dermatol.** v.85, p.585-615, 1985.

TAUSK, F. A.; McCUTCHAN, J. A.; SPECHKO, P.; SCHREIBER, R. D.; GIGLI, I. Altered erythrocyte C3b receptor expression, immune complexes, and complement activation in

homosexual men in varying risk groups for acquired immune deficiency syndrome. **J Clin Invest.** v.78, p.977-982, 1986.

TEIXEIRA, J.E.; MARTINEZ, R.; CÂMARA, L.M.C.; BARBOSA, J.E. Expression of complement receptor type 1 (CR1) on erythrocytes of paracoccidioidomycosis patients. **Mycopathologia.** v.152, p.125–133, 2000.

THAM, W.H.; WILSON, D.W.; LOPATICKI, S.; SCHMIDT, C.Q.; TETTEH-QUARCOO, P.B.; BARLOW, P.N.; RICHARD, D.; CORBIN, J.E.; BEESON, J.G.; COWMAN, A.F. Complement receptor 1 is the host erythrocyte receptor for *Plasmodium falciparum* PfRh4 invasion ligand. **Proc Natl Acad Sci.** v.107, p. 17327-17332, 2010.

THEOFILOPOULOS, N. A.; DIXON, J. F. Immune complexes in human diseases: a review **Am J Pathol.** v.100, p. 531-591, 1980.

TUNCANN, O.G.; TUFAN, A.; TELLI, G.; AKYÜREK, N.; PAMAKÇUOGLUM, M.; YILMAZ, G.; HIZEL, K. Visceral leishmaniasis mimicking autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, and systemic lupus erythematosus overlap. v.50, p.133-136, 2012.

VAN FURTH, R. Mononuclear Phagocytes: characteristics, physiology and function. **Springer Netherlands.** p. 158-160, 1985.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infect Dis Clin N Am.** v.26, p. 309–322, 2012.

VARMA, N.;NASEEM, S. Hematologic changes in visceral leishmaniasis/kala azar. **Indian. J Hematol Blood Transfus.** v.26, p.78–82, 2010.

VESELY, M. C. A.; BERMEJO, D. A.; MONTES, C. L.; ACOSTA-RODRÍGUEZ, E. V.; GRUPPI, A. B-cell response during protozoan parasite infections. **J Parasitol Res.** v.2012, 2012.

VOLANAKIS, J.E.; FRANK, M.M. *The Human Complement System* in Complement in host immunity. **Health and Disease.** 1998.

VON STEBUT, E.; BELKAID, Y.; JAKOB, T.; SACKS, D.L.; ANDUDEY, M.C. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results inactivation and interleukin12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti- *Leishmania* immunity. **J Exp Med.** v.188, p.1547–1552, 1998.

WAGNER, C.; HÄNSCH, G. M. Receptors for complement C3 on T-lymphocytes: Relics of evolution or functional molecules? **Mol Immunol.** v.43, p.22–30, 2006.

WAGNER, C.; OCHMANN, C.; SCHOELS, M.; GIESE, T.; STEGMAIER, S.; RICHTER, R.; HUG, F.; HANSCH, G.M. The complement receptor 1, CR1(CD35), mediates inhibitory signals in human T-lymphocytes. **Mol Immunol.** v.43, p. 643–651, 2006.

WARBURG, A.; SARAIVA, E.; LANZARO, G. C.; TITUS, R.G.; NEVA, F. Saliva of Lutzomyia longipalps sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. **Phil Trans R Soc Lond.** v. 345, p. 223-230, 1994.

WEISS, G.; SCHETT, G. Anaemia in inflammatory rheumatic diseases. **Nat Rev Rheumatol.** v.9, p. 205–215, 2013.

WILSON, J.G.; JACK, R.M.; WONG, W.W. Autoantibody to the C3b/C4b receptor and absence of this receptor from erythrocytes of a patient with systemic lupus erythematosus. **J Clin Invest.** v.76, p.182–190, 1985.

WHO. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em 13 de março de 2015.

