



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

CÁSSIO MARINHO CAMPELO

**QUANTIFICAÇÃO DAS MOLÉCULAS CD35/CR1, CD11b/CR3 EM
LEUCÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

FORTALEZA

2017

CÁSSIO MARINHO CAMPELO

Quantificação das moléculas CD35/CR1, CD11b/CR3 em leucócitos de pacientes com leishmaniose visceral

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

Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

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

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C196q Campelo, Cássio Marinho.
QUANTIFICAÇÃO DAS MOLÉCULAS CD35/CR1, CD11b/CR3 EM LEUCÓCITOS DE PACIENTES
COM LEISHMANIOSE VISCERAL / Cássio Marinho Campelo. – 2017.
80 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Lilia Maria Carneiro Câmara.

1. Leishmaniose visceral . 2. Leucócitos . 3. Receptor para complemento tipo 1 (CD35/CR1). 4.
Receptor para complemento tipo 3 (CD11b/CR3). I. Título.

CDD 616.9

CÁSSIO MARINHO CAMPELO

Quantificação das moléculas CD35/CR1, CD11b/CR3 em leucócitos de pacientes com leishmaniose visceral

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

Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal

Aprovado em: 26/07/2017

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lilia Maria Carneiro Câmara
Orientadora

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Anastácio de Queiróz Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*À Profa. Dra. Lilia Maria Carneiro Câmara
Dedico*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo cuidado, carinho e amor que sempre demonstrou ao caminhar comigo todo este percurso de vida.

À minha orientadora Dra. Lília Câmara o meu MUITO OBRIGADO, pela sua orientação, aprendizado, ensino, condução em todo processo e pelo meu conhecimento científico que ganhei com a sua convivência.

Ao Prof. Luiz Carlos, pelas horas de conversa, troca de conhecimento, aprendizado, paciência em ensinar cada passo dos experimentos.

À minha mãe Marly Marinho, meu pai Mauro Campelo e minha irmã Mayrla Campelo, por serem os propulsores na minha determinação em não apenas passar pela vida.

À Eliane (Eli) e Carol (Linda) Soares pela amizade, cuidado e carinho.

Ao Chico Paiva, Virginia Chacon, Mazé Oliveira, Rebeca Azevedo e Maura Azevedo (In memoriam) pelo incentivo, torcida, amizade e amor.

A todos os profissionais do Hospital São José de Doenças Infecciosas que, direta ou indiretamente, colaboraram de alguma forma para o êxito da pesquisa.

Minha especial e sincera gratidão aos médicos Dr. Bruno Tavares e Dr. Igor Carvalho, pela parceria, disponibilidade, constante atenção e colaboração, essencial no projeto.

Minha gratidão e carinho especial a está equipe que proporcionou conhecimento, amizade, profissionalismo, garra e muito amor pelo que faz, no dia a dia no HSJ, meu MUITO OBRIGADO. Ângela Santos, Marise Lopes, Paula (Paulinha) Araújo, Francisco Coelho, Socorro (Filhinha) Santos, Maria Vânia Freitas, Cleonice Alves, Genilson Fernandes, Ricardo Salviano, Lilian Cristina, Débora Valentim, Ruth (Rutinha) Miranda, Alana Soares, Djanira Soares (Djan), Érica Sousa, Arislene Costa, Ivoneide Cassiano, Linhares Ferreira, Cleide, Roosevelt e Antonio Jaldir

Aos farmacêuticos-bioquímicos do Laboratório de Análises Clínicas do HSJ pelo apoio e ajuda sempre que necessário. Ana Maria Pimentel, André Luis Menezes, Danúbio Andrade, Darcielle Bruna, Dayane Maria, Jorge Luis Silva, Márcia Oriá, Rejane Moraes, Vânia Pontes, Jacó Ricarte Lima, Eliane Lavor e Maria Gorete.

Aos amigos e colegas de mestrado, pela amizade, apoio e incentivo.

À FUNCAP pelo apoio financeiro.

*De um lado a poesia,
o verbo,
a saudade,
do outro a luta,
força e coragem
pra chegar ao fim.*

O Teatro Mágico

RESUMO

As leishmanioses são endêmicas em 98 países no mundo. Estão entre as seis doenças infecciosas e parasitárias de maior ocorrência no mundo, a segunda entre as causadas por protozoários após a malária. A leishmaniose visceral é uma antropozoonose de alta incidência, morbidade e mortalidade nas Américas. No Brasil a *Leishmania infantum* possui ampla distribuição com notificação em 20 Estados, dentre eles o Ceará. Os receptores para complemento do tipo 1 (CR1) e de tipo 3 (CR3) estão presentes na superfície de leucócitos atuando na adesão celular, na fagocitose de células apoptóticas e nas interações do parasita com o sangue do hospedeiro. O objetivo deste estudo foi de compreender a dinâmica da expressão dos receptores CR1 e CR3 em leucócitos, no sangue de pacientes com leishmaniose visceral. Foram analisadas amostras de sangue periférico de 18 pacientes com diagnóstico positivo para leishmaniose visceral conforme aspectos clínicos, parasitológicos e sorológicos e de 18 indivíduos saudáveis. Foram observados em neutrófilos $CD11b^+CD35^+$, diminuição da expressão de CR3 e nas subpopulações de neutrófilos $CD11b^+CD14^+CD35^+$, aumento na expressão de CR1 com diminuição da frequência de células positivas para molécula, sugerindo um tropismo do parasita para esta população e consequentemente uma rota de evasão e entrada silenciosa em macrófagos; em monócitos $CD14^+CD35^+$ foram observados, aumento na expressão de CR1 com aumento de células positivas para a molécula, e nas subpopulações de monócitos $CD14^+CD11b^+CD35^+$, houve aumento na expressão de CR3 e CR1 com aumento da frequência de células positivas para as moléculas, sugerindo que o monócito é uma célula alvo para o parasita e que a associação destes receptores para o complemento possam atuar no aumento da fagocitose e modulação na diferenciação de monócitos em macrófagos anti-inflamatórios; em linfócitos B $CD19^+CD35^+$, foi observada uma diminuição de células positivas com CR1, sugerindo uma possível atuação do receptor para complemento (CD35/CR1) na regulação fisiológica da ativação policlonal destas células. Os dados demonstraram estatística significante pelo teste t ($p<0,05$) e os resultados obtidos sugerem que diferenças na expressão de CR1 e CR3 possam ser considerados fator importante na persistência do parasita na doença.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral, Leucócitos, Receptor para complemento tipo 1 (CD35/CR1), Receptor para complemento tipo 3 (CD11b/CR3)

ABSTRACT

Leishmaniasis is endemic in 98 countries worldwide. They are among the six most frequent infectious and parasitic diseases in the world, the second among those caused by protozoa after malaria. Visceral leishmaniasis is an anthropozoonosis of high incidence, morbidity and mortality in the Americas. In Brazil, *Leishmania infantum* has a wide distribution with notification in 20 states, among them Ceará. Type 1 (CR1) and type 3 (CR3) complement receptors are present on the surface of leukocytes acting on cell adhesion, in apoptosis cell phagocytosis and on parasite interactions with host blood. The objective of this study was to understand the dynamics of CR1 and CR3 receptor expression in leukocytes in the blood of patients with visceral leishmaniasis. Peripheral blood samples from 18 patients with positive diagnosis for visceral leishmaniasis were analyzed conformed clinical, parasitological and serological aspects and 18 healthy individuals. neutrophils CD11b⁺CD35⁺, CR3 expression decrease and neutrophil CD11b⁺CD14⁺CD35⁺ subpopulations, an increase in CR1 expression with decrease in the frequency of positive cells to the molecule were observed, suggesting a parasite tropism for this population and consequently a Escape route and silent entry in macrophages; In monocytes CD14⁺CD35⁺ were observed, an increase in CR1 expression with an increase of cells positive for the molecule, and in monocytes CD14⁺CD11b⁺CD35⁺, there was an increase in the expression of CR3 and CR1 with an increase of the frequency of cells positive for the molecules, Suggesting that the monocyte is a target cell for the parasite and that the association of these receptors for complement may act to increase phagocytosis and modulate the differentiation of monocytes in anti-inflammatory macrophages; In B lymphocytes CD19⁺CD35⁺, a decrease of CR1 positive cells was observed, suggesting a possible action of complement receptor (CD35/CR1) on the physiological regulation of the polyclonal activation of these cells. The data demonstrated a significant statistic by the t test ($p < 0.05$) and the results suggest that differences in the expression of CR1 and CR3 can be considered an important factor in the persistence of the parasite in the disease.

Keywords: Visceral Leishmaniasis, Leukocytes, Receptor for complement type 1 (CD35/CR1), Receptor for complement type 3 (CD11b/CR3)

LISTA DE FIGURAS

Figura 01-	Distribuição dos casos de LV no Brasil por UF de infecção 2015.....	15
Figura 02-	Panorama mundial de distribuição dos casos de LV, 2013	16
Figura 03-	Distribuição dos casos de LV, segundo países com maior ocorrência de casos. Américas, 2001 - 2015.....	17
Figura 04-	Estratificação do risco para LV segundo município de residência, Ceará 2010 a 2012 e 2013 a 2015.....	18
Figura 05-	Dimorfismo da <i>Leishmania infantum</i> , A – Forma promastigota. B – Forma amastigota.....	19
Figura 06-	Flebotomíneo – <i>Lu. Longipalpis</i>	20
Figura 07-	Ciclo de vida da <i>Leishmania infantum</i>	21
Figura 08-	Alterações de glicoconjungados de membrana conforme estágio da <i>Leishmaniai</i>	23
Figura 09-	Modelo de infecção experimental pela <i>Leishmania</i> no sangue humano	24
Figura 10-	Esquema de ativação das vias do complemento.....	28
Figura 11-	Estrutura do receptor para complemento tipo 3 (CR3)	29
Figura 12-	Estrutura do receptor para complemento tipo 1 (CR1)	30
Figura 13-	Fluxograma do processamento das amostras	34
Figura 14-	Distribuição dos pacientes por gênero e idade.....	37
Figura 15-	Citograma da distribuição leucocitárias conforme padrões de tamanho e granulosidade (FSC x SSC).....	40
Figura 16-	Estratégia de análise em <i>gate</i> . A – Formação das <i>gates</i> . B – Separação da população celular a ser estudada. C- Análise em gráfico <i>dot plot</i> da população celular conforme marcadores de superfície celular. D – Análise da intensidade de fluorescência através de histograma. E – Análise da população celular conforme marcadores de superfície celular e intensidade de fluorescência através de gráfico <i>dot plot</i>	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Frequência de neutrófilos CD11b ⁺ CD35 ⁺ e expressão do CR1.....	44
Gráfico 2 -	Expressão do CR3 em população de neutrófilos CD11b ⁺ CD35 ⁺	45
Gráfico 3 -	Frequência de neutrófilos CD11b ⁺ CD14 ⁺ CD35 ⁺ e expressão do CR1.....	46
Gráfico 4 -	Expressão do CR3 em de neutrófilos CD11b ⁺ CD14 ⁺ CD35 ⁺	46
Gráfico 5 -	Frequência de monócitos CD14 ⁺ CD35 ⁺ e expressão do CR1	47
Gráfico 6 -	Expressão do CD14 em população de monócitos CD14 ⁺ CD35 ⁺	48
Gráfico 7 -	Frequência de monócitos CD14 ⁺ CD11b ⁺ CD35 ⁺ e expressão do CR1.....	49
Gráfico 8 -	Expressão do CR3 em população de monócitos CD14 ⁺ CD11b ⁺ CD35 ⁺	49
Gráfico 9 -	Frequência de monócitos CD14 ⁺ CD11b ⁺ e expressão do CR3.....	50
Gráfico 10-	Frequência de linfócitos T CD3 ⁺ CD35 ⁺ e expressão do CR1.....	51
Gráfico 11-	Frequência de linfócitos T CD119 ⁺ CD35 ⁺ e expressão do CR1.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição das frequências dos principais sintomas no momento da admissão dos pacientes.....	38
Tabela 2 -	Perfil hematológico dos pacientes na admissão.....	39
Tabela 3 -	Distribuição da frequência de leucócitos CD11b ⁺ , CD14 ⁺ , CD3 ⁺ e CD19 ⁺ e expressão do CR1.....	42
Tabela 4 -	Frequência de leucócitos CD11b ⁺ , CD14 ⁺ e expressão do CR3 e CD14.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	<i>Allophycocyanin</i> (Aloficianina)
CR	Receptor para Complemento
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunossorbent Assay</i>
FCRL	<i>Fc receptor-like</i> (Receptor do tipo Fc)
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
FSC	<i>Forward scatter</i> (dispersão frontal)
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulation factor</i> (Fator de estimulação de colônia de granulócito-macrófago)
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i> (Glicosilfosfatidilinositol)
GP63	<i>Glycoprotein-63</i> (Glicoproteína-63)
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i>
IC	Imunocomplexos
IL	Interleucina
IT LEISH	Teste rápido imunocromatográfico para leishmaniose visceral
LCF	<i>Leishmania chemotactic factor</i> (Fator <i>Leishmania</i> quimiotático)
LPG	<i>Lypophosphoglycane</i> (Lipofosfoglicano)
LV	Leishmaniose visceral
MAC	<i>Membrane attack complex</i> (Complexo de ataque a membrana)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
MIF	Mediana de intensidade de fluorescência
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i> (Óxido nítrico sintase)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PE	<i>Phycoerythrin</i> (Ficoeritrina)
PerCP	<i>Peridinin Chlorophyll-protein</i> (Proteína clorofilperidina)
PS	<i>Phosphatidylserine</i> (Fosfatidilserina)
RIFI	Imunofluorescência indireta
SisLeish	Sistema de Informação Regional de Leishmanioses
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> (Fator de transformação do crescimento beta)
Th	T <i>helper</i> (Auxiliar)
TLR	<i>Toll-like receptors</i> (Receptor do tipo Toll)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 A Leishmaniose Visceral	14
2.1.1 Epidemiologia	16
2.1.2 O Agente etiológico	19
2.1.3 O Vetor	20
2.1.4 Características clínicas, diagnóstico e tratamento	22
2.2 Resposta Imunológica na Leishmaniose Visceral	22
2.2.1 Leucócitos	25
2.2.1.1 Neutrófilos	25
2.2.1.2 Monócitos	25
2.2.1.3 Linfócitos	26
2.2.2 O Sistema Complemento	27
2.2.2.1 Receptor para complemento tipo 3 (CR3)	28
2.2.2.2 O receptor para complemento tipo 1 (CR1)	30
3 HIPOTÉSES	32
4 OBJETIVO GERAL	32
4.1 Objetivos específicos	32
5 METODOLOGIA	33
5.1 Coleta de dados e descrição do estudo	33
5.2 Aspectos Éticos	33
5.3 Material Clínico e coleta de dados	33
5.4 Coleta de amostras	34
5.5 Delineamento experimental	34
5.6 Processamento dos leucócitos	35
5.7 Quantificação do número de CR1 e CR3 nas populações celulares por citometria de fluxo	35
5.7.1 Ensaio de citometria de fluxo	35
5.8 Análises Estatísticas	36
6 RESULTADOS	37
6.1 Perfil clínico e epidemiológico dos pacientes	37
6.2 Estratégia de análises em gate para observação da frequência e expressão do CD35/CR1 e CD11b/CR3 na membrana dos leucócitos	40
6.2.1 Neutrófilos	44
6.2.2 Monócitos	47

6.2.3 <i>Linfócitos</i>	51
7 DISCUSSÃO	53
8 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) popularmente conhecida como Calazar, é uma antropozoonose, tropical, negligenciada, de ampla distribuição mundial, com alta incidência, morbidade e mortalidade. Tem por principal agente causador a *Leishmania infantum* e de transmissão pela picada da fêmea do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. Devido as crescentes mudanças ambientais, levou a proximidade de reservatórios da doença ao homem, adaptação ambiental do vetor, expansão da doença para zonas periurbanas e urbanas, passando a conviver juntos no mesmo nicho ecológico vetor, reservatório e o homem.

