



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

CÁSSIO MARINHO CAMPELO

ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DO POLIMORFISMO DOS GENES IL6 (-174 G/C)
E TGF β 1 (-509 T/C), A CARGA PARASITÁRIA E O PROGNÓSTICO EM INDIVÍDUOS
COM LESISHMANIOSE VISCERAL

FORTALEZA

2022

CÁSSIO MARINHO CAMPELO

ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DO POLIMORFISMO DOS GENES IL6 (-174 G/C)
E TGF β 1 (-509 T/C), A CARGA PARASITÁRIA E O PROGNÓSTICO EM INDIVÍDUOS
COM LESISHMANIOSE VISCERAL

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

Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Lilia Maria Carneiro
Câmara

FORTALEZA

2022

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

C196a Campelo, Cássio Marinho.

Associação entre a presença do polimorfismo dos genes IL-6 (-174 G/C) e TGF-beta1 (-509 T/C), a carga parasitária e o prognóstico em indivíduos com leishmaniose visceral. / Cássio Marinho Campelo. – 2023.
103 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Lilia Maria Carneiro Câmara .

1. Leishmaniose visceral. 2. polimorfismo genético . 3. carga parasitária. I. Título.

CDD 616.9

CÁSSIO MARINHO CAMPELO

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

Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Lilia Maria Carneiro Câmara
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Jová Keny Baima Colares
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

Prof^ª. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^ª. Dra. Clarissa Romero Teixeira
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/CE

Prof^ª. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/CE

*Em memória de Maria Socorro dos Santos
Gomes (Filhinha) que me acolheu com seus
sorrisos diários, abraços calorosos, cuidado e
que agora emana luz do universo.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo controle minucioso do existir de forma transcendente e sobrenatural.

À minha orientadora Dra. Lilia Câmara, a somatória de todos os sentimentos mais ternos que formem a palavra a GRATIDÃO. Foram novos degraus forjados de forma sólida pela orientação, docência, pesquisa, ciência e saberes...

Ao Prof Luiz Carlos, pelas horas de conversa, aprendizado, partilha e cuidado em cada detalhe do conhecimento científico no Laboratório de Imunologia Médica.

Aos meus, que com carinho proporcionaram sempre o necessário para que eu conseguisse alcançar os meus objetivos; Pai (Mauro Campelo), Mãe (Marly Marinho) e Irmã (Mayrla Campelo).

Aos que caminham tão pertinho dos meus sonhos, Chico Paiva, Virgínia Chacon, Mazé Oliveira, Rebeca Azevedo e Roberto Lopes, essenciais para que estes tornassem realidade.

Carol Soares e Eliane Nascimento, pela amizade, cuidado e incentivo sempre. Foram muitos cafés e celebrações com outros ainda por vir.

Ao Denis Gonçalves, por estar ali no dia a dia no Laboratório de Imunologia Médica e que não mediu esforços em ajudar na finalização deste projeto.

A todos os profissionais do Hospital São José de Doenças Infecciosas que direta ou indiretamente, colaboraram no alcance do êxito da pesquisa.

Ao médico Pablo Eliak pela parceria formada durante todo o percurso de pesquisa no Hospital São José minha imensa GRATIDÃO, pela disponibilidade, colaboração e constante atenção, essenciais na condução do projeto.

A Profa. Dra. Luciana Melo, pela condução e parceria no conhecimento das técnicas em biologia molecular no Laboratório de Genética Molecular no Centro Universitário Fametro - UNIFAMETRO.

Ao Gustavo Sá, pelo dia a dia no Laboratorio de Genética Molecular – UNIFAMETRO, onde conseguimos de forma colaborativa alcançar o aprendizado necessário nas técnicas de biologia molecular. Gratidão.

A Profa. Dra. Silvia Helena Rabenhorst, pela parceira, condução e disponibilização do Laboratório de Genética Molecular – LABGEM, durante o seguimento da pesquisa, mesmo na situação diante do cenário pandêmico que estávamos vivenciando.

A Louise Magalhães doutoranda no Laboratório de Genética Molecular – LABGEM, pela disponibilidade, por partilhar seu conhecimento e contribuir significativamente ao alcance dos resultados da pesquisa.

Minha GRATIDÃO e CARINHO ESPECIAL a esta equipe de profissionais que me proporcionou conhecimento, amizade, boas gargalhadas, profissionalismo e dedicação nos dias, meses e anos que estivemos juntos no Hospital São José: Ângela Santos, Marise Lopes, Ana Paula Araújo (Paulinha), Francisco Coelho, Socorro Santos (in memoriam), Maria Vânia Freitas, Cleonice Alves, Genilson Fernandes, Gardênia Costa, Ricardo Salviano, Inara Alves, Lilian Cristina, Débora Valentim, Ruth (Rutinha) Miranda, Alana Soares, Djanira Soares (Djan), Érica Sousa, Arislene Costa, Ivoneide Cassiano, Linhares Ferreira, Cleide, Roselvet e Antônio Jaldir.

Aos amigos e colegas do doutorado, pela amizade, apoio e incentivo.

A FUNCAP pelo apoio financeiro.

Nada na biologia faz sentido,

exceto à luz da evolução.

Theodosius Dobzhansky

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma antropozoonose parasitária negligenciada de sérios impactos na saúde pública mundial. As interações parasito-hospedeiro têm papel fundamental na resposta imune do hospedeiro e desfecho da doença. O polimorfismo genético de produção de citocinas está implicado na resistência ou susceptibilidade na leishmaniose. O presente estudo teve por objetivo demonstrar a relação entre a carga parasitária com o polimorfismo genético dos genes promotores das citocinas IL-6 e TGF- β ao prognóstico clínico dos indivíduos com LV. Foram analisados indivíduos com diagnóstico para LV atendidos no Hospital São José de doenças infecciosas, a partir de 18 anos, de ambos os sexos, provenientes do Estado do Ceará. Amostras de sangue e medula foram analisadas a partir de técnicas de PCR RFLP e PCR-real time. Os resultados demonstraram que 74 indivíduos, na sua maioria de homens (86%) com mediana de idade de 41 anos, apresentando características clínicas e hematológica próprias da LV. A partir da avaliação por escores clínicos para o prognóstico da evolução da LV, foram classificados 33 indivíduos com pior prognóstico e 41 com melhor prognóstico. A coinfeção com HIV afetou 32 pacientes e destes 24 classificados com pior prognóstico, devido principalmente à baixa adesão ao tratamento, além de ocorrência de recidivas em 7 pacientes. A detecção da carga parasitária da *L. infantum* foi realizada pela técnica de qPCR, sendo positiva em 69 indivíduos e negativa em 5 indivíduos. A carga parasitária foi maior na medula do que sangue, com mediana de $4,70 \times 10^4$ Leishmanias/mL ($P=0,0003$) não apresentando diferenças estatísticas relacionadas ao melhor ou pior prognóstico da LV, à coinfeção com HIV e à presença de recidivas. Para o gene *IL-6* (-174 G/C) foi observado a frequência dominante do alelo G (66%) e genótipo GG (51%), não diferindo nos grupos de pacientes com LV, coinfectados ou não com HIV, ou quanto ao prognóstico da doença. Indivíduos com genótipo CC possuem maior carga parasitária na medula com mediana de $12,51 \times 10^4$ Leishmanias/mL. Para o gene *TGF- β 1* (-509 C/T) foi observado a frequência de 56% do alelo C e de 49% do genótipo CT. Na distribuição dos genótipos conforme prognóstico da doença, foi observado a frequência de 56,4% do genótipo CT em indivíduos com melhor prognóstico e de 45,8% do genótipo CC em indivíduos com pior prognóstico. Contudo, não foi observado diferença estatística entre a carga parasitária e a distribuição dos genótipos nos grupos de pacientes, com e sem coinfeção com HIV, e o prognóstico da LV. A associação do genótipo CT ao genótipo TT, demonstrou diminuição do risco (OR 0,17) no desenvolvimento de formas graves da LV, sugerindo que a maior frequência do alelo T nos indivíduos com melhor prognóstico e não coinfectados com HIV seja fator protetivo na doença. O tropismo

parasitário na medula desencadeia uma série de fenômenos imunológicos de origem multifatorial que podem ter repercussão no efeito da associação de genes, necessitando de melhor compreensão. Os resultados demonstraram que a presença do polimorfismo dos genes *IL-6* (-174G/C) e *TGF-β* (-509 C/T), podem contribuir na carga parasitária e no prognóstico da LV.

PALAVRAS-CHAVES: Leishmaniose visceral, polimorfismo genético, carga parasitária.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a neglected parasitic anthroponosis with serious impacts on public health worldwide. Parasite-host interactions can a vital role in the host's immune response and disease outcome. The polymorphism gene for cytokine production is implicated in resistance or susceptibility in leishmaniasis. The present study aims to demonstrate the relationship between parasite load and genetic polymorphism of cytokine promoter genes IL-6 and TGF- β to the clinical prognosis of individuals with VL. Individuals diagnosed for VL seen at the São José Hospital for infectious diseases, aged 18 years and older, of both sexes, from the State of Ceará, were analyzed. Blood and marrow samples were analyzed using PCR RFLP and PCR-real time techniques. The results showed that 74 individuals, mostly men (86%), with a median age of 41 years, presented clinical and hematological characteristics typical of VL. The evaluation by clinical scores demonstrates for the prognosis of VL evolution, 33 patients were classified with worse prognosis and 41 with better prognosis. Coinfection with HIV affected 32 patients and of these 24 were classified as having a worse prognosis, mainly due to the low adherence to treatment, in addition to the occurrence of relapses in 7 patients. The detection of the parasite load of *L. infantum* was performed by the qPCR technique, being positive in 69 individuals and negative in 5 individuals. The parasite load was higher in the marrow than in the blood, with a mean of 4.70×10^4 Leishmanias/mL. no statistical differences related to the better or worse prognosis of VL, coinfection with HIV, and the presence of relapses were not presented. For the IL-6 gene (-174 G/C), the dominant frequency of the G allele (66%) and GG genotype (51%) was observed, not differing in the groups of patients with VL, coinfecting or not with HIV, or how much to the prognosis of the disease. Individuals with the CC genotype have a higher parasite load in the bone marrow, with a median of 12.51×10^4 Leishmanias/mL. For the TGF- β 1 gene (-509 C/T) a frequency of 56% of the C allele and 49% of the CT genotype was observed. In the distribution of genotypes according to disease prognosis, a frequency of 56.4% of the CT genotype was observed in individuals with a better prognosis and 45.8% of the CC genotype in individuals with a worse prognosis. However, no statistical difference was observed between the parasite load and the distribution of genotypes in the groups of patients, with and without HIV co-infection, and the prognosis of VL. The association of the CT genotype with the TT genotype showed a reduced risk (OR 0.17) in the development of severe forms of VL, suggesting that the higher frequency of the T allele in individuals with better prognosis and not coinfecting with HIV is a protective factor in the disease. Parasitic tropism in

the bone marrow triggers a series of immunological phenomena of multifactorial origin that may have repercussions on the effect of gene association, requiring a better understanding. The results showed that the presence of the polymorphism of the *IL-6* (-174G/C) and *TGF- β* (-509 C/T) genes can contribute to the parasite load and the prognosis of VL.

Keywords: Visceral leishmaniasis, genetic polymorphism, parasite charge.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Primeiro caso identificado de leishmaniose visceral americana do Brasil.	18
Figura 2 Campos de Concentração para flagelados da seca	19
Figura 3 Países endêmicos para leishmaniose visceral	20
Figura 4 Distribuição geográfica da <i>Leishmania infantum</i> no mundo.	21
Figura 5 Formas evolutivas de <i>Leishmania sp.</i>	22
Figura 6 Distribuição de glicoconjugados na membrana de <i>Leishmania sp.</i> conforme alterações morfológicas no vetor e hospedeiro vertebrado (mamíferos).	23
Figura 7 Reservatórios selvagens em potencial para <i>Leishmania infantum</i>	24
Figura 8 Flebotomíneo– <i>Lutzomyia longipalpis</i>	25
Figura 9 Ocorrência de <i>Lu. longipalpis</i> no Brasil.	26
Figura 10 Distribuição de <i>Lu. longipalpis</i> conforme variabilidade genética.	27
Figura 11 Ciclo de vida do <i>Lutzomyia longipalpis</i> e transmissão da LV	28
Figura 12 Avanço de métodos de diagnóstico e estratégias moleculares nas leishmanioses diagnóstico da leishmaniose visceral	31
Figura 13 Citocinas associadas a proteção e progressão da LV	33
Figura 14 Relação das citocinas e seus efeitos na resposta imune adaptativa	36
Figura 15 Região polimórfica do gene <i>IL-6</i> (-174G/C)	39
Figura 16 Representação do gene <i>TGF-β1</i> (-509 C/T)	40
Figura 17 Fluxograma de desenvolvimento do estudo	42
Figura 18 Amplificação de primer upKDNA-SE/upKDNA-AS para kDNA de <i>L. infantum</i> em amostras humanas.	47
Figura 19 Curva padrão de DNA de <i>L. infantum</i> em amostras comLV	48
Figura 20 Exemplo de uma curva padrão da amplificação de DNA de <i>L. infantum</i> em indivíduos com LV.	50
Figura 21 Padrão de bandas específicas para região alvo dos genes para IL-6 e TGF-beta em gel de agarose.	52
Figura 22 Padrão de fragmentos de restrição para polimorfismo de IL-6 e TGF-beta	53
Figura 23 Classificação dos indivíduos pelo modelo de escores clínicos do Ministério da Saúde	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Distribuição de indivíduos com LV por idade	54
Gráfico 2 Distribuição de sinais e sintomas em indivíduos com LV (n=74).	55
Gráfico 3 Positividade para LV através da pesquisa direta por microscopia	56
Gráfico 4 Distribuição de sinais e sintomas conforme prognóstico da LV	58
Gráfico 5 Uso de antirretrovirais por indivíduos coinfectados com HIV-LV	59
Gráfico 6 Distribuição da carga parasitária de <i>L. infantum</i> no sangue e medula de indivíduos diagnosticados para LV	60
Gráfico 7 Distribuição da carga parasitária de <i>L. infantum</i> conforme classificação de prognóstico da LV.	61
Gráfico 8 Distribuição da carga parasitária em relação a associação dos genótipos CT+TT em relação ao genótipo CC.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primer para amplificação de DNA de <i>L. infantum</i>	46
Tabela 2 - Ajuste de concentração dos pares de prime upKDNA-SE/upKDNA-AS para amplificação de kDNA de <i>L. infantum</i> em amostras humanas.....	47
Tabela 3 Sequência de primers para detecção de polimorfismo de citocina.....	51
Tabela 4 Concentrações de reagentes utilizados nas reações de PCR.....	51
Tabela 5 Programação no termociclador.....	51
Tabela 6 Especificações para realização da restrição.....	53
Tabela 7 Classificação dos indivíduos com LV quanto ao sexo.	54
Tabela 8 Classificação dos indivíduos pelo prognóstico da LV.....	57
Tabela 9 Parâmetros hematológicos em indivíduos com LV.....	58
Tabela 11 Distribuição da carga parasitária de <i>L. infantum</i> em indivíduos com LV quanto a presença ou não do HIV.	62
Tabela 12 Distribuição da carga parasitária de <i>L. infantum</i> em indivíduos com e sem recidivas.....	62
Tabela 13 Distribuição dos genótipos <i>IL6</i> (-174 G/C) em indivíduos com LV com ou sem coinfeção por HIV.....	64
Tabela 14 Distribuição dos genótipos <i>TGFβ1</i> (-509 C/T) em indivíduos com LV com ou sem coinfeção por HIV.	66
Tabela 15 Distribuição dos genótipos para o gene <i>IL6</i> (-174 G/C) e a relação com a carga parasitária e prognóstico da LV.....	67
Tabela 16 Distribuição dos genótipos para o gene <i>IL6</i> (-174 G/C) e a relação com a carga parasitária e a coinfeção com HIV.....	68
Tabela 17 Distribuição dos genótipos para o gene <i>TGFβ1</i> (-509 C/T) e a relação com a carga parasitária e prognóstico da LV.....	68
Tabela 18 Distribuição dos genótipos para o gene <i>TGFβ1</i> (-509 C/T) e a relação com a carga parasitária e a coinfeção com HIV.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	Ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico
bp	Pares de base
CR	Receptor para complemento
DP	Desvio padrão
ELISA	Ensaio imunoenzimático
GP63	Metaloprotease leishmanolisina
ICLV	Índice Composto de Leishmaniose Visceral
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
kDNA	DNA de cinetoplasto
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose visceral americana
M1	Monócitos clássicos pró-inflamatórios
M2	Monócitos clássicos anti-inflamatórios
MAC	Complexo de ataque de membrana
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
ml	Mililitro
NK	Linfócito <i>natural killer</i>
NOD	Domínio de Oligomerização Nucleotídica
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PS	Fosfatidilserina

RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
RIFI	Reação de Imunofluorescência indireta
rK39	Antígeno recombinante K39
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TLR	Receptor do tipo <i>toll</i>
TNF- γ	Factor de necrose tumoral gama
Treg	Linfócito T regulatório
μ l	Microlitro
μ M	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Leishmaniose Visceral	17
2.1.1 Aspectos Históricos.....	17
2.1.2 Aspectos epidemiológicos.....	20
2.1.3 O Agente etiológico	21
2.1.4 O Vetor.....	24
2.1.5 Ciclo de transmissão da LV	27
2.1.6 Manifestações clínicas	29
2.1.7 Métodos de diagnóstico.....	29
2.1.7.1 Métodos indiretos	29
2.1.7.2 Métodos diretos	30
2.1.8 As interações parasito-hospedeiro.....	32
2.1.9 Regulação genética de citocinas na LV	37
2.1.9.1 Gene IL-6	38
2.1.9.2 Gene TGF- β	39
3 JUSTIFICATIVA.....	40
4 HIPOTÉSE.....	41
5 OBJETIVOS	41
5.1 Objetivo Geral.....	41
5.2 Objetivos Específicos.....	41
6 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	42
6.1 Delineamento Experimental.....	42
6.2 Descrição do estudo	43
6.3 Aspectos éticos.....	43
6.4 Coleta de dados	43
6.5 Coleta de material biológico	44
6.6 Obtenção de Creme Leucocitário.....	44
6.7 Extração de DNA a partir de creme leucocitário	45
6.8 Ensaio PCR em Tempo Real.....	45
6.8.1 Desenho de primers.....	45
6.8.2 PCR em tempo real quantitativo (RT-PCR).....	46
6.8.3 Estabelecimento de concentração de primer upKDNA.....	46

6.8.4 Construção de curva padrão de quantificação parasitária	48
6.8.5 Detecção de DNA de <i>L. infantum</i>	49
6.9 Detecção dos polimorfismos de <i>IL6</i> (-174 G/C) e <i>TGFβ1</i> (-509 C/T)	50
6.9.1 PCR-RFLP	51
7 Análise Estatística	53
8 RESULTADOS	54
8.1 Perfil clínico e demográfico dos Indivíduos.....	54
8.2 Determinação da presença e carga parasitária de <i>L. infantum</i> por PCR <i>real time</i> (qPCR)	60
8.2.1 Indivíduos positivos para <i>L. infantum</i>	61
8.2.2 Indivíduos negativos para <i>L. infantum</i>	63
8.3 Estudos dos polimorfismos genéticos de <i>IL6</i> (-174 G/C) e <i>TGFβ1</i> (-509 C/T)	63
8.3.1 Parasitemia	67
8.3.1.1 Associação do polimorfismo do Gene <i>IL6</i> (-174 G/C) com a carga parasitária	67
8.3.1.2 Associação do polimorfismo do Gene <i>TGFβ1</i> (-509 C/T) com a carga parasitária	68
Tabela 17 Distribuição dos genótipos para o gene <i>TGFβ1</i> (-509 C/T) e a relação com a carga parasitária e prognóstico da LV	68
9 DISCUSSÃO.....	70
10 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO	88
APÊNDICE B – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE	89
APÊNDICE C – PLANILHA DE DADOS DE DIAGNÓSTICO	90
APÊNDICE D – PLANILHA DE DADOS HEMATOLÓGICOS	96
APÊNDICE E – PLANILHA DE DADOS DE POLIMORFISMO	99
ANEXO A -PARECER COMITÊ DE ÉTICA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ	101
ANEXO B – PARECER COMITÊ DE ÉTICA HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECCIOSAS – HSJ	102
.....	102

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral (LV) destaca-se como um sério problema de saúde pública no Brasil, este fato decorre da expansão para grandes centros urbanos, ocasionado por processos migratórios, agravamento das condições sociais de pobreza, pela forte pressão ambiental de ação antrópica negativa, mudando os processos biológicos, adaptativos e evolutivos do flebotomíneo *Lu. longipalpis* e do parasita *L. infantum*.

Na patogênese da LV, a modulação da resposta imune, entre uma resposta efetora anti-inflamatória e uma resposta inflamatória de susceptibilidade, tem sido associado a regulação da imunidade inata e o desequilíbrio de citocinas envolvidas nos processos de sinalização na montagem da resposta imune celular. A progressão da doença tem sido associada a altos níveis das citocinas IL-10, IL-6, TGF- β e IL-4 (BHOR; RAFATI; PAI, 2021; SAMANT et al., 2021) modulados pela desregulação celular as níveis de transcriptoma, permitindo o aumento do níveis séricos destas citocinas e conseqüentemente facilitando o crescimento e multiplicação do parasito, com piora clínica do hospedeiro e morte (DE FREITAS et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2019; VON STEBUT, 2015).

Na LV a citocina IL-6 está relacionado ao pior prognóstico da doença pelo aumento de fígado e baço, redução da população de neutrófilos, diminuição na contagem de plaquetas, sinergismo com a citocina IL-8 inibindo a produção de albumina no fígado e conseqüentemente edema, diminuição na concentração de hemoglobina nas hemácias contribuindo para anemia, interferindo na cascata de coagulação, e seu níveis séricos sinalizando como preditor de morte para a doença (COSTA et al., 2013; CUNHA FIEVEZ et al., 2019; SRIVASTAVA et al., 2019).

Estudos em modelo animal observando a infecção por *Leishmania*, demonstram a desregulação de níveis séricos da citocina TGF- β no fígado e baço de cães sintomáticos e assintomáticos, modulando os processos bioquímicos de morte celular pela redução da expressão do MHC de classe II em macrófagos, fator importante de susceptibilidade e progressão da LV, relacionado ao aumento da carga parasitária e regulação do processo inflamatório (GANTT et al., 2003; TADESSE et al., 2021; TZAVLAKI; MOUSTAKAS, 2020; ZHANG; ALEXANDER; WANG, 2017).

Considerando a modulação dos níveis séricos das citocinas IL-6 e TGF- β na LV, o envolvimento de genes promotores destas citocinas tem sido estudado com importante papel na susceptibilidade e/ou proteção no desenvolvimento da doença através do polimorfismo

genético. Moléculas presentes na *Leishmania* ativam fatores de transcrição responsáveis pelas variações da resposta imune celular no desenvolvimento das diferentes formas clínicas da leishmaniose (BHARATI, 2022; MAHANTA et al., 2018). A região polimórfica (-174G/C) repercute na diminuição da transcrição de IL-6 em resposta a estímulos inflamatórios; a presença do alelo C resulta em baixa expressão de IL-6, enquanto o alelo G possui associação no aumento da expressão de IL-6 (FISHMAN et al., 1998; LIAO et al., 2008; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2018). A presença do polimorfismo na região - 509 C/T do gene promotor de TGF- β implica em altos níveis séricos da citocina. Indivíduos com genótipo TT possuem maior concentração de TGF- β no plasma do que indivíduos do genótipo CC (DE BRITO et al., 2020; LANGDAHL et al., 2003; MARTELOSSI CEBINELLI et al., 2016). A frequência do genótipo CT em indivíduos com LV possui relação a susceptibilidade e a um pior prognóstico do indivíduo com a doença (BHARATI, 2022).

Portanto, o balanço da resposta imune do indivíduo com LV esteja associado a presença do polimorfismo dos genes *IL6* (-174 G/C) e *TGF β 1* (-509 C/T) promotores das citocinas IL-6 e TGF- β , possuindo papel importante no prognóstico clínico do indivíduo, favorecendo a multiplicação e disseminação sistêmica da *Leishmania*, regulação do sistema imune a persistência do parasito e promovendo o aumento da letalidade da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A dispersão dos casos de leishmaniose no mundo tornou-se um sério problema de saúde pública, atingindo principalmente as populações de maior vulnerabilidade social e econômica, com ausência de sistemas de proteção social que corroboram para ampliação dos problemas de saúde. É classificada entre as 20 doenças tropicais negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (FOODBORNE et al., 2021; HOUWELING et al., 2016; STOLK et al., 2016).

As leishmanioses são zoonoses parasitárias transmitidas por vetores e causadas por pelo menos 20 espécies do gênero *Leishmania*. A transmissão ocorre em humanos com auxílio de um vetor competente, após picada pela fêmea de flebotomíneo. As manifestações clínicas da doença envolvem espécies distintas de *Leishmania* que causam desde lesões cutâneas auto resolutivas e de menor gravidade, a um quadro sistêmico visceral de progressão para um quadro de maior gravidade com sério risco de morte (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; WHO, 2020).

A doença se estabelece a partir da evasão ao sistema imune do indivíduo determinado pela biologia do vetor e características de virulência do parasito, que em conjunto definem o desfecho na relação parasito-hospedeiro (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; PACE, 2014).

2.1 Leishmaniose Visceral

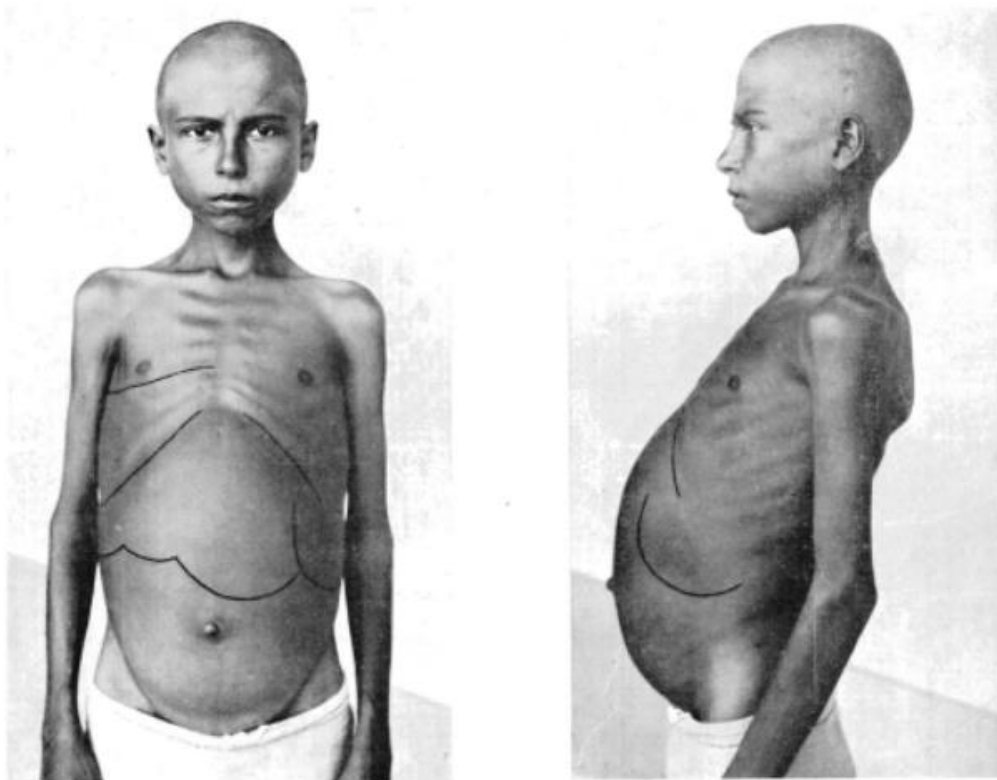
2.1.1 Aspectos Históricos

A Leishmaniose visceral (LV) se estabelece como problema de saúde no Brasil a partir dos anos 1934, após o patologista Henrique Penna observar achados sugestivos de infecção pelo gênero *Leishmania* em amostras de fígado de indivíduos com suspeita de febre de amarela provenientes das regiões Norte e Nordeste do país. Estes achados implicariam na relação direta de 41 óbitos com a leishmaniose visceral e no ano seguinte durante um surto epidêmico no Ceará, 800 casos foram diagnosticados, ocasionando preocupação da comunidade científica pelo total desconhecimento dos aspectos epidemiológicos e de incidência da doença (BENCHIMOL et al., 2019; MARCONDES; ROSSI, 2014; SILVEIRA et al., 2016).

Utilizando-se dos resultados encontrados por Henrique Penna, Evandro Chagas identifica o primeiro indivíduo em Sergipe com relação direta com a LV (Figura 1);

apresentava sinais clínicos de febre, anemia e esplenomegalia, sendo necessário a indicação de punção de fígado e baço para pesquisa parasitológica. A doença passa a ser identificada como leishmaniose visceral americana (LVA), nova doença tropical autóctone descoberta nas Américas (BENCHIMOL et al., 2019; CHAGAS et al., 1937; MARCONDES; ROSSI, 2014).

Figura 1 Primeiro caso identificado de leishmaniose visceral americana do Brasil.



Fonte: (CHAGAS et al., 1937)

A LVA teve então seu perfil epidemiológico traçado o qual demonstrou a singularidade do agente etiológico, que acometia indivíduos em diferentes idades de desenvolvimento, com ocorrência exclusivamente em florestas e em área rurais, cujo reservatório primário era um animal selvagem, com participação de um vetor para sua transmissão. (BENCHIMOL et al., 2019; CHAGAS et al., 1937)

As mudanças climáticas, trouxeram à tona o fenômeno da seca, resultando nos maiores processos migratórios do campo para os grandes centros urbanos já registrado nas décadas de 30 e 40 no Nordeste, especificamente no Ceará (Figura 2A). Campos de concentração (Figura 2B) foram erguidos para a contenção da grande massa de flagelados, que somado a carência de assistência médica, tornou o ambiente perfeito para surtos epidêmicos de doenças, dentre elas a LV (NETO, 2014; NUNES; MEDEIROS, 2020; RIOS, 2020).