XIANG, L.; RUNDLES, J.R.; HAMILTON, D.R.; WILSON, J.G. Quantitative alleles of CR1: coding sequence analysis and comparison of haplotypes in two ethnic groups. **J Immunol.** v.163, p. 4939–4945, 1999.

YAO, C.; DONELSON, J.E.; WILSON, M. E. The major surfasse protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. biosynthesis, regulation of expression, and function. **Mol Biochem Parasitolv.**132, p.1–16, 2003.

DADOS PACIENTE**APÊNDICE A – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS****FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE**

Entrevistador: _____ DATA: ____/____/_____

nº Identificação

Nome:		
Idade:	Data de nascimento: / /	
Endereço:		
Telefone (incluir dois ou mais):		
Prontuário:	Data de admissão: / /	
Início dos sintomas (em semanas/meses):		
Diagnóstico: clínico () laboratorial ()		
Biopsia: medula óssea () fígado () baço ()		
Mielograma:		
Cultura para leishmania: não realizada () realizada ()/ positiva () negativa ()		
Sorologia para calazar: não realizada () realizada ()/ positiva () negativa ()		
Início quadro: Febre () Perda de peso () Aumento do vol. abdominal ()		
Alterações do apetite: Conservado () Aumentado () Diminuido ()		
Gengivorragia () Palidez cutâneo-mucosa () Tosse () Diarréia () Epistaxe ()		
Início do tratamento: / /		
TIPO DE TRATAMENTO		
DROGAS UTILIZADAS	POSOLOGIA	DURAÇÃO EM DIAS
Previsão da data de retorno: / /		
Teve complicações? Não () Sim ()		
Quais complicações:		
DADOS LABORATORIAIS		
ADMISSÃO	ALTA	
Sorologias:	Sorologias:	
Hemoglobina: Hematócrito: Leucócitos totais:	Hemoglobina: Hematócrito: Leucócitos totais:	
Leucograma (% e totais):	Leucograma (% e totais):	
Provas de função hepática: Bilirrubina total () Bilir. Direta () Bilir. Ind ()	Provas de função hepática: Bilirrubina total () Bilir. Direta () Bilir. Ind ()	
TGO/AST () TGP/ALT () Fosfatase alcalina ()	TGO/AST () TGP/ALT () Fosfatase alcalina ()	
Albumina () Globulina () Rel. albumina/globulina ()	Albumina () Globulina () Rel. albumina/globulina ()	
Radiografias/ultrassonografias:		
COLETA DE AMOSTRAS		

APÊNDICE B – TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PACIENTE)

Caro paciente, você tem o diagnóstico de leishmaniose visceral (calazar). Estamos realizando um estudo para dosar o número de moléculas cr1 nas células vermelhas e livre no sangue para verificar se esses valores refletem no desenvolvimento da doença. Gostaria de convidá-lo (a) a participar desta pesquisa intitulada: “Análise