O processo de estabelecimento da doença leva ao desequilíbrio do sistema imune, através estratégias evolutivas do parasita que favorecem a inibição da ativação do complemento, amplificação no processo de quimioatração de neutrófilos, aumento de citocinas imunoreguladoras, mudanças no padrão de resposta imune celular para o tipo Th2 anti-inflamatório, alteração morfológica do parasita no interior de macrófagos, ativação policlonal de linfócitos B, hipergamaglobulinemia, formação de imunocomplexos e disseminação do parasita no hospedeiro.

Dentre os eventos que seguem a evasão ao sistema imune, está a relação do parasita com os receptores para complemento no processo de infecção de células fagocíticas. Os receptores para complemento do tipo 1 - CR1 e do tipo 3 – CR3, estão presentes nas células fagocíticas, atuando na função de adesão, migração e depuração de microrganismos através da ligação dos fragmentos C3b e iC3b respectivamente, seus ligantes naturais.

Na LV o processo exploratório pela *Leishmania* ocorre através da relação de glicoconjungados (LPG e GP63) presentes na sua superfície de membrana, com os fragmentos do complemento C3b e iC3b, e ligação a receptores para complemento presentes em leucócitos. A internalização do parasita em células fagocíticas pela utilização de receptores para complemento, ainda não está elucidado; sendo assim, os receptores para complemento CR1 e CR3 podem sofrer modulação quanto a expressão em leucócitos de pacientes com a doença.

Foi investigado a expressão dos receptores CR1 e CR3 em leucócitos de pacientes com LV no momento da admissão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As Leishmanioses são um complexo de doenças tropicais negligenciadas que acometem mamíferos, dentre eles o homem. Nas últimas duas décadas, ultrapassaram novas fronteiras, tornando-se prevalentes em 98 países, três territórios e cinco continentes, afetando diretamente mais de 14 milhões de pessoas no mundo; com ocorrência de aproximadamente 1,3 milhões de casos novos registrados anualmente. (OPAS, 2016; PACE, 2014; WHO, 2015)

Dentre as doenças negligenciadas, estão entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância no mundo após a malária. Nas Américas são consideradas um problema de saúde pública devido as altas taxas de incidência, mortalidade e expansão geográfica. A persistência das leishmanioses é devido a fatores de riscos que facilitam a disseminação, incluindo alterações ambientais e climáticas, condições socioeconômicas desfavoráveis, deslocamento populacional, desnutrição e em condições imunossupressoras como na cointfecção com HIV. (OPAS, 2016; OPS, 2013; WHO, 2010)

Os parasitas do gênero *Leishmania* são responsáveis pelas diferentes formas clínicas da doença no mundo; destes, 15 espécies estão presentes nas Américas. A infecção em humanos ocorre por transmissão vetorial, ocasionando apresentação de manifestações clínicas específicas, tropismo próprio envolvendo pele, mucosas do trato respiratório superior e órgãos viscerais. A forma visceral é a mais grave, com evolução para óbito em 90% dos casos não tratados adequadamente. (OPAS, 2017; OPAS, 2016; OPAS, 2013).

2.1 A Leishmaniose Visceral

O primeiro registro de leishmaniose visceral (LV) nas Américas foi descrito em 1913 e com confirmação do primeiro caso no Brasil em 1934; foram observadas formas amastigotas de *Leishmania*, em 41 cortes histopatológicos de fígado proveniente de pacientes com suspeita clínica de óbito por febre amarela. Após 20 anos, em 1954 acontece o primeiro surto na cidade de Sobral, que registra 188 casos em poucos meses, quatro vezes o número de casos registrados no Brasil no mesmo ano. (CONTI *et al.*, 2016; GONTIJO; MELO, 2004; MARCONDES; ROSSI, 2013).

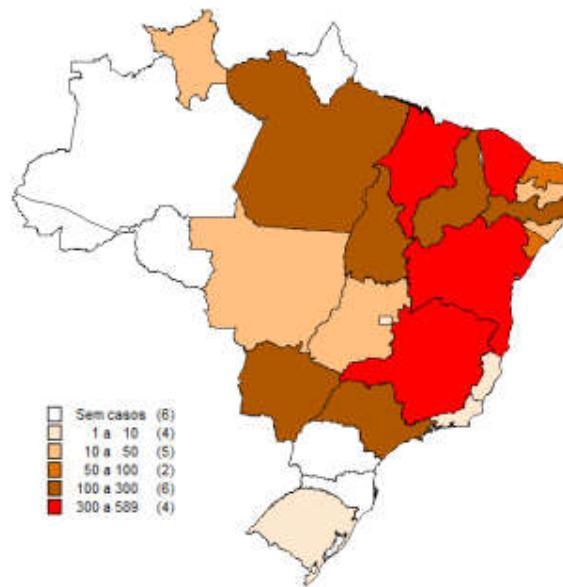
Nas Américas a LV é de caráter antropozoonótico, causada pelo protozoário da espécie *Leishmania infantum*, transmitido principalmente pela picada da fêmea do

flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis* (BRASIL, 2014; ROMERO, 2010). A doença possui período de incubação variável de 10 dias a mais de 1 ano, de início gradual e progressão rápida, apresentando viscerotropismo do parasita para órgãos como fígado, baço e medula óssea durante a evolução da infecção, que se não tratada pode evoluir para óbito (BRASIL, 2006; BRASIL, 2014; CEARÁ, 2016).

Embora a principal via de transmissão esteja associada a fêmea do flebotomíneo (*Lutzomyia longipalpis*), há relatos de outras possíveis vias de transmissão que incluem o compartilhamento de agulhas por indivíduos coinfetados por LV/HIV (ALVAR *et al.*, 2008), transplante de órgãos, provenientes de indivíduos de áreas endêmicas (ANTINORI *et al.*, 2008) e acidentes laboratoriais pelo manuseio de materiais contaminados com *Leishmania*. (MAGILL, 1995)

A LV é endêmica no Brasil, de notificação compulsória em todo território nacional conforme portaria de n.º 204 de 17 de fevereiro de 2016 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2016), possui alta incidência, ampla distribuição geográfica no país, relatada nas 20 unidades federadas (Figura 01), com transformações no padrão de transmissão da doença nos últimos quinze anos (BRASIL, 2015; SOARES, 2016).

Figura 01 - Distribuição dos casos de LV no Brasil por UF, 2015.



Fonte: SVS/MS. BRASIL, 2015

Inicialmente os indivíduos acometidos por LV eram provenientes de zonas rurais ou semiáridas do Nordeste com condições socioeconômicas desfavoráveis. Ao passar dos anos, as notificações de casos em outras regiões (Norte, Sudeste, Centro-

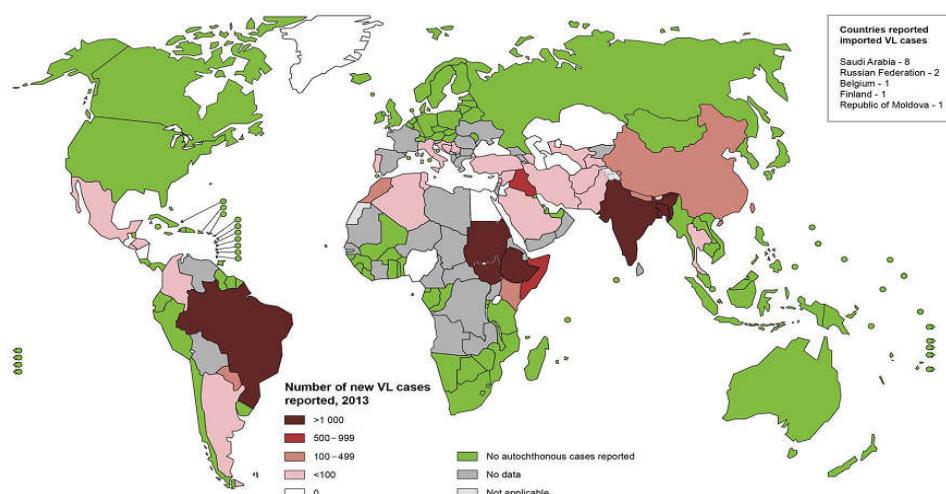
Oeste e Sul) tornaram-se frequentes, demonstrando alta capacidade adaptativa do vetor envolvido na transmissão e por consequência, na colonização do meio ambiente modificado pelo homem, provocando a dispersão da doença para áreas urbanas e periurbanas. Assim, seres humanos, vetor e reservatório passaram a conviver no mesmo nicho ecológico, contribuindo para a persistência da doença (DANTAS-TORRES, 2009; MENON *et al.*, 2016; SOARES, 2016)

2.1.1 Epidemiologia

A LV possui aspecto epidemiológico dinâmico e com condições de transmissão em constante mudança, conforme ocorram alterações climáticas, demográficas, mudanças no comportamento humano, status socioeconômico e perfil imunológicos das populações afetadas (HAILU *et al.*, 2016; WHO, 2015).

Apesar da doença historicamente estar limitada as regiões tropicais e subtropicais, a sua expansão nas últimas duas décadas cresceu exponencialmente em números de casos por infecção pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum* (Figura 02) (KEVRIC *et al.*, 2016; MARCONDES; ROSSI, 2013; PONTE *et al.*, 2011). A Organização Mundial de Saúde, contabiliza 300.000 casos novos, com estimativa de 20.000 a 50.000 óbitos anualmente; 90% destes casos estão distribuídos em 7 países, dentre eles o Brasil (*L. infantum*) (WHO, 2015).

Figura 02 – Panorama mundial de distribuição dos casos de LV, 2013

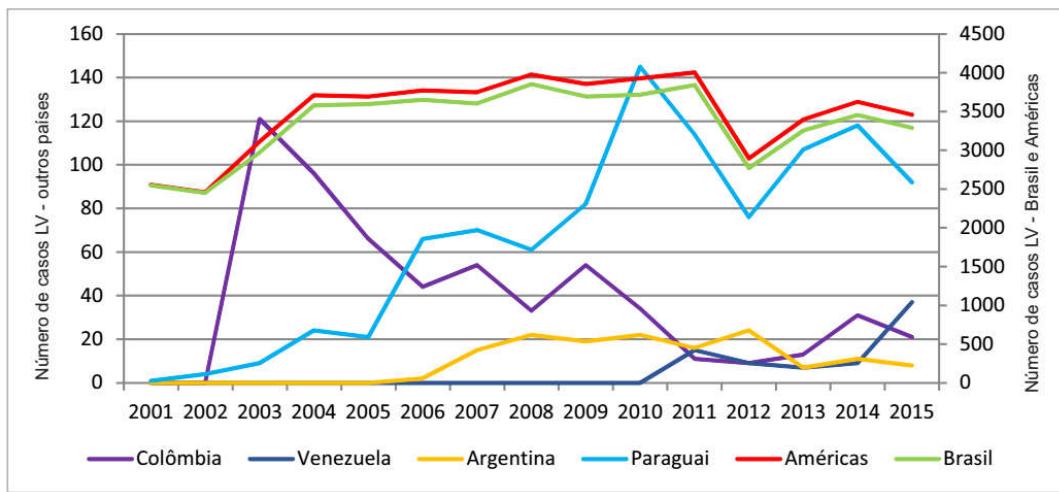


Fonte: WHO, 2015.

Nas Américas, é endêmica em 12 países, classificados segundo três cenários epidemiológicos: países com transmissão esporádica (Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Bolívia, Guiana e México), transmissão controlada (Colômbia e Venezuela) e com transmissão em expansão (Argentina, Brasil e Paraguai). Em 2015 a Organização Pan-Americana da Saúde contabilizou 3.456 casos de LV, com taxa de incidência de 2,27/100.000 habitantes e taxa de letalidade de 7,7% (OPAS, 2017).

O Brasil figura como país nas Américas com maior concentração de casos (Figura 03) e maiores taxas de letalidade da doença. No mesmo ano, o país respondeu por 95,1% (3.456) dos casos e 93,65% (251) dos óbitos nas Américas, com taxa de incidência de 2,54 casos/100.000 habitantes e taxa de letalidade de 7,8%. As maiores concentrações destes estão nos estados que compõem as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste. (OPAS, 2017)

Figura 03 - Distribuição dos casos de LV, segundo países com maior ocorrência de casos. Américas, 2001 – 2015.