Figura 2 Campos de Concentração para flagelados da seca



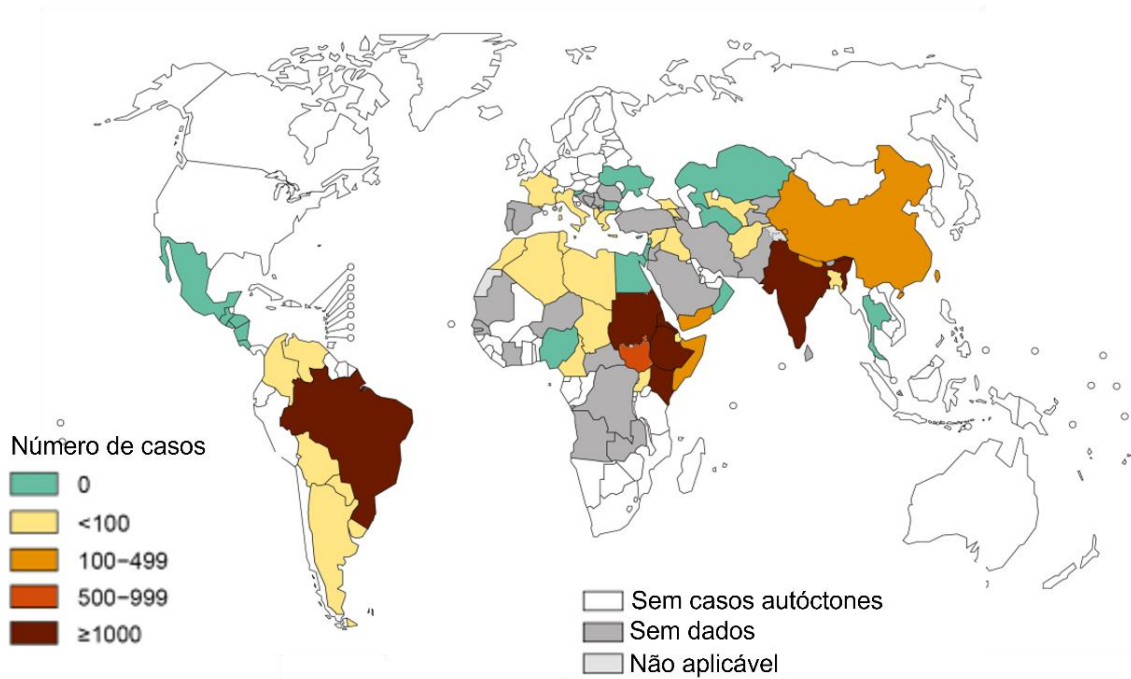
Fonte: (RIOS, 2020) A – Estação de Trem no município de Iguatu. B – Crianças no campo de concentração da cidade de Ipu.

Em 1953, o casal Leônidas e Maria Deane, realizam a descoberta do primeiro animal silvestre como reservatório para *Leishmania*, uma raposa da espécie *Lycalopex vetulus*. Aos poucos, a LVA deixava seu aspecto de ocorrência sazonal em áreas rurais e de floresta, para ocorrer em áreas urbanas, e um novo reservatório passou a ser incriminado – o cão doméstico. As condições sociais e econômicas potencializadas por fatores climáticos extremos, levaram a variações epidemiológicas regionais anuais de morbidade e mortalidade pela doença. A melhoria no acesso a assistência médica e a maior frequência nos diagnósticos permitiu a o achado de novas áreas endêmicas (BENCHIMOL et al., 2019; MARCONDES; ROSSI, 2014).

2.1.2 Aspectos epidemiológicos

Após décadas, a leishmaniose visceral (LV) permaneceu como doença negligenciada, de alta incidência, morbidade e mortalidade no mundo, colocando em risco mais de 1 bilhão de pessoas, com registro de 50.000 a 90.000 casos novos por ano, atingindo letalmente 95% dos indivíduos com a doença, destacando-se com um grave problema de saúde pública. Entre os anos de 2019 e 2020 a Organização Mundial de Saúde classificou 79 países como endêmicos (Figura 3), dos quais 6 países (Brasil, Etiópia, Eritreia, Quênia, Índia, e Sudão) concentram 79% de todos os casos no mundo (ORGANIZATION, 2020; RUIZ-POSTIGO et al., 2021; WHO, 2021).

Figura 3 Países endêmicos para leishmaniose visceral



Fonte: Adaptado pelo autor de WHO, 2020.

O Brasil detém 97,15% dos casos anuais de LV nas Américas (WHO-PAHO, 2019), com 24 Unidades Federativas de área de transmissão para a doença. O Nordeste apresenta 49% dos casos reportados pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), afetando com maior intensidade os Estados do Ceará e Maranhão. O Ceará notifica de forma contínua os casos de LV desde 1986, com predomínio por indivíduos do sexo masculino (67,61%), crianças menores de 5 anos (22,01%) e adultos jovens com idade entre 20 e 49 anos (36,01%), residentes em áreas urbanas (72,82%), apontando os municípios de Fortaleza e Iraporanga como áreas classificadas de transmissão intensa para a doença. Em 2021 a taxa de incidência da LV foi de 1,05/100.000 habitantes, alcançando a taxa de letalidade de 9,84% (BRASIL; MINISTÉRIO

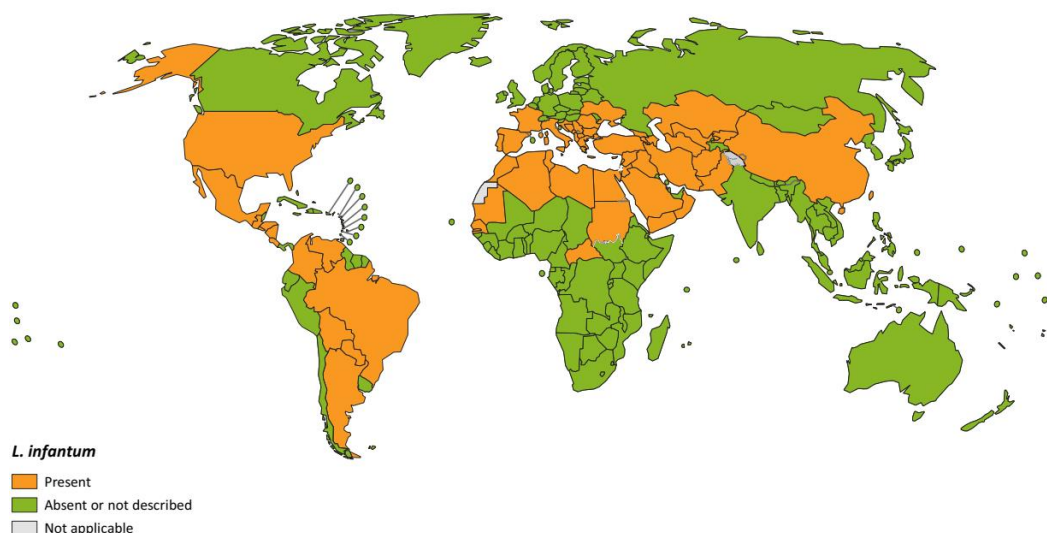
DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2021; CEARÁ; SECRETARIA DA SAÚDE DO CEARÁ, 2021).

A expansão da LV é dinâmica, sofrendo mudanças aos longos dos anos, conforme ocorram alterações climáticas causadas por pressões ambientais ocasionado pela ação antrópica negativa e ao aumento dos indicadores de desigualdade social. Estes fatores pressionam os processos biológicos adaptativos e evolutivos para o vetor e parasito, o que torna a disseminação da doença cosmopolita (DOS REIS et al., 2017; MARCONDES; ROSSI, 2014).

2.1.3 O Agente etiológico

A *Leishmania infantum* (sin. *Chagasi*) é o agente etiológico responsável pelos casos de LV na América Central e América do Sul, bacia do Mediterrâneo, no oeste Asiático e na parte central da Ásia e Oriente Médio, como também causando leishmaniose cutânea principalmente no Mediterrâneo (Figura 4). É um protozoário pertencente ao gênero *Leishmania* e as espécies do complexo “*Leishmania donovani*” (ALVAR et al., 2019; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; NEVES, 2016; PAHO, 2020; REY, 2008; SERAFIM; INIGUEZ; OLIVEIRA, 2020).

Figura 4 Distribuição geográfica da *Leishmania infantum* no mundo.

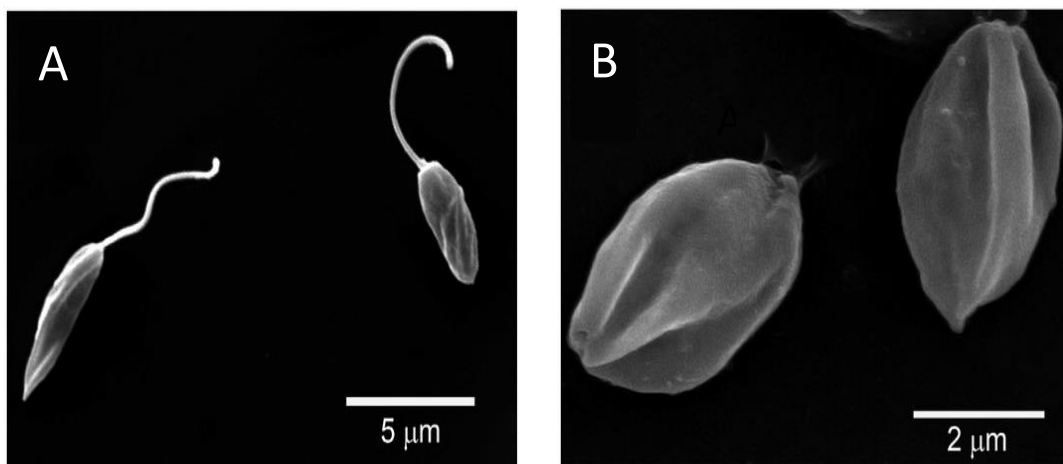


Fonte: (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010)

O parasito possui ciclo biológico heteroxênico e sua sobrevivência no hospedeiro vertebrado depende obrigatoriamente ao escape de enzimas hidrolíticas no fagolisossoma dos fagócitos, apresentando morfologia dimórfica na forma promastigota flagelada (Figura 5A)

longa e achatada de 20 - 30µm de comprimento, com núcleo situado na porção média e cinetoplasto na região proximal de saída do flagelo e encontrada no intestino do vetor; a forma amastigota possui flagelo curto internalizado (Figura 5B), de contorno circular, ovóide ou fusiforme de 2 - 5 µm, com núcleo grande e cinetoplasto visível, é encontrada em vacúolos fagolisossomais nas células fagocíticas do hospedeiro vertebrado (ALVAR et al., 2012; GOMES et al., 2017; NEVES, 2016; PAHO, 2020; REY, 2008).

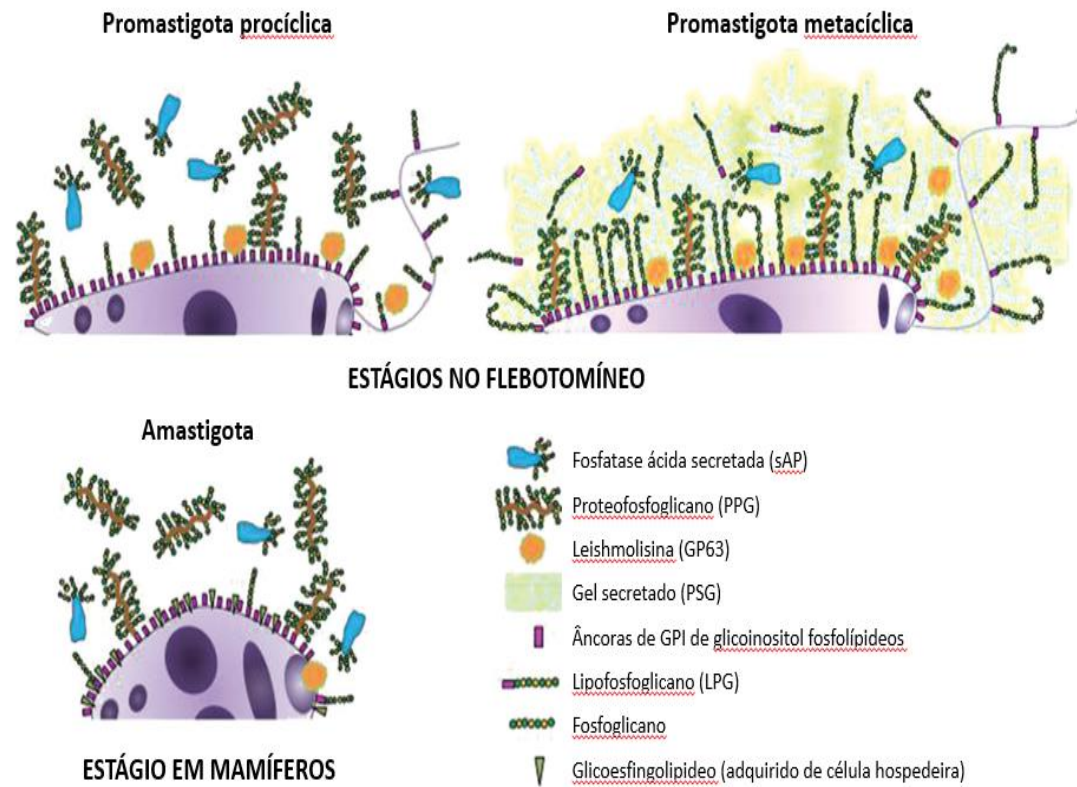
Figura 5 Formas evolutivas de *Leishmania sp.*



Fonte: (GOMES et al., 2017). Imagem por eletromicrografia. A – Forma promastigota flagelada. B – Forma amastigota de flagelo curto internalizado.

Os fatores de virulência estão associados ao revestimento denso de glicocálix composto por glicoconjugados que atuam na relação parasito-hospedeiro. As formas promastigotas possuem glicoconjugados (Figura 6) em sua superfície, como o lipofosfoglicano (LPG), e metaloprotease leishmanolisina (GP63) que lhe confere fator protetivo para sobrevivência no intestino do vetor e infecção em macrófagos. A alteração morfológica para a forma amastigota incorpora lipídeos da célula do hospedeiro, com diminuição na espessura do glicocálix e queda brusca na expressão de LPG e GP63, apresentando cisteína protease somados a protofosfoglicanos e fosfatases ácida. que tem sido ligado diretamente à sobrevivência e à patogenicidade (CABEZAS et al., 2015; OLIVIER; GREGORY; VE FORGET, 2005; VALENTE et al., 2019).

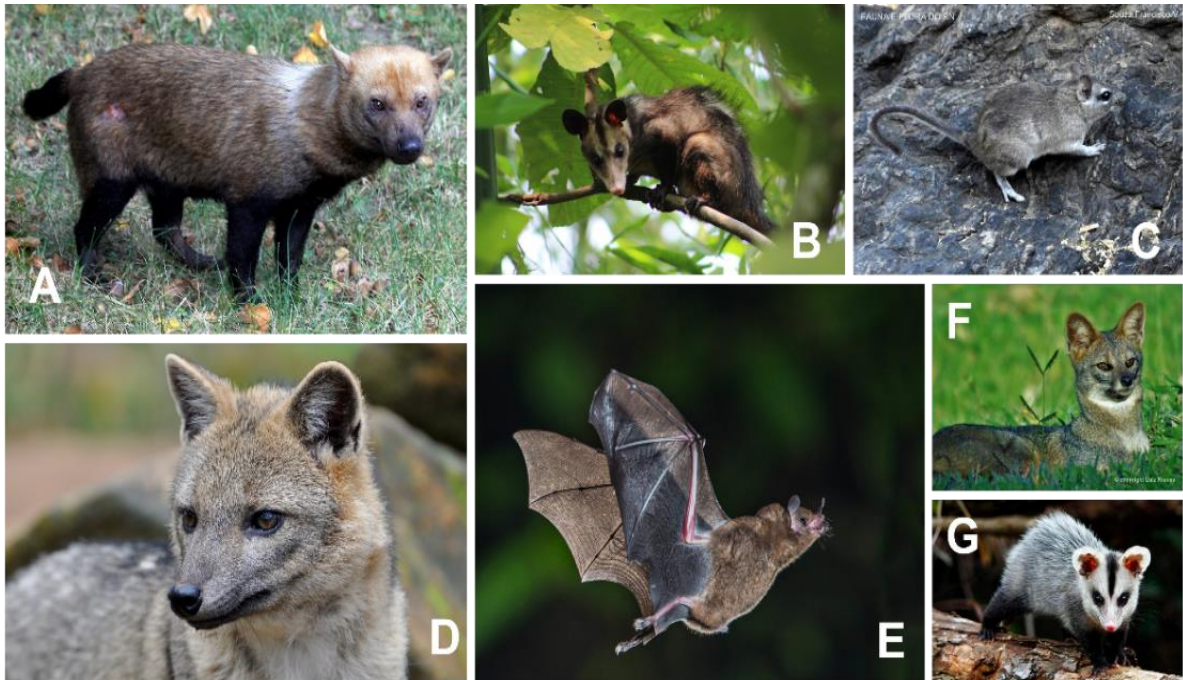
Figura 6 Distribuição de glicoconjugados na membra de *Leishmania* sp. conforme alterações morfológicas no vetor e hospedeiro vertebrado (mamíferos).



Fonte: Adaptado de (CABEZAS et al., 2015)

Desde a descoberta de *L. infantum* pelo casal Deane, em vísceras e pele de canídeo da espécie *Cerdocyon thous* (Cachorro-do-matooutros), hospedeiros mamíferos foram identificados como reservatório selvagem em potencial (Figura 7): *Lycalopex vetulos* (Raposa-do-campo), *Didelphis albiventris* (Cassaco ou gambá), *Didelphis marsupialis* (Cassaco ou gambá), *Thrichomys laurentius* (Punaré ou rabudo), *Speothos venaticus*, (Cachorro-vinagre) e *Carolia perspicillata* (morcego) (ARAUJO SOARES et al., 2017; CHAGAS et al., 1937; PAHO, 2020; RAGEL LAINSON; JJ SHAW; FT SILVEIRA; RR BRAGA, 1987; ROQUE; JANSEN, 2014; SHERLOCK et al., 1988).

Figura 7 Reservatórios selvagens em potencial para *Leishmania infantum*



Fonte: Google Imagens. A – *Speothos venaticus*. B - *Didelphis marsupialis*. C - *Thrichomys laurentius*. D - *Cerdocyon thous*. E - *Carolia perspicillata*. F - *Lycalopex vetulos*. G - *Didelphis albiventris*.

Com a expansão da doença para áreas urbanas, o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) tornou-se o principal reservatório para *L. infantum* pela alta susceptibilidade a infecção. À medida que novos testes surgem para o rastreamento do parasito, outros mamíferos passaram a ser potenciais reservatórios: *Mus musculus* (Rato-doméstico), *Rattus rattus* (Rato-urbano), *Rattus norvegicus* (Rato-urbano), *Cerradomys subflavus* (Rato-do-mato), *Equus caballus* (Cavalo) e *Felis catus* (Gato-doméstico). Despertando preocupação sobre a população de vetores e sua diversidade em áreas urbanas com potencial para disseminação da *L. infantum* (DA SILVA et al., 2010; FERREIRA et al., 2015; LARA-SILVA et al., 2014; ROQUE; JANSEN, 2014; SOARES et al., 2013; SOUZA et al., 2014; ZANET et al., 2014).

2.1.4 O Vetor

Os Flebotomíneos são pequenos dípteros hematófagos, pertencente à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia*, com 536 espécies já descritas nas Américas. No Brasil várias espécies do gênero *Lutzomyia* são objetos de pesquisa como potenciais fontes de disseminação para a *Leishmania infantum*, dentre elas *Lu. cruzi*, *Lu. almerio*, *Lu. salesi* e *Lu. migonei*, porém é a *Lu. longipalpis* que se destaca por sua dispersão

no território brasileiro, adaptação aos grandes centros urbanos e alta infectividade pelo parasito (ALVAR et al., 2012; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; LAINSON; RANGEL, 2003; LIDANI et al., 2017; PAHO, 2020; REY, 2008).

A espécie *Lu. longipalpis* (Figura 8) apresenta metamorfose completa (ovo, larva, pupa e adultos), medem 5mm de comprimento, possuem patas largas, asas lanceoladas, revestidos por cerdas longas e finas, com aparência desalinhada, de voo curto, silencioso e em pequenos saltos. De hábito alimentar diverso, sua ocorrência tem sido observada em áreas tropicais onde o ciclo vital ocorre durante o ano todo, no período crepuscular e noturno, mas permanece ativo no decorrer do dia. (ALVAR et al., 2012; LAINSON; RANGEL, 2003; LIDANI et al., 2017; PAHO, 2020; REY, 2008)

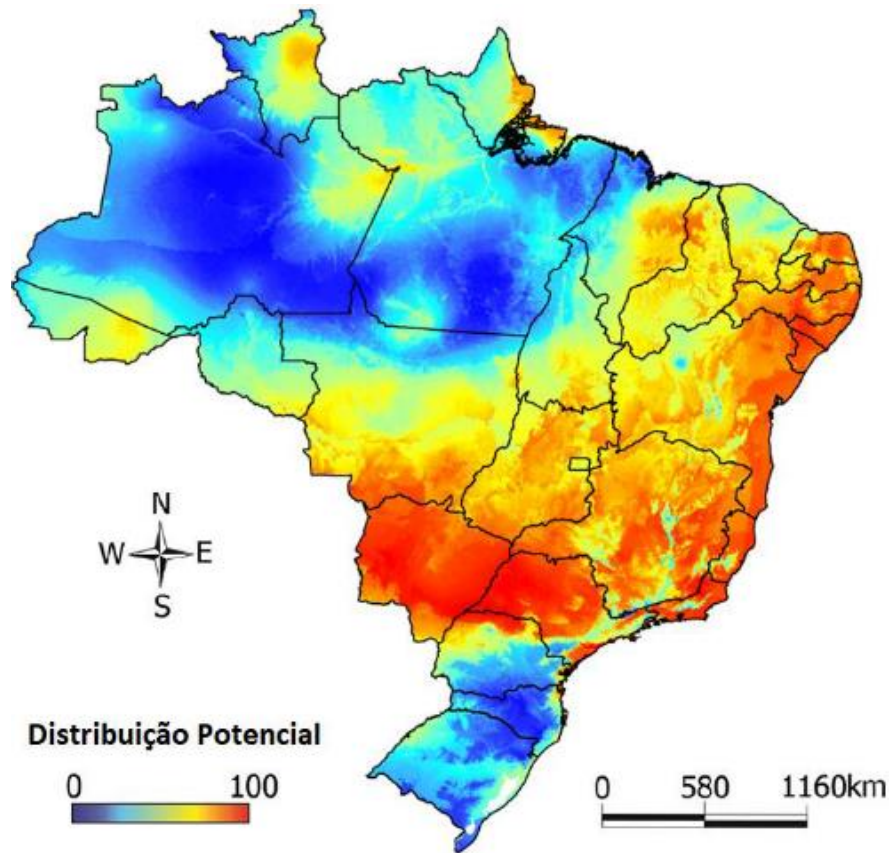
Figura 8 Flebotomíneo– *Lutzomyia longipalpis*



FONTE: (VON STEBUT, 2015)

Desde a sua descoberta, o *Lu. longipalpis* passou de ocorrência essencialmente silvestre em matas remotas e distante de habitações, avançando para áreas no peridomicílio conforme ocorram novos processos de abertura de estradas e construções de barragens, até sua ampla dispersão e expansão das suas fronteiras para o novo ambiente urbano, alterando seus processos de comportamento, reprodução, alimentação e influenciando a epidemiologia da LV (Figura 9) (ALVAR et al., 2012; DE SOUZA et al., 2017; DECOTE-RICARDO et al., 2018; DORNELLES SOUZA et al., 2009; LAINSON; RANGEL, 2003; PAHO, 2020; SILVA et al., 2014).

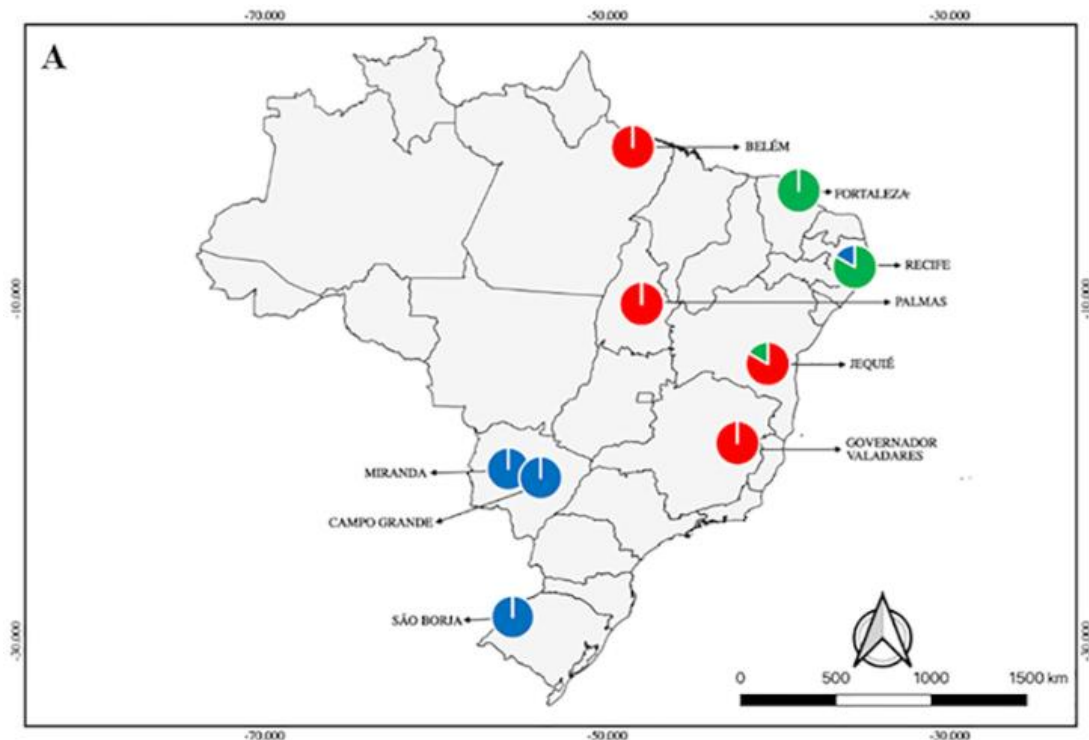
Figura 9 Ocorrência de *Lu. longipalpis* no Brasil.



Fonte: (LORENZ; AZEVEDO; CHIARAVALLOTI-NETO, 2019) Mapa colorimétrico demonstrando a expansão do *Lu. longipalpis* no território. Cores quentes maior ocorrência e cores frias menor ocorrência.

Associada a essa adaptabilidade ao ambiente urbano, foram observadas várias alterações morfológicas nos pontos que correspondem o tergito abdominal, conforme biomas e distribuição geográfica (Figura 10). Observou-se também mudança na frequência sonora emitida pelos machos para corte e atração da fêmea, como também, na produção de feromônios sexuais, o que consequentemente conferiu a *Lu. longipalpis* variabilidade genética importante com possíveis consequências na capacidade e resistência a inseticidas, limitação, prevenção e retardo nos processos de especiação, contribuindo para a concentração de casos nas Américas ao Brasil. (CASARIL et al., 2019; DE SOUZA et al., 2017) .

Figura 10 Distribuição de *Lu. longipalpis* conforme variabilidade genética.



Fonte: (CASARIL et al., 2019). As cores são representativas das diferenças dentro da espécie *Lu. longipalpis* (tergito abdominal, produção sonora e de feromônios)

2.1.5 Ciclo de transmissão da LV

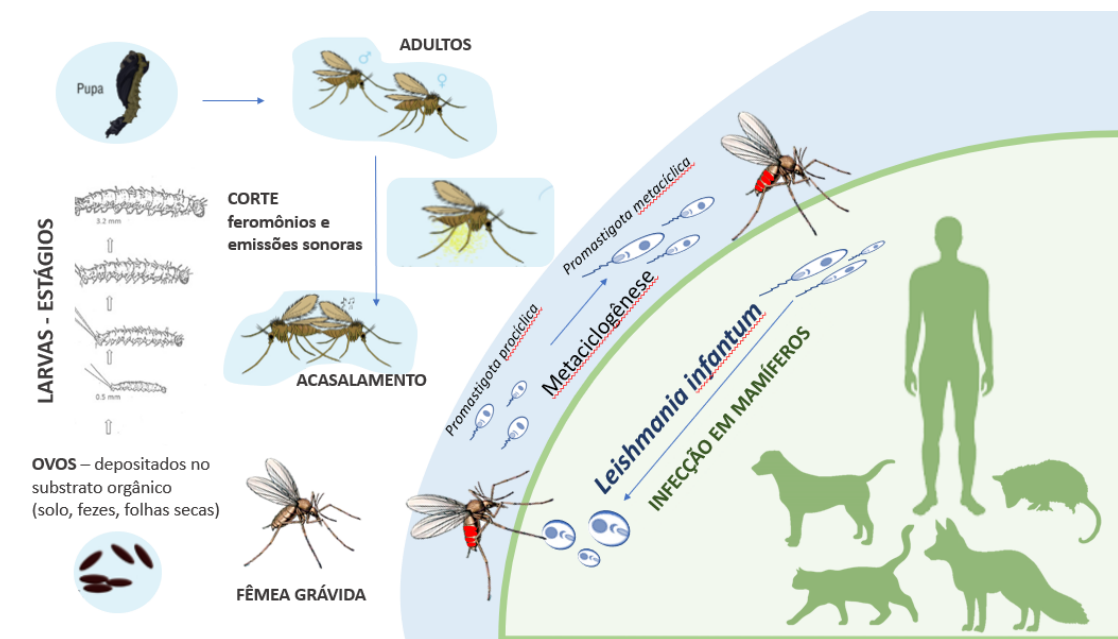
Os flebotomíneos permanecem ativos durante todo o dia, mas é no período crepuscular e noturno que as fêmeas se encontram com maior atividade na busca de alimentação próximo de abrigos de animais e habitações. As fêmeas infectadas pela *L. infantum*, liberam no ato da picada as formas promastigotas metacíclicas, que auxiliadas por componentes químicos da saliva, promovem a entrada do parasito na pele e disseminação via corrente sanguínea. (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; LAINSON; RANGEL, 2003; LIDANI et al., 2017; PAHO, 2020; SOUSA-PAULA; OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2020; VON STEBUT, 2015).

No hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas metacíclicas ativam o sistema complemento e pelas células fagocíticas que atacam e destroem os parasitos livres para sobreviverem, estas evadem alterando as condições bioquímicas de defesa celular dos fagócitos, contribuindo para mudança morfológica para a forma amastigota, multiplicando-se por sucessivas divisões binárias até o rompimento da célula infectada. (KEVRIC; CAPPEL;

KEELING, 2015; LIDANI et al., 2017; PAHO, 2020; SOUSA-PAULA; OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2020; VON STEBUT, 2015)

As amastigotas livres, infectam novas células fagocíticas iniciando a disseminação de forma sistêmica para fígado, baço e medula óssea, acarretando no adoecimento do hospedeiro. Após novo repasto sanguíneo pela fêmea do *Lu. longipalpis*, as formas amastigotas são digeridas, passam por nova mudança morfológica em um processo de metaciclogênese para a forma promastigota procíclica no intestino médio, em seguida para a forma promastigota metacíclica, onde a microbiota do vetor exerce influência na infectividade, promovendo visceralização do parasito, retroalimentando o ciclo contínuo de transmissão da LV conforme observada na Figura 11.(KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; LIDANI et al., 2017; PAHO, 2020; SOUSA-PAULA; OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2020; VON STEBUT, 2015)

Figura 11 Ciclo de vida do *Lutzomyia longipalpis* e transmissão da LV



Fonte: Adaptado de (SOUSA-PAULA; OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2020)

A transmissão da LV por um vetor competente está amplamente descrita, porém há possibilidades de novas formas de transmissão da doença, sendo provável ocorrer por transmissão congênita (ARGY et al., 2020), através do ato transfusional (DEY; SINGH, 2006), por cirurgias de transplante de órgãos (ANTINORI et al., 2008; BASSET et al., 2005) acidentes de trabalho em laboratórios (HERWALDT, 2001) e por usuários de drogas (CRUZ et al., 2002), mas a forma de transmissão mais eficiente continua sendo através do vetor.

2.1.6 Manifestações clínicas

A manifestação inicial da doença, pode ser facilmente confundida com outras doenças. Os primeiros sintomas aparecem entre 2 semanas a 8 meses após a infecção, com febre constante ou irregular persistente, esplenomegalia discreta, com ou sem hepatomegalia, linfadenopatia frequentemente disseminadas com presença de nódulos palpáveis e indolores e palidez cutânea. (ALVAR et al., 2019; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; PAHO, 2020; SILVA DE LIMA et al., 2019; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012a; ZIJLSTRA, 2016)

À medida que o quadro clínico evolui, associado ao tempo de busca por diagnóstico e tratamento são observados fraqueza, perda de peso, aumento do volume abdominal com presença de hepatoesplenomegalia, palidez cutânea e de mucosas, anemia, edema, icterícia, infecções bacterianas secundárias, fenômenos hemorrágicos, pancitopenia grave, complicações cardíacas, insuficiência renal, e sepse; e na ausência do tratamento específico, pode evoluir para a morte. (ALVAR et al., 2019; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; PAHO, 2020; SILVA DE LIMA et al., 2019; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012a; ZIJLSTRA, 2016)

A fim de identificar os indivíduos com LV que possuem maiores chances de evolução clínica de maior gravidade e óbito, o Ministério da Saúde recomenda o uso do sistema de avaliação do risco de vida, através de modelo de predição por escores que utiliza tanto de variáveis clínicas como clínico-laboratoriais. (BRASIL, 2011; BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2019)

2.1.7 Métodos de diagnóstico

A LV não possui achados patognomônicos, logo é imprescindível o auxílio de testes parasitológico, imunológicos e moleculares, associados a clínica do paciente para o diagnóstico oportuno, tratamento e consequente redução da letalidade.

2.1.7.1 Métodos indiretos

2.1.7.1.1 Testes sorológicos

Testes sorológicos buscam o rastreamento de anticorpos contra antígeno-alvo. Os testes sorológicos disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde - SUS de forma gratuita são os testes de imunofluorescência e imunocromatográficos. No estado do Ceará o teste por

imunofluorescência indireta (RIFI) é preconizado apenas para municípios que não possuam teste rápido anti-rK39 (baseado no antígeno recombinante de repetição do amino ácido 39 presente na *L. infantum*) ou para indivíduos que tenham sinais clínicos discordantes do teste rápido. Os testes imunocromatográficos anti-rK39 são amplamente utilizados pois além da técnica ser não invasiva, de fácil reprodutibilidade e interpretação. Possuem sensibilidade e especificidade acima de 90%. (ALVAR et al., 2019; BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2019; DA MATTA et al., 2000; GIDWANI et al., 2011; MOLLETT et al., 2019; PATIL et al., 2012; REITER-OWONA et al., 2016; VALLUR et al., 2015).

Estudos têm demonstrado que a intensidade do sinal no teste rápido anti-rK39 produzido pela ligação de IgG em amostras positivas, possui relação com a subclasses de IgG do tipo 1 (IgG1) de alta avidéz na doença ativa, secundária à ativação policlonal de linfócitos B com hipergamaglobulinemia. Após o tratamento, os níveis de IgG1 decaem rapidamente, permanecendo a positividade no teste rápido com sinal fraco por até 12 anos, indicativo de cicatriz sorológica (DA MATTA et al., 2000; GIDWANI et al., 2011; MOLLETT et al., 2019; PATIL et al., 2012; REITER-OWONA et al., 2016; VALLUR et al., 2015).

O ensaio imunoenzimático (ELISA), tem demonstrado alta precisão na maioria dos estudos, porém de uso limitado, podendo ter resultados negativos em indivíduos imunossuprimidos. O método não possui utilização na rede pública de saúde, contudo a rede privada de saúde utiliza kits comerciais registrados e comercializados no Brasil. (ALVAR et al., 2019; BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2019).

2.1.7.2 Métodos diretos

2.1.7.2.1 Microscopia direta

Diagnóstico parasitológico por exame baseado na visualização de amastigotas por microscopia direta é realizado a partir de amostras biológicas de medula óssea, linfonodo e baço, podendo o mesmo tipo de material ser usado para cultura. Possui alta especificidade, com sensibilidade variável dependente do tipo de material biológico. O aspirado de baço, com sensibilidade de 93% a 99%, apresenta alto risco devido a plaquetopenia que ocorre na doença. A sensibilidade do aspirado de medula óssea pode variar entre 53% a 86%, e o aspirado de linfonodo, entre 53% a 65%. Mesmo que não haja observação de amastigotas, a suspeita clínica

não deve ser descartada. (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2019; CEARÁ; SECRETARIA DA SAÚDE DO CEARÁ, 2021)

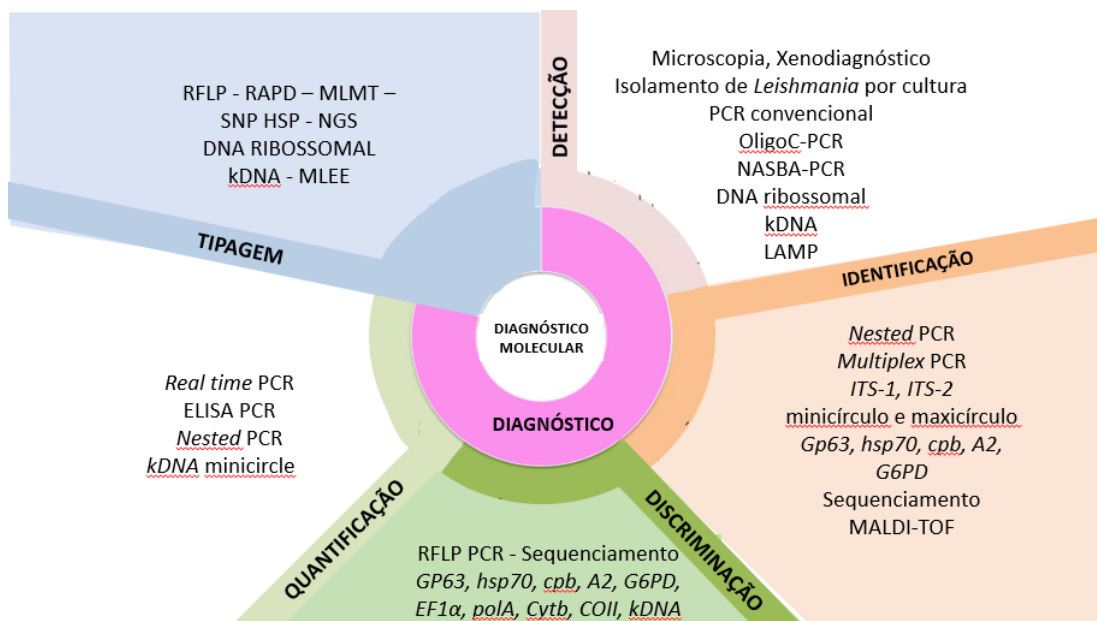
2.1.7.1.2 Cultura

Isolamento do parasito por cultura de amostras biológicas de aspirado medular, aumenta a sensibilidade do diagnóstico. Não disponibilizado no SUS, é pouco utilizado na rotina diagnóstica para LV no Brasil. (ALVAR et al., 2019; BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2019)

2.1.7.1.3 Diagnóstico molecular

Com o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR), foi possível realizar diagnóstico com maior precisão em inúmeras doenças infecciosas, dentre elas a LV. A sensibilidade da PCR depende do tipo de amostra biológica e os primers utilizados para amplificação do DNA alvo. Espécies de *Leishmania* tiveram seu genoma sequenciado, relevando genes de áreas conservadas, estrutura de cromossomos e discretas diferenças interespecies, possibilitando análise filogenética e avanço de novas técnicas de diagnóstico molecular. O crescimento do diagnóstico molecular possibilitou o desenvolvimento de vários métodos para detecção, identificação, quantificação e análise filogenética (Figura 12). (ALVAR et al., 2019; CAMACHO et al., 2019; SAKKAS; GARTZONIKA, 2016; SUNDAR et al., 2018)

Figura 12 Avanço de métodos de diagnóstico e estratégias moleculares nas leishmanioses diagnóstico da leishmaniose visceral



Fonte: Adaptado de (SUNDAR et al., 2018)

O genoma da *Leishmania* é composto 60% de regiões conservadas, onde se destacam como alvo para diagnóstico molecular, os genes: RNA ribossomal, minixon, kDNA de cinetoplasto, gene repetitivo da tubalina, gene da enzima glicose-6-fosfatodesidrogenase, rDNA e gene do choque térmico (CAMACHO et al., 2019). Destes, o kDNA de cinetoplasto se destaca pela abundância, especificidade, regiões conservadas únicas entre espécies, oferece maior especificidade, permitindo a detecção de DNA correspondente a apenas um parasito. (CAMACHO et al., 2019; MARY et al., 2004; PITA-PEREIRA et al., 2012)

Desde o surgimento da possibilidade de amplificação do DNA pela PCR, formou-se conhecimento de métodos de detecção rápida e de alta sensibilidade para diferenciar as espécies de *Leishmania*, dentre os quais se destacam os métodos: análise do polimorfismo de conformação de filamento único (SSCP), análise de polimorfismo por restrição de fragmento único (PCR-RFLP), PCR *fingerprinting*, amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD) e *Melting* de alta resolução (HRM). Destes a PCR-RFLP e análise de sequência acopladas ao alvo são adequadas para a discriminação entre espécies de *Leishmania* (AKHOUNDI et al., 2017).

O diagnóstico molecular avança permitindo a utilização de amostras biológica de sangue ou medula e apresenta maior sensibilidade do que a microscopia direta para os mesmos tipos de amostras (ALVAR et al., 2019), mas a sua utilização na rotina nos serviços de saúde não ocorre, devido à falta de padronização e validação de testes para os diferentes cenários epidemiológicos no país, estando restrito apenas nas instituições de pesquisa.

2.1.8 As interações parasito-hospedeiro

O processo de estabelecimento da infecção crônica está diretamente relacionado as estratégias de escape que a *L. infantum* desenvolveu para se evadir, invadir, alterar os mecanismos de defesa do sistema-imune do hospedeiro e modular os processos metabólicos celular para a própria sobrevivência. (DE FREITAS E SILVA; VON STEBUT, 2021; FALEIRO et al., 2014; GURUNG; KANNEGANTI, 2015; VON STEBUT, 2015)

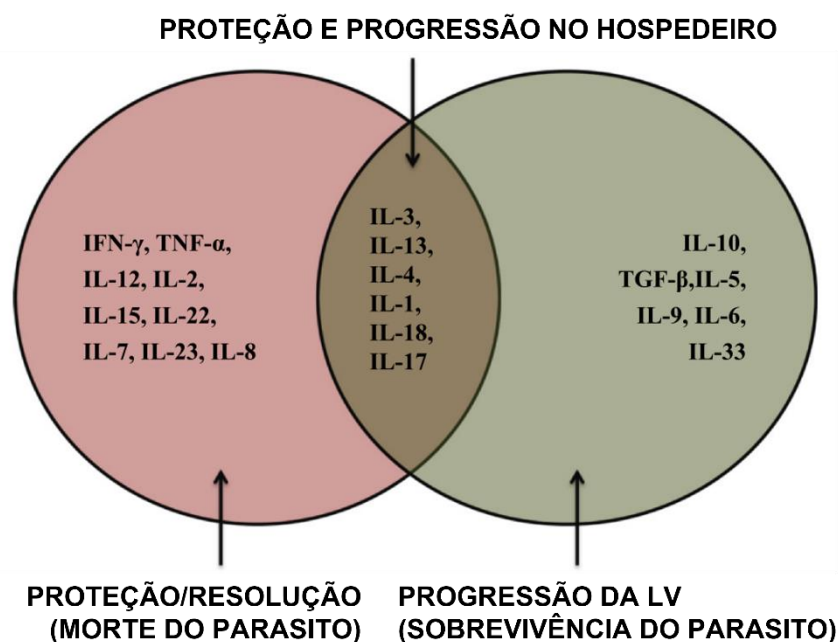
Os fatores de virulência presentes no parasito (LPG e GP63) favorecem a modulação positiva e/ou negativa de receptores para complemento no processo de fagocitose, facilitando o escape ao sistema complemento (CABEZAS et al., 2015; CAMPELO et al., 2020; DE FREITAS E SILVA; VON STEBUT, 2021; TIRADO et al., 2021). O nicho intracelular para *Leishmania* permite a modulação da célula hospedeira, com manipulação do transcriptoma

por modificações epigenéticas alterando o perfil e os níveis séricos de citocinas e quimiocinas. O comprometimento nos caminhos de sinalização celular por citocinas, direcionam os processos efetores da resposta imune inata e adaptativa, tornando um ambiente propício para o desenvolvimento, crescimento e sobrevivência do parasito (DE FREITAS et al., 2016; DE FREITAS E SILVA; VON STEBUT, 2021; FALEIRO et al., 2014; OLIVIER; GREGORY; VE FORGET, 2005; SRIVASTAVA et al., 2019).

2.1.8.1 Resposta a citocinas na LV

Na patogênese da LV, principalmente à luz de estudos experimentais, ocorre uma dicotomia da resposta imunológica entre as populações de linfócitos do tipo 1 (Th1) que conferem resistência à infecção e do tipo 2 (Th2) pró-inflamatória de susceptibilidade (Figura 13). A modulação desses dois padrões depende da resposta inicial da imunidade inata e do equilíbrio de citocinas envolvidas na sinalização celular de forma autócrina e parácrina para regular a resposta imune. As citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, TNF- α , IFN- α e IFN- β atuam na regulação da imune inata, enquanto as citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-25, IFN- γ e TGF- β regulam a imune adaptativa (BHOR; RAFATI; PAI, 2021; SAMANT et al., 2021; SRIVASTAVA et al., 2019)

Figura 13 Citocinas associadas a proteção e progressão da LV



Fonte: Adaptado de (BHOR; RAFATI; PAI, 2021)

A progressão da doença está associada a altos níveis de citocinas IL-10, IL-6, TGF- β e IL-4 que diminuem a atividade antiparasitária em monócitos/macrófagos, com diferenciação em subpopulações de perfil anti-inflamatório, que possuem alta expressão de arginase, permitindo a biossíntese de poliaminas, facilitando o crescimento do parasito e a baixa capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). (BHOR; RAFATI; PAI, 2021; SAMANT et al., 2021; SRIVASTAVA et al., 2019)

A IL-10 inibe parcialmente a produção de IFN- γ nas células *natural killer* (NK), a apresentação de antígenos por células dendríticas (DC), diminuição na população de linfócitos T CD4⁺ efetora e aumento de linfócitos T CD4⁺ regulatórios do tipo 1 (Tr1) produtoras de TGF- β , como resultado há o predomínio de uma resposta Th2 de susceptibilidade, com produção de altos níveis de IL-4 sinalizando a inibição do ROS e produção de citocinas anti-inflamatórias IL-5, IL-13 e IL-10, bloqueando a produção de IFN- γ e TNF- α no fígado e baço, favorecendo o aumento da carga parasitária e ocasionando a hepatoesplenomegalia. (BHOR; RAFATI; PAI, 2021; SRIVASTAVA et al., 2019)

No baço, linfócitos T CD4⁺, DC e macrófagos esplênicos produzem IL-27 e IL-21, estimulando uma resposta imune do tipo 17 (Th17). A IL-21 induz a produção de IL-10 pela ação autócrina em linfócitos T CD4⁺ ativados. No fígado altos níveis de IL-33 produzidas por linfócitos Th2, induz a produção de IL-5 e IL-13 em subpopulações de linfócitos T, inibindo a produção de IFN- γ e IL-12 e levando a infiltração de monócitos e neutrófilos (BHOR; RAFATI; PAI, 2021; SRIVASTAVA et al., 2019).

O efeito imunomodulador sistêmico induzido pela infecção por *Leishmania*, leva a altos níveis de LPS associado na ativação de linfócitos T, elevando os níveis séricos de citocinas, agravando o estado clínico do indivíduo, causando uma tempestade de citocinas de perfil inflamatório (IFN-gama, TNF-alfa, IL-2, IL-6, IL-12, IL-17 e MIF), anti-inflamatório (IL-4, IL-5 e IL-13), regulatório (IL-10, TGF- β) e quimiocinas (IL-8, MCP e MIP-1beta). (MORENO et al., 2020; SAMANT et al., 2021)

2.1.8.1.1 Interleucina – 6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica multifuncional de 26kDa, produzida por várias populações celulares da imunidade inata e adaptativa em resposta a estímulos inflamatórios, inclusive em infecções por parasitas de vida intracelular. Sua atividade biológica está ligada a

síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos na inflamação como a proteína C reativa, amiloide A sérica, fibrinogênio, trombopoietina, haptoglobina e hepcidina. (BHOR; RAFATI; PAI, 2021; DOS SANTOS et al., 2016; KANG et al., 2019; SRIVASTAVA et al., 2019; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2018)

Na imunidade inata a IL-6 é produzida por células mieloides (macrófagos, monócitos e células dendríticas) mediante reconhecimento de patógenos por meio de receptores do tipo *toll-like* (TLR) no local da infecção ou lesão tecidual. Na imunidade adaptativa, a IL-6 possui papel importante na diferenciação de linfócitos B em plasmócitos para produção de anticorpos. (KANG et al., 2019; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2018; ROSE-JOHN, 2020; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2018; UNVER; MCALLISTER, 2018)

A sinalização da IL-6 nos processos infecciosos pode ser órgão-específica, o que inclui a modulação para uma resposta Th2, diferenciação de linfócitos Th17 e inibição linfócitos T regulatório (Treg) em sinergismo com a TGF- β , contribuindo neste processo para supressão da ativação do ROS em monócitos/macrófagos, produção de IL-27 e indução na produção de IL-10 (BHOR; RAFATI; PAI, 2021; DOS SANTOS et al., 2016; KANG et al., 2019; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2018; SRIVASTAVA et al., 2019; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2018).

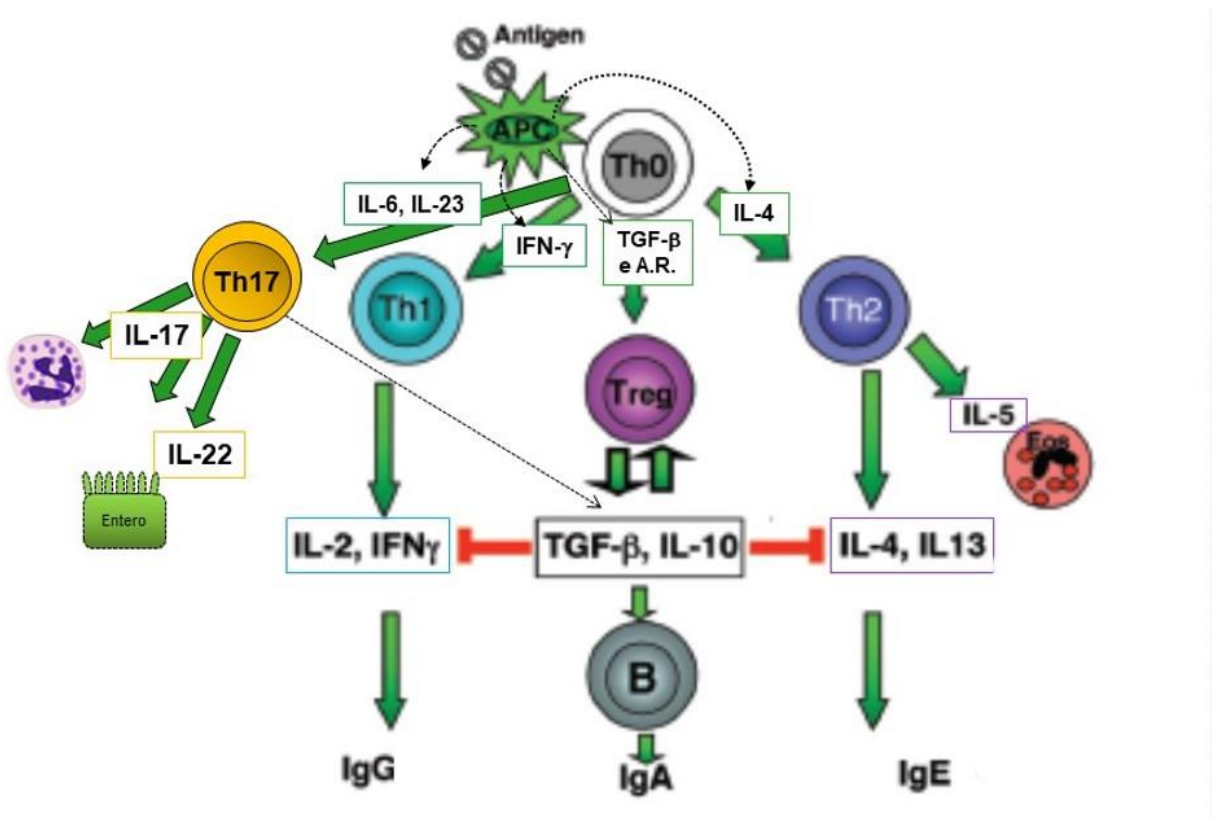
Na LV o papel da IL-6 está relacionado ao pior prognóstico da doença: pela associação ao aumento de fígado e baço; redução nas populações de neutrófilos; diminuição na contagem de plaquetas (trombocitopenia) episódios de sangramento; aumento na liberação de enzimas hepáticas; forte relação ao edema em associação com a IL-8 inibindo a produção de albumina no fígado; alta regulação da IL-1 β diminui a concentração de hemoglobina nas hemácias contribuindo para anemia, sinal clínico como preditor de morte para a doença. (COSTA et al., 2013; CUNHA FIEVEZ et al., 2019; DOS SANTOS et al., 2016; RAMOS et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2019).

2.1.8.1.1 Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β)

A TGF- β é uma citocina pleiotrópica produzida por leucócitos e células estromais, com importante papel na regeneração de tecidos e homeostase, induzindo a proliferação, diferenciação, adesão, quimiotaxia, metabolismo, sinalização e morte celular. Sua expressão na forma de homodímeros ou heterodímeros tem ação anti-inflamatória e regeneradora. Entre

as proteínas da família TGF- β destaca-se a TGF- β 1 um homodímero de 28kDa de maior expressão biológica. Esta citocina possui efeito imunossupressor sobre as populações tanto Th1 como Th2, em algumas doenças infecciosas e doenças autoimunes (. (BHOR; RAFATI; PAI, 2021; DERYNCK; BUDI, 2019; GANTT et al., 2003; HINCK; MUELLER; SPRINGER, 2016).

Figura 14 Relação das citocinas e seus efeitos na resposta imune adaptativa



Fonte: Elaborado por Câmara 2022

As proteínas da família do TGF- β regulam a geração e funções efetoras em várias populações celulares. Na imunidade inata, inibem células *natural killer* (NK), controlando a expressão do óxido nítrico sintase (iNOS) de macrófagos e neutrófilos. Na imunidade adaptativa atua na expansão de linfócitos T regulatórios, inibem a função de linfócitos T efetores pelo bloqueio da função da TNF- α e IFN- γ e o balanço da resposta Th1 e Th2 na apresentação de antígeno pelas células dendríticas (DCs) (BATLLE; MASSAGUÉ, 2019; PEREIRA et al., 2017; TZAVLAKI; MOUSTAKAS, 2020; ZHANG; ALEXANDER; WANG, 2017).

Na infecção por *Leishmania*, estudos em modelo animal demonstram a capacidade do parasito em induzir a expressão de TGF- β no fígado e baço de cães assintomáticos e sintomáticos, modulando os processos bioquímicos celular de morte do parasito, redução na expressão do complexo principal de histocompatibilidade do tipo II (MHC II) em macrófagos, o que aumenta a susceptibilidade e progressão da leishmaniose, aumento da atividade da caspase-3 facilitando a infecção e multiplicação do parasito (GANNTT et al., 2003; SAMANT et al., 2021; SRIVASTAVA et al., 2019; TADESSE et al., 2021).

A ativação da TGF- β favorece no local da infecção o crescimento do parasito pela modulação da resposta imune inata e adaptativa, expressão da arginase nos fagócitos e decaimento na produção do ROS, indução da fagocitose mediada por receptores de complemento e Fc γ , inibição na produção de IL-12 e falha na resposta por linfócitos T (GANNTT et al., 2003; SAMANT et al., 2021; SRIVASTAVA et al., 2019; TADESSE et al., 2021).

Na medula, linfócitos T regulatórios ativados de fenótipo CD4+CD25+FoxP3+ estão associadas a altos níveis de TGF- β ligados aos altos níveis de IL-10, possibilitando a multiplicação, persistência e tropismo parasitário, ocasionando a progressão da LV. O que dificulta a montagem de uma resposta celular efetora Th1, ocasionado pelo bloqueio da proliferação e ativação de linfócitos T, não permitindo que linfócitos T CD4+ se diferenciem em linfócitos efetores Th1 e que linfócitos T CD8+ adquiram função citotóxica. Este desfecho favorece o aumento da expressão de mediadores de morte celular programada (PD-1 e PDL-1), levando a exaustão de linfócitos T, impedindo o controle e eliminação do parasito (BHATTACHARYA et al., 2016; BHOR; RAFATI; PAI, 2021; DE FREITAS E SILVA; VON STEBUT, 2021; GAUTAM et al., 2013; KUMAR et al., 2018b).

2.1.9 Regulação genética de citocinas na LV

As citocinas têm sua expressão regulada por modificações epigenéticas que incluem a metilação do DNA, modificação das histonas, interações na cromatina de ordem superior, assim como, regulação pós-transcricional por mecanismos mediados por micro RNA. Estudos tem demonstrado a relação de moléculas secretadas por protozoários, modulando ativamente o ambiente celular do hospedeiro através de alterações no transcriptoma em níveis epigenéticos. Estas alterações repercutem nos processos de sinalização imunológicos, metabólicos e do ciclo celular, favorecendo o crescimento, desenvolvimento, sobrevivência do parasito pela supressão

da imunidade através da alteração dos níveis de citocinas. (BHOR; RAFATI; PAI, 2021; MAHANTA et al., 2018)

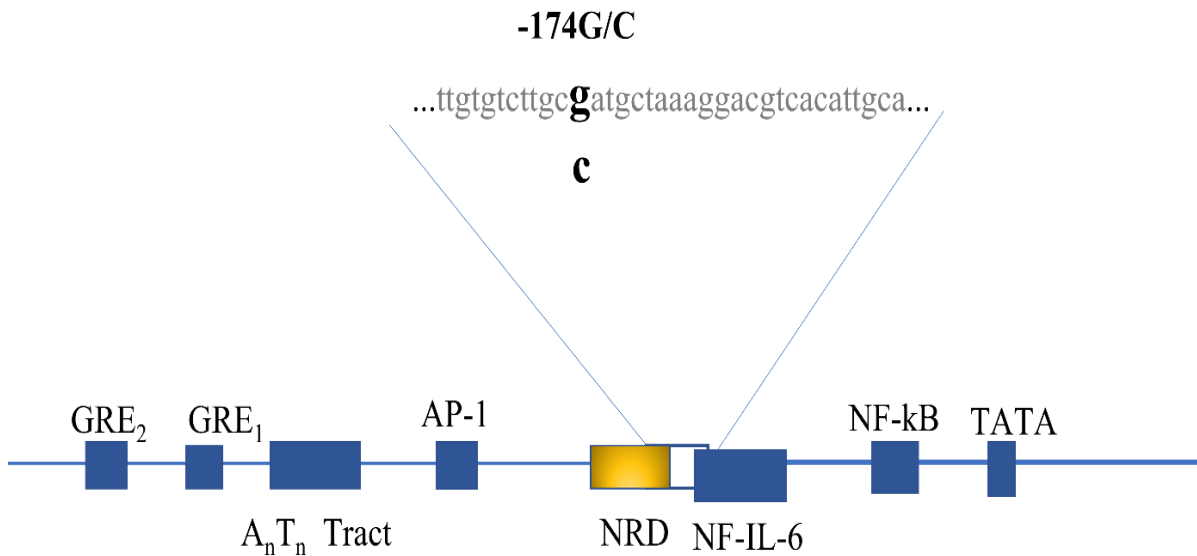
Neste contexto destacam-se os estudos sobre a relação do polimorfismo nos genes que regulam a produção de citocinas na LV: para as citocinas pró-inflamatórias os genes IL-1 β (associada a resistência) (+3953 T/C) e (-511 T/C) (MORAVEJ et al., 2012); IL-8 (associada ao risco) posição 251 e +2767 (AHMADI et al., 2016); IL-17 (associada a susceptibilidade) variante genética rs8193036, rs2275913 (KHATONIER et al., 2020); TNFB e TNFA (associada a doença) (KARPLUS et al., 2002) e para as citocinas anti-inflamatórias IL-10 (associada a doença) g.5311A com quatro variações rs1518111 – 2195A>G intron, rs1554286 – 2607C>T intron, rs3024496 – 4976T>C 3'UTR, rs3024498 – 5311A>G 3'UTR (HAJILOOI et al., 2013); TGF- β 1 (associada a susceptibilidade) -509C/T e +869T/C (HAMIDI; HAJILOOEI; BAZMANI, 2013). (BHARATI, 2022)

As moléculas presentes na superfície da *Leishmania* ativam vários fatores de transcrição (ERK1/2, NF-kB, NFAT, AP1, STAT3), iniciando a síntese e produção de várias citocinas. Por outro lado, a susceptibilidade do hospedeiro está ligada ao polimorfismo em genes chaves da resposta imune em termos de expressão de citocinas na atividade funcional de sinalização celular e resistência ao adoecimento A presença de polimorfismos genéticos de um único nucleotídeo tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) de genes promotores de citocinas tem sido considerado como importante no desenvolvimento das diferentes formas clínicas na infecção por *Leishmania sp* (BHARATI, 2022; MAHANTA et al., 2018).