do receptor para complementotípico 1 (CR1/CD35) em células o sangue de portadores de Leishmaniose Visceral antes e depois do tratamento". O objetivo deste estudo é descobrir se a quantidade dessas moléculas nas células vermelhas e no soro pode estar associada à doença e/ou à resposta do paciente ao tratamento. Participando você estará contribuindo para os avanços na área da saúde. Caso deseje participar do estudo, será necessário que assine este termo de consentimento. Serão colhidas duas amostras de 5 ml de sangue cada de uma veia do braço (uma com anti-coagulante e outra sem anti-coagulante) no momento de seu internamento, e mais duas amostras com o mesmo volume no momento de sua alta hospitalar. Isto não trará risco à sua vida, mas poderá ocasionar um desconforto e um pouco de dor no local da coleta. Além disso, será preenchido um formulário com informações como idade, data de nascimento, telefone, endereço, sinais e sintomas da doença e exames laboratoriais. As informações referentes aos exames laboratoriais serão retiradas do prontuário. Não haverá mudança em qualquer tratamento que você esteja fazendo. Seu consentimento poderá ser retirado a qualquer momento, sem prejuízo no atendimento. Você não pagará e nem receberá qualquer valor em dinheiro pela participação neste estudo. Os dados referentes à sua identidade serão preservados, não aparecendo em qualquer momento na apresentação dos resultados ou síntese deste trabalho. Os dados obtidos e o sangue coletado serão utilizados somente para esta pesquisa, não sendo utilizados para nenhum outro fim. Os resultados da pesquisa gerados pelo trabalho serão disponibilizados ao participante e à comunidade. Você terá todas as informações que desejar sobre os resultados da pesquisa através das responsáveis pelo projeto: isabel paiva dias mendes carneiro (85- 9999-2371) e profa dra lilia maria carneiro câmara (85-9973-2748 / 3366-8641). Os pesquisadores envolvidos serão encontrados no endereço: rua coronel nunes de melo nº 1315, bairro rodolfo teófilo. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre sua participação na pesquisa entre em contato com o comitê de ética em pesquisa da ufc - rua coronel nunes de melo, 1127, fone: 3366-8344 e/ou o comitê de ética em pesquisa do hospital são josé de doenças infecciosas – rua nestor barbosa, 315- parquelândia, fone 3452-7880. Caso você se sinta suficientemente informado a respeito das informações que leu ou que foram lidas para você e se você autorizar sua participação no estudo solicitamos que assine no espaço abaixo.

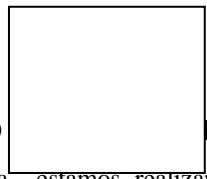
Assinatura do participante

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

TERMO



Digital do participante (se analfabeto)
MENTO LIVRE E ESCLARECIDO (CONTROLE)

Caro Sr./Sra., estamos realizando um estudo para dosar o número de moléculas CR1 nas células vermelhas e livre no sangue de indivíduos normais para comparar estes dados com os de pacientes portadores de leishmaniose visceral. Nossa pesquisa é intitulada: "Análise do receptor para complementotípico 1 (CR1/CD35) em células o sangue de portadores de Leishmaniose Visceral antes e depois do tratamento". O objetivo deste estudo é descobrir se a quantidade dessas moléculas nas células vermelhas e no soro pode estar associada à doença e/ou à resposta do paciente ao tratamento. Participando você estará contribuindo para os avanços na área da saúde.

Caso deseje participar do estudo, será necessário que assine este termo de consentimento. Serão colhidas duas amostras de 5 mL cada de sangue de uma veia do braço (uma com anti-coagulante e outra sem anti-coagulante) uma única vez. Isto não trará risco à sua vida, mas poderá ocasionar um desconforto e um pouco de dor no local da coleta. Além disso, será preenchido um formulário com informações como idade, data de nascimento, telefone, endereço, e doenças atuais ou preegressas. Caso não haja informações sobre resultados sorológicos para HIV 1/2, HBsAg, HTLV I e II, anti-HCV e anti-HBc, pedimos sua autorização para obter essas informações, que serão unicamente reportadas a você. Você não pagará e nem receberá qualquer valor em dinheiro pela participação neste estudo. Os dados referentes à sua identidade serão preservados, não aparecendo em qualquer momento na apresentação dos resultados ou síntese deste trabalho. Os dados obtidos e o sangue coletado serão utilizados somente para esta pesquisa, não sendo utilizados para nenhum outro fim. Os resultados da pesquisa gerados pelo trabalho serão disponibilizados ao participante e à comunidade. Você terá todas as informações que desejar sobre os resultados da pesquisa através das responsáveis pelo projeto: Isabel Paiva Dias Mendes Carneiro (85- 99992371) e Profa Dra Lília Maria Carneiro Câmara (85-9973-2748 / 3366-8641). Os pesquisadores envolvidos serão encontrados no endereço: Rua Coronel Nunes de Melo nº 1315, Bairro Rodolfo Teófilo. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre sua participação na pesquisa entre em contato com o comitê de Ética em Pesquisa da UFC - Rua Coronel Nunes de Melo, 1127, fone: 3366-8344 e/ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José de Doenças Infecciosas – Rua Nestor Barbosa, 315- Parquelândia, fone 3452-7880. Caso você se sinta suficientemente informado a respeito das informações que leu ou que foram lidas para você e se você autorizar sua participação no estudo solicitamos que assine no espaço abaixo.