Fonte: OPAS, 2017

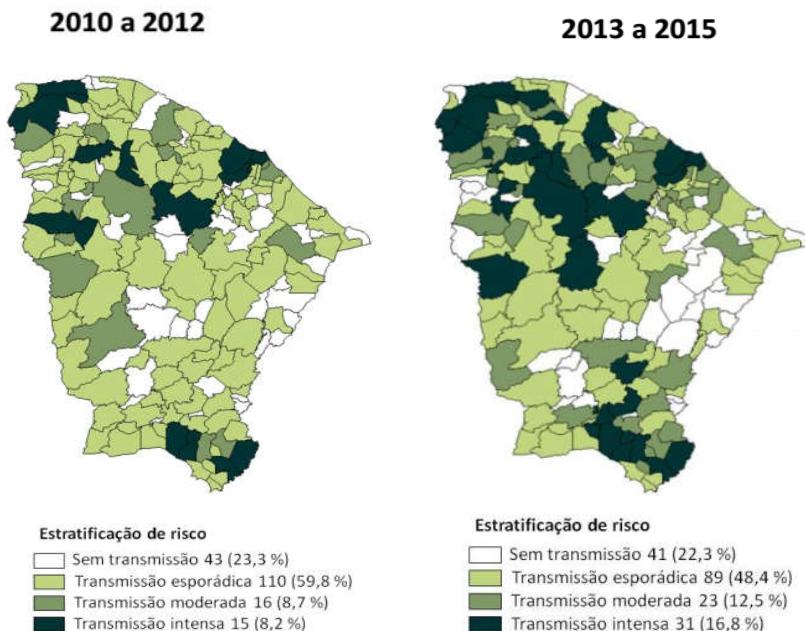
O Nordeste apresenta média de 57,1% dos casos LV no Brasil, conforme apurado entre os períodos de 2000 a 2013. No Ceará, entre os períodos de 2007 a agosto de 2016, houve registro de 5.657 casos, com incidência de 8,6/100.000 habitantes em 2007, e diminuição até o ano de 2012 (4,6/100.000 hab.), retomando o crescimento em 2013 (6,2/100.000 hab.) e 2014 (7,5/100.000 hab.) evidenciando o caráter epidêmico. (CEARÁ, 2014; CEARÁ, 2016)

No mesmo período, foram observados que a doença acometia 66% dos indivíduos do sexo masculino, com ocorrência maior entre as faixas etárias de 20 a 39 anos (24,3%), seguido de crianças com idade entre 1 a 4 anos (23,8%), e abrangência geográfica em 171 (93%) municípios do Estado, com destaque por número de casos: Fortaleza (33,2%/1.880), Sobral (6%/339), Caucaia (5,6%/318) e Maracanaú (3,8%/215). (CEARÁ, 2016)

A ocorrência de óbitos por LV entre 2007 e 2015, teve aumento de 41,7% com taxa de letalidade crescente > 7,0% distribuídos em 80 municípios. Fortaleza (132), Sobral (18), Caucaia (18), Maracanaú (17) e Juazeiro do Norte (13) aparecem com maior número de óbitos confirmados. (CEARÁ, 2016)

A transmissão da doença no Estado é classificada conforme preconizado pelo Ministério de Saúde, de acordo com a média de casos dos últimos três anos em áreas: sem transmissão, transmissão esporádica ($\geq 0,1$ e $\leq 2,3$ casos), transmissão moderada ($\geq 2,4$ e $\leq 4,3$ casos) e transmissão intensa ($\geq 55,7$ casos). Nos últimos seis anos houve um aumento na expansão geográfica da LV no Estado, com maior número de municípios apresentando transmissão intensa e moderada da doença. (Figura 04). (CEARÁ, 2016)

Figura 04 – Estratificação do risco para LV segundo município de residência, Ceará, 2010 a 2012 e 2013 a 2015.



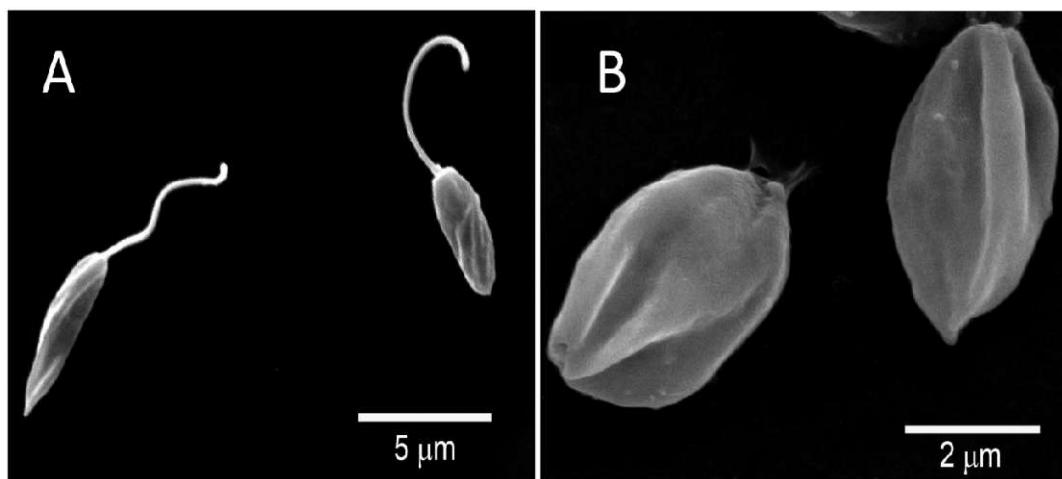
Fonte: CEARÁ, 2016

2.1.2 O Agente etiológico

A LV tem como agente etiológico *Leishmania infantum* (sin. *chagasi*), protozoário da ordem Kinetoplastida, filo Mastigophora, pertencente à família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*, pertencente ao complexo *donovani*. É a espécie mais comumente isolada nas Américas. (MENON *et al.*, 2016; PONTES *et al.*, 2011). É encontrada no ambiente silvestre em reservatórios da espécie *Licalopex vetulus* (raposa), *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato), *Didelphis albiventris* (marsupiais) e no ambiente doméstico o cão (*Canis familiaris*), considerado reservatório principal, devido a alta susceptibilidade para infecção (COSTA, 2008; DANTAS-TORRES, 2012; AFONSO, 2012).

A *Leishmania infantum* é um parasita intracelular obrigatório, digenético, com ciclo biológico heteroxênico, que inclui passagem em um vetor invertebrado a um hospedeiro mamífero e vice-versa; apresenta dimorfismo no intestino de um flebotomíneo na forma promastigota flagelada (Figura 5A) com 5 - 14 μ m de comprimento e 1,5 – 3,5 μ m de largura e outra residente em vacúolos fagolisossomais em células fagocíticas de mamíferos na forma amastigota com 2 - 4 μ m de diâmetro e flagelo encurtado (Figura 5B). Sua transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo da fêmea de *Lutzomyia longipalpis*. (GOMES *et al.*, 2017; KEVRIC *et al.*, 2016; MOUGNEAU *et al.*, 2011; YAO; WILSON, 2016)

Figura 05 – Dimorfismo da *Leishmania infantum*. A – Forma promastigota. B – Forma amastigota.



Fonte: GOMES *et al.*, 2017

2.1.3 O Vetor

No Brasil, a transmissão da LV ocorre por duas espécies de flebotomíneos da subfamília do gênero *Lutzomyia*, espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*; a primeira possui ampla distribuição no país, enquanto a segunda de ocorrência apenas no Estado do Mato Grosso do sul. São conhecidos vulgarmente por mosquito-areia, mosquito-palha, tatuquiras e birigui.(BRASIL, 2006; LIDANI *et al.*, 2017; MISSAWA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2014).

Os flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* (Figura 06) são insetos que medem cerca de 1 a 3 mm de comprimento, possuem olhos proeminentes, corpo revestidos por pelos claros, voam em saltos, alcançando pequenas distâncias, não fazem ruído audível e pousam de asas entreabertas. Possuem hábitos crepuscular e noturno, adaptados as mudanças de temperaturas e são encontrados próximos as fontes de alimento. (BRASIL, 2006; SPIEGEL *et al.*, 2016; STEBUT, 2015)

Figura 06 – Flebotomíneo - *Lu. Longipalpis*



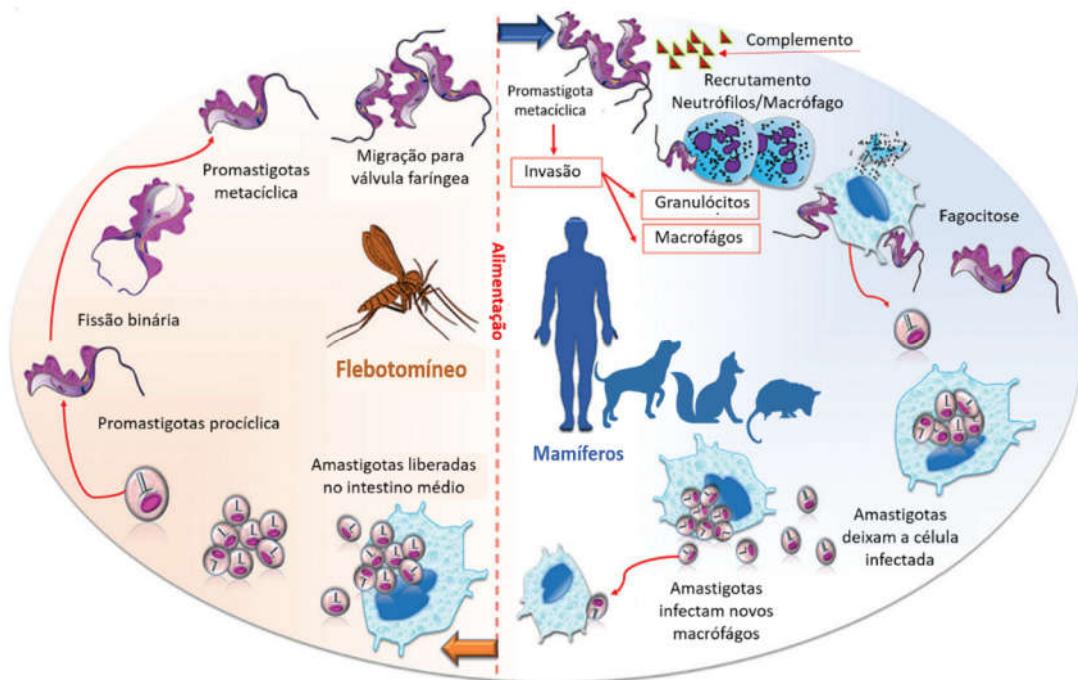
Fonte: STEBUT, 2015

Possui ampla distribuição geográfica no Brasil; eram originalmente encontradas zonas rurais e atualmente encontra-se em progressão do seu habitat para zonas urbanas e periurbanas, em meio doméstico e peridoméstico. As fêmeas são hematófagas com hábito alimentar eclético, possuem picadas indolores de maior ocorrência nas regiões dos braços, pernas, pescoço e face desprotegidos. (BRASIL,

2006; HAILU *et al.*, 2016; KEVRIC *et al.*, 2016; MARCONDES; ROSSI, 2013; PONTE *et al.*, 2011;)

Após o repasto sanguíneo da fêmea de *Lu. longipalpis*, as promastigotas metacíclicas junto com a saliva, são injetadas através da pele na corrente sanguínea e rapidamente sofrem ação pelo complemento e por células fagocíticas no hospedeiro (macrófagos, células dendríticas e neutrófilos). Em macrófagos, as promastigotas sofrem transformação morfológica para amastigotas (forma obrigatoriamente intracelular), altamente especializadas e adaptadas à sobrevivência no fagolisossoma, onde se multiplicam por fissão binária e posteriormente são liberadas no meio extracelular com infecção em novas células. O ciclo de transmissão está completo quando macrófagos infectados ou amastigotas livres são reingeridas pela fêmea de *Lu. longipalpis*, ocorrendo a transformação para a forma promastigota procíclica no intestino médio, diferenciação em promastigotas metacíclicas e a retroalimentação do ciclo (Figura 07) (KEVRIC *et al.*, 2016; LIDANI *et al.*, 2017; MOUGNEAU *et al.*, 2011; STEBUT, 2015)

Figura 07 – Ciclo de vida da *Leishmania infantum*



Fonte: Adaptado de LIDANI, 2017

2.1.4 Características clínicas, diagnóstico e tratamento

O tempo de busca por tratamento, somado a evolução da doença levam ao quadro clínico sugestivo da LV apresentado no paciente por: hepatoesplenomegalia, caracterizada pela distensão abdominal com fígado e baço palpáveis; febre, perda muscular, perda de peso ponderal, anemia, hipergamaglobulinemia, pancitopenia, palidez cutânea e de mucosas, podendo ocorrer alterações ou não de enzimas hepáticas, diarréia, tosse não produtiva, trombocitopenia associada a episódios hemorrágicos (epistaxe, gengivorragia). Podem ser observadas infecções bacterianas oportunistas, complicações cardíacas, renais, sepse e morte. (BRASIL, 2014; FALEIRO *et al.*, 2014; GRIENSVEN; DIRO, 2012; PONTE *et al.*, 2011; STEBUT, 2015;)

Como a apresentação clínica na LV não possui achados patognomônico, testes laboratoriais e imunológicos são necessários para confirmação da doença. O aspirado medular é o método padrão-ouro de diagnóstico, através da pesquisa direta das formas amastigotas no esfregaço ou isolamento parasitológico em meio de cultura. Os testes de diagnóstico imunológico para pesquisa de anticorpos contra *Leishmania* podem ser realizados através de imunofluorescência direta (RIFI), ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e testes rápidos imunocromatográficos (IT-LEISH K39); estes métodos auxiliam no manejo clínico do paciente e diagnóstico diferencial (BRASIL, 2006; BRASIL, 2014; PACE, 2014)

O tratamento é altamente recomendado na LV, devido sua evolução rápida para o óbito quando não tratada. São poucos os medicamentos antiparasitários disponíveis; no Brasil os fármacos utilizados são o antimoniato de meglumina (Glucantime®) a Anfotericina B nas suas formulações lipossomal e desoxicolato. A escolha do fármaco a ser administrado ao paciente está relacionada ao grau de evolução da doença, idade, gravidez e toxicidade da droga. (BRASIL, 2014; CHAPPUIS *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2016)

2.2 Resposta Imunológica na Leishmaniose Visceral

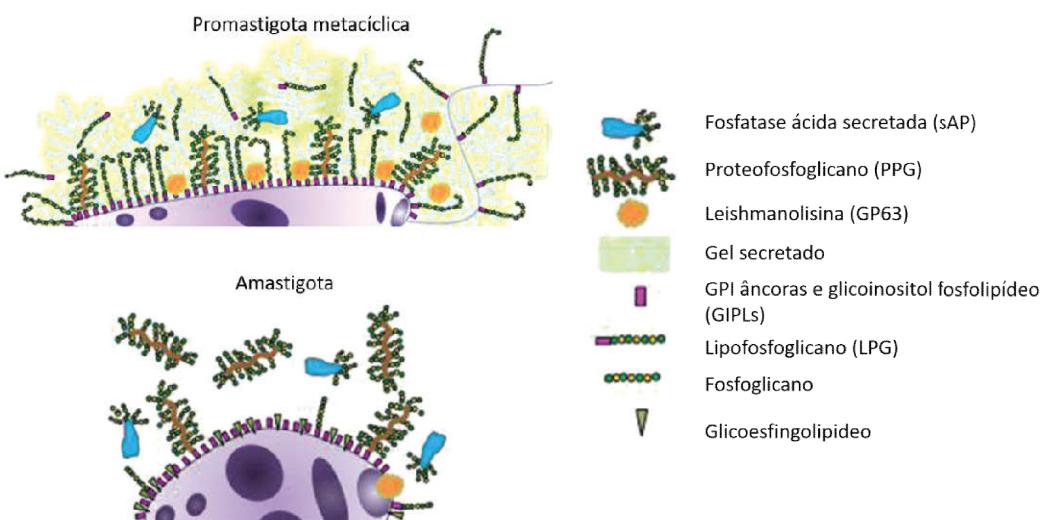
A grande maioria das pessoas infectadas não desenvolve a LV e o seu processo de estabelecimento está diretamente ligado as diversas estratégias evolutivas da *Leishmania* nas interações parasita-hospedeiro. O processo de infecção da *Leishmania* leva a um desequilíbrio imunitário generalizado, pelo aumento de citocinas imunoreguladoras IL-10 e TGF-β, afetando a resposta celular anti-*Leishmania*.