2.1.9.1 Gene IL-6

O gene IL-6 está localizado no braço curto do cromossomo 7 e as regiões polimórficas são identificadas por diferentes SNPs: IL-6 -597, -572, -373 e -174. A região rs1800795 (-174G/C) (Figura 15) repercute na diminuição da transcrição de IL-6 em resposta a estímulos inflamatórios, onde a presença do alelo C polimórfico resulta em uma baixa expressão de IL-6 (LIAO et al., 2008; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2018). Por outro lado, no estudo *in vivo* por FISHMAN et al., (1998) a frequência do alelo G selvagem possui associação no aumento 2x mais da expressão de IL-6 em relação a frequência do alelo C polimórfico

Figura 15 Região polimórfica do gene *IL-6* (-174G/C)



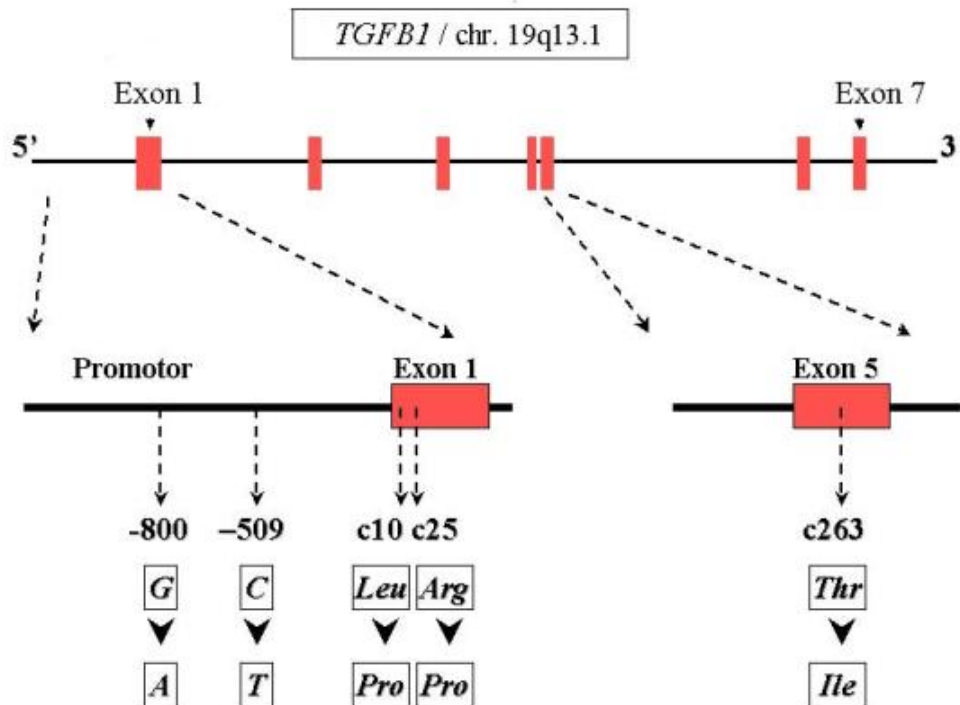
Fonte: Adaptado de (FISHMAN et al., 1998)

2.1.9.2 Gene TGF- β

A família da TGF- β humana incluem 33 genes que codificam citocinas homodiméricas e heterodiméricas secretadas (ativinas, proteínas morfogenéticas de medula (BMPs), fatores de diferenciação de crescimento (GDFs), substância inibidora mulleriana (MIS), nodal e TGF- β s. Esta última é compreendida em três isoformas TGF- β 1, TGF- β 2, e TGF- β 3, com destaque para TGF- β 1 devido ao seu papel na regulação do sistema imune, estando associado ao câncer, infarto, doenças autoimunes e nas doenças infecciosas. (BATLLE; MASSAGUÉ, 2019; DERYNCK; BUDI, 2019; HINCK; MUELLER; SPRINGER, 2016; KELLY et al., 2017; TZAVLAKI; MOUSTAKAS, 2020)

A produção de TGF- β é regulada geneticamente com vários SNPs afetando regulação de níveis séricos da citocina. A presença do polimorfismo na região -509 C/T (rs1800469) (Figura 16) está associado com a susceptibilidade para doenças e altos níveis de concentração de TGF- β 1 nas implicações funcionais. Indivíduos homozigotos TT possuem até duas vezes mais concentração desta citocina no plasma do que indivíduos homozigotos CC. (DE BRITO et al., 2020; FERREIRA et al., 2018; FRADE et al., 2011; KELLY et al., 2017; LANGDAHL et al., 2003; MARTELOSSI CEBINELLI et al., 2016; PEREIRA et al., 2017)

Figura 16 Representação do gene *TGF-β1* (-509 C/T)



Fonte: Carmo, 2016

O gene *TGF-β1* está localizado no braço longo do cromossomo 19 compreendido pelos genes *TGFβ1* (-509 C/T) e *TGFβ1* (+869 T/C), ambos localizados na região promotora para alta produção de TGF-β. Indivíduos que apresentam genótipo CT para o gene *TGFβ1* (-509 C/T) possui associação de susceptibilidade para um pior prognóstico clínico da LV(BHARATI, 2022; HAMIDI; HAJILOOEI; BAZMANI, 2013)

3 JUSTIFICATIVA

Há na leishmaniose visceral um ambiente inflamatório com diferentes níveis séricos de citocinas pró e anti-inflamatórias que podem ser modulados através de alterações genéticas decorrente de genes codificadores de citocinas que atuam na resposta imune, contribuindo para visceralização do parasito e tropismo pela medula óssea.

As citocinas TGF-β e IL-6 devido a sua função reguladora e inflamatória nos processos infecciosos, possuem regiões polimórficas nos genes promotores que atuam nos

níveis destas citocinas promovendo um ambiente inflamatório permissivo a disseminação do parasito no hospedeiro.

O aumento da carga parasitária na medula ocasiona um quadro clínico de pancitopenia severa, contribuindo para episódios hemorrágicos, edema, visceromegalias e consequentemente a um pior prognóstico do indivíduo com LV e morte.

4 HIPOTÉSE

A evolução clínica do indivíduo com LV sofre interferência da presença do polimorfismo de regiões promotoras dos genes das citocinas IL6 e TGF- β e aumento na carga parasitária e evolução ao pior prognóstico da doença.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Demonstrar a relação do polimorfismo genético dos genes promotores das citocinas IL-6 e TGF- β e da carga parasitária na evolução clínica do indivíduo com leishmaniose visceral a um pior prognóstico para a doença.

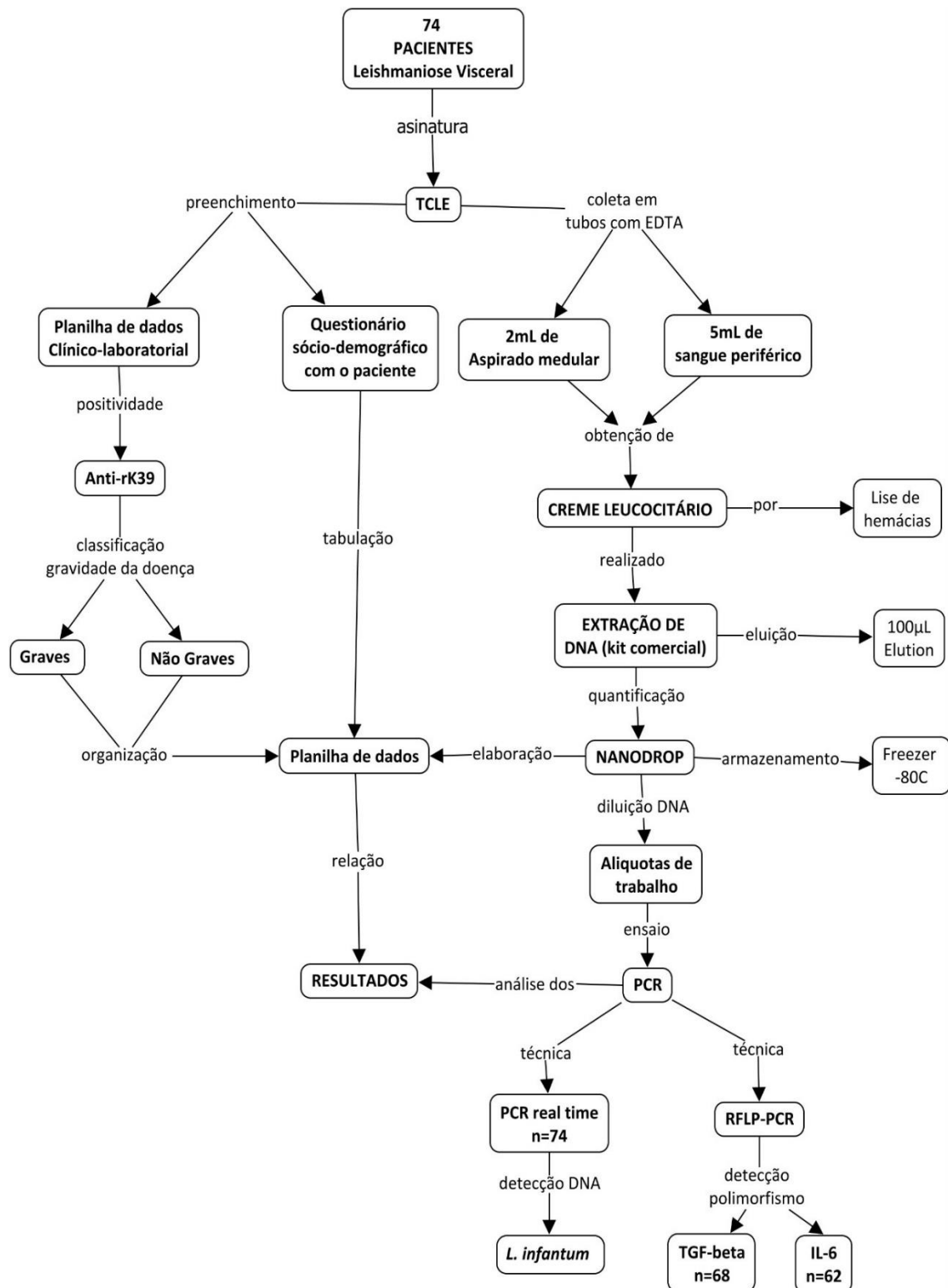
5.2 Objetivos Específicos

- Identificar a relação entre a carga parasitária no sangue e medula óssea com a clínica em indivíduos com leishmaniose visceral;
- Relacionar a frequência do polimorfismo dos genes *IL-6 (-174 G/C)* e *TGF β 1 (-509 C/T)* ao aumento da carga parasitária em indivíduos com leishmaniose visceral;
- Identificar a frequência do polimorfismo dos genes *IL-6 (-174 G/C)* e *TGF β 1 (-509 C/T)* que modulam a produção das citocinas IL-6 e TGF- β em indivíduos com leishmaniose visceral;
- Correlacionar a frequência de polimorfismo dos genes *IL-6 (-174 G/C)* e *TGF β 1 (-509 C/T)* com a carga parasitária e a evolução clínica do indivíduo com leishmaniose visceral.

6 CASUÍSTICA E MÉTODOS

6.1 Delineamento Experimental

Figura 17 Fluxograma de desenvolvimento do estudo



Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2 Descrição do estudo

Estudo de natureza transversal, prospectivo e de abordagem quantitativa realizado no período de agosto de 2017 a dezembro de 2019.

Participaram do estudo, indivíduos com diagnóstico confirmado da leishmaniose visceral, atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ) por demanda espontânea, com idade a partir de 18 anos, de ambos os sexos, através de busca ativa nos setores de emergência, ambulatório, enfermaria, UTI e laboratório de análises clínicas.

Foram considerados como critério confirmatório para LV, os aspectos clínicos descritos no prontuário e os aspectos laboratoriais através de exames hematológicos, parasitológico por microscopia direta, sorológico pela positividade em teste imunocromatográfico (IT-LEISH rk39 - Bio-Rad™, EUA), com ou sem associação de outras doenças infecciosas e que não tenham iniciado o tratamento para LV.

6.3 Aspectos éticos

O presente estudo recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (PROPESQ) em 07 de abril de 2016 conforme CAAE 52870716.1.0000.5054 (Anexo A) e do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José de Doenças Infecciosas, 20 de julho de 2016 conforme CAAE 52870716.1.5044 (Anexo B)

Os indivíduos foram esclarecidos a respeito da finalidade do estudo e procedimentos de risco através de Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (Apêndice A), com o aceite da participação, autoriza através da assinatura, seguido de entrevista e preenchimento de ficha sociodemográfica (Apêndice B) pelo entrevistador. Após entrevista, foi realizada a coleta de amostra biológica.

6.4 Coleta de dados

Os dados clínicos e laboratoriais coletados do prontuário, foram tabulados e organizados a partir do modelo de prognóstico para a redução da letalidade da LV preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2011). Foram considerados o peso do escores no modelo clínico para as variáveis de idade, sangramento, HIV, edema, icterícia dispneia e infecção bacteriana.

Para a classificação dos indivíduos com melhor ou pior prognóstico da LV, foi seguido o valor de corte estabelecido no modelo de clínicos escores com total de pontos maior ou igual a 4 para pior prognóstico da doença e condição de tratamento em âmbito hospitalar que engloba terapia específica, medidas adicionais de hidratação, antitérmicos, antibióticos, hemoterapia e suporte nutricional (BRASIL, 2011). Indivíduos que alcançaram total de pontos menor que 4 foram classificados com melhor prognóstico, com tratamento realizado no âmbito ambulatorial do HSJ ou no município de residência.

6.5 Coleta de material biológico

Foram coletados 5 mL de sangue periférico por punção venosa por técnico de enfermagem do laboratório de análises clínicas do HSJ e 2 mL de aspirado medular em tubos *Vacutainer*® com EDTA, por médico residente do HSJ. As amostras foram armazenadas sob refrigeração em caixa térmica com temperatura entre 4°C a 8°C, hermeticamente fechadas e transportadas para o Laboratório de Imunologia Médica (LIME) da Universidade Federal do Ceará (UFC), seguindo os procedimentos técnicos de acondicionamento e transporte de amostras biológicas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Ceará (LACEN). (LACEN-CE, 2020)

6.6 Obtenção de Creme Leucocitário

Os tubos com EDTA com amostras de 5mL de sangue periférico e 2 mL medula óssea a temperatura ambiente (TA), foram centrifugados (centrífuga Clinical 200) por 10 minutos a 460 g, retirado o plasma e adicionado em cada tubo 2x o volume de solução de lise formada por 9 partes de NH_4Cl a 0,144M + 1 parte de NH_4CO_3 a 0,01M, homogeneizado por inversão por 20 minutos a TA. Decorrido o tempo de lise de hemácias, os tubos foram centrifugados (centrífuga Clinical 200) por 20 minutos a 700 g. O sobrenadante foi retirado e adicionado 1,5mL de solução de e repetido por mais uma vez o passo de homogeneização, transferido para 2 tubos eppendorf de 2,0mL, um para cada tipo de amostra biológica. Os passos de lise foram repetidos por mais uma vez adicionando 1,5mL de solução de lise, centrifugados (centrífuga SIGMA 2k15) por 5 minutos, a temperatura de 5°C a 1400 g, retirados o sobrenadante, seguido de mais duas lavagens com 1,5 mL de PBS, centrifugados por 5 minutos a temperatura 5°C a 1400 g.

6.7 Extração de DNA a partir de creme leucocitário

Para a extração de DNA foi utilizado kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini kit (Invitrogen™). Seguindo os passos propostos pelo fabricante, adicionando as amostras 20µL de proteinase K do kit e 20µL de RNase A, homogeneizado em vortex em agitação máxima por 5 segundos, adicionado 200µL de *PureLink™ Genomic Digestion Buffer*, homogeneizado e incubado em banho-maria por 10 minutos a 55°C. Passados o tempo em banho-maria, foram adicionados 200µL de Etanol PA (96 – 100%), homogeneizado por 5 minutos e transferido os conteúdos para 2 tubos *Spin Collum* com tubo coletor acoplado, centrifugado (centrífuga SIGMA 2k15) a 10.000 rcf por 1 minuto, descartado o tubo coletor e acoplado o *Spin Collum* a um novo tubo coletor, adicionados 500µL de *PureLink™ Genomic Washing Buffer 1*, centrifugados (centrífuga SIGMA 2k15) a 10.000 rcf por 1 minuto, foi desprezado o líquido do tubo coletor, adicionado 500µL de *PureLink™ Genomic Washing Buffer 2*, centrifugado (centrífuga SIGMA 2k15) a 20.000 rcf por 3 minutos. O tubo coletor foi descartado, o tubo *Spin Collum* transferido para tubo eppendorf de 1,5 mL, adicionados 100µL de *Genomic Elution Buffer*, incubados por 2 minutos a TA, centrifugados (centrífuga SIGMA 2k15) a 20.000 rcf por 2 minutos.

Para a quantificação de DNA das amostras, foram utilizados 2µL em equipamento Nanodrop 1000 (ThermoScientific, EUA). A pureza do DNA foi observada pela razão 260/280nm onde a proporção de ~1,8 foi considerada como DNA livre de impurezas. O resultado foi dado em concentração de ng/µL de DNA e gerado uma planilha de dados de soluções de estoque. As soluções de estoque foram diluídas em soluções de trabalho nas concentrações de 30ng/µL para os ensaios de polimorfismo (PCR-RFLP) e detecção de DNA de *L. infantum* (qPCR *real time*).

6.8 Ensaio PCR em Tempo Real

6.8.1 Desenho de primers

Para amplificação de DNA de *L. infantum* foram desenhados os iniciadores (primers) utilizando o software *Primer-BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (YE et al., 2012) para sequência de DNA minicírculo de cinetoplasto (kDNA) de *L. infantum* sequência completa (AF169138.1). Os parâmetros do *Primer-BLAST* foram ajustados para excluir amplificações para *Leishmania brasiliensis* (taxid 5660), complexo de espécies de *Leishmania brasiliensis* (taxid 37617), HIV (taxid 11676), grupo dos vírus C das hepatites

(taxid 11102), vírus da hepatite B humana (taxid 10407), complexo *Mycobacterium tuberculosis* (taxid 77643), *Mycobacterium leprae* (taxid 1769) e *Homo sapiens* (taxid 9606).

Os iniciadores desenhados no software *primer-BLAST* foram denominados de upkDNA, composto de 21 nucleotídeos no sentido positivo (*forward*) e 20 nucleotídeos no sentido negativo (*reverse*), formando produtos de 79bp (Tabela 1).

Tabela 1 - Primer para amplificação de DNA de *L. infantum*

Primer	Sequência	Produto (bp)
upkDNA-SE	GGGGGTGTCGTAAATTCTGGA	79
upkDNA-AS	CCCGGAGGACCAGAAAAGTT	

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.8.2 PCR em tempo real quantitativo (RT-PCR)

Cada reação consistiu em volume total de 25µL, contendo 12,5µL de SYBER™ *Green Master Mix* (Applied Biosystem, USA), 2,5µL de mix de primers (primer-SE e primer-AS), 1µL de DNA da amostra, 9µL de água ultrapura. A amplificação foi realizada em termociclador *QuantStudio3 Real Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific, USA), com ciclo térmico de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de programa de amplificação 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos.

6.8.3 Estabelecimento de concentração de primer upkDNA

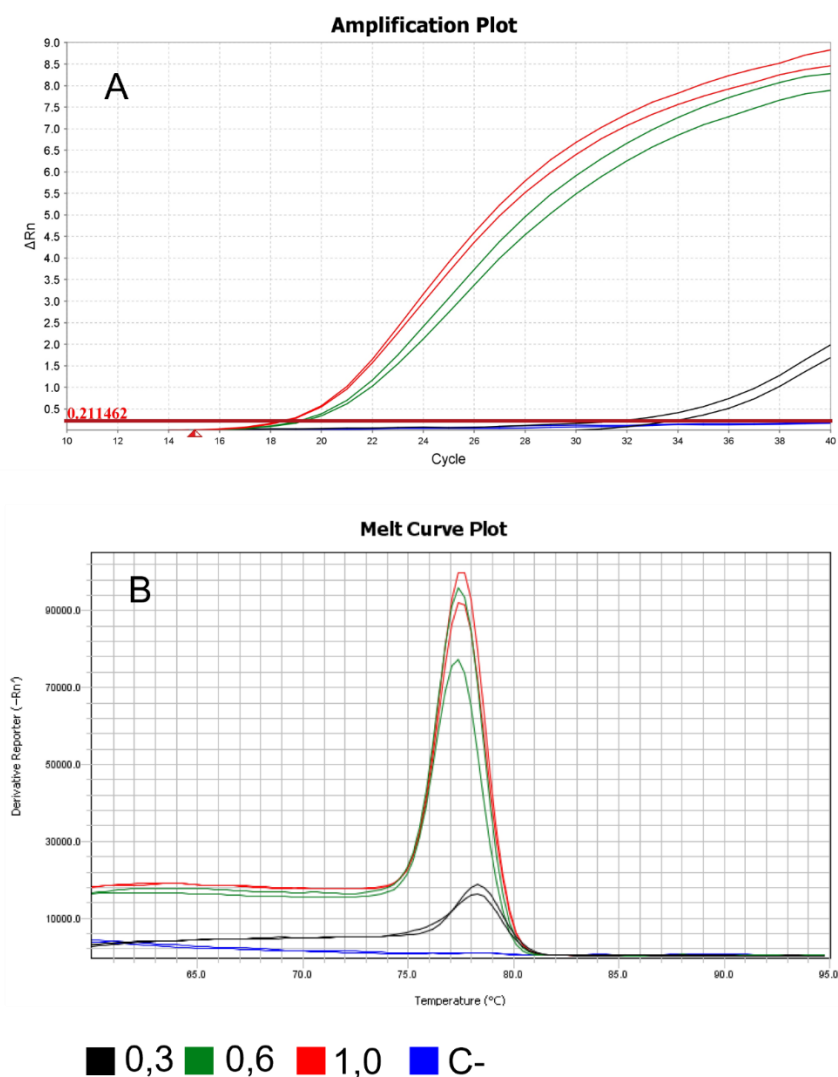
O par de prime upkDNA foi submetido a triagem de concentração há 0,3µM, 0,6µM e 10,0µM em amostra contendo 1µL DNA *Leishmania* + 14µL DNA humano na concentração de 33.000 *Leishmania*/µL. A escolha decisória foi a concentração de 10,0 µM (Tabela 2), que apresentou menor Ct em relação as demais concentrações avaliadas de DNA de *L. infantum* nas amostras caracterizadas nas cores preto, verde e vermelho demonstradas na Figura 18. e para controle positivo da reação foi utilizado DNA puro de *Leishmania infantum* (MHOM 46/LC/HZ1) cedido do laboratório de parasitologia da UFC.

Tabela 2 - Ajuste de concentração dos pares de prime upKDNA-SE/upKDNA-AS para amplificação de kDNA de *L. infantum* em amostras humanas.

Concentração μM	Ct (média \pm DP)
0,3	19,33 \pm 0,07
0,6	17,96 \pm 0,08
1,0	17,57 \pm 0,19

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 18 Amplificação de prime upKDNA-SE/upKDNA-AS para kDNA de *L. infantum* em amostras humanas.



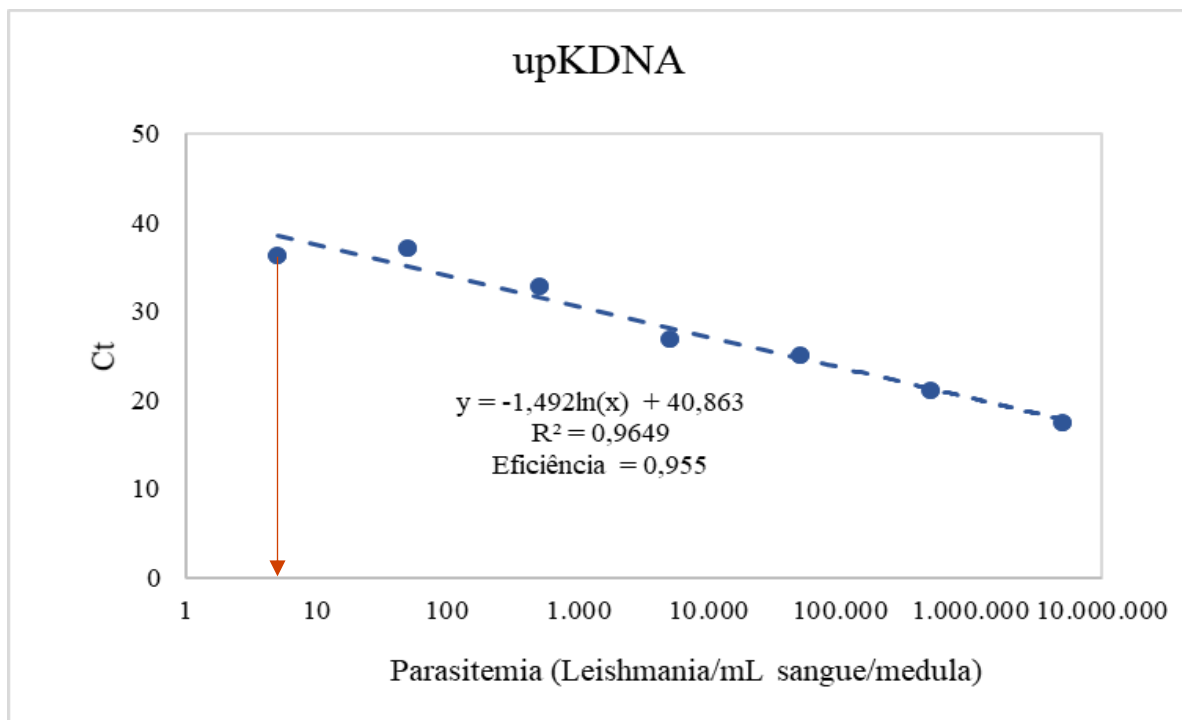
Fonte: elaborado pelo. A – Sinal de produção de amplicons de DNA de *L. infantum*, cores preto, verde e vermelho B – Demonstração de especificidade dos produtos amplificados de DNA de *L. infantum*. A cor azul controle negativo.

6.8.4 Construção de curva padrão de quantificação parasitária

Para a curva padrão foi realizado a reação de PCR contendo 9 μL de DNA humano na concentração de 96ng/ μL , acrescentado 1 μL de DNA de *L. infantum* na concentração de 0,5 x 10⁶ *leishmanias*/ μL . A partir do mix foram feitas diluições seriadas até o limite de detecção equivalente ao genoma de 0,5 *Leishmanias*/ml de amostra de sangue ou medula. As amplificações na curva-padrão foram expressas em número de parasito mínimo detectável, os parâmetros da curva como Eficiência e Linearidade (R^2) e foram avaliados de forma qualitativa.

Os primers upkDNA-SE/upkDNA-AS apresentou sensibilidade de amplificação equivalente a parasitemia inferior a 10 *Leishmanias*/mL de sangue/medula. (Figura 19) Os parâmetros da curva foram: Y-Intercept: 40,863, R^2 : 0,937, Slope:3,435 e Eficiência: 95,47; apresentando amplificação com linearidade adequada.

Figura 19 Curva padrão de DNA de *L. infantum* em amostras comLV



Fonte: Elaborado pelo autor.

6.8.5 Detecção de DNA de *L. infantum*

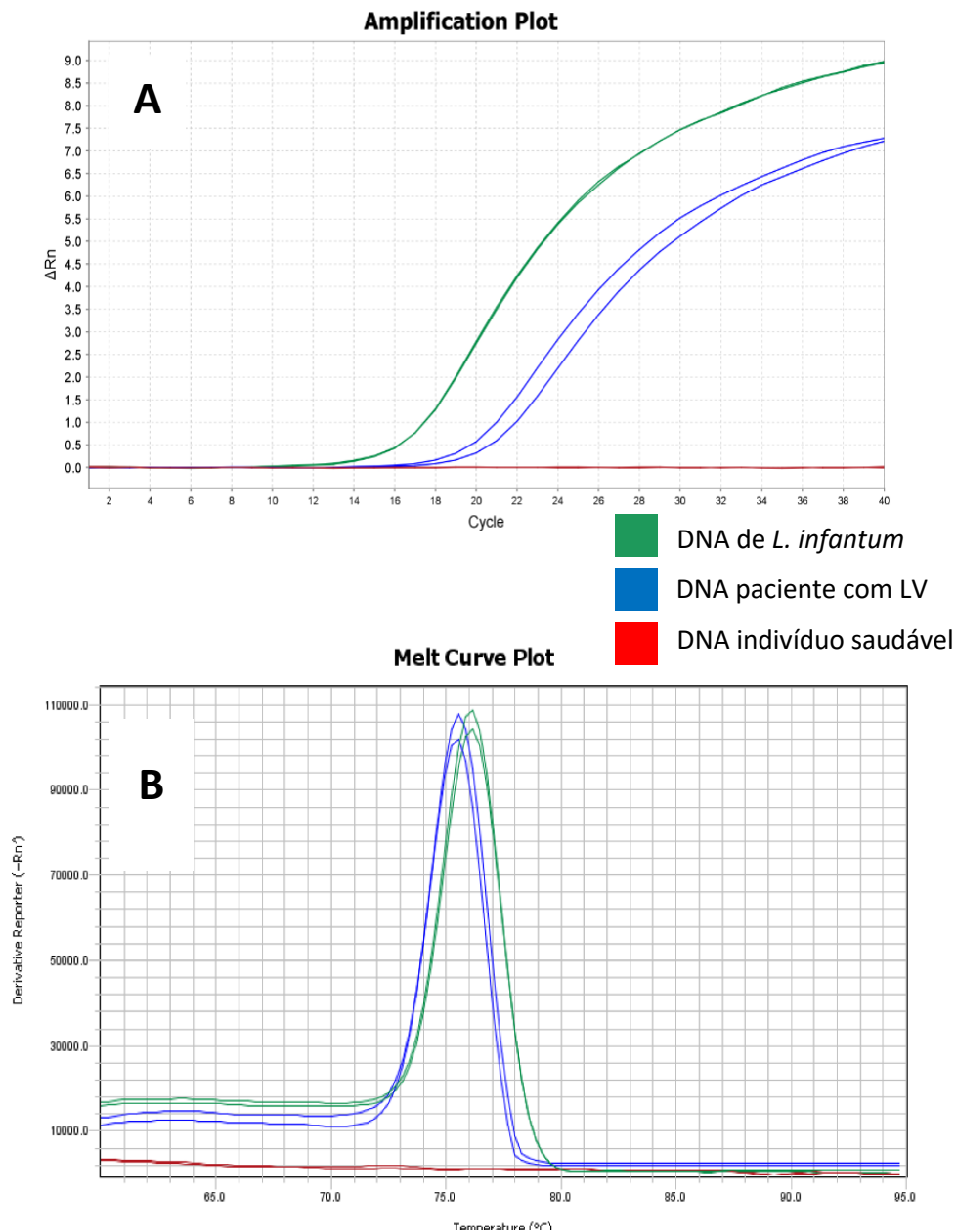
Amostras de sangue e medula óssea na concentração de DNA de 30ng/ μ L foram transportados sob refrigeração em caixa térmica para o Laboratório de Genética Molecular do Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO) em Fortaleza, para detecção e quantificação de DNA de *Leishmania infantum*.