Assinatura do participante

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____



Digital do participante (se analfabeto)

APÊNDICE C -PLANILHAS COM BANCO DE DADOS

PACIENTES			ERITRÓCITOS – CR1/CD35				ERITRÓCITOS – CD59				IMUNOCOMPLEXOS	
ID	IDADE	SEXO	MIF (A)	MIF (B)	% (A)	% (B)	MIF (A)	MIF (B)	% (A)	% (B)	(A)	(B)
P1	14	F	4,31	6,77	27,95	27,95					73,6	4,3
P2	33	M	2,86	5,96	17,80	41,67					55,1	8,3
P3	20	M	1,30	3,18	9,74	21,37					26,6	5,2
P4	29	M	2,48	6,35	14,25	44,29					1,2	1,2
P5	62	F	2,65	3,04	12,79	19,83					31,6	1,3
P6	50	M	1,78	3,74	10,16	27,36					28,5	15,4
P7	8	F	1,91	3,07	7,94	18,87			97,60	97,87	1,4	1,3
P8	33	M	0,88	4,19	3,25	20,02					100,0	100,0
P9	4	M	3,84	3,21	23,74	22,80					1,3	1,3
P10	15	M	3,33	4,09	18,73	30,26					1,2	1,2
P11	3	M	2,49	2,99	14,15	22,49					1,4	1,2
P12	21	M	3,36	4,73	19,22	31,18					3,3	25,4
P13	50	M	1,88	3,53	10,24	23,41					34,4	7,3
P14	40	M	2,02	5,64	11,12	40,33					100	13,9
P15	18	M	2,81	4,09	12,36	27,60					5,6	1,2
P16	15	M	0,85	1,87	4,10	8,95					100,0	66,8
P17	4	F	3,02	2,95	14,93	21,73	208,38	193,75	99,19	98,92	27,5	6,1
P18	34	F	3,39	4,81	20,47	34,67	193,43	128,28	99,26	98,41	48,6	16,9
P19	15	M	1,96	3,87	11,71	24,41	322,38	250,00	99,23	99,29	5,3	1,3
P20	5	M	0,07	0,43	1,65	1,34	116,29	90,71	98,28	97,91	10,9	1,4
P21	18	M	1,18	4,11	3,81	24,43	85,73	271,31	98,82	99,13	2,9	10,7
P22	3	M	4,33	5,22								
P23	6	M	2,51	2,46							148,1	89,1
P24	2	M	1,78	2,59							14,3	10,9
P25	4	F	3,12	3,90							58,8	6,7
P26	4	F	3,03	3,83							49,0	24,6
P27	4	F	3,41	6,13							28,9	23,1
P28	28	F	2,96	5,46							105,5	59,7
P29	20	M	2,54	5,94							36,6	45,4
P30	24	M	4,19	4,84								

(A): antes dos tratamento; (B): depois do tratamento.