(FREITAS *et al.*, 2016; GOLLOB *et al.*, 2014; KHADEM; UZONA, 2014; ROY *et al.*, 2015; WALKER *et al.*, 2014)

Após a deposição do parasita na forma de promastigota metacíclica, associada aos componentes salivares do flebotomíneo no momento da picada, há ação vaso dilatadora, reconhecimento antícorpo-independente, seguida da ativação e opsonização por fragmentos de proteínas do complemento, aumento na migração de células inflamatórias que reconhecem o invasor através de receptores expressos na membrana e indução para uma resposta celular protetora do tipo Th1 ou para o tipo Th2 e estabelecimento da doença (FREITAS *et al.*, 2016; KHADEM; UZONA, 2014; ROY *et al.*, 2015; WALKER *et al.*, 2014)

Para evadir-se do sistema imune do hospedeiro a *L. infantum* desenvolveu estratégias sofisticadas de escape, que envolvem fatores de virulência específicos, fortemente regulados durante o seu ciclo de vida, através de mudanças estruturais e morfológicas em seu glicocálice, correlacionadas com modulação molecular e na expressão de glicoconjungados na superfície da membrana, conforme ocorram as mudanças de estágio da forma promastigota metacíclica para forma amastigota (Figura 08), apropriando-se da maquinaria celular do hospedeiro, sequestro de componentes celulares e de vias de sinalização. (CABEZAS *et al.*, 2015; MOAL; LOISEAU, 2016)

Figura 08 – Alterações de glicoconjungados de membrana conforme estágio da *Leishmania*

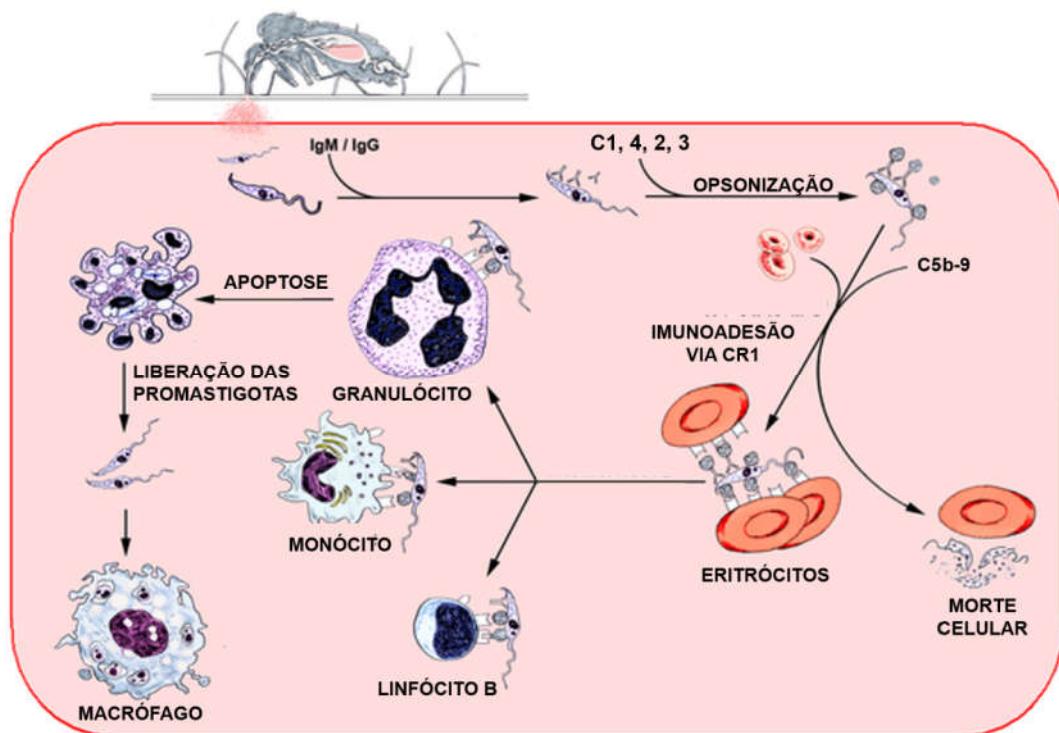


Fonte: Adaptado de CABEZAS, 2015

A disseminação no hospedeiro ocorre de duas formas: a primeira através da ligação de promastigotas e amastigotas opsonizadas por IgM/complemento aos eritrócitos, transferência para granulócitos, tornando-os apoptóticos e infecção em novos macrófagos recrutados; na segunda, promastigotas se refugiam em macrófagos dérmicos, fibroblastos, queratinócitos e células dendríticas, evitando a destruição imediata pelas vias de ativação do complemento. Em ambas as formas de disseminação, o macrófago é o principal alvo para as mudanças morfológicas do parasita e estabelecimento do mesmo no hospedeiro (ALI *et al.*, 2014; GROSS *et al.*, 2014; MORENO *et al.*, 2010; ROY *et al.*, 2015; SOONG *et al.*, 2012; WALKER *et al.*, 2014).

Para a compreensão do processo de infecção da *L. infantum*, é necessário caracterizar os eventos que ocorrem nas interações do parasita com o sistema complemento e leucócitos. Essas etapas foram demonstradas em diversos estudos *ex vivo*, com sangue humano (Figura 09), e *in vivo*, em modelos animais.

Figura 09 - Modelo de infecção experimental pela *Leishmania* no sangue humano.



Fonte: Adaptado de Moreno, 2010

2.2.1 Leucócitos

2.2.1.1 Neutrófilos

São polimorfonucleares de vida curta, que nos humanos representam 50% a 70% de todos os leucócitos circulantes, com número médio de 4400 e variações entre 1800 - 7700 células por microlitro e sangue. Possuem núcleo de dois a cinco lobos, citoplasma pálido, contorno irregular e grânulos citotóxicos preenchidos com lisozimas, collagenases, elastases e substâncias microbicidas, incluindo defensinas e catelicidinas. Constituem a primeira linha de defesa contra microrganismos, com reconhecimento e fagocitose através de receptores para complemento (CR), tipo Toll (TLRs) e Fc γ Rs. (ABBAS *et al.*, 2015; HOFFBRAND; MOSS, 2013; MAYADA *et al.*, 2014; MURPHY, 2014)

O recrutamento de neutrófilos na LV depende de sinais específicos fornecidos pela liberação de citocinas e quimiocinas, induzidas pelos componentes da saliva do flebotomíneo. As promastigotas metacíclicas que conseguem evadir-se da ação do complemento, liberam fator *Leishmania* quimiotático (LCF) que amplifica a atração de neutrófilos e fagocitose mediante opsonização pelo iC3b do complemento, com ligação a receptores específicos. (MOAL; LOISEAU, 2016; WALKER *et al.*, 2014)

Internalizadas, a LPG das promastigotas inibem a fusão dos lisossomas e a LCF (fator quimiotático) liga-se a receptores de lipoxina-A4 (ALX) que desativa a explosão oxidativa. Promastigotas apoptóticas induzem a expressão de fosfatidilserina (PS), recrutando macrófagos envolvidos na depuração de neutrófilos senescentes, o que os torna permissivos para o crescimento do parasita. (MOAL; LOISEAU, 2016; WALKER *et al.*, 2014)

2.2.1.2 Monócitos

Os monócitos são provenientes de um precursor mielóide na medula óssea, constituem de 3% a 8% dos leucócitos no sangue, possuem forte interação com o endotélio vascular, respondendo a sinais endoteliais e subendoteliais. São rapidamente recrutados para o local da infecção e tecidos danificados, através da estimulação de citocinas e diferenciação em macrófagos e células dendríticas. São classificados em

subpopulações distintas: monócitos clássicos, intermediário e não clássico. (ABBAS *et al.*, 2015; HOFFBRAND; MOSS, 2013; MURPHY, 2014; ROJAS *et al.*, 2015; SHI; PAMER, 2011)

Os sinais pró-inflamatórios na infecção por microrganismos induzem a emigração de monócitos da medula óssea e circulantes no sangue para sítios inflamatórios, através da regulação positiva de moléculas de adesão de células endoteliais, transferindo o antígeno para células dendríticas. Na infecção monócitos podem se diferenciar em macrofágos clássicos (M1), com forte resposta pró-inflamatória microbicida, ativação linfocitária e eliminação do microrganismo ou em macrofágos alternativos (M2), com forte resposta anti-inflamatória, reparação tecidual e cicatrização. (ABBAS *et al.*, 2015; MURPHY, 2014; ROJAS *et al.*, 2015; SHI; PAMER, 2011)

Na LV a *Leishmania* é transferida dos eritrócitos para monócitos clássicos circulantes, com ajuda de receptores para complemento e internalizada em vacúolos, induzindo a uma resposta inflamatória que inclui a produção de TNF e iNOS, estimulando a diferenciação para macrófagos alternativos (M2) anti-inflamatórios. (ROJAS *et al.*, 2015; SHI; PAMER, 2011)

O processo de evasão do macrófago pelo parasita inclui: perda das moléculas microbicidas pelo aumento da produção de IL-10, deslocamento do colesterol de membrana levando a uma maior fluidez e inibindo a capacidade de exibir抗ígenos parasitários; alteração na sinalização; modulação para uma resposta celular por linfócitos T do tipo Th2 anti-inflamatória, levando ao aumento da arginase e supressão da produção do óxido nítrico (NO); inibição da expressão de MHC-II; o que promove o estabelecimento da doença, mudança da forma promastigotametacíclica para amastigota, replicação e persistência intracelular, disseminação do parasita e infecções latentes de longo prazo que podem levar a reativação da doença após anos ou décadas da infecção primária. (BHATTACHARY *et al.*, 2015; MOAL; LOISEAU, 2016; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2015; SHI; PAMER, 2011; WALKER *et al.*, 2014)

2.2.1.3 Linfócitos

Os linfócitos são células pertencentes a imunidade adaptativa, que expressam receptores para uma alta variedade de抗ígenos em sua superfície. Em um adulto saudável são cerca de 1600 a 2200 células/mm³ (2%) no sangue e sua maior população (65%) nos órgãos linfoides (baço e linfonodos). Existem dois tipos de

linfócitos: linfócitos T e B, que consistem em subgrupos distintos, com diferentes funções no sistema imune. (ABBAS *et al.*, 2015; HOFFBRAND; MOSS, 2013; MURPHY, 2014)

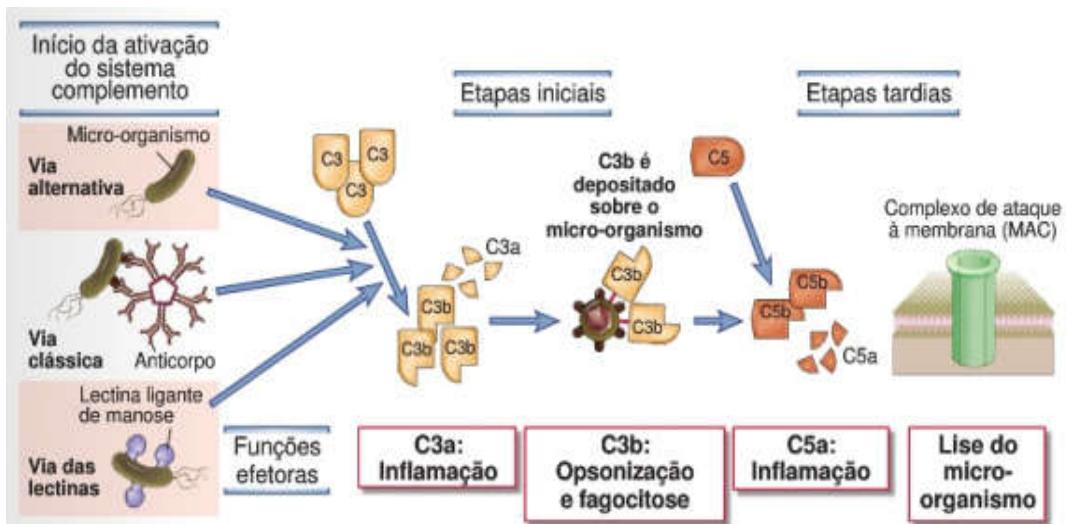
Os linfócitos T representam 80% dos linfócitos, dividem-se em três classes: morte - células T citotóxicas (T CD8+), ativação - células T auxiliares (T CD4+) e regulação - células T regulatórias (T reg). Linfócitos T CD4+ produzem sinais adicionais essenciais, que influenciam o comportamento de outras células imunes e diferenciação para células efetoras do tipo Th1, ativação de macrófagos e auxílio a linfócitos B na produção de anticorpos ou do tipo Th2 com auxílio a linfócitos B na produção de anticorpos. Os linfócitos B representam 20% dos linfócitos participando na imunidade humoral, que quando ativados se diferenciam para plasmócitos e produção de anticorpos. (ABBAS *et al.*, 2015; HOFFBRAND; MOSS, 2013; MURPHY, 2014)