Cada reação de PCR em tempo real consistiu em volume total de 25 μ L, contendo 12,5 μ L de SYBER™ *Green Master Mix* (Applied Biosystem, USA), 2,5 μ L de mix de primers (primer-SE e primer-AS), 1 μ L de DNA de paciente com LV, 9 μ L de água ultrapura. A amplificação foi realizada em termociclador QuantStudio3 *Real Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific, USA), com ciclo térmico de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de programa de amplificação 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos.

A especificidade de cada reação foi determinada através de análise da curva de *melting* dos amplicons obtidos. Valores de limiar por ciclo (*Ct*) foram determinados por *Desing and Analysis Software* v.1.5.1 utilizando o parâmetro padrão. Para controle positivo foi utilizado DNA de *Leishmania infantum* e para controle negativo apenas DNA humano de indivíduo saudável. A sensibilidade (limiar de detecção) das amplificações de qPCR foi acessado através de curva-padrão com reações em duplicata, através de diluições seriadas com fator 10 do DNA de *L. infantum*, com limiar de detecção de 5 *leishmanias* genoma/ml e valor de *Ct* de 36 para amostras consideradas positivas. Amplificações com *Ct* superior a 36 foram consideradas negativas.

O primer upkDNA produziu amplificação linear de DNA de *L. infantum* com base a uma reação em duplicata com amostras contendo apenas DNA de *L. infantum* (verde), DNA de paciente com LV (azul), DNA de indivíduo saudável (vermelho) conforme observado no Gráfico 20A. Os produtos da amplificação geraram um gráfico de curva de *Melting*, demonstrando a especificidade da reação pelos picos em verde (DNA de *L. infantum*) e azul (DNA de *L. infantum* em amostra clínica de paciente de LV) sem a ocorrência de formação de dímeros. (Figura 20B)

Figura 20 Exemplo de uma curva padrão da amplificação de DNA de *L. infantum* em indivíduos com LV.



Fonte: Elaborado pelo autor.

6.9 Detecção dos polimorfismos de *IL6* (-174 G/C) e *TGFβ1* (-509 C/T)

A presença de polimorfismo para os genes *IL6* (-174 G/C) - rs1800795 e *TGFβ1* (-509 C/T) – rs198203 foi detectada a partir de DNA genômico extraído de sangue periférico, utilizando a técnica de RFLP-PCR (*Restriction fragmente length polymorphism*). As condições específicas da técnica e os iniciadores (primers) utilizados, estão de acordo com a literatura conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3 Sequência de primers para detecção de polimorfismo de citocina

SNP	Primer	Fragmento	Referência
<i>IL6</i> (-174 G/C) rs1800795	F 5' TGA CTT CAG CTT TACT CTT TGT 3' R 5' CTG ATT GGAA ACCTT ATTAAG 3'	198pb	(FERNÁNDEZ- REAL et al., 2000)
<i>TGFβ1</i> (-509 C/T) rs1982073	F 5'-CAG ACT CTA GAG ACT GTC AG-3' R 5'-GTC ACC AGA GAA AGA GGA C-3'	419pb	(CHEN et al., 2009)

Fonte: elaborado pelo autor

6.9.1 PCR-RFLP

A reação de PCR ocorreu conforme amplificação geradas nas concentrações dos reagentes descritos na Tabela 4. O DNA foi amplificado utilizando o termociclador MiniAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) conforme especificações na Tabela 5. Os produtos da PCR foram detectados através de técnica de eletroforese em gel de agarose 1%, voltagem de 75volts pelo tempo de 15 minutos.

Tabela 4 Concentrações de reagentes utilizados nas reações de PCR

REAGENTES (μL)	Gene <i>IL6</i> (-174G/C)	Gene <i>TGFβ1</i> (-509C/T)
Prime F	0,4 μL	0,5 μL
Prime R	0,4 μL	0,5 μL
GoTaq® Master Mix	10 μL	10 μL
DNA	1 μL	1 μL
Água ultrapura	8,2 μL	8,0 μL
Volume final	20 μL	20 μL

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 Programação no termociclador

PROGRAMAÇÃO	Gene <i>IL6</i> (-174G/C)	Gene <i>TGFβ1</i> (-509C/T)
Desnaturação inicial	94°C por 5 minutos	94°C por 5 minutos
Anelamento	55°C por 45 segundos (35 ciclos)	94°C por 60 segundos (40 ciclos)
Extensão	72°C por 1 minuto	72°C por 60 segundos
Extensão final	72°C por 5 minutos	72°C por 5 minutos

Fonte: Elaborato pelo autor.

A qualidade dos produtos da PCR amplificados foram avaliados em gel de agarose a 1,0% com Brometo de Etídio ($C_{21}H_{20}BrN_3$), e observado em transluminador com excitação de luz ultravioleta; o resultado foi gerado no software Quantum ST4 que demonstrou a presença bandas formadas por amplicons com 198pb para o gene *IL6* (-174 G/C) e de 419pb para o gene *TGFβ1* (-509 C/T). (Figura 21)

Figura 21 Padrão de bandas específicas para região alvo dos genes para IL-6 e TGF-beta em gel de agarose.



Fonte: elaborado pelo autor. **A** – Amplicons de 198pb gene *IL6* (-174 G/C). **B**- Amplicons de 419pb gene *TGFβ1* (-509 C/T)

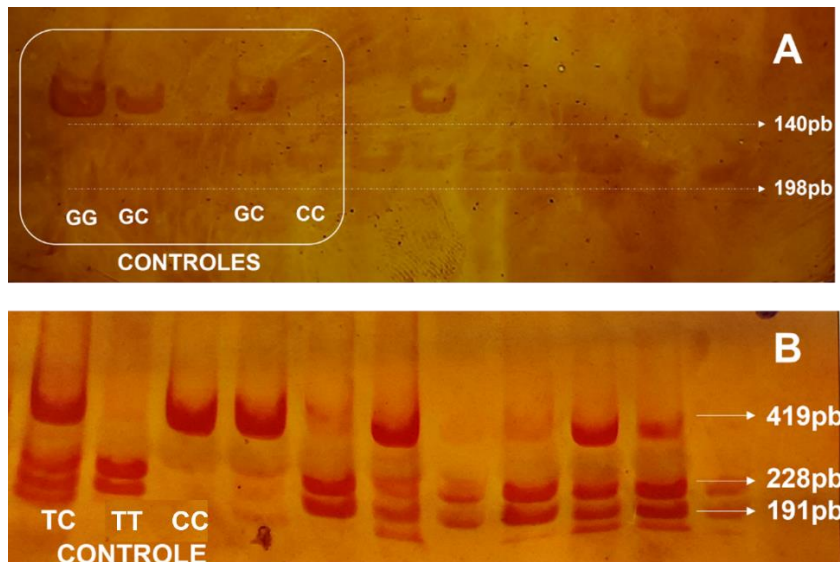
Os produtos da PCR (5μL) foram submetidos a digestão enzimática por 16 – 18 horas (overnight) a temperatura de 37°C, contendo 0,3μL (*SfaNI*) e 0,2 μL (*Bsu36 I* (*Eco811*)) de enzima de restrição para volume final de 12,5 μL conforme protocolo e especificações na Tabela 6. Após a digestão enzimática o genótipo foi observado em gel de poliacrilamida a 6%. O padrão de bandas observadas está apresentado na Tabela 6, as bandas específicas pela ação da enzima de restrição foram visualizadas através de impregnação do gel com solução de nitrato de prata. (Figura 22).

Tabela 6 Especificações para realização da restrição

Polimorfismo	Fragmento da PCR	Enzima de Restrição	Fragmento de Restrição	Referência
IL6 (-174 G/C)	198pb	<i>SfaNI</i>	(GG) 140pb (CC) 198pb + 58pb (GC) 140pb+198pb+58pb	Fernandez-Real <i>et al.</i> (2000)
TGFβ1 (-509 C/T)	419pb	<i>Bsu36 I</i> (<i>Eco811</i>)	(CC) 419pb (TT) 228pb+191pb (CT) 419pb+228pb+191pb	Chen <i>et al.</i> (2009)

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 22 Padrão de fragmentos de restrição para polimorfismo de IL-6 e TGF-beta



Fonte: Elaborado pelo autor. **A** - Presença de polimorfismo para IL-6 onde: GG – alelos selvagens, GC – alelo polimórfico heterozigoto e CC – alelos polimórficos homozigoto. **B** – Presença de polimorfismo para TGF-beta onde: CC – alelos selvagens, CT – alelo polimórfico heterozigoto, TT – alelos polimórficos homozigoto.

7 Análise Estatística

Os dados quantitativos foram analisados de forma não pareada em testes de normalidade de *D'Agostino & Person*, *Shapiro-Wilk*. Dados que assumiram distribuição Gaussiana foram analisados de forma paramétrica entre duas variáveis através de teste *t* e entre mais de duas variáveis através de teste de ANOVA. Dados não paramétricos foram utilizados o teste *Mann-Whitney* entre duas variáveis e entre mais de duas variáveis através de teste de

Kruskal-Wallis. Variáveis categóricas foram analisados pelos testes *Fisher's exact* e *Chi-square*. Os dados de frequência de polimorfismo de SNPs fora analisados com o software estatístico SNPStats (<https://www.snptest.net/start.htm?>).

8 RESULTADOS

8.1 Perfil clínico e demográfico dos Indivíduos

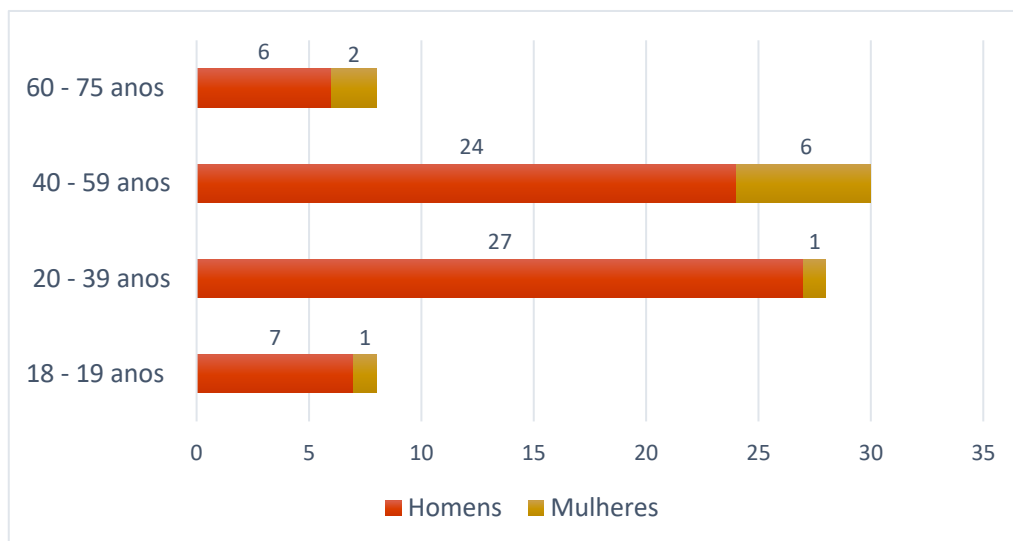
Setenta e quatro indivíduos com LV foi composto em sua maioria de homens (86%) e com menor proporção de mulheres (14%) (Tabela 7), com mediana de idade de 41 anos (IIQ = 20). (Gráfico 4).

Tabela 7 Classificação dos indivíduos com LV quanto ao sexo.

SEXO	n = 74	%
HOMENS	64	86
MULHERES	10	14

Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 1 Distribuição de indivíduos com LV por idade

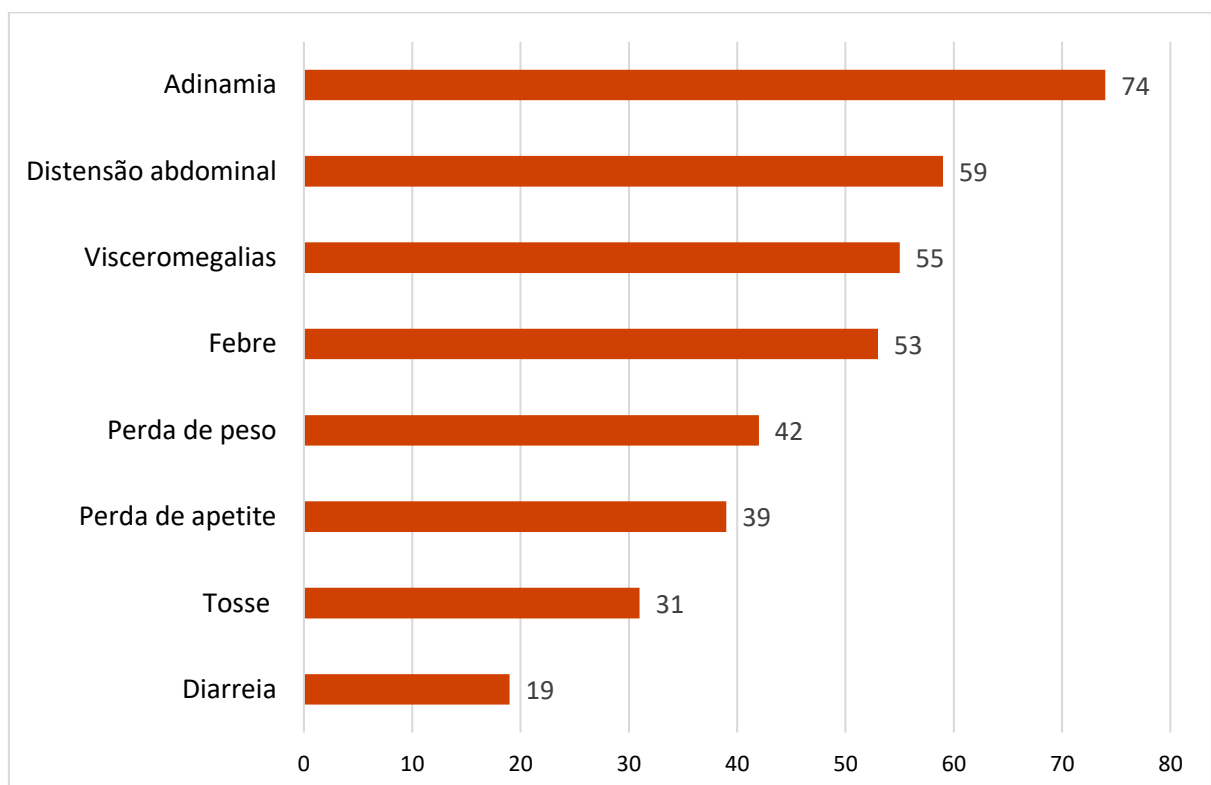


Fonte: elaborado pelo autor.

Os indivíduos foram provenientes de diferentes áreas geográficas do Estado do Ceará, sendo 82,4% de residentes de zona urbana com alta densidade, de Fortaleza (48,6%), Caucaia (8,1%), Maranguape (4%), Quixadá (4%), Granja (2,7%), São Luis do Curu (2,7%) e Trairi (2,7%) e 17,6% originários de zona rural (vilas, lugarejos e subdistritos) pertencentes aos municípios de Quixadá, Miraíma, Capistrano, Palmácia, Granja, Horizonte, Cascavel, Palhano, Trairi, Ibareta, Aciraz e Russas.

O tempo médio de busca por atendimento desde a entrada na atenção primária de saúde até o primeiro atendimento no HSJ ocorreu em média de 48 dias, com variações entre 3 e 365 dias. As dificuldades de acesso a busca por atendimento médico, associado a demora no diagnóstico e tratamento popular contribuem ao acesso tardio ao tratamento e piora do quadro clínico de indivíduos com LV. Os sinais e sintomas clínicos clássicos de leishmaniose visceral, como adinamia, distensão abdominal, visceromegalias, febre, perda de peso e perda de apetite estavam presentes na maioria dos indivíduos, associados ou não a tosse e diarreia, conforme está ilustrado no Gráfico 2.

Gráfico 2 Distribuição de sinais e sintomas em indivíduos com LV (n=74).

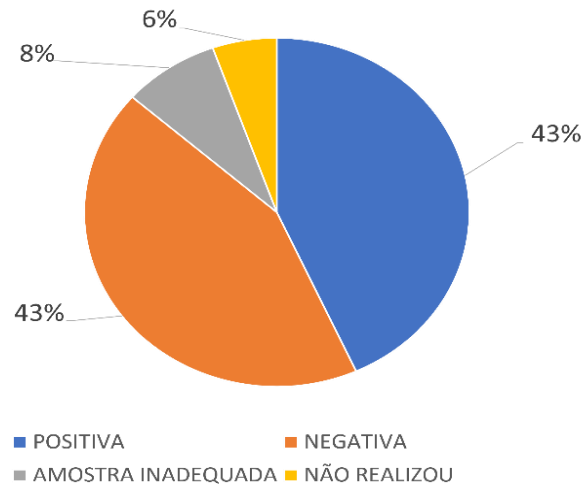


Fonte: elaborado pelo autor.

O diagnóstico clínico para LV foi confirmado pela positividade sorológica para anticorpos anti-rK39, no teste imunocromatográfico, em todos os indivíduos. A pesquisa por

microscopia direta com observação das formas amastigotas de *Leishmania sp.* em esfregaço de aspirado medular, foi positiva em 43% dos indivíduos estudados, demonstrando a baixa sensibilidade dessa técnica (Gráfico 3).

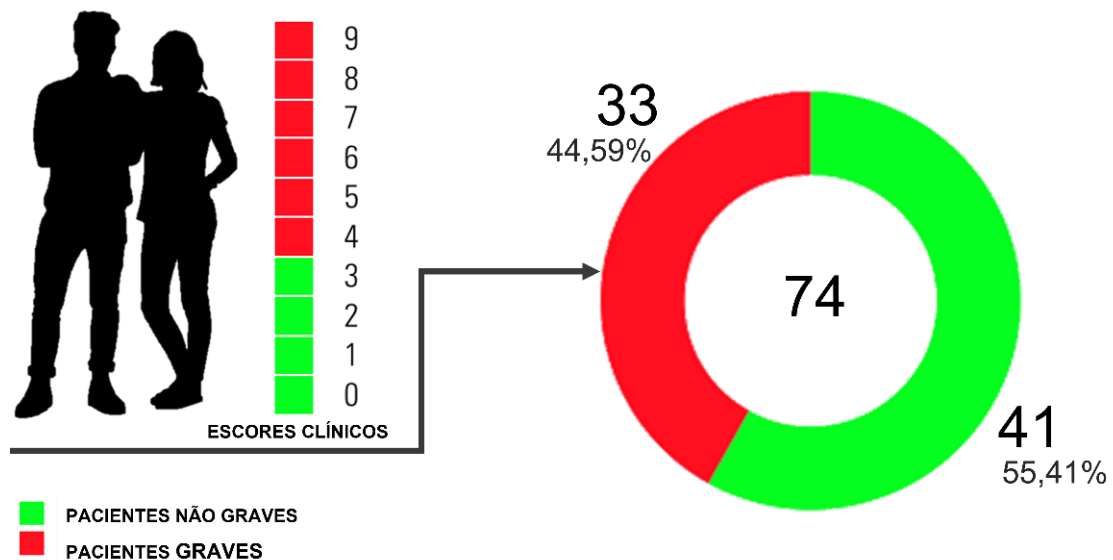
Gráfico 3 Positividade para LV através da pesquisa direta por microscopia



Fonte: elaborado pelo autor

Pela classificação de risco, conforme escores clínicos de prognóstico para LV, 44,59% (33/74) dos indivíduos foram classificados com pior prognóstico (soma dos escores \geq 4). Enquanto, 55,41% (41/74) dos indivíduos foram classificados com melhor prognóstico (soma dos escores $<$ 4). (Figura 23) A coinfeção HIV-LV foi observada em 32 indivíduos, destes 24 foram classificados com pior prognóstico e 8 indivíduos foram classificados com melhor prognóstico (Tabela 7).

Figura 23 Classificação dos indivíduos pelo modelo de escores clínicos do Ministério da Saúde



Fonte: Elaborado pelo autor.

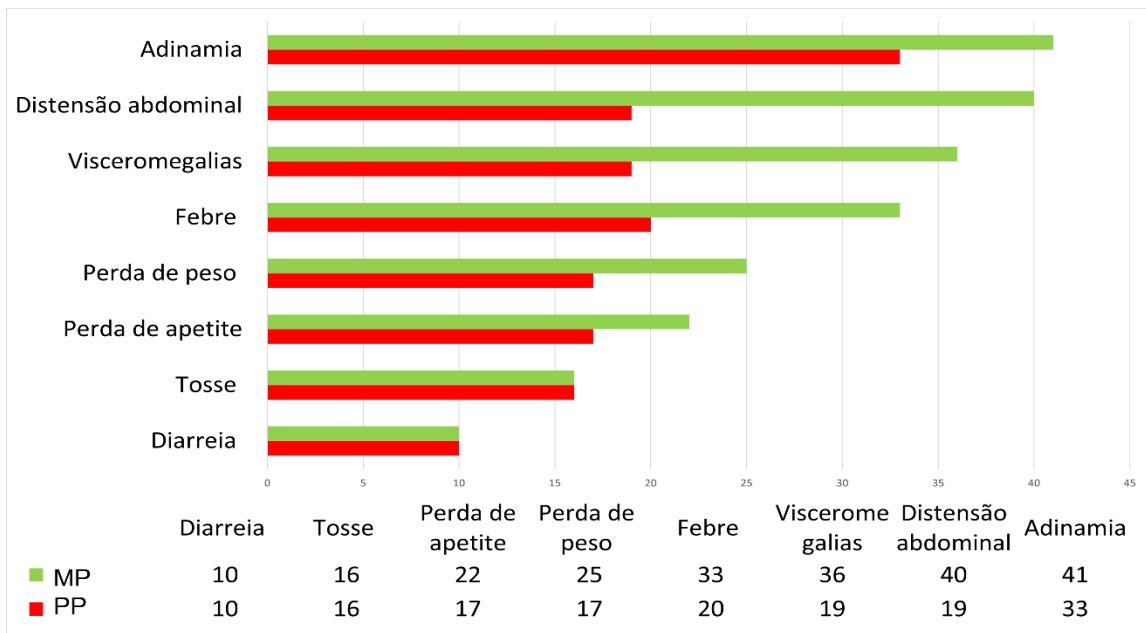
Tabela 8 Classificação dos indivíduos pelo prognóstico da LV

CARACTERÍSTICAS	Indivíduos (n=74)	PROGNÓSTICO DA LV	
		MELHOR (n=41)	PIOR (n=33)
Grupo por Idade			
18 -19	6	6	0
20 - 40	31	24	7
>40	37	11	26
HIV			
Sim	32	8	24
Não	42	33	9
Sangramento			
Sim	14	5	9
Não	60	36	24
Edema			
Sim	24	10	14
Não	50	31	19
Icterícia			
Sim	9	1	8
Não	65	40	25
Infecções bacterianas			
Sim	9	6	3
Não	65	35	30
Dispneia			
Sim	9	2	7
Não	65	39	26

Fonte: elaborado pelo autor.

Os sinais e sintomas, apresentados no momento do atendimento ao profissional de saúde, se distribuíram com uma frequência superior ou igual nos indivíduos com melhor prognóstico em relação aos indivíduos com pior prognóstico, conforme ilustrado no Gráfico 4, sem diferença estatística entre eles (Teste de Chi-quadrado, $P=0,6069$).

Gráfico 4 Distribuição de sinais e sintomas conforme prognóstico da LV



Fonte: Elaborado pelo autor. MP- Melhor prognóstico da LV. PP – Pior prognóstico da LV.

O perfil hematológico dos indivíduos apresentou o padrão característico da doença demonstrado pelo quadro de pancitopenia e anemia (Tabela 9). Os parâmetros hematológicos não diferiram entre indivíduos com LV e indivíduos coinfectados com HIV-LV, bem como, entre os grupos de indivíduos com melhor ou pior prognóstico da LV, não apresentando diferenças estatísticas. Não foi observado diferenças estatísticas entre os grupos de indivíduos classificados com melhor e pior prognóstico da doença.

Tabela 9 Parâmetros hematológicos em indivíduos com LV

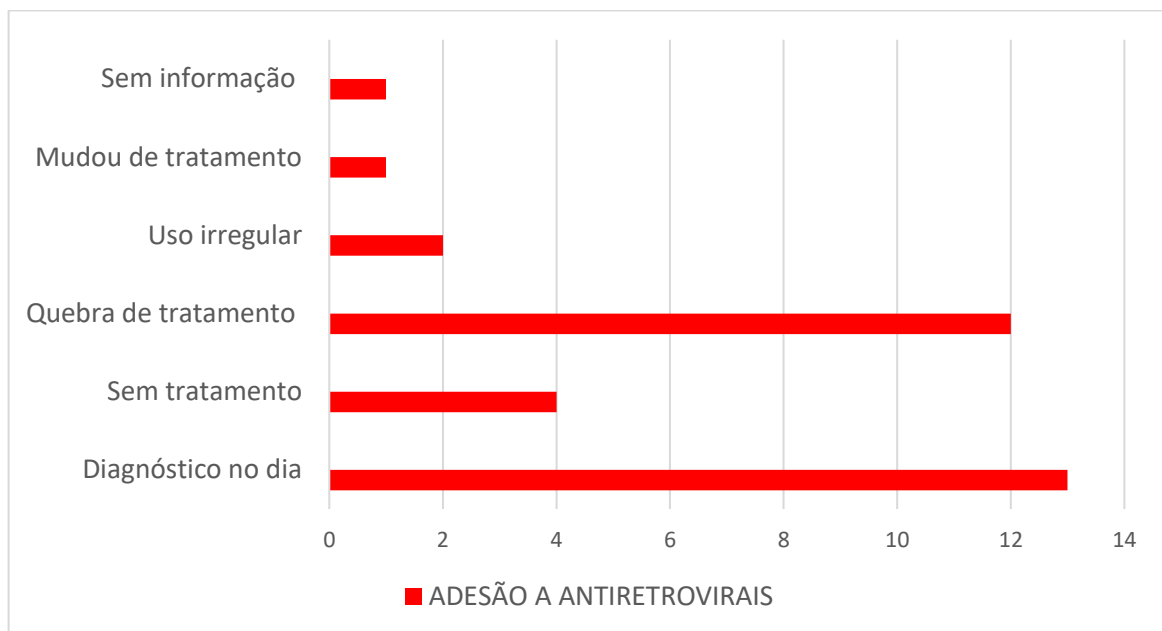
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	MÉDIA	DP
Hemoglobina (g/dL)	9,4	2,65
Hematócrito (%)	29,22	7,29
Leucócitos totais (cels/mm ³)	3430	2719
Neutrófilos (cels/mm ³)	2101	2048
Linfócitos (cels/mm ³)	956,7	761,7
Monócitos (cels/mm ³)	288	251,3
Eosinófilos (cels/mm ³)	4453	95,23
Basófilos (cels/mm ³)	7,44	10,64
Plaquetas (cels/mm ³)	117205	90106

Fonte: Elaborado pelo autor.

Indivíduos com LV coinfectados com HIV estão classificados com pior prognóstico da doença, pela observação do Ministério da Saúde de que a LV pode ocorrer em indivíduos com HIV como doença oportunista, agravando o estado clínico de imunossupressão no HIV. Entretanto, 8 indivíduos que apresentaram a coinfeção HIV-LV foram classificados com melhor prognóstico tinham idade inferior a 40 anos, não pontuaram nas demais variáveis clínicas e diferiram na apresentação de sinais e sintomas clássicos para a doença.

Para melhor entendimento da condição clínica dos indivíduos coinfectados com HIV-LV e o risco de desenvolvimento de quadro graves da doença, foi avaliado, através de prontuário o uso de antirretrovirais no momento da admissão. Os resultados demonstraram que 40,62% (13/32) iniciaram a terapia pelo diagnóstico inicial do HIV e da LV no momento do 1º. atendimento, 37,5% (12/32) não possuem adesão ao tratamento, 9,37% (3/32) estavam sem tratamento e 6,25% (2/32) faziam uso irregular e 3,12% (1/32) mudou a terapia ou não havia registro da informação.

Gráfico 5 Uso de antirretrovirais por indivíduos coinfectados com HIV-LV



Fonte: Elaborado pelo autor.

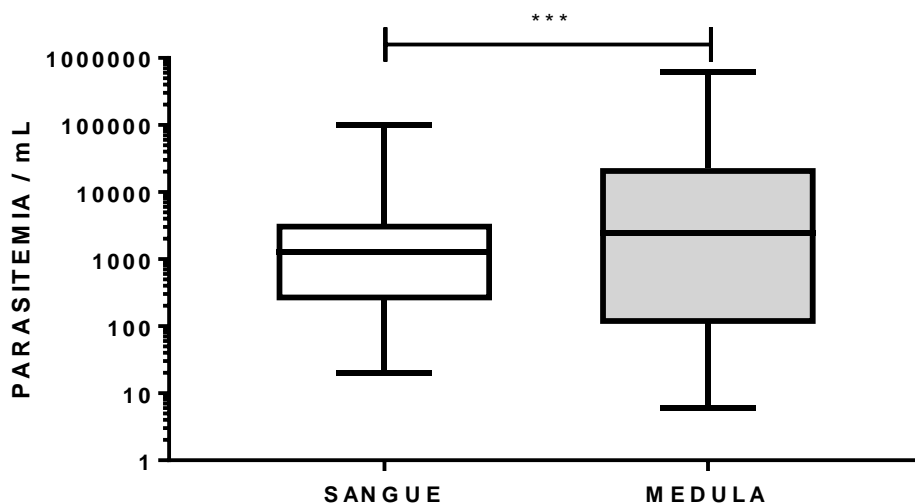
Onze indivíduos apresentaram histórico de recidivas da leishmaniose visceral no momento da admissão hospitalar. A apresentação clínica clássica da LV foi observada em todos. 64% (7/11) apresentaram coinfeção com HIV-LV e 36% (4/11) não apresentaram a coinfeção. Os episódios de recidivas foram mais frequentes em indivíduos coinfectados,

classificados com pior prognóstico da LV, com intervalos menores de 1 ano entre um episódio e outro, mediana de idade de 58 anos (IIQ = 17), baixa adesão a terapia antirretroviral, apresentando insuficiência renal, insuficiência cardíaca, icterícia e hepatite granulomatosa. Indivíduos não coinfetados apresentaram mediana de idade 39 anos (IIQ = 21,75), intervalos maiores entre os episódios de recidivas e classificados com melhor prognóstico para doença.