			LINFÓCITOS – CR1				MONÓCITOS – CR1				NEUTRÓFILOS – CR1			
ID	IDADE	SEXO	MIF (A)	MIF (B)	% (A)	% (B)	MIF (A)	MIF (B)	% (A)	% (B)	MIF (A)	MIF (B)	% (A)	% (B)
P1	14	F												
P2	33	M												
P3	20	M												
P4	29	M	30,10	15,82	6,39	25,82	32,78	24,80	77,59	61,40	19,46	30,51	94,69	80,48
P5	62	F	50,03	49,36	15,79	17,32	44,11	43,71	78,00	91,93	23,08	39,95	94,26	97,84
P6	50	M	52,33	39,60	13,36	19,37	33,98	34,91	66,43	73,14	21,87	47,83	95,71	94,63
P7	8	F	70,41	50,48	32,22	33,20	74,99	37,01	84,21	70,26	37,86	60,43	98,85	93,99
P8	33	M	17,94	36,52	11,50	17,88	59,89	35,55	93,87	84,17	25,25	44,11	90,14	86,01
P9	4	M	53,76	82,05	49,16	59,59	42,55	59,89	89,68	96,14	30,23	67,93	99,55	99,88
P10	15	M	41,42	24,36	21,48	30,54	44,51	28,13	89,63	74,75	20,91	32,20	96,54	86,80
P11	3	M	37,52	36,85	35,07	51,66	122,98	27,38	70,30	82,61	97,34	46,56	98,59	96,25
P12	21	M	36,52	38,20	14,46	28,63	32,49	25,48	53,67	82,85	21,48	29,69	95,17	92,42
P13	50	M	23,61	17,62	7,04	20,92	27,63	42,17	73,19	81,67	26,66	38,20	93,23	96,17
P14	40	M	17,39	15,54	11,20	22,99	57,52	28,13	85,16	74,79	39,95	33,98	94,15	87,26
P15	18	M	27,88	31,91	23,85	23,54	33,38	24,80	88,98	65,32	30,51	19,11	85,36	73,78
P16	15	M	38,89	54,74	21,61	30,66	19,63	19,81	64,13	30,66	15,26	21,48	82,57	90,22
P17	4	F	37,18	31,48	21,46	29,28	33,98	21,10	85,32	53,51	45,73	22,47	98,29	96,59
P18	34	F	16,70	19,81	28,07	43,89	64,65	41,42	70,87	65,79	67,93	40,32	99,81	94,22
P19	15	M	44,51	62,08	21,75	38,06	35,87	17,62	97,95	38,06	20,91	17,62	90,30	85,60
P20	5	M	55,73	46,56	22,08	28,00	27,38	74,12	70,19	20,17	44,51	26,66	96,90	99,10
P21	18	M												
P22	3	M												
P23	6	M												
P24	2	M												
P25	4	F												
P26	4	F												
P27	4	F												
P28	28	F												
P29	20	M												
P30	24	M												

(A): antes dos tratamento; (B): depois do tratamento.

CONTROLES			ERITRÓCITOS – CR1/CD35		ERITRÓCITOS – CD59	
ID	IDADE	SEXO	MIF	%	MIF	%
C1	54	F	4,89	21,68	291,68	99,01
C2	32	F	2,71	16,66	263,76	99,20
C3	20	M	2,12	12,02	369,18	98,52
C4	59	M	1,27	30,05	461,26	96,84
C5	43	F	5,07	32,06	371,27	96,98
C6	35	M	3,93	29,47	210,19	98,72
C7	26	M	10,00	64,12	254,39	98,30
C8	44	F	3,82	25,36	225,82	100,46
C9	35	F	7,85	45,21	130,54	96,90
C10	21	M	4,21	27,21	199,07	99,75
C11	32	M	3,82	24,30	302,38	98,51
C12	35	M	5,36	36,71	204,66	98,37
C13	43	M	4,97	33,94	252,19	98,63
C14	51	M	5,98	41,69	206,44	98,42
C15	62	M	6,73	46,43	108,81	98,57
C16	27	F	4,10	27,12	252,12	96,72
C17	56	F	7,21	50,10	226,82	98,56
C18	45	M	3,12	14,95	181,65	96,42
C19	56	M	2,15	10,39	151,51	97,65
C20	24	M	4,44	29,45	178,35	97,06
C21	29	M	3,74	22,61	224,00	97,06
C22	34	M	3,90	25,00	214,17	97,15
C23	37	M	4,80	34,48	307,88	98,68
C24	34	M	6,60	47,68	240,88	98,71
C25	34	M	1,78	8,68	191,87	98,73
C26	45	M	3,85	25,22	171,85	98,74
C27	46	M	1,86	8,81	147,15	98,95
C28	26	F	2,38	14,75	188,26	98,44
C29	40	F	5,12	35,26	200,84	98,50
C30	26	M	1,86	8,73	188,43	98,94