Cerca de uma semana após a deposição de *Leishmania* pelo vetor, são geradas células T CD4 específicas que migram para o local da infecção onde se acumulam. A proteína GP63 derivada do parasita é capaz de atenuar a resposta imune com comprometimento da proliferação de células T CD4+, aumento da produção de IL-10, diferenciação da resposta celular do tipo 2 (Th2) e desativação de macrófagos através do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II), com prevalência e disseminação do parasita (BOGGIATTO *et al.*, 2010; CHONG *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2015). A ativação policlonal de linfócitos B tem por consequência hipergamaglobulinemia de IgM e IgG e altos níveis de imunocomplexos circulantes formados por抗ígenos de *Leishmania* ligados a auto-anticorpos. (FALEIRO *et al.*, 2014; SINGH; SUNDAR, 2014)

2.2.2 O Sistema Complemento

O sistema complemento é um dos primeiros mecanismos de defesa do hospedeiro contra patógenos, que consiste em mais de 30 proteínas solúveis presentes no sangue. A ativação do complemento envolve cascadas proteolíticas de reações enzimáticas, que resultam em produtos com funções efetoras e reconhecimento de moléculas na superfície de microrganismos em três diferentes vias: via clássica, via alternativa e via das lectinas, todas as vias convergem para a proteína central do complemento C3 e formação de subprodutos C3a e C3b (Figura 10). (ABBAS, 2015; GOTO, 2013; SARMA; WARD, 2011)

Figura 10 - Esquema de ativação das vias do complemento



Fonte: Abbas, *et al.*, 2015

O C3a, menor fragmento liberado, estimula a inflamação agindo como quimoatraente para neutrófilos e monócitos, atua como vasodilatador, estimula a produção de histamina nos mastócitos e a explosão oxidativa nos neutrófilos. O C3b liga-se covalentemente a superfície dos microrganismos (opsonina), promovendo a fagocitose, atuando na interligação das três vias de ativação do complemento e formação complexo de ataque a membrana (MAC). (ABBAS *et al.*, 2015; GOTO *et al.*, 2013; MURPHY, 2014; SARMA; WARD, 2011)

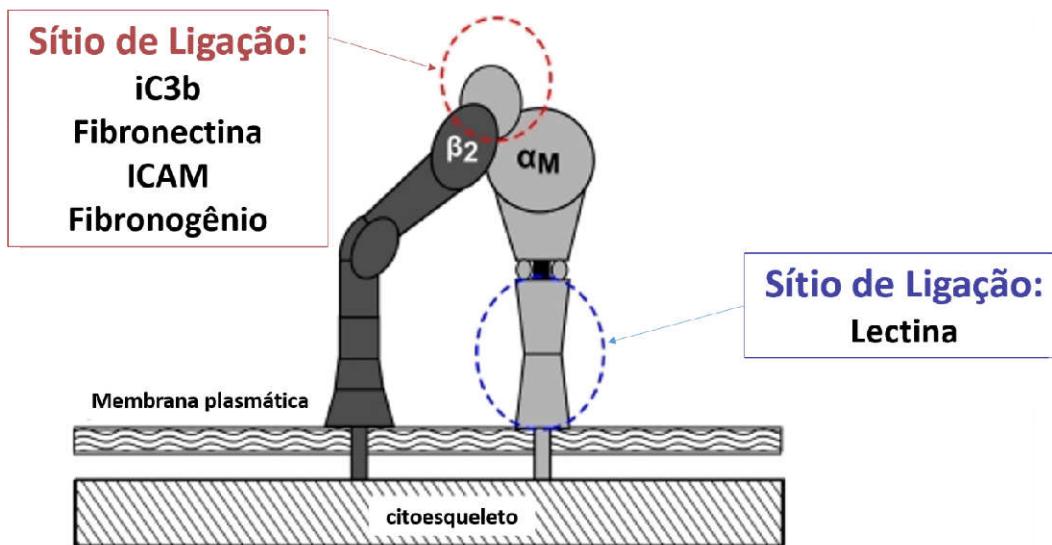
As formas promastigotasmetacíclicas e amastigotas são mais resistentes a lise pelo complemento devido a modificação do glicosilfosfatidilinositol (GPI) que dificulta formação do MAC na membrana do parasita. Estas formas evitam a destruição imediata, desativando as vias clássicas e alternativa através do aumento da expressão da proteína quinase C, que fosforila os componentes C3, C5, C9, inibição da fusão entre fagossoma e lisossoma pela LPG expresso na membrana, e clivagem do C3b ligado a superfície pela leishmolisina GP63 a uma forma inativa iC3b, que facilita a entrada em macrófagos, monócitos e neutrófilos, mediada por receptores para complemento. (GUPTA *et al.*, 2013; UENO; WILSON, 2012; WALKER *et al.*, 2014)

2.2.2.1 Receptor para complemento tipo 3 (CR3)

O receptor para complemento do tipo 3 – CR3 (CD11b/CD18) também conhecido como Mac-1 e $\alpha_M\beta_2$, pertence à família das integrinas, contendo uma cadeia β e diferentes subunidades α (Figura 11). Este receptor é altamente expresso na ativação

de neutrófilos e fagócitos mononucleares, com importante papel na adesão, migração celular depuração de microrganismos, células tumorais e apoptóticas através da fagocitose. O seu ligante natural é o fragmento inativado de C3 (iC3b), mas pode se ligar ao fibrinogênio e aumentar as funções antimicrobianas, e ao ICAM-1 no processo de adesão celular. (LUKÁCSI *et al.*, 2017; ROSEN; LAW, 1990; ROSS; VETVICKA, 1993)

Figura 11 – Estrutura do receptor para complemento tipo 3 (CR3)



Fonte: Adaptado de O'BRIEN *et al.*, 2012

Na infecção por microrganismos, após ativação de células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos e monócitos) o processo de migração celular ocorre mediada por integrinas, até o local dos invasores. As células fagocíticas capturam e internalizam microrganismos utilizando vários receptores de superfície, dentre eles estão os receptores para complemento, que atuam no reconhecimento de patógenos opsonizados por fragmentos do C3 (C3b e iC3b). As integrinas também são utilizadas com artifício de entrada em células hospedeiras na infecção por microrganismos. (LEY *et al.*, 2007; SANDOR *et al.*, 2016; DUPUY *et al.*, 2008)

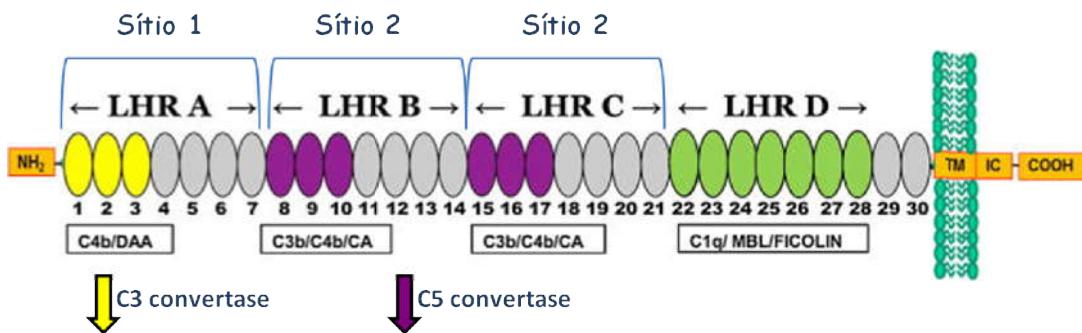
Estudos *in vitro* demonstram a importância na associação de receptores para complemento na fagocitose de microrganismos; CR3 e CR4 associados ajudam na fagocitose de *S. aureus* (LUKÁCSI *et al.*, 2017), *Mycobacterium tuberculosis* (HIRSH *et al.*, 1994), *Cryptococcus neoformans* (LEVITZ, 2002), *Mycobacterium leprae* (SCHLESINGER; HORWITZ, 1991), opsonizados iC3b e na formação de podossomas em macrófagos, monócitos e neutrófilos. Nas leishmanioses o parasita através da GP63 expressa na membrana, cliva o fragmento C3b em iC3b, que facilita a ligação ao CR3 e

por consequente o aumento na adesão celular e fagocitose em macrófagos (UENO, 2011, 2012)

2.2.2.2 O receptor para complemento tipo 1 (CR1)

O CR1 é uma glicoproteína polimórfica de cadeia única, possui 30 porções de proteínas de repetição de controle para complemento (CCPs), com dois sítios de interação com os fragmentos C3b e C4b do complemento (Figura 12). O sítio 1 é responsável pelo decaimento da atividade da C3 convertase; o sítio 2 liga-se com eficiência com ambos os fragmentos C3b e C4b mas, com alta afinidade para C3b, além de ser cofator indispensável para o decaimento da atividade da C5 convertase (JAVA *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2014; ROCHOWIAK; NIEMIR, 2015; STOUTE, 2011).

Figura 12 - Estrutura do receptor para complemento tipo 1 (CR1)



Fonte: Adaptado de JAVA *et al.*, 2015

É encontrado na superfície de eritrócitos, neutrófilos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, linfócitos T e B, podócitos e células dendríticas. As funções deste receptor na resposta imune são: indução da fagocitose em monócitos e neutrófilos, através da ligação com os fragmentos C3b e C4b; apresentação de抗ígenos de linfócitos B para linfócitos T; regulação das vias do complemento pela diminuição das convertases C3 e C5; imunoaderência de imunocomplexos circulantes (ICC) em eritrócitos, formados pela ligação a抗ígenos por fragmentos do complemento C3b, C4b e anticorpos (CRICKLIN *et al.*, 2010; JAVA *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2014; ROCHOWIAK; NIEMIR, 2015).

Estudos têm demonstrado que a diminuição na expressão do CR1 favorece o desenvolvimento de doenças autoimunes, como observado na anemia hemolítica

autoimune, síndrome de Goujerot-Sjogren (ROSS *et al.*, 1985), artrite reumatoide (KUMAR *et al.*, 1994), glomerulonefrite (ARORA *et al.*, 2000) e no lúpus eritematoso sistêmico (MOULDS *et al.*, 1996). Nas doenças infecciosas, o polimorfismo encontrado no CR1 está diretamente ligado a resistência à malária pelo *Plasmodiumfalciparume* à suscetibilidade pelo HIV, aumentando a replicação do vírus em monócitos e linfócitos T CD4. (MOUHOUB *et al.*, 2000; THIEBLEMONT *et al.*, 1995)

Carneiro (2015) avaliou a expressão do CR1 em eritrócitos de pacientes com leishmaniose visceral no momento da admissão (antes do tratamento) e na alta hospitalar (pós tratamento) e observaram que a expressão do CR1 era diminuída em pacientes antes do tratamento e após o tratamento os níveis do receptor expresso nos eritrócitos se restabeleciam, quando comparados a indivíduos saudáveis.

Os mecanismos que envolvem a expressão e modulação do CR1 em leucócitos, estão diretamente ligados ao padrão de citocinas transcritas e aos efeitos das mesmas na doença, ocorrendo variações no tipo celular e mudanças nas condições inflamatórias locais e sistêmicas (WAGNER *et al.*, 2006).

O parasita explora as opsoninas presentes no soro, pela ligação da LPG e GP63 presentes na *Leishmania*, que é ligante dos fragmentos do complemento C3b e iC3b respectivamente (COLLING, 2015). Esperamos que possa ocorrer uma relação maior entre os receptores CR1 e CR3 na ligação do parasita e que estes receptores possam ter contribuição nos subsequentes eventos no processo de estabelecimento da leishmaniose visceral.

3 HIPOTÉSES

Na Leishmaniose visceral há diferenças na expressão dos receptores para complemento CR1 e CR3 em leucócitos no sangue e estas diferenças contribuem na evolução clínica da doença no paciente.

4 OBJETIVO GERAL

Compreender a dinâmica da expressão dos receptores para complemento tipo 1 (CR1) e tipo 3 (CR3), em leucócitos, no sangue de pacientes com Leishmaniose visceral e sua correlação com estado clínico.

4.1 Objetivos específicos

- Analisar a expressão de CR1, CR3 em neutrófilos CD11b⁺, monócitos CD14⁺, linfócitos T CD3⁺, linfócitos B CD19⁺ de pacientes com leishmaniose visceral e de indivíduos saudáveis;
 - Comparar a expressão de CR1, CR3 em neutrófilos CD11b⁺, monócitos CD14⁺, linfócitos T CD3⁺, linfócitos B CD19⁺ de pacientes com leishmaniose visceral com sua expressão em indivíduos saudáveis;
 - Comparar a expressão de CR1, CR3 em neutrófilos CD11b⁺, monócitos CD14⁺, linfócitos T CD3⁺, linfócitos B CD19⁺ de pacientes com leishmaniose visceral com sua evolução clínica.

5 METODOLOGIA

5.1 Coleta de dados e descrição do estudo

Estudo de natureza experimental, prospectivo e de abordagem quantitativa realizado no período de julho de 2016 a maio de 2017.

Dezoito pacientes atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas, referência no Estado do Ceará no tratamento da Leishmaniose visceral, com diagnóstico confirmado de leishmaniose visceral, considerando aspectos clínicos, parasitológicos e sorológico (teste imunocromatográfico IT LEISH- K39), com idade a partir de 18 anos, de ambos os sexos, provenientes ou não de regiões endêmicas, virgem de tratamento ou que tenha iniciado o tratamento a menos de 24 horas.

Pacientes com sorologia positiva para anti-HBc, HbsAg, anti-HCV, anti-HIV 1/2 e HTLV I/II e que tenham associação com outras doenças infecto-parasitárias, não entrarão na pesquisa.

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

5.2 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 junho de 2016 conforme CAAE 52870716.1.5044 (Anexo B)

5.3 Material Clínico e coleta de dados

As coletas da amostra foram realizadas através busca ativa pelos pacientes nos setores de emergência, laboratório de análises clínica – coleta de sangue e enfermaria no HSJ. Os pacientes abordados foram esclarecidos a respeito do estudo, procedimentos, risco e finalidades através do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE), ocorrendo o aceite, autoriza através da assinatura (Apêndice A) e

dar continuidade com o preenchimento de ficha epidemiológica (Apêndice B) pelo entrevistador, do mesmo modo aos controles saudáveis.