8.2 Determinação da presença e carga parasitária de *L. infantum* por PCR *real time* (qPCR)

Sessenta e nove indivíduos foram positivos para *L. infantum* e 5 foram considerados negativos. Os indivíduos positivos apresentaram parasitemia, com mediana maior na medula ($4,70 \times 10^4$ *Leishmanias*/mL) em relação ao sangue ($0,29 \times 10^4$ *Leishmanias*/mL), demonstrando o tropismo parasitário pela medula óssea (Gráfico 6). As análises que se seguem da relação da carga parasitária e o desfecho clínico do indivíduo com LV levaram em consideração a carga parasitária na medula devido ao intenso parasitismo.

Gráfico 6 Distribuição da carga parasitária de *L. infantum* no sangue e medula de indivíduos diagnosticados para LV

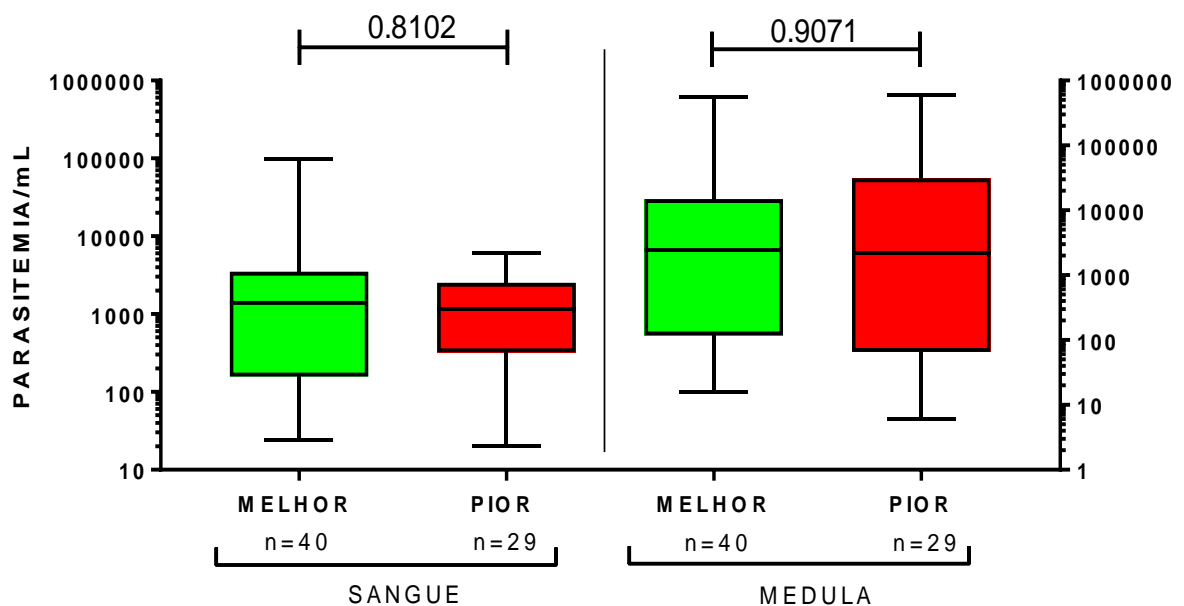


Fonte: Elaborado pelo autor. *** Teste de *Mann Whitney*, $P=0,0003$

8.2.1 Indivíduos positivos para *L. infantum*

Indivíduos classificados pelo prognóstico da LV (Gráfico 7), não apresentam diferença estatística entre a mediana da carga parasitária no melhor e pior prognóstico da doença na medula ($P=0,907$) e no sangue ($P=0,8102$).

Gráfico 7 Distribuição da carga parasitária de *L. infantum* conforme classificação de prognóstico da LV.



Fonte: Elaborado pelo autor. *Teste de *Mann Whitney*. Valores considerados para $P < 0,05$.

Indivíduos coinfectados com HIV-LV não apresentaram diferença estatística entre a mediana da carga parasitária na medula entre indivíduos não coinfectados ($P=0,7301$). As cargas parasitárias, distribuídas segundo a classificação de melhor e pior prognóstico da LV em indivíduos coinfectados ou não com HIV, não apresentaram diferenças estatísticas (Tabela 11).

Tabela 10 Distribuição da carga parasitária de *L. infantum* em indivíduos com LV quanto a presença ou não do HIV.

SÍTIO DE INFECÇÃO (MEDULA) n=69	CARGA PARASITÁRIA <i>Leishmania</i> /mL x 10 ⁴ (IIQ)	PROGNÓSTICO DA LV		
		MELHOR (n=41) <i>Leishmania</i> /mL x 10 ⁴ (IIQ)	PIOR (n=28) <i>Leishmania</i> /mL x 10 ⁴ (IIQ)	P*
HIV-LV (n=27)	5,57 (3,46)	3,89 (5,97)	5,79 (3,81)	0,8425
LV (n= 42)	4,37 (1,90)	3,43 (9,66)	8,22 (1,66)	0,9165

Fonte: Elaborado pelo autor. IIQ – Intervalo Interquartil. *Teste de *Mann Whitney*. Valores considerados para $P < 0,05$.

Os indivíduos com recidivas não apresentaram diferença estatística entre a mediana da carga parasitária na medula, comparados a indivíduos sem recidiva, sugerindo que provavelmente os casos de recidivas não estão relacionados a uma carga parasitária maior (Teste de *Mann Whitney*, $P=0,2331$). Não houve diferença estatística nas cargas parasitárias dos grupos de indivíduos com e sem coinfeção com HIV. (Tabela 12)

Tabela 11 Distribuição da carga parasitária de *L. infantum* em indivíduos com e sem recidivas

SÍTIO DE INFECÇÃO MEDULA (n=69)	CARGA PARASITÁRIA LV(n=42) <i>Leishmania</i> /mL x 10 ⁴ (IIQ)	CARGA PARASITÁRIA HIV-LV (n=27) <i>Leishmania</i> /mL x 10 ⁴ (IIQ)	P*
COM RECIDIVA (n=11)	0,84 (2,34)	9,25 (19,09)	0,2303
SEM RECIDIVA (n=58)	4,63 (1,72)	4,01 (1,12)	0,5894

Fonte: Elaborado pelo autor. IIQ – Intervalo Interquartil. *Teste de *Mann Whitney*. Valores considerados para $P < 0,05$.

8.2.2 Indivíduos negativos para *L. infantum*

Em cinco indivíduos, não houve amplificação de DNA de *L. infantum*. O diagnóstico de leishmaniose visceral dos indivíduos ocorreu na admissão através do exame clínico, no qual apresentaram febre, visceromegalias, adinamia, perda de apetite e perda de peso, não havendo relatos de tosse ou diarreia, não diferindo dos sinais e sintomas clássicos para LV. Os critérios laboratoriais confirmatórios para doença revelaram positividade no teste rápido anti-rK39 para todos, no exame de microscopia direta por esfregaço de aspirado medular, revelou presença de formas amastigotas para *Leishmania sp* por microscopia direta em apenas um dos indivíduos.

Todos os indivíduos apresentavam coinfeção com HIV, sendo que dois destes foram diagnosticados no ato do 1º atendimento. Na classificação pelo modelo de escores de gravidade para LV, três indivíduos foram classificados com pior prognóstico e dois indivíduos foram classificados como melhor prognóstico da LV, pois se encontravam na faixa etária abaixo de 20 anos.

Os indivíduos classificados com pior prognóstico da LV possuíam alta vulnerabilidade social pois se encontravam em situação de rua, fazendo uso de álcool, tabaco e crack, além de relatarem quebra de tratamento do uso antirretrovirais por abandono e não adesão ao tratamento. É importante destacar que em um paciente, classificado com pior prognóstico da doença, foi detectado um quadro de sepse por *Leishmania*, com resultados de biopsia de estômago e duodeno demonstrando a presença de amastigotas sugestivas de *Leishmania sp*. Outro paciente apresentava, no momento da admissão, quadro de tuberculose pulmonar ativa, com expectoração sanguinolenta e resultado de baciloscopia positivo +++ para *M. tuberculosis*. Os dois indivíduos classificados com menor gravidade não necessitaram de internação. Todos os indivíduos fizeram uso do esquema terapêutico preconizado pelo Ministério da Saúde para o tratamento da LV.

8.3 Estudos dos polimorfismos genéticos de *IL6* (-174 G/C) e *TGFβ1* (-509 C/T)

A distribuição da frequência de alelos e genótipos para o gene *IL6* (-174 G/C) rs1800795 dos indivíduos com LV na amostra total estava consistente com o equilíbrio de

Hardy-Weinberg, sendo a frequência do alelo G selvagem (66%) em relação ao alelo C polimórfico (34%) e distribuição dos genótipos GG (51%), GC heterozigoto polimórfico (30%) e CC homozigoto polimórfico (19%).

Quando os genótipos foram distribuídos de acordo com o prognóstico da doença, não foram observadas diferenças significativas entre indivíduos com melhor ou pior prognóstico de LV. O mesmo comportamento foi observado nos grupos de indivíduos com LV coinfectados ou não com HIV. Não foram observadas diferenças estatísticas entre a relação de alelos e genótipos de produção para citocina IL-6 com o prognóstico da LV. (Tabela 13).

Tabela 12 Distribuição dos genótipos *IL6* (-174 G/C) em indivíduos com LV com ou sem coinfeção por HIV

	GENÓTIPO <i>IL6</i> (-174 G/C)	PROGNÓSTICO DA LV EM INDIVÍDUOS TOTAIS				PROGNÓSTICO DA LV EM INDIVÍDUOS SEM HIV				PROGNÓSTICO DA LV EM INDIVÍDUOS COM HIV			
		MELHOR n (%)	PIOR n (%)	P	OR (95% CI)	MELHOR n (%)	PIOR n (%)	P	OR (95% CI)	MELHOR n (%)	PIOR n (%)	P	OR (95% CI)
FREQUÊNCIA DOS ALELOS	G	46 (69)	29 (64)	0,68	Referência 0.92 (0.69 - 1.25)	39 (65)	9 (75)	0,73	Referência 0.92 (0.75 - 1.20)	7 (58)	20 (67)	0,72	Referência 0.77 (0.31 - 2.43)
	C	26 (36)	13 (31)			21 (35)	3 (25)			5 (42)	10 (33)		
FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS	GG	19 (52,8)	10 (47,6)	0,16	Referência 2.14 (0.63 - 7.25)	17 (56,7)	4 (66,7)	0,86	Referência 0.85 (0.08-9.44)	2 (33,3)	6 (40)	0,79	Referência 0.89 (0.11-7.11)
	GC	8 (22,2%)	9 (42,9)			5 (16,7)	1 (16,7)			3 (37)	8 (53,3)		
	CC	9 (25)	2 (9,5)			8 (26,7)	1 (16,7)			1 (16,7)	1 (6,7)		
RECESSIVO	GG	19 (52,8)	10 (47,6)	0,71	Referência 1.23 (0.42 -3.61)	17 (56,7)	4 (66,7)	0,65	Referência 0.65 (0.10-4.14)	2 (33,3)	6 (40)	0,78	Referência 0.75 (0.10-5.47)
	GC/CC	17 (47,2)	11 (52,4)			13 (43,3)	2 (33,3)			4 (66,7)	9 (60)		
DOMINANTE	GG/GC	27 (75)	19 (90,5)	0,14	Referência 0.32 (0.06 - 1.63)	22 (73,3)	5 (83,3)	0,59	Referência 0.55 (0.06-5.46)	5 (83,3)	14 (93,3)	0,50	Referência 0.36 (0.02-6.85)
	CC	9 (25)	2 (9,5)			8 (26,7)	1 (16,7)			1 (16,7)	1 (6,7)		
SOBREDOMINANTE	GG/CC	28 (77,8)	12 (57,1)	0,10	Referência 2.62 (0.82 -8.44)	25 (83,3)	5 (83,3)	1,00	Referência 1.00 (0.10-10.51)	3 (50)	7 (46,7)	0,89	Referência 1.14 (0.17-7.60)
	GC	8 (22,2)	9 (42,9)			5 (16,7)	1 (16,7)			3 (50)	8 (53,3)		

Fonte: Elaborado pelo autor. *Valores considerados para $P < 0,05$ Teste de Chi-quadrado.

Para o gene *TGFβ1* (-509 C/T) rs1982073 a frequência do alelo C selvagem foi de 56% em relação ao alelo T polimórfico de 44%, a distribuição das frequências genotípicas foi para genótipo CT heterozigoto polimórfico de 49% em relação aos genótipos CC homozigoto selvagem (32%) e TT homozigoto polimórfico (19%), o que não apresentou consistência para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

À associação da frequência do alelo C ao prognóstico da LV, não apresentou diferença estatística significativa. A distribuição dos genótipos em relação ao prognóstico da LV demonstrou a frequência de 60,6% do genótipo CT em indivíduos classificados com melhor prognóstico e de 57,1% do genótipo CC em indivíduos classificados com pior prognóstico da doença. Contudo, não foram observadas diferenças estatísticas para ambos os grupos. Não foram observadas diferenças estatísticas em indivíduos com ou sem coinfeção com HIV e o prognóstico da doença. (Tabela 14)

A associação do genótipo CT ao genótipo TT, apresentou diferença estatística entre a frequência dos genótipos e o prognóstico da LV ($P=0,042$). Esta associação genotípica demonstrou diminuição do risco (OR 0,17) no desenvolvimento de formas graves da LV, sugerindo que a maior frequência do alelo T nos indivíduos com melhor prognóstico e não coinfectados com HIV seja fator protetivo na doença. (Tabela 14)

Tabela 13 Distribuição dos genótipos *TGFβ1* (-509 C/T) em indivíduos com LV com ou sem coinfeção por HIV.

	GENÓTIPO <i>TGFβ1</i> (-509 C/T)	PROGNÓSTICO DA LV EM INDIVÍDUOS TOTAIS				PROGNÓSTICO DA LV EM INDIVÍDUOS SEM HIV				PROGNÓSTICO DA LV EM INDIVÍDUOS COM HIV			
		MELHOR n (%)	PIOR n (%)	P	OR (95% CI)	MELHOR n (%)	PIOR n (%)	P	OR (95% CI)	MELHOR n (%)	PIOR n (%)	P	OR (95% CI)
FREQUÊNCIA DOS ALELOS	C	40 (64)	31 (69)	0,19	Referência 0.81 (0.61 - 1.07)	32 (48)	10 (71)	0,14	Referência 0.85 (0.67 - 1.04)	8 (67)	21 (62)	1,00	Referência 1.17 (0.44 - 3.31)
	T	38 (36)	17 (31)			34 (52)	4 (29)			4 (33)	13 (38)		
FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS	CC	9 (23,1)	11 (45,8)	0,17	Referência 0.33 (0.10 - 1.08) 0.41 (0.09 - 1.81)	6 (18.2)	4 (57.1)	0,12	Referência 0.15 (0.02-1.03) 0.21 (0.02-2.48)	3 (50)	7 (41.2)	0,93	Referência 1.50 (0.19-11.93) 1.29 (0.09-17.96)
	CT	22 (56,4)	9 (37,5)			20 (60.6)	2 (28.6)			2 (33.3)	7 (41.2)		
	TT	8 (20,5)	4 (16,7)			7 (21.2)	1 (14.3)			1 (16.7)	3 (17.6)		
RECESSIVO	CC	9 (23.1)	11 (45,8)	0,061	Referência 0.35 (0.12 - 1.06)	6 (18.2)	4 (57.1)	0,04	Referência 0.17 (0.03-0.95)	3 (50)	7 (41.2)	0,71	Referência 1.43 (0.22-9.26)
	CT/TT	30 (76.9)	13 (54,2)			27 (81.8)	3 (42.9)			3 (50)	10 (58.8)		
DOMINANTE	CC/CT	31 (79,5)	20 (83,3)	0,70	Referência 0.78 (0.21 - 2.92)	26 (78.8)	6 (85.7)	0,67	Referência 0.62 (0.06-6.03)	5 (83.3)	14 (82.3)	0,96	Referência 1.07 (0.09-12.83)
	TT	8 (20,5)	4 (16,7)			7 (21.2)	1 (14.3)			1 (16.7)	3 (17.6)		
SOBREDOMINANTE	CC/TT	17 (43,6)	15 (62,5)	0,14	Referência 0.46 (0.16 - 1.31)	13 (39.4)	5 (71.4)	0,12	Referência 0.26 (0.04-1.55)	4 (66.7)	10 (58.8)	0,73	Referência 1.40 (0.20-9.87)
	CT	22 (56,4)	9 (37,5)			20 (60.6)	2 (28.6)			2 (33.3)	7 (41.2)		

Fonte: elaborado pelo autor. *Valores considerados para $P < 0,05$ test *Chi-Square*.

8.3.1 Parasitemia

A presença de genes polimórficos que possam regular positivamente a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias pode ter um possível papel na regulação da carga parasitária em indivíduos com LV. Os indivíduos estudados apresentaram diferenças na carga parasitária na medula conforme a distribuição de genes polimórficos *IL6* (-174 G/C) e *TGFβ1* (-509 C/T)

8.3.1.1 Associação do polimorfismo do Gene *IL6* (-174 G/C) com a carga parasitária

Não foi observado diferença estatística da carga parasitária do alelo C e os genótipos do gene *IL6* (-174 G/C) mesmo quando os indivíduos foram agrupados de acordo com o prognóstico clínico para a doença (Teste de *Kruskal-Wallis*, $P=0,4438$). Nos indivíduos classificados conforme prognóstico da LV, as cargas parasitárias, na medula, não apresentaram diferença estatística quanto a distribuição dos genótipos para a produção da citocina IL-6 (Tabela 15).

Tabela 14 Distribuição dos genótipos para o gene *IL6* (-174 G/C) e a relação com a carga parasitária e prognóstico da LV

SÍTIO DE INFEÇÃO MEDULA (n=62)	CARGA PARASITÁRIA <i>Leishmania</i> /mL x 10 ⁴ (IIQ)	PROGNÓSTICO DA LV		
		MELHOR (n=41) <i>Leishmania</i> /mL x 10 ⁴ (IIQ)	PIOR (n=28) <i>Leishmania</i> /mL x 10 ⁴ (IIQ)	P*
GG (n=29)	2,74 (2,16)	2,74 (1,47)	2,73 (2,90)	0,2110
GC (n=17)	8,50 (9,88)	9,67 (0,82)	7,46 (9,82)	0,3704
CC (n=11)	2,93 (1,21)	0,52 (1,16)	13,75 (27,50)	0,9999

Fonte: Elaborado pelo autor. IIQ – Intervalo Interquartil. *Teste de *Mann Whitney*. Valores considerados para $P<0,05$.

Entretanto, quando os indivíduos com LV coinfectados com HIV foram comparados com os indivíduos sem coinfeção, a frequência do genótipo CC estava associada

a uma maior a carga parasitária na medula ($P=0,0078$). Não foram observadas diferenças estatísticas entre a carga parasitária e os genótipos GG e GC. Não houve relação entre o prognóstico da doença em indivíduos coinfectados e a frequência dos genótipos de produção da citocina IL-6.

Tabela 15 Distribuição dos genótipos para o gene IL6 (-174 G/C) e a relação com a carga parasitária e a coinfeção com HIV

SÍTIO DE INFEÇÃO MEDULA (n=63)	HIV_LV <i>Leishmania</i> /mL x 10 ⁴ (IIQ)	LV <i>Leishmania</i> /mL x 10 ⁴ (IIQ)	P*
GG (n=29)	5,48 (17,05)	1,74 (1,44)	0,4610
GC (n=17)	6,26 (0,94)	9,67 (11,19)	0,8091
CC (n=11)	12,51 (26,39)	0,41 (0,94)	0,0078

Fonte: Elaborado pelo autor. IIQ – Intervalo Interquartil. *Teste de *Mann Whitney*. Valores considerados para $P < 0,05$.

8.3.1.2 Associação do polimorfismo do Gene *TGFβ1* (-509 C/T) com a carga parasitária

Considerando a carga parasitária a distribuição da frequência dos genótipos CC, CT e TT para o gene *TGFβ1* (-509 C/T) demonstrou diferença estatística entre os genótipos CC e TT (Teste de *Mann Whitney*, $P=0,0236$), o que não foi observado para o genótipo CT (Teste de *Mann Whitney*, $P=0,5215$). Entretanto, não foi observado diferença estatística na carga parasitária e os genótipos CT e TT (Teste de *Mann Whitney*, $P=0,0759$). Nos indivíduos classificados conforme o prognóstico da LV, as cargas parasitárias, na medula, não apresentaram diferença estatística quanto a distribuição dos genótipos para a produção da citocina TGF-β (Tabela 17).

Tabela 16 Distribuição dos genótipos para o gene *TGFβ1* (-509 C/T) e a relação com a carga parasitária e prognóstico da LV

SÍTIO DE INFEÇÃO MEDULA (n=63)	CARGA PARASITÁRIA <i>Leishmania</i> /mL x 10 ⁴ (IIQ)	PROGNÓSTICO DA LV		P*
		MELHOR (n=41) <i>Leishmania</i> /mL x 10 ⁴ (IIQ)	PIOR (n=28) <i>Leishmania</i> /mL x 10 ⁴ (IIQ)	
CC (n=20)	7,00 (4,55)	2,93 (3,14)	10,17 (17,05)	0,2610
CT (n=31)	5,76 (4,26)	5,03 (2,91)	7,96 (11,87)	0,6536
TT (n=12)	0,46 (0,36)	0,23 (0,21)	0,91 (2,40)	0,4606

Fonte: Elaborado pelo autor. IIQ – Intervalo Interquartil. *Teste de *Mann Whitney*. Valores considerados para $P < 0,05$.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre a mediana da carga parasitária e os genótipos CC, CT e TT, e indivíduos com e sem coinfeção com HIV. Não houve relação entre o prognóstico da doença em indivíduos coinfectados e a frequência dos genótipos de produção da citocina TGF- β .

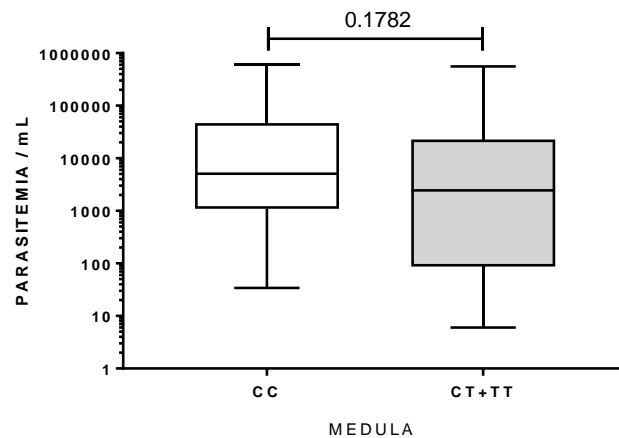
Tabela 17 Distribuição dos genótipos para o gene *TGF β 1* (-509 C/T) e a relação com a carga parasitária e a coinfeção com HIV

SÍTIO DE INFEÇÃO MEDULA (n=63)	HIV_LV <i>Leishmania/mL x 10⁴</i> (IIQ)	LV <i>Leishmania/mL x 10⁴</i> (IIQ)	P*
CC (n=20)	6,86 (17,92)	7,13 (3,66)	0,5288
CT (n=31)	8,06 (11,87)	4,82 (2,93)	0,7164
TT (n=12)	0,88 (2,44)	0,25 (0,21)	0,9999

Fonte: Elaborado pelo autor. IIQ – Intervalo Interquartil. *Teste de *Mann Whitney*. Valores considerados para $P < 0,05$.

Mesmo que a substituição do alelo C pelo alelo T para produção de TGF- β , possa favorecer o aumento da carga parasitária maior na medula, a associação dos genótipos CT (heterozigoto polimórfico) + TT (homozigoto polimórfico) não apresentou diferença estatística em relação ao genótipo CC (homozigoto selvagem) (Gráfico 7). Associado ao genótipo CT+TT a carga parasitária na medula apresentou mediana \pm DP de $4,28 \times 10^4 \pm 11,40 \times 10^4$ *Leishmanias/mL*. Associado ao genótipo CC a carga parasitária apresentou $7 \times 10^4 \pm 14,92 \times 10^4$ *Leishmanias/mL* na medula.

Gráfico 8 Distribuição da carga parasitária em relação a associação dos genótipos CT+TT em relação ao genótipo CC.



Fonte: Elaborado pelo autor. Valores considerados para $P < 0,05$. *Teste de Mann Whitney*.

9 DISCUSSÃO

Desde o estabelecimento da LV como problema de Saúde Pública no Brasil em 1934 até os dias atuais, a doença tem passado por mudanças na sua disseminação pelo território ocasionado por grandes processos migratórios decorrentes de fenômenos climáticos (NETO, 2014), adaptações biológicas e evolutivas ligados ao vetor e parasito (DOS REIS et al., 2017) com diminuição expressiva na incidência da doença em áreas rurais (DA SILVA SANTANA CRUZ et al., 2021; HARHAY et al., 2011; LIMA et al., 2017). (DA SILVA SANTANA CRUZ et al., 2021)

Em nosso estudo foi observado a ocorrência da urbanização da LV, com 82,4% dos participantes provenientes de grandes centros urbanos de municípios cearenses, não diferindo dos resultados encontrados em estudos realizados sobre as mudanças na epidemiologia da LV em regiões do Brasil (DA SILVA SANTANA CRUZ et al., 2021; DOS REIS et al., 2017; LIMA et al., 2018), no Estado de Alagoas (BRAZ et al., 2021), em Feira de Santa – Bahia (ANTUNES DA SILVA MAIA et al., 2018) e em Fortaleza – Ceará (RODRIGUES et al., 2017), que demonstraram o caráter cosmopolita da doença, ocasionado pela ação antrópica que pressiona os espaços no território, promovendo alterações microbiológicas no ambiente, com consequências genéticas importantes no ecossistema (REGINA et al., 2021).

Com a urbanização da LV o domicílio torna-se o principal local de risco de infecção, colocando homens e mulheres expostos igualmente em todas as faixas etárias (LIMA et al., 2017). Percebemos que há uma maior incidência da doença na população de adultos

jovens com idade entre 20 e 59 anos, sugerindo que o processo biológico do envelhecimento tenha papel fundamental na susceptibilidade e adoecimento na LV. Como tem sido observado por CAVALCANTE; VALE, (2014) no Ceará, conforme a incidência da LV avança entre os grupos de idade, maior a letalidade nos grupos de idosos e longevos.

A predominância de indivíduos do sexo masculino (86%) contrapondo-se ao número menos expressivo do sexo feminino (14%), é sugestivo de que a resposta hormonal exerça influência no estabelecimento da LV, com papel protetivo do estrogênio na mulher. Estudos em modelo animal tem estabelecido o papel dos hormônios sexuais na susceptibilidade para LV, em que machos são mais susceptíveis, apresentam uma maior carga parasitária e severidade da doença do que fêmeas. (RODRIGUEZ et al., 2018; TRAVI et al., 2002), enquanto no estudo com fêmeas de camundongo por LEZAMA-DÁVILA et al., (2007), a relação entre o estrogênio e o aumento da atividade leishmanicida em macrófagos foi observado. O que podemos inferir na associação direta do papel de hormônios sexuais masculinos na regulação do sistema imune do hospedeiro, atração de fêmeas de flebotomíneos e permissividade da infecção pelo parasito.

A LV segue mantendo uma apresentação clínica clássica no paciente, descrita na literatura ao longo dos anos, apresentando adinamia, distensão abdominal, visceromegalias, febre, perda de peso, perda de apetite, tosse e diarreia, associado a busca tardia por atendimento médico (ALVAR et al., 2019; CHAKRAVARTY et al., 2018; OLIVEIRA-SENA; WERNECK, 2020; SAPORITO et al., 2013; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012b; ZIJLSTRA, 2016), não diferindo na apresentação clínica dos indivíduos em nosso estudo,

A anemia, leucopenia e trombocitopenia são alterações hematológicas comuns observadas na LV (BOSSOLASCO et al., 2004; DIAMANTIDIS et al., 2020; RESHMA et al., 2021; VARMA; NASEEM, 2010), não diferindo do perfil hematológico apresentado nos indivíduos estudados. Apesar de comum, a pancitopenia severa tem causas multifatoriais associadas ao hiperesplenismo, hemofagocitose, inflamação crônica, depressão medular promovida pelo aumento da carga parasitária e fatores relacionados a nutrição (VARMA; NASEEM, 2010).

O Ministério da Saúde preconiza o uso de teste rápido anti-rK39 (Nota técnica nº45/UVR/CGDT/DEVEP/SVS/MS), imunofluorescência direta e parasitológico (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2019) no diagnóstico da LV. No

geral o teste rápido anti-rK39 foi sensível na identificação da LV ativa em 100% dos indivíduos, enquanto no teste parasitológico por microscopia direta, a positividade alcançou 43%, apresentando menor sensibilidade, que pode ser atribuída pelo tipo de material biológico, elaboração do esfregaço e baixa carga parasitária (THAKUR; JOSHI; KAUR, 2020).

Diagnosticar e tratar a LV com maior eficiência e reduzir as altas taxas de letalidade da doença no Brasil, são ações previstas no Plano de Vigilância e Controle das leishmanioses nas Américas (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017). Desde então, o Ministério da Saúde tem adotado o modelo de prognóstico por escores clínicos e laboratoriais no manejo clínico da LV (BRASIL, 2011). O que nos permitiu a classificação de 33 indivíduos com pior prognóstico e 41 indivíduos classificados melhor prognóstico, a partir de variáveis de risco associado ao óbito pela LV.

Dentro da coinfeção com HIV na LV, a associação a gravidade da LV é associada pelo quadro de dupla imunossupressão (ALVAR et al., 2008; DONATO et al., 2020; DOS REIS et al., 2017; OLIVEIRA-SENA; WERNECK, 2020; ZIJLSTRA, 2016). O Ministério da Saúde considera a LV como doença oportunista para o HIV, o que conseqüentemente afeta na pontuação da variável no modelo de escores e classificação do paciente com pior prognóstico. Não diferindo de outros modelos escores onde a presença do HIV é fator de gravidade no paciente com LV (BELO et al., 2014; COURA-VITAL et al., 2014) Do total de indivíduos com HIV em nosso estudo, 75% foram classificados com pior prognóstico da doença apenas por serem HIV, mas não necessariamente com apresentação clínica da AIDS.