CONTROLES			LINFÓCITOS		MONÓCITOS		NEUTRÓFILOS	
ID	IDADE	SEXO	MIF	%	MIF	%	MIF	%
C1	54	F	30,51	19,27	16,11	55,23	47,40	99,48
C2	32	F	31,06	21,49	20,26	66,43	31,34	98,01
C3	20	M	79,15	25,07	26,66	86,91	23,29	98,39
C4	59	M	42,17	23,89	74,99	68,01	45,32	72,59
C5	43	F	30,23	24,00	22,27	52,22	25,25	70,98
C6	35	M	24,80	26,58	40,32	80,09	33,38	98,24
C7	26	M	20,91	37,59	25,03	74,31	37,86	98,87
C8	44	F	17,78	24,33	22,67	66,49	46,56	96,73
C9	35	F	30,78	51,62	50,94	78,15	78,44	94,35
C10	21	M	17,15	16,87	28,64	57,31	36,19	98,52
C11	32	M	33,98	16,67	16,11	53,53	35,55	88,66
C12	35	M	19,46	22,95	22,27	59,12	36,85	96,80
C13	43	M	17,94	24,72	25,48	82,95	35,87	99,08
C14	51	M	19,46	31,52	18,11	61,47	27,14	95,17
C15	62	M	25,14	34,53	32,78	61,65	41,42	96,59
C16	27	F	27,14	30,66	45,56	78,45	39,60	98,95
C17	56	F	26,30	39,66	25,03	73,95	27,14	98,03
C18	45	M	16,55	23,87	19,11	56,56	45,32	98,58
C19	56	M	29,69	27,30	22,47	76,04	46,98	98,88
C20	24	M	20,17	21,99	16,70	68,94	34,60	92,88
C21	29	M	22,67	26,77	19,11	65,59	34,29	98,17
C22	34	M	16,11	22,90	19,99	63,60	37,52	86,98
C23	37	M	23,71	34,04	29,43	81,82	67,32	98,23
C24	34	M	18,27	37,15	22,27	80,8	42,94	96,48
C25	34	M	27,67	31,10	29,43	87,06	46,14	96,61
C26	45	M	25,25	34,97	25,03	81,90	39,95	98,79
C27	46	M	39,77	31,36	34,29	87,30	47,83	98,25
C28	26	F	44,11	13,34	43,71	75,55	67,93	98,19
C29	40	F	18,77	30,48	38,20	89,13	51,40	99,20
C30	26	M	37,52	26,26	25,95	69,74	34,60	96,40

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANIADO DO COMITÊ DE ÉTICA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ/ PROPESQ



PARECER CONSUBSTANIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Titulo da Pesquisa: QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CR1 POR ERITRÓCITOS E DOSAGEM DE CR1 SOLÚVEL EM PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE VISCERAL, CORRELACIONANDO ESSES DOIS PARÂMETROS COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA.

Pesquisador: Isabel Paiva Dias Mendes Carneiro

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 20297113.5.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 576.177

Data da Relatoria: 31/03/2014

Apresentação do Projeto:

Justificativa da Emenda:

Foram alterados o TCLE dos pacientes e o TCLE do grupo controle, onde foram acrescentados, como solicitado, o endereço do CEP do Hospital de Doenças Infecciosas São José, além da área destinada à digital, caso o participante seja analfabeto.

Objetivo da Pesquisa:

Justificativa da Emenda:

Foram alterados o TCLE dos pacientes e o TCLE do grupo controle, onde foram acrescentados, como solicitado, o endereço do CEP do Hospital de Doenças Infecciosas São José, além da área destinada à digital, caso o participante seja analfabeto.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Justificativa da Emenda:

Foram alterados o TCLE dos pacientes e o TCLE do grupo controle, onde foram acrescentados, como solicitado, o endereço do CEP do Hospital de Doenças Infecciosas São José, além da área destinada à digital, caso o participante seja analfabeto.