Os dados complementares relevantes a pesquisa como exames realizados e tratamento administrado foram obtidos através da ficha de atendimento na emergência e do prontuário nos casos de internamento. As informações coletadas geraram um banco de dados organizados em planilha do Excel 2013 (Apêndice C).

A coleta das amostras e dados clínicos foram realizados no momento do diagnóstico confirmatório.

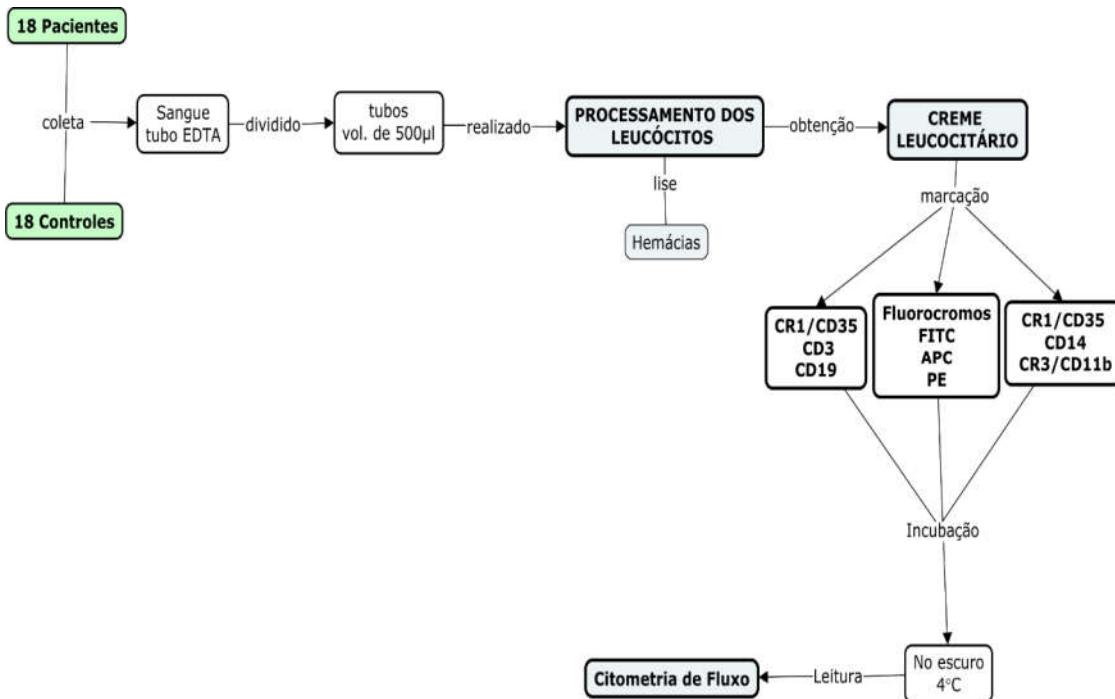
5.4 Coleta de amostras

As amostras foram coletadas por profissionais capacitados do Laboratório de Análises Clínicas do HSJ, com transporte sob refrigeração para processamento no Laboratório de Imunologia Médica da Universidade Federal do Ceará.

Dos pacientes foram colhidas duas amostras de 5 ml de sangue venoso periférico, em tubo com EDTA *Vacutainer*®, para ensaios com leucócitos.

5.5 Delineamento experimental

Figura 13 – Fluxograma do processamento das amostras



Fonte: elaborado pelo autor.

5.6 Processamento dos leucócitos

Dois mililitros de sangue total foram divididos em volumes de quinhentos microlitros em 4 tubos identificados: não marcado (NM), marcado com controle isotípico (ISO), marcado para monócitos e neutrófilos painel 1 (P1), marcado para linfócitos painel 2 (P2) e incubados por 20 minutos, à temperatura ambiente, com uma solução de tampão de lise de eritrócitos (ACK). Após a incubação, a amostra foi centrifugada por 10 minutos, 460g e lavadas duas vezes com solução de PBS e soro fetal bovino a 2% (Cultilab[®]) (tampão FACS 2%).

A camada de *buffy coat* obtida em cada tubo, foi incubada nas seguintes condições estabelecidas conforme protocolo operacional padrão desenvolvido pelo Laboratório de Imunologia Médica – LIME/UFC : tubo NM - células sem nenhuma marcação; tubo ISO - células marcadas com anticorpos sem alvo específico ligados aos fluorocromos PE, FITC e APC ; tubo P1 - células marcadas com anticorpos anti-CD35-FITC (CR1), anti-CD14-PE (monócitos), anti-CD11b-APC(neutrófilos); tubo P2 - células marcadas com anticorpos anti-CD35-FITC (CR1), anti-CD19-PerCP (linfócito B) e anti-CD3-APC (linfócito T); após marcação, foram incubadas a temperatura a 4°C, por 45 minutos, no escuro, lavadas por duas vezes com tampão FACS 2% e centrifugadas a 460g por 10 minutos.

Os sobrenadantes foram descartados e o precipitado de leucócitos foi ressuspensionado em 500 microlitros de tampão de fixação com paraformaldeído a 1% (Sigma[®]) para serem analisados no citômetro de fluxo (FACSCalibur-Becton Dickinson[®]).

5.7 Quantificação do número de CR1 e CR3 nas populações celulares por citometria de fluxo

5.7.1 Ensaio de citometria de fluxo

O tubo (ISO) com células marcadas com os fluorocromos foram utilizados para o ajuste das compensações das fluorescências, enquanto que o tubo (NM) não marcado foi utilizado para os ajustes das voltagens e do ponto de corte (*threshold*). A definição

de células positivas e negativas foi dada pelo controle isotípico, a fim de fixar as *gates* e distinguir entre células coradas positivamente, autofluorescência e ligações inespecíficas.

A mediana de intensidade de fluorescência (MIF) foi utilizada para identificar as células e quantificar os níveis de expressão de CR1 (CD35) e CR3 (CD11b) em monócitos (CD14-PE), neutrófilos (CD11b-APC), linfócitos T (CD3-APC) e linfócitos B (CD19-PerCP). A análise por histograma foi utilizada para a quantificação da MIF por célula, e a análise utilizando gráfico de pontos (*dotplot*) forneceu a frequência de células positivas na *gate* para essas duas moléculas nas populações-alvo.

Durante a aquisição dos leucócitos de cada tubo, foram obtidos 5.000 eventos para *gate* R3 (PMNs), *gate* R2 (monócitos) e *gate* R1 (linfócitos) através da detecção das dispersões das luzes frontal (FSC) e lateral (SSC).

5.8 Análises Estatísticas

A análise das células marcadas foi feita através do software CellQuest (BD). Os dados obtidos de cada paciente foram organizados em planilhas do software Microsoft Excel® 2013 e, posteriormente, analisados no programa estatístico GraphPadPrism versão 6.0.

Nas análises dos dados entre pacientes e controles foram utilizados teste não pareado - teste *t* (paramétrico) para análise do CR1 e CR3 dos leucócitos.

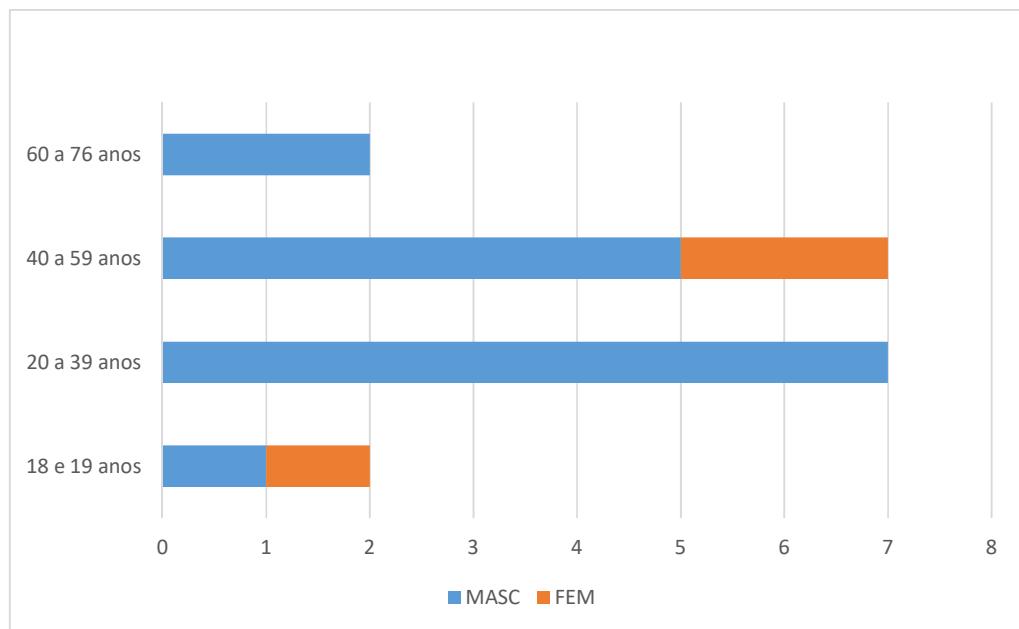
6 RESULTADOS

6.1 Perfil clínico e epidemiológico dos pacientes

Foram obtidas 18 amostras de sangue periférico de pacientes com diagnóstico confirmado de leishmaniose visceral, segundo critérios clínicos de manejo da doença e com diagnóstico laboratorial positivo para teste rápido imunocromatográfico IT LEISH-K39 que resultou em 100% dos pacientes; destes foram ainda realizadas pesquisa direta para *Leishmania* através de aspirado de medula óssea com positividade para 33% dos 18 pacientes.

O perfil epidemiológico dos pacientes mostrou que 15 eram homens e 3 mulheres com média de idade \pm DP de $40 \pm 16,87$ anos (var. min. 18 e máx 74 anos) (Figura 14); 13 provenientes da zona urbana e 5 da Zona rural (Figura 14), segundo o domicílio de residência, pertencentes aos municípios de Fortaleza (8), Quixadá (2), São Luiz do Curu (2), Apuiáres, Aquiraz, Ibaretama, Itapipoca, Miraíma e Palhano

Figura 14 – Distribuição dos pacientes por gênero e idade.



Fonte: Elaborado pelo autor

O tempo médio do início dos sintomas dos pacientes até a busca do atendimento médico no HSJ foi de $67 \pm 83,46$ variando de 14 a 365 dias. O perfil clínico dos pacientes foi distribuído, conforme a frequência dos sinais e sintomas no momento da admissão (Tabela 1). Todos os pacientes apresentaram o padrão clínico da doença no momento da admissão, com febre, aumento do volume abdominal, hepatomegalia, esplenomegalia, falta de apetite e adinamia. Pacientes que apresentaram sintomas de maior gravidade e/ou intercorrência tiveram o seguinte perfil clínico no momento da admissão para o internamento: edema de membros inferiores, dispneia, desidratação, icterícia e hiporexia

Tabela 1 - Distribuição das frequências dos principais sintomas no momento da admissão dos pacientes.

SINAIS E SINTOMAS NA ADMISSÃO	PACIENTES	
	n = 18	%
Febre	15	83
Aumento do volume abdominal	15	83
Perda de peso	13	72
Hepatoesplenomegalia	11	61
Falta de apetite	10	55
Tosse	10	55
Diarréia	3	16
Esplenomegalia	3	16
Hepatomegalia	1	5

Fonte: Elaborado pelo autor

O perfil hematológico dos pacientes demonstrou diferenças nas características frequentes da doença, apresentando anemia e trombocitopenia com maior gravidade, quando comparados entre pacientes tratados no ambulatório ou internos (Tabela 2).

Tabela 2 - Perfil hematológico dos pacientes na admissão.

PARÂMETROS	PERFIL HEMATOLÓGICO						<i>P</i> = 0,05
	Média ± DP n = 18	Min - Máx	Referência	Atendimento Ambulatorial (n = 9)	Internamento (n = 9)		
				Média ± DP	Média ± DP		
Hemoglobina (g/dL)	8,7 ± 2,3	5,6 - 14,9	11,4 - 18,0	9,98 ± 2,36	7,53 ± 1,78	0,0247	
Hematócrito (%)	27,1 ± 6,5	16,7 - 43,8	36 - 54	30,98 ± 6,11	23,7 ± 5,15	0,0148	
Leucócitos (nº. céls/mm ³)	3506 ± 2898	950 - 12.150	4.000 - 10.000	4627 ± 3514	2637 ± 1909	0,1549	
Neutrófilo (nº. céls/mm ³)	2.054 ± 1.919	608 - 7.898	4.300 - 5.300	2656 ± 2351	1452 ± 1219	0,1913	
Linfócitos (nº. céls/mm ³)	1.091 ± 701	219 - 2795	1.600 - 2.200	1294 ± 791,70	889 ± 569,90	0,2314	
Monócitos (nº. céls/mm ³)	374 ± 291	65 - 1215	840 - 1.680	475 ± 350,30	271,90 ± 186,60	0,1442	
Eosinófilos (nº. céls/mm ³)	70 ± 169	0 - 704	210 - 840	128,2 ± 229,2	12,33 ± 23,51	0,1509	
Basófilos (nº. céls/mm ³)	9 ± 15,2	0 - 54	0 - 210	9,88 ± 12,38	7,77 ± 18,12	0,7766	
Plaquetas (nº. x10 ³ céls/mm ³)	123321 ± 80058	19.000 - 334.000	150.000 - 440.000	169778 ± 85671	79233 ± 49090	0,0142	

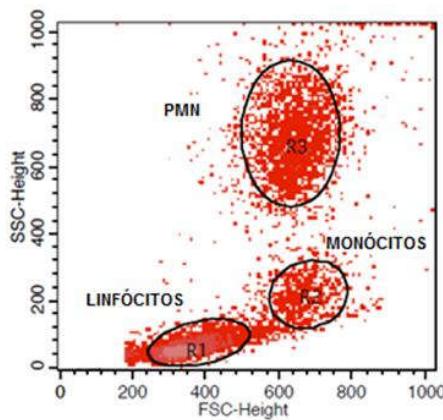
Fonte: Elaborado pelo autor. Teste *t* não paramétrico (*p*=0,05)

Um paciente apresentou quadro clínico de leishmaniose visceral grave, com anemia, hepatoesplenomegalia, astenia, anorexia, diurese espontânea, desidratação, icterícia, litíase biliar, ventilação mecânica, hematomas, choque séptico, evoluindo para óbito.