A baixa adesão ao ART, com quebra ou ausência de tratamento, observados nos indivíduos do nosso no momento da admissão hospitalar, pode contribuir para o estabelecimento da AIDS e piora clínica do paciente. Porém, não é claro a relação do uso do ART ao quadro clínico da LV de menor gravidade na literatura. É possível inferir que a adesão ao ART e seu uso regular, evitem quadros clínicos de maior gravidade, redução da mortalidade, com restabelecimento das populações de linfócitos T CD4+ e diminuição dos episódios de recidivas (JARVIS; LOCKWOOD, 2013; LIMA et al., 2013; LINDOSO et al., 2018), permitindo que possam responder clinicamente semelhantes aos pacientes com LV sem coinfeção.

Os episódios de recidivas em nosso estudo, foram observados com maior frequência em indivíduos coinfectados com HIV, do que indivíduos não coinfectados, não diferindo do apresentado na literatura (ALVAR et al., 2008; DIRO et al., 2014; KUSCHNIR et al., 2021;

SIMÃO; VICTÓRIA; FORTALEZA, 2020). A persistência do parasito nesses indivíduos pode ter relação a deficiência na reconstituição dos níveis de linfócitos T CD4⁺, mudança na classe de IgG para altos níveis de IgG3 associado ao aumento da citocina IL-6 (ALVAR et al., 2008; KUSCHNIR et al., 2021), permitindo a evasão para novos nichos imunoprivilegiados de sobrevivência em células tronco mesenquimais de fenótipo CD271⁺(LOPES et al., 2016).

Devido ao comprometimento medular na LV e a disseminação sistêmica do parasito no indivíduo, optamos pela quantificação do parasito na medula e sangue, correlacionando com a classificação dos indivíduos com melhor e pior prognóstico para a doença. Observamos o maior número de parasitos na medula do que no sangue, não diferindo de estudos que avaliaram a carga parasitária para ambos os sítios de infecção. (ANTINORI et al., 2007; BOSSOLASCO et al., 2004; LE RUTTE et al., 2020; MARY et al., 2004; TADESSE et al., 2021; ZACARIAS et al., 2017a) O tropismo parasitário pela medula está diretamente ligado ao estado clínico de imunossupressão regulado pelo ambiente de citocinas inflamatórias (IL-10 e TGF-β) produzidas por linfócitos Tregs de fenótipo CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ que favorecem o crescimento do parasito e diminuição de células T efectoras (BHATTACHARYA et al., 2016; KUMAR et al., 2018a).

Considerando o prognóstico clínico do indivíduo com LV, não observamos nos 69 indivíduos avaliados a relação entre a carga parasitária com o melhor ou pior prognóstico. Porém, em estudo de coorte com 625 indivíduos com LV no Brasil, onde foi comparado a carga parasitária por qPCR no sangue e medula, e a relação com a gravidade da doença, demonstrou que a carga parasitária é maior na medula com relação direta a gravidade da doença e associação a sintomas e complicações clínicas graves, quadro de septicemia, pneumonia, icterícia, anemia, leucopenia e trombocitopenia, e a um maior risco de morte. A carga parasitária no sangue pode ser relacionada ao monitoramento de cura ou recidiva (ZACARIAS et al., 2017).

No estudo de Zacarias *et al.*, (2017) foi demonstrado que a carga parasitária em indivíduos com LV coinfectados com HIV possuem uma contagem de parasitos no sangue de até três vezes maior do que indivíduos não coinfectados, o que não foi possível observar em nosso estudo devido a divisão do total amostral em diversas categorias, impedindo uma análise estatística de melhor relevância. O número de parasitos na medula seria órgão específico, refletindo na carga parasitária em todo o corpo. O que não observamos em relação ao nosso estudo quando segmentamos em grupos cada vez menores de análise.

A relação de sinais e sintomas clínicos para LV, positividade no teste anti-rK39, presença de formas amastigotas de *Leishmania* por exame parasitológico e admissão hospitalar por sepse por *Leishmania*, foi uma realidade em 5 indivíduos negativos para pesquisa de DNA de *L. infantum* por PCR-real time. Em estudo realizado por MARUYAMA et al., (2019) foi demonstrado uma nova espécie de parasito *responsável* por casos fatais de leishmaniose visceral no Estado de Sergipe, o que não descarta uma possível disseminação deste parasito para outros Estados da região Nordeste. Porém, a hipótese que justifique a não positividade no teste, seja uma possível migração da *Leishmania* para mucosa do trato gastrointestinal, que possibilita a multiplicação silenciosa, intenso parasitismo em macrófagos e episódios de recidivas (CIARLINI, 2018).

O uso da técnica de RT-PCR na identificação de indivíduos com LV ativa é promissor, visto que a sensibilidade da técnica é superior a todos os testes de diagnóstico convencional em indivíduos coinfectados ou não com HIV. Em geral, a baixa carga parasitária no sangue em relação a medula é comumente aceita, sendo possível identificar quantidades do parasito suficientes como indicador de LV ativa, podendo assim, ser utilizada no monitoramento de cura e de episódios de recidivas, haja visto, que níveis do parasito no sangue desaparecem após o tratamento e níveis muito baixos do parasito em indivíduos coinfectados com HIV é indicativo de recidiva (ANTINORI et al., 2007; ZACARIAS et al., 2017b).

A progressão da LV envolve aspectos multifatoriais incluindo mudanças genéticas na produção de citocinas que regulam a interação parasito-hospedeiro. Entre as estratégias de avaliação nas mudanças genética, avaliamos os genes *IL6* (-174 G/C) e *TGFβ1* (-509 C/T) responsáveis pela modulação dos níveis das citocinas IL-6 e TGF-β responsáveis pela modulação entre a resposta imune efetora e de susceptibilidade. A população estudada foi composta de indivíduos pertencentes ao Estado do Ceará, cuja distribuição dos alelos para os genes estudados não apresentaram associação com a carga parasitária e prognóstico da LV.

A frequência dos alelos G (selvagem) e C (polimórfico), para o gene *IL6* (-174 G/C) foi de 66% e 34% respectivamente, não diferindo do comportamento de distribuição semelhante nos estudos com a população brasileira, que demonstraram a frequência predominante do alelo ancestral (G) variando entre 64% - 84%, em relação ao alelo polimórfico (C) variando entre 11% - 30% (BARBOZA et al., 2021; BRAGA et al., 2014; CAMPOS et al., 2019; CASTELLUCCI et al., 2006; GABRIELA TEIXEIRA et al., 2014; PORTO et al., 2014). A frequência dos genótipos GG (51%), GC (30%) e CC (19%) possuem distribuição semelhante na população brasileira conforme estudos citados anteriormente.

Observamos a associação do genótipo CC para o gene *IL6* (-174 G/C) em indivíduos coinfectados HIV a uma maior carga parasitária em relação a indivíduos não coinfectados. A presença do alelo C está associado ao risco de pior prognóstico e consequente a AIDS IL-6 (LOUREIRO DOS REIS et al., 2020), o que pode sugerir que indivíduos com genótipo CC tenha associação a regulação positiva na produção da IL-6 e seus níveis séricos, favorecendo a replicação viral em linfócitos T CD4 e monócitos causando uma imunossupressão permissiva para a multiplicação do parasito na medula e a retroalimentação de citocinas regulatórias e inflamatória, e consequentemente a um pior prognóstico na LV. (BHOR; RAFATI; PAI, 2021) A não associação direta do gene *IL6* (-174 G/C) com a LV, não descarta que outras regiões polimórficas funcionais como as variantes -572 G/C, -597 G/A e -373AnTn, possam estar envolvidas na associação com aumento da carga parasitária, susceptibilidade e gravidade da doença (CHRISTIANSEN et al., 2004; TERRY; LOUKACI; GREEN, 2000).

Para o gene *TGFβ1* (-509 C/T) a frequência dos alelos C (selvagem) e T (polimórfico) foi de 56% e 44% respectivamente, não diferindo no comportamento de distribuição em estudos com a população Brasileira onde o alelo T possui predominância (variação de 56% - 71%) em relação ao alelo C (variação de 28% - 46%) (DE BRITO et al., 2020; DO CARMO, 2016; FERREIRA et al., 2018; SHEHADEH et al., 2019).

A presença do alelo T, na associação dos genótipos CT+TT em relação ao genótipo CC confere proteção em indivíduos classificados com menor gravidade na LV não coinfectados com HIV de 0,17 de desenvolver formas graves da doença e consequentemente morte. O que pode sugerir que a presença do alelo T nesta população e associação genotípica favoreça o recrutamento da API e consequentemente a regulação da atividade da luciferase, responsável pelo aumento dos níveis séricos de TGF-β (MARTELOSSI CEBINELLI et al., 2016).

Contudo, no estudo de BHATTACHARYA et al., (2016) em indivíduos com LV na Índia, altos níveis de TGF-β estavam associado ao aumento da carga parasitária e população de Treg com fenótipo CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ na medula, sugerindo que o tropismo parasitário na medula desencadeia um desfecho na LV de origem multifatorial encobrendo o efeito da associação do gene polimórfico, necessitando de novos estudos que estabeleçam uma melhor correlação entre a frequência do alelo T ao aumento de Tregs na medula, associado a níveis de TGF-β, a carga parasitária e gravidade da LV, fator limitante em nosso estudo.

10 CONCLUSÃO

- A carga parasitária é maior na medula do que no sangue;
- A carga parasitária na medula não possui associação ao melhor ou pior prognóstico clínico da LV.
- Indivíduos com LV e coinfectados com HIV não apresentam diferença na carga parasitária na medula associada ao melhor ou pior prognóstico da doença e aos episódios de recidivas.
- A distribuição da frequência de alelos e genótipos para o gene *IL6* (-174 G/C) foi de 66% para o alelo G selvagem e de 51% para o genótipo GG homozigoto selvagem;
- O gene *IL6* (-174 G/C) possui associação a uma maior carga parasitária na medula de indivíduos com genótipo CC coinfectados com HIV
- A distribuição da frequência de alelos e genótipos para o gene *TGFβ1* (-579 C/T) foi de 56% para o alelo C selvagem e de 49% para o genótipo CT homozigoto polimórfico;
- A presença do alelo T para o gene *TGFβ1* (-579 C/T) nos indivíduos não coinfectados com HIV e classificados com melhor prognóstico da LV indicando um fator protetivo.
- Não houve associação entre a carga parasitária na medula com a distribuição dos genótipos dos genes *IL6* (-174 G/C) e *TGFβ1* (-579 C/T) ao melhor ou pior prognóstico da LV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADI, A. et al. Evaluation of interleukin 8 +2767 A/T polymorphism in visceral leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 11, p. 1075–1077, 2016.
- AKHOUNDI, M. et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 57, p. 1–29, 2017.
- ALVAR, J. et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 334–359, 2008.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 35671, 2012.
- ALVAR, J. et al. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. [s.l.] Organización Panamericana de la Salud, 2019.
- ANTINORI, S. et al. Clinical Use of Polymerase Chain Reaction Performed on Peripheral Blood and Bone Marrow Samples for the Diagnosis and Monitoring of Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected and HIV-Uninfected Patients: A Single-Center, 8-Year Experience in Italy and Review of the Literature. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 12, p. 1602–1610, 15 jun. 2007.
- ANTINORI, S. et al. Leishmaniasis among organ transplant recipients. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, mar. 2008.
- ANTUNES DA SILVA MAIA, H. A. et al. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL EM FEIRA DE SANTANA, BAHIA, NO PERÍODO DE 2001 A 2015. **Revista de Saúde Coletiva da UEFS**, v. 8, n. 1, p. 70–74, 18 jul. 2018.
- ARAUJO SOARES, M. R. et al. Occurrence of *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva 1912 and *Cerdocyon thous* Linnaeus 1977, in a visceral leishmaniasis endemic area in Brazil. **Acta Tropica**, v. 174, p. 118–121, out. 2017.
- ARGY, N. et al. Congenital Leishmaniasis in a Newborn Infant Whose Mother was Coinfected With Leishmaniasis and HIV. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 9, n. 2, p. 277–280, 30 abr. 2020.
- BARBOZA, M. M. DE O. et al. Contribution of genetic polymorphisms of interleukins IL1B-511 C/T, IL1RN VNTR, IL6-174 G/C, and IL8-251 A/T in gastric lesions: gender and *Helicobacter pylori* genes matter. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 6, p. 3467–3472, 26 ago. 2021.
- BASSET, D. et al. Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 13, out. 2005.
- BATLLE, E.; MASSAGUÉ, J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 924–940, 2019.
- BELO, V. S. et al. **Risk Factors for Adverse Prognosis and Death in American Visceral Leishmaniasis: A Meta-analysis**. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2014. Disponível em: <www.plosntds.org>
- BENCHIMOL, J. L. et al. Leishmaniasis: Historical configuration in Brazil with an emphasis on the visceral disease, from the 1930s to the 1960s. **Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi: Ciências Humanas**, v. 14, n. 2, p. 611–626, 26 ago. 2019.

- BHARATI, K. Human genetic polymorphism and Leishmaniasis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 98, n. January, p. 105203, 2022.
- BHATTACHARYA, P. et al. Induction of IL-10 and TGF β from CD4+CD25+FoxP3+ T Cells Correlates with Parasite Load in Indian Kala-azar Patients Infected with *Leishmania donovani*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, 2016.
- BHOR, R.; RAFATI, S.; PAI, K. Cytokine saga in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 147, n. May, p. 155322, 2021.
- BOSSOLASCO, S. et al. Real-Time PCR Assay for Clinical Management of Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1858–1858, abr. 2004.
- BRAGA, M. P. et al. Association between interleukin-6 polymorphism in the –174 G/C region and hearing loss in the elderly with a history of occupational noise exposure. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 80, n. 5, p. 373–378, 2014.
- BRASIL, M. DA S. S. DE V. EM S. D. DE V. E. **Leishmaniose Visceral - Recomendações clínicas para redução da letalidade**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=document&layout=default&alias=1464-leishmaniose-visceral-recomendacoes-clinicas-para-reducao-da-letalidade-4&category_slug=leishmanioses-978&Itemid=965>.
- BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Guia de Vigilância em Saúde**. 3a. edição ed. Brasília: [s.n.]. v. 10
- BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Epidemiological Report – Neglected tropical diseases**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/3/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf>.
- BRAZ, B. M. DE A. et al. Demographic and spatial study of visceral leishmaniasis in the state of Alagoas, Brazil, during 2007-2018. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, n. 06102020, p. 2021, 2021.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.
- CABEZAS, Y. et al. **Leishmania cell wall as a potent target for antiparasitic drugs. A focus on the glycoconjugates**. **Organic and Biomolecular Chemistry** Royal Society of Chemistry, , 21 ago. 2015.
- CAMACHO, E. et al. Leishmania Mitochondrial Genomes: Maxicircle Structure and Heterogeneity of Minicircles. **Genes**, v. 10, n. 10, p. 758, 26 set. 2019.
- CAMPELO, C. M. et al. Modulation in the expression of type 1 (CR1/CD35) and type 3 (CR3/CD11b) complement receptors on leukocytes from patients with Visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 218, 1 nov. 2020.
- CAMPOS, L. P. et al. Research Article Polymorphisms rs1800795 of interleukin-6 and rs2228145 of interleukin-6 receptor genes in Euro-Brazilians with adult-onset type 1 diabetes mellitus. **Genetics and Molecular Research**, v. 18, n. 3, p. 1–10, 2019.
- CASARIL, A. E. et al. Macrogeographic genetic structure of *Lutzomyia longipalpis* complex populations using Next Generation Sequencing. 2019.

CASTELLUCCI, L. et al. *IL6* -174 G/C Promoter Polymorphism Influences Susceptibility to Mucosal but Not Localized Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 4, p. 519–527, 15 ago. 2006.

CAVALCANTE, Í. J. M.; VALE, M. R. Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Ceará in the period 2007 to 2011. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, n. 4, p. 911–924, dez. 2014.

CEARÁ; SECRETARIA DA SAÚDE DO CEARÁ. **Leishmaniose visceral Proterapêutica: programa de atualização em terapêutica: ciclo 9: volume 2**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.saude.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/9/2018/06/BOLETIM_LV_2021_FINAL_KKC.pdf>.

CHAGAS, E. et al. Leishmaniose Visceral Americana (Nova entidade morbida do homem na America do Sul): relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 32, n. 3, p. 321–389, 1937.

CHAKRAVARTY, J. et al. Determinants for progression from asymptomatic infection to symptomatic visceral leishmaniasis: A cohort study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, 1 mar. 2018.

CHEN, R. F. et al. Combination of CTLA-4 and TGFβ1 gene polymorphisms associated with dengue hemorrhagic fever and virus load in a dengue-2 outbreak. **Clinical Immunology**, v. 131, n. 3, p. 404–409, jun. 2009.

CHRISTIANSEN, L. et al. Modest implication of interleukin-6 promoter polymorphisms in longevity. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, n. 5, p. 391–395, 2004.

CIARLINI, N. D. S. C. **PARASITISMO DUODENAL DE LEISHMANIA SPP. EM PACIENTES COM COINFEÇÃO HIV/LEISHMANIA**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, 2018.

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

COURA-VITAL, W. et al. Prognostic Factors and Scoring System for Death from Visceral Leishmaniasis: An Historical Cohort Study in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. e3374, 11 dez. 2014.

CRUZ, I. et al. Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. **Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1124–1125, 2002.

CUNHA FIEVEZ, A. M. DA et al. Lower levels of leptin are associated with severity parameters in visceral leishmaniasis patients. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. 1–15, 2019.

DA MATTA, V. L. R. et al. **Detection of Specific Antibody Isotypes and Subtypes Before and After Treatment of American Visceral Leishmaniasis** *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. [s.l.: s.n.].

DA SILVA, S. M. et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 1–2, p. 150–154, 2010.

DA SILVA SANTANA CRUZ, C. et al. Factors associated with human visceral leishmaniasis cases during urban epidemics in Brazil: a systematic review. **Parasitology**, v. 148, n. 6, p. 639–647, 12 maio 2021.

- DE BRITO, W. B. et al. The TGFB1 -509C/T polymorphism and elevated TGF- β 1 levels are associated with chronic hepatitis C and cirrhosis. **Immunobiology**, v. 225, n. 5, 2020.
- DE FREITAS, E. O. et al. The Contribution of Immune Evasive Mechanisms to Parasite Persistence in Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 153, 22 abr. 2016.
- DE FREITAS E SILVA, R.; VON STEBUT, E. Unraveling the Role of Immune Checkpoints in Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 11 mar. 2021.
- DE SOUZA, N. A. et al. The current status of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species complex. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 112, n. 3, p. 161–174, 2017.
- DECOTE-RICARDO, D. et al. *Leishmania infantum* Virulence Factor A2 Protein: Linear B-Cell Epitope Mapping and Identification of Three Main Linear B-Cell Epitopes in Vaccinated and Naturally Infected Dogs. **Immunol**, v. 9, p. 1690, 2018.
- DERYNCK, R.; BUDI, E. H. Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling. **Science Signaling**, v. 12, n. 570, 2019.
- DEY, A.; SINGH, S. TRANSFUSION TRANSMITTED LEISHMANIASIS: A CASE REPORT AND REVIEW OF LITERATURE. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, n. 3, jul. 2006.
- DIAMANTIDIS, M. D. et al. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis as a Manifestation of Underlying Visceral Leishmaniasis. **Cureus**, 5 dez. 2020.
- DIRO, E. et al. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in East Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. e2869, 26 jun. 2014.
- DO CARMO, A. P. S. **Estudo da influência dos polimorfismos genéticos das citocinas IL-8, IL- 17 e TGF beta e dos receptores DC-SIGN e CTLA-4 na susceptibilidade à infecção por Dengue.** [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2016.
- DONATO, L. E. et al. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical Visceral leishmaniasis lethality in Brazil: an exploratory analysis of associated demographic and socioeconomic factors. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, p. 2020, 2020.
- DORNELLES SOUZA, G. et al. **The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil** **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**. [s.l: s.n.].
- DOS REIS, L. L. et al. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 638–645, 1 set. 2017.
- DOS SANTOS, P. L. et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2016.
- FALEIRO, R. J. et al. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2914, 10 jul. 2014.
- FERNÁNDEZ-REAL, J.-M. et al. Interleukin-6 Gene Polymorphism and Lipid Abnormalities in Healthy Subjects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 3, p. 1334–1339, mar. 2000.
- FERREIRA, E. DE C. et al. Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, 2015.

- FERREIRA, R. R. et al. TGF- β polymorphisms are a risk factor for Chagas disease. **Disease Markers**, v. 2018, p. 1–10, 2018.
- FISHMAN, D. et al. **Interleukin-6 Polymorphisms and Systemic-Onset Juvenile Chronic Arthritis The Effect of Novel Polymorphisms in the Interleukin-6 (IL-6) Gene on IL-6 Transcription and Plasma IL-6 Levels, and an Association with Systemic-Onset Juvenile Chronic Arthritis**. **J. Clin. Invest.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.jci.org>>.
- FOODBORNE, D. E. et al. **Chagas disease Echinococcosis Foodborne trematodiasis Human African trypanosomiasis Leishmaniasis Leprosy Rabies Yaws Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals A sustainability framework for action against neglected tropical diseases** . [s.l.] world health organization, 2021.
- FRADE, A. F. et al. TGFB1 and IL8 gene polymorphisms and susceptibility to visceral leishmaniasis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 912–916, 2011.
- GABRIELA TEIXEIRA, F. et al. Interleukin-6 c.-174G>C Polymorphism and Periodontitis in a Brazilian Population. **Molecular Biology International**, v. 2014, p. 1–8, 4 dez. 2014.
- GANTT, K. R. et al. Activation of TGF- β by *Leishmania chagasi* : Importance for Parasite Survival in Macrophages . **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 5, p. 2613–2620, 2003.
- GAUTAM, S. et al. CD8 T Cell Exhaustion in Human Visceral Leishmaniasis. 2013.
- GIDWANI, K. et al. Persistence of *Leishmania donovani* Antibodies in Past Visceral Leishmaniasis Cases in India. **CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY**, v. 18, n. 2, p. 346–348, 2011.
- GOMES, C. B. et al. Increasing in cysteine proteinase B expression and enzymatic activity during in vitro differentiation of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: First evidence of modulation during morphological transition. **Biochimie**, v. 133, n. January, p. 28–36, fev. 2017.
- GURUNG, P.; KANNEGANTI, T.-D. Innate immunity against *Leishmania* infections. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 1286–1294, 1 set. 2015.
- HAIJLOOI, M. et al. Is the IL-10 –819 Polymorphism Associated with Visceral Leishmaniasis? **Inflammation**, v. 36, n. 6, p. 1513–1518, 4 dez. 2013.
- HAMIDI, M.; HAIJLOOEI, M.; BAZMANI, A. Association of transforming growth factor- β 1 gene polymorphism with visceral leishmaniasis in an iranian population. **Shiraz E Medical Journal**, v. 14, n. 2, 2013.
- HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403–409, set. 2011.
- HERWALDT, B. L. Laboratory-Acquired Parasitic Infections from Accidental Exposures. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, out. 2001.
- HINCK, A. P.; MUELLER, T. D.; SPRINGER, T. A. Structural biology and evolution of the TGF- β family. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 12, 2016.
- HOUWELING, T. A. J. et al. **Socioeconomic Inequalities in Neglected Tropical Diseases: A Systematic Review**. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2016.
- JARVIS, J. N.; LOCKWOOD, D. N. Clinical aspects of visceral leishmaniasis in HIV infection. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 26, n. 1, p. 1–9, 2013.
- KANG, S. et al. Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 1007–1023, 2019.

- KARPLUS, T. M. et al. Association between the Tumor Necrosis Factor Locus and the Clinical Outcome of *Leishmania chagasi* Infection. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 70, n. 12, p. 6919–6925, 2002.
- KELLY, A. et al. Regulation of Innate and Adaptive Immunity by TGF β . **Advances in Immunology**, v. 134, p. 137–233, 2017.
- KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. **New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. Dermatologic Clinics** W.B. Saunders, , 2015.
- KHATONIER, R. et al. Role of IL-17 gene polymorphism in Indian kala-azar. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 57, n. 1, p. 23, 2020.
- KUMAR, P. et al. T cell suppression in the bone marrow of visceral leishmaniasis patients: impact of parasite load. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 191, n. 3, p. 318–327, 7 fev. 2018a.
- KUMAR, P. et al. T cell suppression in the bone marrow of visceral leishmaniasis patients: impact of parasite load. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 191, n. 3, p. 318–327, mar. 2018b.
- KUSCHNIR, R. C. et al. High levels of anti-*Leishmania* IgG3 and low CD4+ T cells count were associated with relapses in visceral leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 369, 20 dez. 2021.
- LACEN-CE. Manual de coleta, acondicionamento e transporte de amostras 2020. p. 164, 2020.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* e a eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana (LVA) no Brasil. **Editora Fiocruz**, 2003.
- LANGDAHL, B. L. et al. Polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 gene and osteoporosis. **Bone**, v. 32, n. 3, p. 297–310, 2003.
- LARA-SILVA, F. DE O. et al. *Rattus norvegicus* (Rodentia: Muridae) Infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (syn. *Le. chagasi*) in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–7, 2014.
- LE RUTTE, E. et al. Application of Quantitative PCR in the Diagnosis and Evaluating Treatment Efficacy of Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** | www.frontiersin.org, v. 10, p. 581639, 2020.
- LEZAMA-DÁVILA, C. M. et al. 17 β -estradiol increases *Leishmania mexicana* killing in macrophages from DBA/2 mice by enhancing production of nitric oxide but not pro-inflammatory cytokines. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 6, p. 1125–1127, 2007.
- LIAO, W.-C. et al. Serum Interleukin-6 Level but not Genotype Predicts Survival after Resection in Stages II and III Gastric Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 2, p. 428–434, 15 jan. 2008.
- LIDANI, K. C. F. et al. Visceral Leishmaniasis and Natural Infection Rates of *Leishmania* in *Lutzomyia longipalpis* in Latin America. Em: **The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis**. [s.l.] InTech, 2017.
- LIMA, Á. L. M. et al. Changing epidemiology of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil: a 25-year follow-up of an urban outbreak. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 111, p. 440–447, 2017.
- LIMA, I. D. et al. Changing demographics of visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Lessons for the future. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, 6 mar. 2018.

- LIMA, I. P. et al. Human immunodeficiency virus/Leishmania infantum in the first foci of urban American visceral leishmaniasis: clinical presentation from 1994 to 2010. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 156–160, abr. 2013.
- LINDOSO, J. et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. **HIV/AIDS - Research and Palliative Care**, v. Volume 10, p. 193–201, out. 2018.
- LOPES, C. S. et al. CD271+ Mesenchymal Stem Cells as a Possible Infectious Niche for Leishmania infantum. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0162927, 13 set. 2016.
- LORENZ, C.; AZEVEDO, T. S.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. DISTRIBUIÇÃO POTENCIAL DE Lutzomyia longipalpis ASSOCIADA A MUDANÇAS CLIMÁTICAS NO BRASIL. **Anais do XIX Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, n. November, p. 4, 2019.
- LOUREIRO DOS REIS, M. M. et al. IL6 and FAS/FASL gene polymorphisms may be associated with disease progression in HIV-1-positive ethnically mixed patients. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 8, p. 1148–1157, 2020.
- MAHANTA, A. et al. Integrative approaches to understand the Mastery in manipulation of host cytokine networks by protozoan parasites with emphasis on Plasmodium and Leishmania species. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. FEB, 23 fev. 2018.
- MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 341, 29 out. 2014.
- MARTELOSSI CEBINELLI, G. C. et al. TGF- β 1 functional polymorphisms: A review. **European Cytokine Network**, v. 27, n. 4, p. 81–89, 2016.
- MARUYAMA, S. R. et al. Non- Leishmania Parasite in Fatal Visceral Leishmaniasis–Like Disease, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 11, p. 2088–2092, nov. 2019.
- MARY, C. et al. Quantification of Leishmania infantum DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 42, n. 11, p. 5249–5255, 2004.
- MOLLETT, G. et al. Detection of Immunoglobulin G1 Against rK39 Improves Monitoring of Treatment Outcomes in Visceral Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. 7, p. 1130–1135, 13 set. 2019.
- MORAVEJ, A. et al. IL-1 β (-511T/C) gene polymorphism not IL-1 β (+3953T/C) and LT- α (+252A/G) gene variants confers susceptibility to visceral leishmaniasis. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 6, p. 6907–6914, 2012.
- MORENO, E. S. et al. Evidence of a sylvatic enzootic cycle of leishmania infantum in the State of Amapá, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, n. June, p. 13–15, 2020.
- NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. The Two-Faced Cytokine IL-6 in Host Defense and Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3528, 9 nov. 2018.
- NETO, A. P. De Cural Da Fome a Campo Santo: O Campo De Concentração De Retirantes Na Seca De 1915 Em Fortaleza. **Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em História, da Faculdade de História da Universidade Federal do Rio de Janeiro.**, 2014.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 13. ed. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2016.

- NUNES, L.; MEDEIROS, P. Análise histórica da severidade de secas no Ceará: efeitos da aquisição de capital hidráulico sobre a sociedade. **Revista de Gestão de Água da América Latina**, v. 17, n. 1, p. 18–0, 2020.
- OLIVEIRA-SENA, I. V.; WERNECK, G. L. Risk factors for in-hospital mortality from visceral leishmaniasis: A case-control study. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 4, p. 538–543, 1 abr. 2020.
- OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; VE FORGET, G. Subversion Mechanisms by Which Leishmania Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 18, n. 2, p. 293–305, 2005.
- ORGANIZATION, W. H. **Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide 2020**WHO, **World Health Organization**. [s.l: s.n.].
- PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, n. S1, p. S10–S18, 2014.
- PAHO. **Interactive Atlas of Leishmaniasis in**. [s.l: s.n.].
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Plan of Action to Strengthen the Surveillance and Control of Leishmaniasis in the Americas 2017-2022**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/34147>>.
- PATIL, R. et al. Dynamics of the antibodies in cohorts of cured cases of visceral leishmaniasis: Its implication on the validity of serological test, value in prognosis and in post therapeutic assessment. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 8, n. 6, p. 725–730, 12 jun. 2012.
- PEREIRA, L. M. S. et al. Regulatory T cell and forkhead box protein 3 as modulators of immune homeostasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAY, p. 1–24, 2017.
- PITA-PEREIRA, D. et al. **SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis**Parasites & Vectors. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>.
- PORTO, C. R. C. et al. Polymorphism of Interleukin-6 is not associated with the presence or absence of high HPV E6/E7. **Anticancer Research**, v. 34, n. 7, p. 3501–3504, 2014.
- RAGEL LAINSON; JJ SHAW; FT SILVEIRA; RR BRAGA. American visceral leishmaniasis: on the origin of Leishmania (Leishmania) chagasi. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 2, n. 2, p. 123–125, 1987.
- RAMOS, P. K. et al. Serum cytokine responses over the entire clinical-immunological spectrum of human Leishmania (L.) infantum chagasi infection. **BioMed Research International**, v. 2016, n. 1, 2016.
- REGINA, A. L. A. et al. A watershed impacted by anthropogenic activities: Microbial community alterations and reservoir of antimicrobial resistance genes. **Science of the Total Environment**, v. 793, p. 148552, 2021.
- REITER-OWONA, I. et al. Specific K39 antibody response and its persistence after treatment in patients with imported leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 115, n. 2, p. 761–769, 2016.
- RESHMA, S. T. et al. Clinico-Haematological Study of Pancytopenia. **Medicine Today**, v. 33, n. 1, p. 12–18, 25 fev. 2021.

- REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. **GEN / GUANABARA KOOGAN**, p. 883, 2008.
- RIOS, K. Condenados da Terra: o confinamento dos pobres em Campos de Concentração no Ceará, Nordeste do Brasil. **Mester**, v. 49, n. 1, p. 1–6, 2020.
- RODRIGUES, A. C. M. et al. Epidemiologia da leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1119–1124, 2017.
- RODRIGUEZ, N. E. et al. Epidemiological and experimental evidence for sex-dependent differences in the outcome of *Leishmania infantum* Infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 142–145, 2018.
- ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251–262, dez. 2014.
- ROSE-JOHN, S. Interleukin-6 signalling in health and disease. **F1000Research**, v. 9, p. 1013, 20 ago. 2020.
- RUIZ-POSTIGO, J. A. et al. Global leishmaniasis a baseline for the 2030 roadmap Surveillance mondiale de la leishmaniose : 2019-2020 , une période de référence pour la feuille de route à l ' horizon 2030. **Relevé Épidémiologique Hebdomadaire**, v. 35, p. 19, 2021.
- SAKKAS, H.; GARTZONIKA, C. **Laboratory diagnosis of human Visceral Leishmaniasis Molecular evolution of enteroviruses View project Antibiotic resistance View project** Article in **Journal of Vector Borne Diseases**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/299513652>>.
- SAMANT, M. et al. **Role of Cytokines in Experimental and Human Visceral Leishmaniasis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 18 fev. 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.624009/full>>
- SAPORITO, L. et al. Visceral leishmaniasis: host–parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. e572–e576, ago. 2013.
- SERAFIM, T. D.; INIGUEZ, E.; OLIVEIRA, F. *Leishmania infantum*. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 1, p. 80–81, 2020.
- SHEHADEH, F. V. B. et al. TGF- β 1 polymorphism in American tegumentary leishmaniasis in a Southern Brazilian population. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.
- SHERLOCK, I. A. et al. Experimental infection of the Opossum *didelphis albiventris* (Marsupialia, didelphidae) with *Leishmania donovani*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 1, p. 141–141, mar. 1988.
- SILVA DE LIMA, U. R. et al. Visceral leishmaniasis in Northeast Brazil: What is the impact of HIV on this protozoan infection? **PLoS ONE**, v. 14, n. 12, 1 dez. 2019.
- SILVA, R. A. et al. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei* in an endemic area for visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 3, p. 320–327, set. 2014.
- SILVEIRA, F. T. et al. Revendo a trajetória da leishmaniose visceral americana na Amazônia, Brasil: de Evandro Chagas aos dias atuais. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. esp, p. 15–22, 2016.

- SIMÃO, J. C.; VICTÓRIA, C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Predictors of relapse of visceral leishmaniasis in inner São Paulo State, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 95, p. 44–49, 2020.
- SOARES, I. R. et al. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 665–669, nov. 2013.
- SOUSA-PAULA, L. C. DE; OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. *Lutzomyia longipalpis* (Sand Fly). **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 9, p. 796–797, 2020.
- SOUZA, T. D. et al. Visceral leishmaniasis in zoo and wildlife. **Veterinary Parasitology**, v. 200, n. 3–4, p. 233–241, 2014.
- SRIVASTAVA, R. M. et al. Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. **Frontiers in Immunology** | www.frontiersin.org, v. 1, p. 670, 2019.
- STOLK, W. A. et al. Between-Country Inequalities in the Neglected Tropical Disease Burden in 1990 and 2010, with Projections for 2020. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, 2016.
- SUNDAR, S. et al. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 22, p. 443–457, 2018.
- TADESSE, D. et al. Antibody and cytokine levels in visceral leishmaniasis patients with varied parasitemia before, during, and after treatment in patients admitted to Arba Minch General Hospital, southern Ethiopia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 8, p. e0009632, 5 ago. 2021.
- TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. Interleukin (IL-6) Immunotherapy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 8, p. a028456, ago. 2018.
- TERRY, C. F.; LOUKACI, V.; GREEN, F. R. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 24, p. 18138–18144, 2000.
- THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 44, n. 2, p. 253–272, 16 jun. 2020.
- TIRADO, T. C. et al. A comparative approach on the activation of the three complement system pathways in different hosts of Visceral Leishmaniasis after stimulation with *Leishmania infantum*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 120, p. 104061, jul. 2021.
- TRAVI, B. L. et al. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2288–2296, 2002.
- TZAVLAKI, K.; MOUSTAKAS, A. TGF- β Signaling. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 487, 23 mar. 2020.
- UNVER, N.; MCALLISTER, F. IL-6 family cytokines: Key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 41, p. 10–17, jun. 2018.
- VALENTE, M. et al. Overview of the role of kinetoplastid surface carbohydrates in infection and host cell invasion: prospects for therapeutic intervention. **Parasitology**, v. 146, n. 14, p. 1743–1754, 11 dez. 2019.

- VALLUR, A. C. et al. Specific antibody responses as indicators of treatment efficacy for visceral leishmaniasis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 4, p. 679–686, 2015.
- VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309–322, 2012a.
- VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. **Visceral Leishmaniasis. Infectious Disease Clinics of North America**, jun. 2012b.
- VARMA, N.; NASEEM, S. Hematologic Changes in Visceral Leishmaniasis/Kala Azar. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 26, n. 3, p. 78–82, 30 set. 2010.
- VON STEBUT, E. Leishmaniasis. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 13, n. 3, p. 191–201, mar. 2015.
- WHO. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. **Weekly epidemiological record**, v. 95, n. 25, p. 265–280, 2020.
- WHO, W. H. O. **Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide**. [s.l.: s.n.].
- WHO-PAHO. Leishmaniasis Informe Epidemiológico de las Américas. **Informe Leishmaniasis**, v. 4, p. 3–7, 2019.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Geographical distribution of *Leishmania* spp. – *L. infantum*. n. 949, p. 44412, 2010.
- YE, J. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, 18 dez. 2012.
- ZACARIAS, D. A. et al. Causes and consequences of higher *Leishmania infantum* burden in patients with kala-azar: a study of 625 patients. **Tropical Medicine & International Health**, v. 22, n. 6, p. 679–687, jun. 2017a.
- ZACARIAS, D. A. et al. Causes and consequences of higher *Leishmania infantum* burden in patients with kala-azar: a study of 625 patients. **Tropical Medicine & International Health**, v. 22, n. 6, p. 679–687, jun. 2017b.
- ZANET, S. et al. Epidemiology of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in *Rattus rattus* in absence of domestic reservoir and definitive hosts. **Veterinary Parasitology**, v. 199, p. 247–249, 2014.
- ZHANG, Y.; ALEXANDER, P. B.; WANG, X.-F. TGF- β Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 9, n. 4, p. a022145, abr. 2017.
- ZIJLSTRA, E. E. Visceral leishmaniasis: A forgotten epidemic. **Archives of Disease in Childhood**, v. 101, n. 6, p. 561–567, 1 jun. 2016.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado pela Dra. Lilia Maria Carneiro Câmara para participar da pesquisa: AVALIAÇÃO DA COINFEÇÃO POR MICOBACTÉRIAS EM PACIENTES COM CALAZAR. Estamos realizando um estudo sobre a possibilidade de você estar infectado com os bacilos da Tuberculose e da Hanseníase e sua relação com o desenvolvimento da doença Calazar. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos. Serão colhidas duas amostras de 5 ml de sangue de uma veia do braço e mais amostra de 2 ml de aspirado de medula óssea no momento de seu internamento, que servirá tanto para o diagnóstico como para este estudo (detecção no sangue e na medula óssea do material genético dos bacilos da tuberculose e da hanseníase). Isto não trará risco à sua vida, mas poderá ocasionar um desconforto e 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. Destacamos, que a qualquer momento o participante poderá recusar a continuar na pesquisa e também poderá retirar o seu consentimento sem que isso lhe traga qualquer prejuízo. Garantimos que as informações conseguidas através da sua participação não permitirão a identificação da sua pessoa, exceto aos responsáveis pela pesquisa, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto. Os que uma via será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores envolvidos serão encontrados no endereço: Rua Coronel Nunes de Melo nº. 1315, bairro Rodolfo Teófilo. Você terá todas as informações que desejar sobre os resultados da pesquisa através da coordenação responsável pelo projeto: Profª Drª. Lilia Maria Carneiro Câmara (85) 99973-2748 / 3366-8641 / 3023-2084.

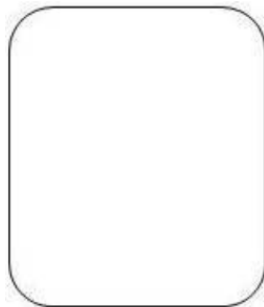
ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC na Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344 (Horário: 08:00 às 12:00 horas).

AUTORIZAÇÃO CEP CAAE 52626116.8.3001.5044 Parecer N.º.: 1.646.584 25/07/2016

O abaixo assinado _____, _____ anos,

RG: _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, ____/____/____



POLEGAR DIREITO

Nome do participante da pesquisa Data: ____/____/____

Nome do pesquisador Data: ____/____/____

Nome da testemunha Data: ____/____/____

Nome do profissional que aplicou o TCLE Data: ____/____/____

APÊNDICE B – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE		
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 () Diminuído ()		
Gengivorragia () Palidez cutâneo-mucosa () Tosse () Diarréia ()		
Início do tratamento:		
Tipo de tratamento (drogas utilizadas, posologia e duração em dias):		
Teve complicações? Não () Sim ()		
Quais complicações:		
DADOS LABORATORIAIS:		
Sorologias:		
Hemoglobina:	Hematócrito:	Leucócitos totais:
Leucograma (% e totais):		
Provas de função hepática: Bilirrubina total () Bilir. Direta () Bilir. Ind ()		
TGO/AST () TGP/ALT () Fosfatase alcalina ()		
Albumina () Globulina () Rel. albumina/globulina ()		
Radiografias/ultrassonografias:		
COLETA DE AMOSTRAS:		
Data da 1ª Coleta de sangue: Sangue (/ /) Soro (/ /)		
Data da 2ª Coleta de sangue: Sangue (/ /) Soro (/ /)		
OBSERVAÇÕES (no verso):		

APÊNDICE C – PLANILHA DE DADOS DE DIAGNÓSTICO

PACIENTE	SEXO	IDADE	HIV	MICROSCOPI A DIRETA	qPCR <i>L. Infantum</i>	PARASITEMI A SANGUE	PARASITEMI A MEDULA
1	M	54	NÃO	POSITIVA	POSITIVO	0	580
2	M	60	NÃO	NEGATIVA	POSITIVO	24	108
3	M	21	NÃO	POSITIVA	POSITIVO	121	1236
4	M	64	SIM	POSITIVA	POSITIVO	1979	172062
5	F	42	SIM	A.I.	POSITIVO	654	4112
7	M	39	NÃO	NEGATIVA	POSITIVO	1496	7654
8	F	58	SIM	POSITIVA	POSITIVO	3998	192487
10	M	44	NÃO	POSITIVA	POSITIVO	14584	177382
11	M	58	SIM	POSITIVA	POSITIVO	0	1499
12	M	72	NÃO	NEGATIVO	POSITIVO	798	107
13	F	40	NÃO	NEGATIVA	POSITIVO	113	199
14	M	21	SIM	NEGATIVA	POSITIVO	1129	38
16	F	42	SIM	POSITIVA	POSITIVO	2515	31212
17	M	27	NÃO	POSITIVA	POSITIVO	1591	73
18	M	50	SIM	NEGATIVA	POSITIVO	1173	87
19	F	18	NÃO	NEGATIVA	POSITIVO	1030	12498
20	F	74	NÃO	POSITIVA	POSITIVO	6020	9
21	M	31	SIM	NEGATIVA	POSITIVO	3507	275028
22	M	20	NÃO	NEGATIVA	POSITIVO	152	42802
23	M	39	SIM	ÑR	POSITIVO	446	11404
24	M	31	NÃO	POSITIVA	POSITIVO	563	1463
25	M	45	SIM	POSITIVA	POSITIVO	94	1575
26	M	55	NÃO	NEGATIVA	POSITIVO	325	1431
27	M	44	SIM	POSITIVA	POSITIVO	2295	15621
28	M	20	NÃO	NEGATIVA	POSITIVO	711	52064
29	M	38	SIM	NEGATIVA	POSITIVO	3668	9601
30	M	35	NÃO	NEGATIVA	POSITIVO	3783	245
31	F	46	SIM	POSITIVA	POSITIVO	1742	5819
32	M	31	NÃO	NEGATIVA	POSITIVO	20	34
33	M	51	SIM	ÑR	POSITIVO	96	142
34	M	40	SIM	NEGATIVA	POSITIVO	21	32
35	M	18	NÃO	POSITIVA	POSITIVO	160	303
37	M	39	SIM	NEGATIVA	POSITIVO	99941	206136
38	M	36	SIM	POSITIVA	POSITIVO	6766	7098
39	M	54	NÃO	POSITIVA	POSITIVO	0	2843
6	F	43	SIM	NEGATIVA	NEGATIV O	0	0
9	F	33	SIM	POSITIVA	NEGATIV O	0	0
15	M	40	SIM	A.I.	NEGATIV O	0	0

36	M	39	SIM	NEGATIVA	NEGATIVO	0	0
40	M	49	NÃO	A.I.	POSITIVO	3484	112139
41	M	51	SIM	POSITIVA	POSITIVO	4421	469110
42	M	62	SIM	POSITIVA	POSITIVO	1894	3657
43	M	22	SIM	ÑR	POSITIVO	79	58
44	M	56	SIM	NEGATIVA	POSITIVO	122	1594
45	M	18	NÃO	ÑR	POSITIVO	8051	3101
46	M	49	NÃO	NEGATIVA	POSITIVO	1553	*
47	M	36	NÃO	POSITIVA	POSITIVO	1829	127
48	M	47	NÃO	NEGATIVA	POSITIVO	129	118
49	M	31	SIM	NEGATIVA	POSITIVO	0	6
51	M	34	NÃO	POSITIVA	POSITIVO	0	64
52	M	34	SIM	POSTIVA	POSITIVO	0	18
53	M	42	SIM	NEGATIVA	POSITIVO	0	59
54	M	19	SIM	POSITIVA	POSITIVO	0	11076
55	M	22	NÃO	NEGATIVA	POSITIVO	0	29
56	M	34	NÃO	A.I.	POSITIVO	0	5352
50	M	60	SIM	A.I.	NEGATIVO	0	*
57	M	25	NÃO	POSITIVA	POSITIVO	0	22683
58	M	44	NÃO	A.I.	POSITIVO	0	30357
59	M	18	NÃO	POSITIVA	POSITIVO	0	16
60	M	58	NÃO	POSITIVA	POSITIVO	0	57
61	M	44	NÃO	NEGATIVA	POSITIVO	0	34
62	M	47	SIM	NEGATIVA	POSITIVO	938	971
63	M	64	NÃO	NEGATIVA	POSITIVO	28	85972
64	M	43	SIM	NEGATIVA	POSITIVO	591	*
65	M	22	NÃO	NEGATIVA	POSITIVO	2300	2417
66	M	25	NÃO	NEGATIVA	POSITIVO	0	1557086
67	M	47	NÃO	POSITIVA	POSITIVO	3236	4212
68	M	53	NÃO	NEGATIVA	POSITIVO	3548	25034
69	M	21	NÃO	NEGATIVA	POSITIVO	574	14841
70	M	33	NÃO	POSITIVA	POSITIVO	1276	2820
71	M	19	NÃO	POSITIVA	POSITIVO	568	1417
72	F	61	SIM	POSITIVA	POSITIVO	4243	45180
73	M	59	NÃO	POSITIVA	POSITIVO	1853	607803
74	M	49	NÃO	POSITIVA	POSITIVO	3158	2444

ÑR – não realizou exame de microscopia direta

AI – amostra inaqueda

* - recusou a realizar a punção de medula óssea

APÊNDICE D – PLANILHA DE DADOS HEMATOLÓGICOS

PACIENTE	HEMOG	HEMATO	LEUC TOTAIS	NEUTR	BASTÕES	SEGM	LINF	MON	EOSI	BASO	PLAQ
1	9,6	27,5	2990	1719	0	1719	1049	176	29	8	101000
2	11,4	33	2750	1100	0	1100	1430	220	0	0	100000
3	11,7	31,4	3230	1356	0	1356	1615	258	0	0	91000
4	6,4	19,2	1530	948	0	948	420	160	0	0	63000
5	8,99	26,4	1920	960	0	960	590	346	10	16	137000
7	9,1	27,8	1630	896	16	880	619	65	0	16	19000
8	4,7	16	4070	1831	0	1831	2039	170	0	8	144000
10	8,9	26,7	2650	1298	0	1298	1007	265	79	0	133000
11	11	32,6	2330	1509	0	1509	589	209	0	20	44000
12	10,5	31,6	8090	4951	0	4951	1415	809	703	16	206000
13	12,6	36,7	6210	3142	0	3142	2378	577	80	31	334000
14	11,4	35,7	9630	8869	0	8869	491	240	0	0	304000
16	7,3	24,4	1710	957	0	957	478	256	17	0	101000
17	14,9	43,8	12.150	7897	0	7897	2794	1215	243	0	276000
18	15	43,3	2510	1530	0	1530	600	310	60	10	20000
19	4,9	16,7	1660	641	0	641	860	159	0	0	71000
20	8	23,8	1130	622	0	622	407	102	0	0	47000
21	12,9	34,2	2980	1937	0	1937	20	238	208	0	131000
22	9,3	29,9	2180	850	0	850	1046	261	21	0	73000
23	9,5	29,8	2980	864	0	864	1698	387	29	8	147000

24	8,5	27,3	1800	1314	18	1296	342	144	0	0	100000
25	12,4	37,6	6760	5340	0	5340	669	419	297	20	228000
26	8	23,5	2060	1174	0	1174	577	288	21	0	77000
27	6,45	20,4	2620	1043	0	1043	1108	406	8	54	76100
28	7,2	24,2	3280	1836	0	1836	1148	295	0	0	134000
29	8,9	26,9	1590	1209	15	1194	279	90	0	9	71000
30	10,8	33,8	2840	1874	0	1874	738	227	0	0	74000
31	11,1	34,6	3310	2416	0	2416	695	198	0	0	91000
32	5,6	18,1	7180	4452	0	4452	2082	574	72	0	142000
33	11,6	36,1	7760	4500	0	4500	2328	620	310	7	283000
34	11,5	34	1830	940	0	940	36,6	190	20	0	57000
35	7,3	23,9	3660	1757	0	1757	1391	512	0	0	172000
37	6,6	21	1510	966	0	966	439	75	19	19	163000
38	8,3	24,5	4250	3952	127	3825	212	85	0	0	62000
39	7,7	25,3	950	608	0	608	219	114	10	0	35000
6	11,8	35,3	2560	1254	0	1254	1280	25	0	0	102000
9	7	22	1370	822	0	822	506	41	0	0	41000
15	13,4	39,2	7940	2548	0	2548	3842	992	555	0	448000
36	10,5	30,7	3250	1742	0	1742	1098	390	0	9	103000
40	11,1	34,2	3770	3053	0	3053	603	113	0	0	43000
41	6,5	22,8	2050	1219	0	1219	629	180	10	10	57000
42	5,6	17,7	3160	1128	0	1128	1561	461	0	9	163000
43	10,7	32,2	6080	5034	0	5034	668	304	60	12	246000
44	9,1	27,1	1170	596	0	596	456	117	0	0	38000
45	9	27	1130	468	0	468	490	160	0	10	84000
46	8,5	26,6	2220	1487	0	1487	488	222	11	11	86000
47	7,9	24,6	1710	803	0	803	769	136	0	0	93000
48	13	40,9	11000	6930	0	6930	3080	660	330	0	513000
49	11,1	34,2	3770	3053	0	3053	603	113	0	0	43000

51	12,5	36,5	4150	2946	41	2905	830	178	41	29	136000
52	9,3	27,4	6100	4806	0	4806	622	610	18	12	73000
53	13,4	38,7	3920	2720	0	2720	780	309	31	19	60000
54	7,8	25,4	1280	538	0	538	602	128	0	10	73000
55	11,9	36,3	11990	9124	0	9124	1163	1079	95	23	301000
56	8,9	27,4	2210	1237	0	1237	740	221	11	11	202000
50	7,8	24	2800	1898	0	1898	380	324	168	11	49000
57	6,4	20,6	1470	352	0	352	882	220	14	0	65000
58	8,5	26,2	2090	1107	0	1107	606	334	41	0	71000
59	5,8	19,3	1730	1297	0	1297	276	155	0	0	69000
60	11,3	34,8	1760	985	0	985	457	186	119	10	59000
61	14,4	45	13560	9085	0	9085	3390	1084	0	0	290000
62											
63	7,3	23,9	2900	2079	0	2079	571	240	0	8	125000
64	4,3	34,6	2860	1973	0	1973	715	171	0	0	56000
65	10,6	33,3	3390	1593	0	1593	1322	339	135	30	262000
66											
67	12,1	35,4	2790	1381	0	1381	1116	139	27	0	83000
68	8,2	24	1020	558	0	54,8	330	110	10	0	63000
69	12	36,9	2990	1321	0	1321	1169	469	8	20	104000
70	10,7		1800	90	0	90	1602	90	0	0	63000
71	10,3	30,7	3300	1914	0	1914	1122	198	33	33	27000
72	6,7	19,7	1100	1045	0	1045	44	11	0	0	43000
73											
74	8,7	27,1	1800	1440	0	1440	324	36	0	0	51000

HEMOG - hemoglobina, HEMATO – hematócrito, LEUC TOTAIS – leucócitos totais, NEUTR – neutrófilo, SEGM – segmentado, LINF – linfócitos, MON – monócitos, EOSI – eosinófilos, BASO – basófilos, PLAQ – plaquetas.

APÊNDICE E – PLANILHA DE DADOS DE POLIMORFISMO

PACIENTE	POLIMORFISMO IL-6	RESULTADO	POLIMORFISMO TGF-B	RESULTADO
1	CC	HOMOZIGOTO	TC	HETEROZIGOTO
2	GG	SELVAGEM	TT	SELVAGEM
3	GG	SELVAGEM	TC	HETEROZIGOTO
4	GG	SELVAGEM	CC	HOMOZIGOTO
5	GC	HETEROZIGOTO	TT	SELVAGEM
7	GG	SELVAGEM	TC	HETEROZIGOTO
8	GC	HETEROZIGOTO	TC	HETEROZIGOTO
10	GG	SELVAGEM	TC	HETEROZIGOTO
11	GG	SELVAGEM	CC	HOMOZIGOTO
12	GG	SELVAGEM	TC	HETEROZIGOTO
13	GC	HETEROZIGOTO	TC	HETEROZIGOTO
14				
16	GG	SELVAGEM	TT	SELVAGEM
17			TC	HETEROZIGOTO
18			TC	HETEROZIGOTO
19	CC	HOMOZIGOTO	TC	HETEROZIGOTO
20	CC	HOMOZIGOTO	TC	HETEROZIGOTO
21	CC	HOMOZIGOTO	CC	HOMOZIGOTO
22	GG	SELVAGEM	TC	HETEROZIGOTO
23	GG	SELVAGEM	CC	HOMOZIGOTO
24	GC	HETEROZIGOTO	CC	HOMOZIGOTO
25	GC	HETEROZIGOTO	CC	HOMOZIGOTO
26	GG	SELVAGEM	TT	SELVAGEM
27	GG	SELVAGEM	CC	HOMOZIGOTO
28	GG	SELVAGEM	CC	HOMOZIGOTO
29	GC	HETEROZIGOTO	TC	HETEROZIGOTO
30	GG	SELVAGEM	TT	SELVAGEM
31	GG	SELVAGEM	TC	HETEROZIGOTO
32				
33	GC	HETEROZIGOTO	CC	HOMOZIGOTO
34				
35	CC	HOMOZIGOTO	TC	HETEROZIGOTO
37	GG	SELVAGEM	CC	HOMOZIGOTO
38	GC	HETEROZIGOTO	CC	HOMOZIGOTO
39	GG	SELVAGEM	CC	HOMOZIGOTO
6	GG	SELVAGEM	TC	HETEROZIGOTO
9	GG	SELVAGEM	TC	HETEROZIGOTO
15	GG	SELVAGEM	TC	HETEROZIGOTO

36	GG	SELVAGEM	TC	HETEROZIGOTO
40	GC	HETEROZIGOTO	TC	HETEROZIGOTO
41	GC	HETEROZIGOTO	TC	HETEROZIGOTO
42	GC	HETEROZIGOTO	TC	HETEROZIGOTO
43	GC	HETEROZIGOTO	TC	HETEROZIGOTO
44	GG	SELVAGEM		
45	GG	SELVAGEM	CC	HOMOZIGOTO
46				
47	CC	HOMOZIGOTO	CC	HOMOZIGOTO
48	CC	HOMOZIGOTO	CC	HOMOZIGOTO
49	GC	HETEROZIGOTO	TT	SELVAGEM
51	CC	HOMOZIGOTO	TT	SELVAGEM
52	GG	SELVAGEM	TT	SELVAGEM
53			TC	HETEROZIGOTO
54	CC	HOMOZIGOTO	CC	HOMOZIGOTO
55	GG	SELVAGEM	TC	HETEROZIGOTO
56	GG	SELVAGEM	TC	HETEROZIGOTO
50	CC	HOMOZIGOTO	TT	SELVAGEM
57	CC	HOMOZIGOTO	TC	HETEROZIGOTO
58	GG	SELVAGEM	CC	HOMOZIGOTO
59	GG	SELVAGEM	TT	SELVAGEM
60	GC	HETEROZIGOTO	TC	HETEROZIGOTO
61	CC	HOMOZIGOTO	CC	HOMOZIGOTO
62	GC	HETEROZIGOTO	CC	HOMOZIGOTO
63	GC	HETEROZIGOTO	TC	HETEROZIGOTO
64				
65	GG	SELVAGEM	TC	HETEROZIGOTO
66	GC	HETEROZIGOTO	TC	HETEROZIGOTO
67	GG	SELVAGEM	TC	HETEROZIGOTO
68			TC	HETEROZIGOTO
69	GG	SELVAGEM	TT	SELVAGEM
70	GG	SELVAGEM	TC	HETEROZIGOTO
71	GG	SELVAGEM	TT	SELVAGEM
72			TC	HETEROZIGOTO
73			CC	HOMOZIGOTO
74			TT	SELVAGEM

ANEXO A -PARECER COMITÊ DE ÉTICA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA****Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA COINFECÇÃO POR MICOBACTÉRIAS EM ADULTOS COM**Pesquisador:** Lília Maria Carneiro Câmara**Área Temática:****Versão:** 3**CAAE:** 52626116.8.0000.5054**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio**DADOS DO PARECER****Número do Parecer:** 1.482.643**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um projeto de pesquisa que visa identificar se existe coinfeção por mycobacterium leprae e/ou Mycobacterium tuberculosis, em indivíduos com calazar, e que a medula óssea pode ser o nicho onde as micobactérias permanecem no indivíduo infectado ou seja avaliar a existência de coinfeção por Mycobacterium tuberculosis e Mycobacterium leprae em pacientes com calazar e sua correlação com a evolução clínica.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Avaliar a existência de coinfeção por Mycobacterium tuberculosis e Mycobacterium leprae em paciente com calazar e sua correlação com a evolução clínica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: poderá ocasionar no participante da pesquisa um desconforto e dor no local da coleta, se o participante da pesquisa se sentir constrangido ou desconfortável terá a total liberdade em desistir em qualquer momento independente do motivo.

Benefícios: essa pesquisa poderá contribuir na compreensão do papel das interações de micobactérias em pacientes doentes com leishmaniose visceral, mudanças no desencadeamento ou não de infecções e sua associação na mudança no padrão da resposta imune do paciente. Caso nossa hipótese se confirme, as ações de vigilância e controle de doenças infecciosas devem ser

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000**Bairro:** Rodolfo Teófilo**CEP:** 60.430-275**UF:** CE**Município:** FORTALEZA**Telefone:** (85)3366-8344**E-mail:** comepe@ufc.br

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

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA COINFEÇÃO POR MICOBACTÉRIAS EM ADULTOS COM

Pesquisador: Lília Maria Carneiro Câmara

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 52626116.8.3001.5044

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.646.584

Apresentação do Projeto:

Nos últimos anos o mundo vem assistindo o aumento global das doenças infecciosas emergentes em animais silvestre e seres humanos. Com o avanço das viagens turísticas e dos processos migratórios, é imperativo que o sistema de saúde esteja ciente da associação de organismos nas doenças infecciosas e como isso pode representar um desafio e impacto no tratamento e diagnóstico. A coinfeção pode desempenhar um papel crítico no binômio saúde-doença, através dos efeitos sobre a resposta imune do hospedeiro e sobre a associação da patogenicidade entre organismos modificando os padrões epidemiológicos das doenças humanas. Leishmaniose visceral, hanseníase e tuberculose são doenças infecciosas crônicas que acometem principalmente indivíduos de países de clima tropical, em desenvolvimento e representam um importante problema de saúde pública no Brasil. Acredita-se que existe coinfeção por *Mycobacterium leprae* e/ou *Mycobacterium tuberculosis*, em indivíduos com calazar, e que a medula óssea pode ser o nicho onde as micobactérias permanecem no indivíduo infectado. O objetivo do trabalho atual é avaliar a existência de coinfeção por *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae* em pacientes com calazar e sua correlação com a evolução clínica. **Materias e Métodos** - Serão avaliados 100 pacientes com diagnóstico de Leishmaniose visceral, considerando aspectos clínicos, parasitológicos e sorológicos em indivíduos atendidos no Hospital São José de Doenças Infeciosas.

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