Endereço:	Rua Cel. Nunes de Melo, 1127		
Bairro:	Rodolfo Teófilo	CEP:	60.430-270
UF: CE	Município: FORTALEZA		
Telefone:	(85)3366-8344	Fax:	(85)3223-2903
		E-mail:	comepe@ufc.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ**



Continuação do Parecer: 576.177

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Justificativa da Emenda:

Foram alterados o TCLE dos pacientes e o TCLE do grupo controle, onde foram acrescentados, como solicitado, o endereço do CEP do Hospital de Doenças Infecciosas São José, além da área destinada à digital, caso o participante seja analfabeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Justificativa da Emenda:

Foram alterados o TCLE dos pacientes e o TCLE do grupo controle, onde foram acrescentados, como solicitado, o endereço do CEP do Hospital de Doenças Infecciosas São José, além da área destinada à digital, caso o participante seja analfabeto.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Justificativa da Emenda:

Foram alterados o TCLE dos pacientes e o TCLE do grupo controle, onde foram acrescentados, como solicitado, o endereço do CEP do Hospital de Doenças Infecciosas São José, além da área destinada à digital, caso o participante seja analfabeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Justificativa da Emenda:

Foram alterados o TCLE dos pacientes e o TCLE do grupo controle, onde foram acrescentados, como solicitado, o endereço do CEP do Hospital de Doenças Infecciosas São José, além da área destinada à digital, caso o participante seja analfabeto.

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: comepe@ufc.br

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANIADO DO COMITÊ DE ÉTICA HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECCIOSAS

**HOSPITAL SÃO JOSÉ DE
DOENÇAS INFECCIOSAS - HSJ
/ SECRETARIA DE SAÚDE DE**



PARECER CONSUBSTANIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CR1 POR ERITRÓCITOS E DOSAGEM DE CR1 SOLÚVEL EM PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE VISCERAL, CORRELACIONANDO ESSES DOIS PARÂMETROS COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA.

Pesquisador: Isabel Paiva Dias Mendes Carneiro

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 20297113.5.3001.5044

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 609.827

Data da Relatoria: 25/04/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto aprovado previamente e resubmetido para a alteração de TCLE.

Justificativa da Emenda:

Foram alterados o TCLE dos pacientes e o TCLE do grupo controle, onde foram acrescentados, como solicitado, o endereço do CEP do Hospital de Doenças Infecciosas São José, além da área destinada à digital, caso o participante seja analfabeto.

Objetivo da Pesquisa:

Justificativa da Emenda:

Foram alterados o TCLE dos pacientes e o TCLE do grupo controle, onde foram acrescentados, como solicitado, o endereço do CEP do Hospital de Doenças Infecciosas São José, além da área destinada à digital, caso o participante seja analfabeto.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Justificativa de emenda.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Foram alterados o TCLE dos pacientes e o TCLE do grupo controle, onde foram acrescentados, como solicitado, o endereço do CEP do Hospital de Doenças Infecciosas São José, além da área

Endereço:	Rua Nestor Barbosa, 315	CEP:	60.455-610
Bairro:	Parquelândia	Município:	FORTALEZA
UF: CE		Fax:	(85)3101-2319
Telefone:	(85)3452-7880	E-mail:	melmedeiros@hotmail.com

HOSPITAL SÃO JOSÉ DE
DOENÇAS INFECTOSES - HSJ
/ SECRETARIA DE SAÚDE DE



Continuação do Parecer: 609.827

destinada à digital, caso o participante seja analfabeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE devidamente corrigido.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovada emenda.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovação de emenda ad referendum visto já ter sido apresentado projeto em reunião do CEP anterior.

FORTALEZA, 23 de Abril de 2014

Assinador por:

Melissa Soares Medeiros
(Coordenador)

Endereço: Rua Nestor Barbosa, 315
Bairro: Parquelândia **CEP:** 60.455-610
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3452-7880 **Fax:** (85)3101-2319 **E-mail:** melmedeiros@hotmail.com