6.2 Estratégia de análises em *gate* para observação da frequência e expressão do CD35/CR1 e CD11b/CR3 na membrana dos leucócitos

No ensaio utilizado, neutrófilos, monócitos e linfócitos; possuem propriedades de dispersão da luz distintas de acordo com o tamanho (FSC) e a granularidade (SSC). Assim a medida da intensidade de fluorescência dada por FSC x SSC em uma escala linear, proporcionou a identificação das populações celulares e formação das *gates*: *gate* R1 - população de linfócitos, *gate* R2 - população de monócitos e *gate* R3 - população de neutrófilos; como demonstrado na figura 15.

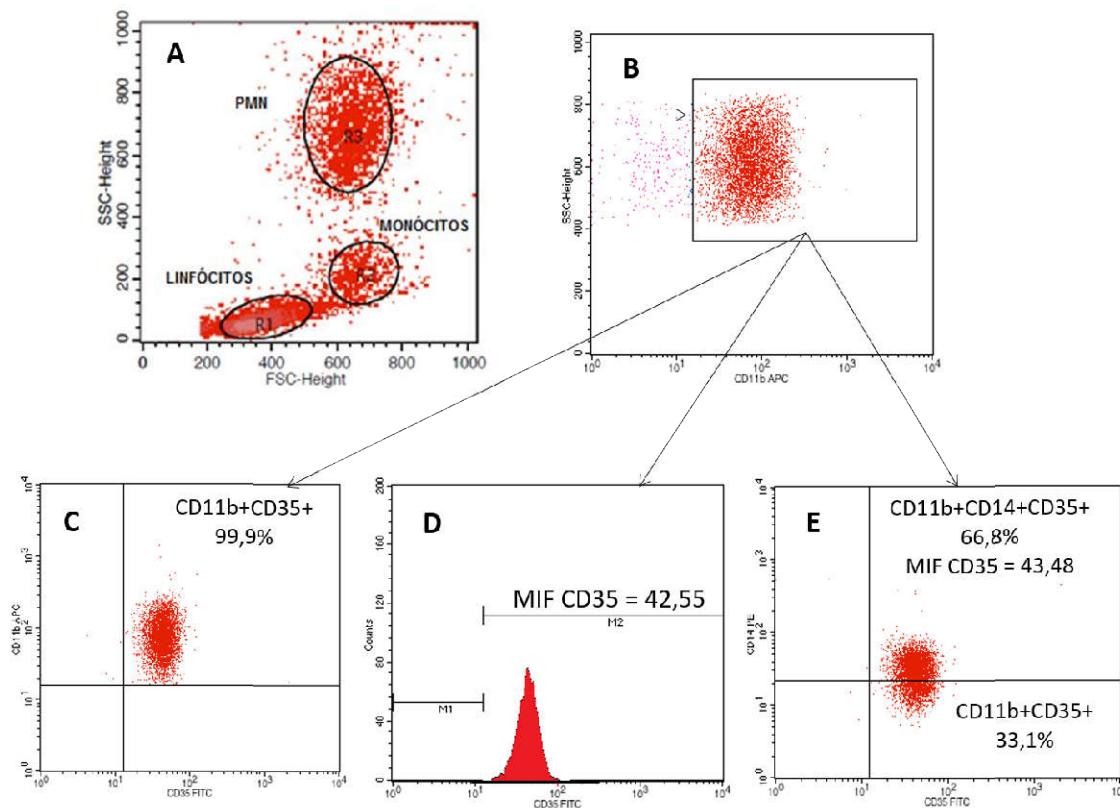
Figura 15 - Citograma da distribuição leucocitária conforme padrões de tamanho e granulosidade (FSC x SSC)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a identificação de neutrófilos, monócitos e linfócitos, em cada *gate* foi realizada a separação da população celular específica a ser estudada, conforme marcadores de superfície e emissão de luz do fluorocromo. Para parâmetros da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) e da frequência de células, serão representados através de histograma e gráfico do tipo *dot plot* (Figura 16). Análises estatísticas Tabela 3 e Tabela 4.

Figura 16 - Estratégia de análise emgate. A – Formação das *gates*. B – Separação da população celular a ser estudada. C- Análise em gráfico *dot plot* da população celular conforme marcadores de superfície celular. D – Análise da intensidade de fluorescência através de histograma. E – Análise da população celular conforme marcadores de superfície celular e intensidade de fluorescência através de gráfico *dot plot*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3 - Distribuição da frequência de leucócitos CD11b⁺, CD14⁺, CD3⁺ e CD19⁺ e expressão do CR1

LEUCÓCITOS	FREQUÊNCIA %			EXPRESSÃO MIF		
	Controle	Paciente	<i>P</i> = 0,05	Controle	Paciente	<i>P</i> = 0,05
	média ± DP	média ± DP		média ± DP	média ± DP	
PMN - neutrófios						
CD11b⁺CD35⁺	98,48 ± 2,96	96,54 ± 3,26	0,0707	39,81 ± 10,40	43,49 ± 9,26	0,2697
CD11b⁺CD14⁺CD35⁺	67,25 ± 23,29	40,96 ± 31,22	0,0014	40,63 ± 9,59	64,59 ± 38,28	0,0145
Monócitos						
CD14⁺CD35⁺	13,66 ± 14,54	46,35 ± 20,15	< 0,0001	18,27 ± 4,30	33,82 ± 9,11	< 0,0001
CD14⁺CD11b⁺CD35⁺	7,45 ± 8,90	26,94 ± 22,57	0,0017	26,16 ± 5,64	62,24 ± 51,4	0,0056
Linfócitos T						
CD3⁺CD35⁺	9,5 ± 5,12	6,94 ± 6,26	0,1893	14,02 ± 3,06	15,95 ± 7,14	0,2999
Linfócitos B						
CD19⁺CD35⁺	95,84 ± 1,83	86,43 ± 10,92	0,001	55,99 ± 8,18	65,48 ± 28,04	0,1774

Fonte: Elaborado pelo autor. Teste *t* não paramétrico (*p*=0,05)

Tabela 4 - Frequência de leucócitos CD11b⁺, CD14⁺ e expressão do CR3 e CD14

LEUCÓCITOS	FREQUÊNCIA %			EXPRESSÃO MIF – CR3		
	Controle	Paciente	<i>P</i> = 0,05	Controle	Paciente	<i>P</i> = 0,05
	média ± DP	média ± DP		média ± DP	média ± DP	
PMN - neutrófios						
CD11b⁺CD35⁺	98,48 ± 2,96	96,54 ± 3,26	0,0707	121,7 ± 43,48	69,44 ± 48,85	0,0018
CD11b⁺CD14⁺CD35⁺	67,25 ± 23,29	40,96 ± 31,22	0,0014	124,8 ± 44,02	100 ± 127,2	0,4415
Monócitos						
CD14⁺CD11b⁺	31,85 ± 26,34	59,17 ± 29,17	0,0057	48,79 ± 12,33	88,03 ± 81,5	0,0514
CD14⁺CD11b⁺CD35⁺	7,45 ± 8,90	26,94 ± 22,57	0,0017	48,79 ± 12,33	88,03 ± 81,5	0,0514
EXPRESSÃO MIF – CD14						
CD14⁺CD35⁺	13,66 ± 14,54	46,35 ± 20,15	< 0,0001	504,6 ± 129,7	534,5 ± 280,7	0,6848

Fonte: Elaborado pelo autor. Teste *t* não paramétrico (*p*=0,05)

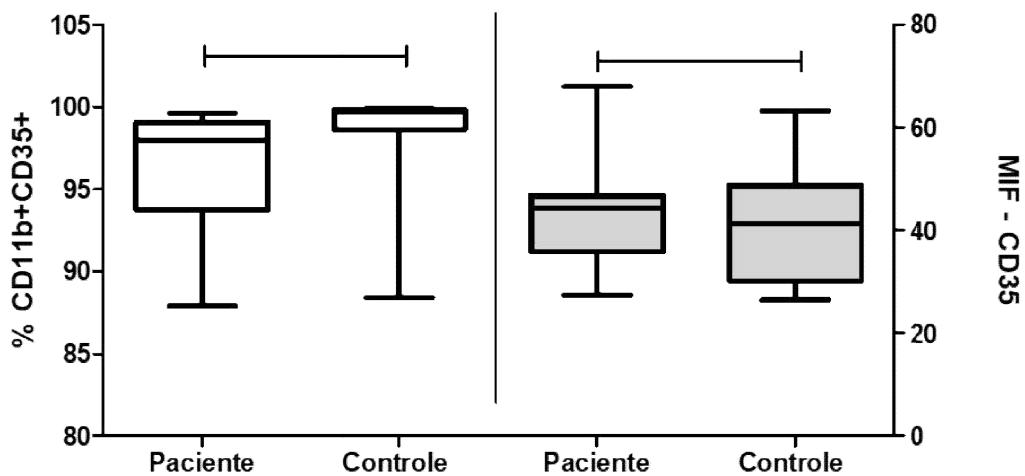
6.2.1 Neutrófilos

Cinco mil eventos foram adquiridos na *gateR3* para cada paciente e indivíduos saudáveis. As células foram separadas conforme marcadores de superfícies na membrana; população de neutrófilos $CD11b^+CD35^+$ e neutrófilos $CD11b^+CD14^+CD35^+$.

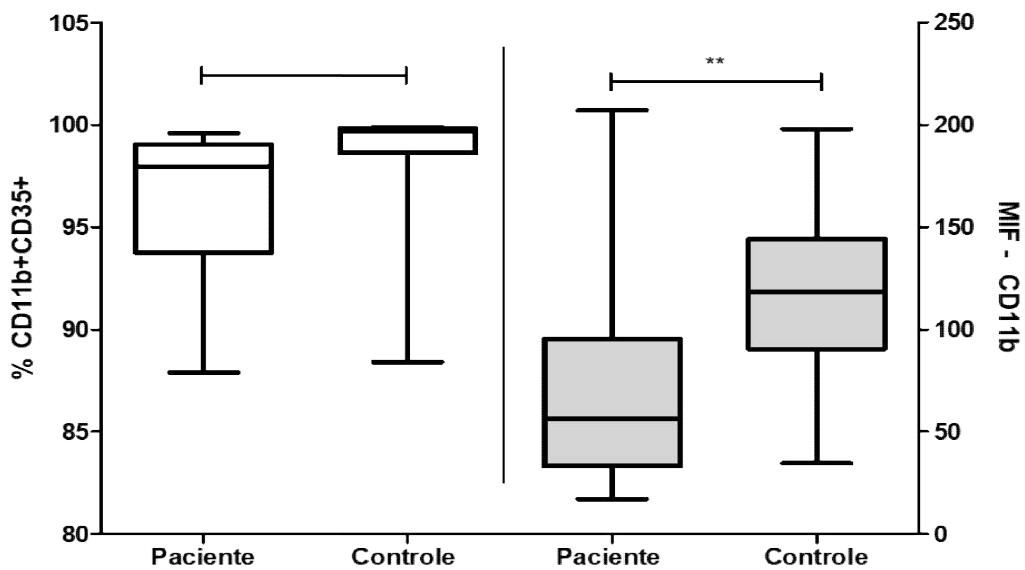
Para neutrófilos $CD11b^+CD35^+$, indivíduos saudáveis apresentaram média de $98,48 \pm 2,96$ células positivas para CR1 e média da MIF de $39,81 \pm 10,4$ para a expressão do CR1 em células positivas para a molécula. Em pacientes a média de células positivas foi de $96,54 \pm 3,23$ e média da MIF de $43,49 \pm 9,26$. Para a expressão do CR3 em células positivas para CR1 foi encontrado média de $121,7 \pm 43,48$ em indivíduos saudáveis e de $69,44 \pm 48,85$ em pacientes.

Os resultados obtidos para o CR1 (Gráfico 1), não demonstraram significância estatística entre pacientes e indivíduos saudáveis quanto a quantidade de células positivas para a molécula ($p=0,0707$) e expressão do CR1 pela MIF ($p=0,2697$). Quando observados a expressão do CR3 (Gráfico 2) em células positivas para CR1, houve diminuição na expressão do CR3 entre indivíduos saudáveis e pacientes, com significado estatístico ($p=0,0018$).

Gráfico 1 – Frequência de neutrófilos $CD11b^+CD35^+$ e expressão do CR1



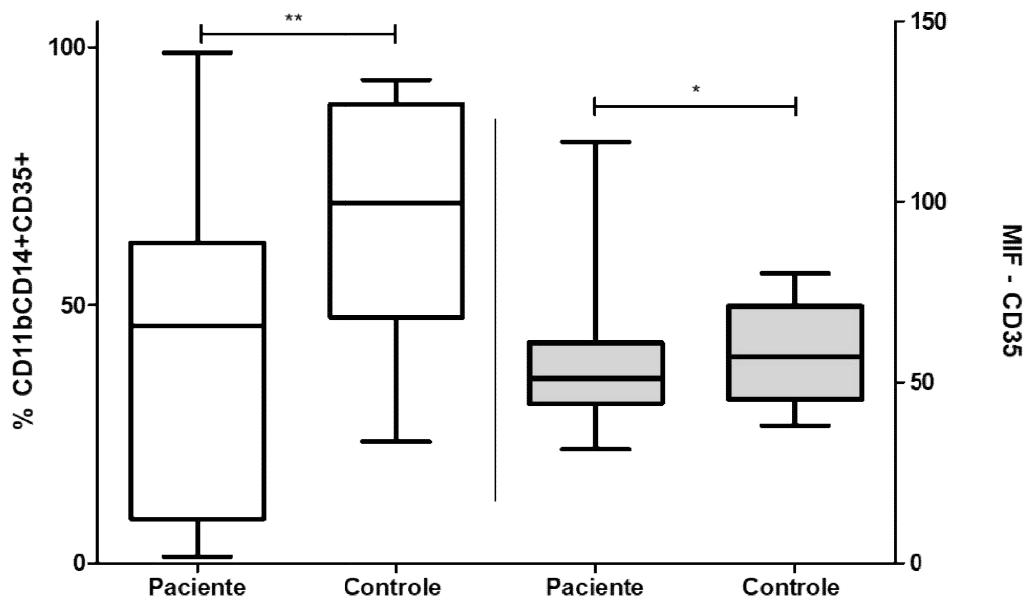
Fonte: Elaborado pelo autor. Teste t ($p=0,0707$) e Teste t ($p=0,2697$)

Gráfico 2 – Expressão do CR3 em população de neutrófilos CD11b⁺CD35⁺

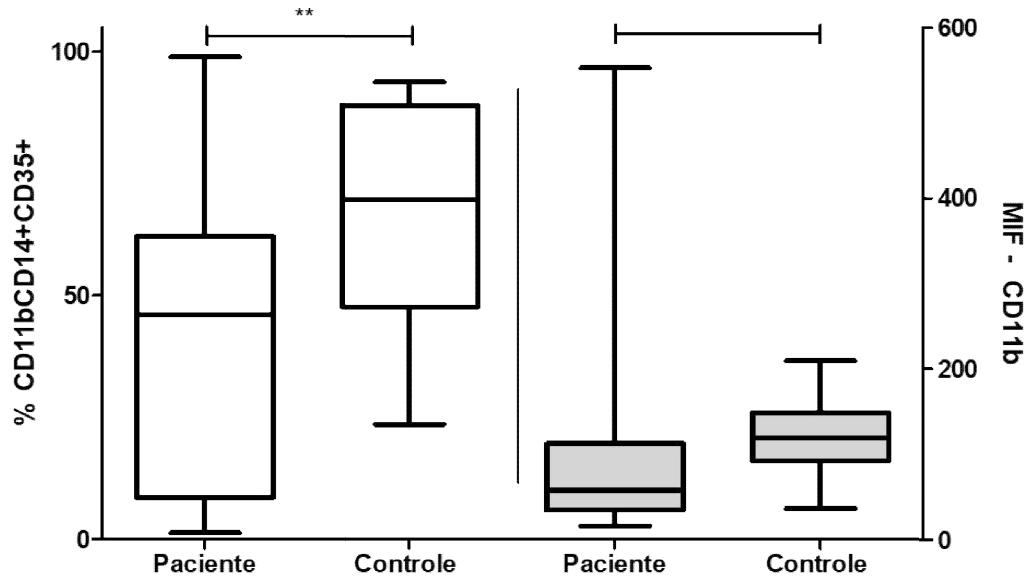
Fonte: Elaborado pelo autor. Teste t ($p=0,0707$) e **Teste t ($p=0,0018$)

Para neutrófilos CD11b⁺CD14⁺CD35⁺ indivíduos saudáveis apresentaram média de $67,25 \pm 23,29$ células positivas para CR1 e média da MIF de $40,63 \pm 9,59$ para expressão do CR1 em células positivas para a molécula. Em pacientes a média de células positivas foi de $37,69 \pm 27,67$ e média da MIF de $64,59 \pm 38,28$. Para a expressão do CR3 em células positivas para CR1 foi encontrada média de $124,8 \pm 44,02$ em indivíduos saudáveis e de $100 \pm 127,2$ em pacientes.

Os resultados obtidos para o CR1 (Gráfico 3), demonstraram significado estatístico entre pacientes e indivíduos saudáveis, com diminuição na quantidade de células positivas para a molécula ($p=0,0014$) e aumento da expressão do CR1 pela MIF ($p=0,0145$). Quando observados a expressão do CR3 (Gráfico 4) em células positivas para CR1, não houve significado estatístico ($p=0,4415$).

Gráfico 3 – Frequência de neutrófilos CD11b⁺CD14⁺CD35⁺ e expressão do CR1

Fonte: Elaborado pelo autor. **Teste t ($p=0,0014$) e *Teste t ($p=0,0145$) MIF CD35 pacientes com DP alto devido à alta expressão de CR1 paciente 22 (MIF = 116,58)

Gráfico 4 – Expressão do CR3 em de neutrófilos CD11b⁺CD14⁺CD35⁺

Fonte: Elaborado pelo autor. **Teste t ($p=0,0014$) e Teste t ($p=0,4415$) MIF CD11b pacientes com DP alto devido à alta expressão de CR3 paciente 26 (MIF = 552,32)

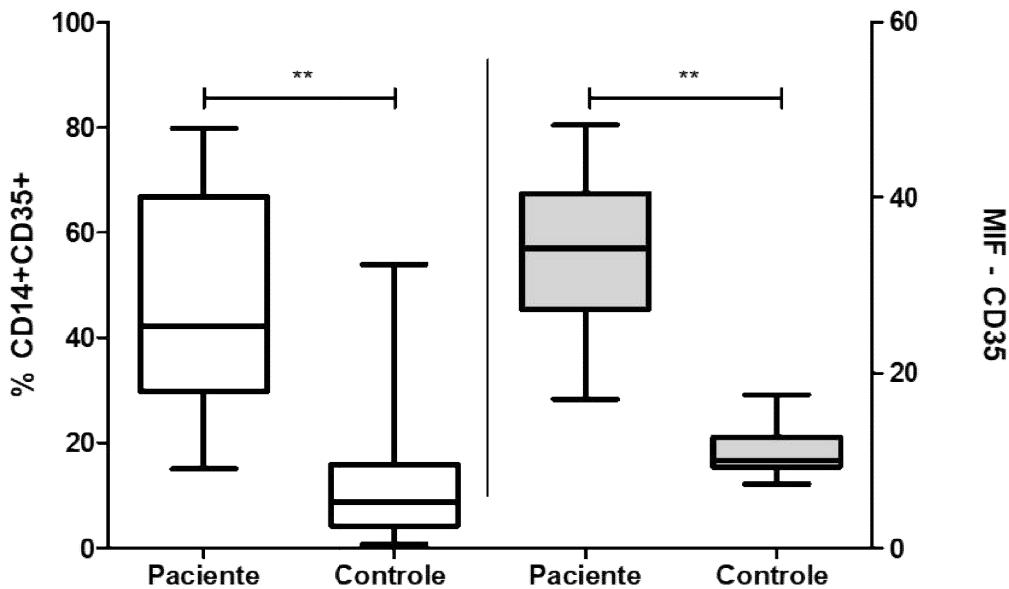
6.2.2 Monócitos

Cinco mil eventos foram adquiridos na *gateR2* para cada paciente e indivíduos saudáveis. As células foram separadas conforme marcadores de superfícies na membrana, população de monócitos $CD14^+CD35^+$ e monócitos $CD14^+CD11b^+CD35^+$.

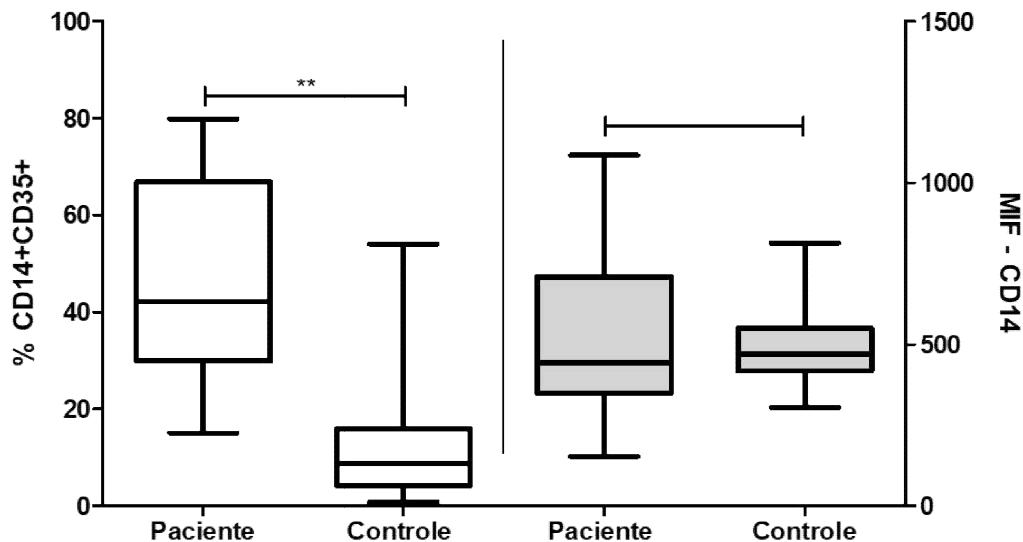
Para monócitos $CD14^+CD35^+$, indivíduos saudáveis apresentaram média de $13,66 \pm 14,54$ células positivas para CR1 e média da MIF de $18,27 \pm 4,30$ para a expressão do CR1 em células positivas para a molécula. Em pacientes a média de células positivas foi de $46,35 \pm 20,15$ e média da MIF de $33,82 \pm 9,11$. Para a expressão de CD14 foi encontrada a média da MIF de $504,6 \pm 129,7$ em indivíduos saudáveis e de $534,5 \pm 280,7$ em pacientes.

Os resultados obtidos para o CR1 (Gráfico 5), demonstraram significância estatística entre pacientes e indivíduos saudáveis com aumento na quantidade de células positivas para a molécula ($p<0,0001$) e aumento da expressão do CR1 pela MIF ($p<0,0001$). Quando observados a expressão de CD14 (Gráfico 6) em células positivas para CR1, não houve significado estatístico ($p=0,6848$).

Gráfico 5– Frequência de monócitos $CD14^+CD35^+$ e expressão do CR1



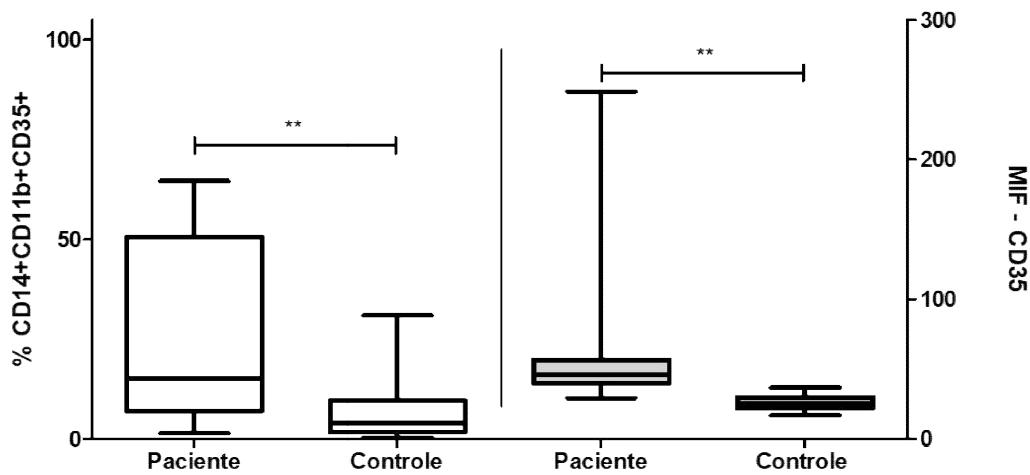
Fonte: Elaborado pelo autor. **Teste *t* ($p<0,0001$) e **Teste *t* ($p<0,0001$)

Gráfico 6 – Expressão do CD14 em população de monócitos $CD14^+CD35^+$ 

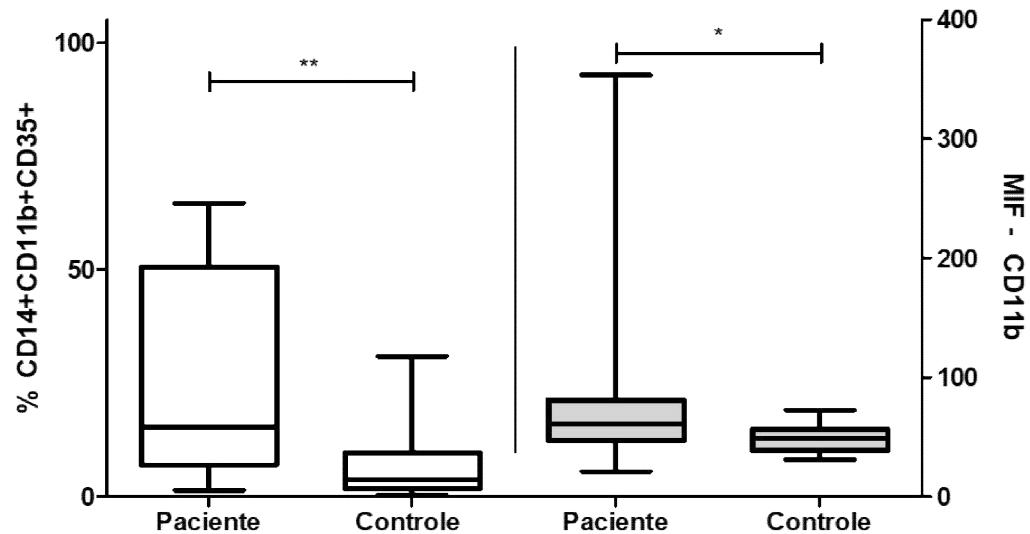
Fonte: Elaborado pelo autor. **Teste t ($p<0,0001$) e Teste t ($p=0,6848$)

Para monócitos $CD14^+CD11b^+CD35^+$, indivíduos saudáveis apresentaram média de $7,45 \pm 8,90$ células positivas para CR1 e média da MIF de $26,16 \pm 5,64$ para a expressão do CR1 em células positivas para a molécula. Em pacientes a média de células positivas foi de $26,94 \pm 22,57$ e média da MIF de $62,24 \pm 51,4$. Para a expressão do CR3 foi encontrado média da MIF de $48,79 \pm 12,33$ em indivíduos saudáveis e de MIF de $88,03 \pm 81,5$ em pacientes.

Os resultados obtidos para o CR1 (Gráfico 7), demonstraram significância estatística entre pacientes e indivíduos saudáveis com aumento na quantidade de células positivas para a molécula ($p=0,0017$) e aumento da expressão do CR1 pela MIF ($p=0,0056$). Quando observados a expressão do CR3 (Gráfico 8) em células positivas para CR1, houve significado estatístico com aumento da expressão do CR3 entre pacientes e indivíduos saudáveis ($p=0,0514$).

Gráfico 7 – Frequência de monócitos CD14⁺CD11b⁺CD35⁺ e expressão do CR1

Fonte: Elaborado pelo autor. **Teste *t* ($p=0,0017$) e **Teste *t* ($p=0,0056$)

Gráfico 8 – Expressão do CR3 em população de monócitos CD14⁺CD11b⁺CD35⁺

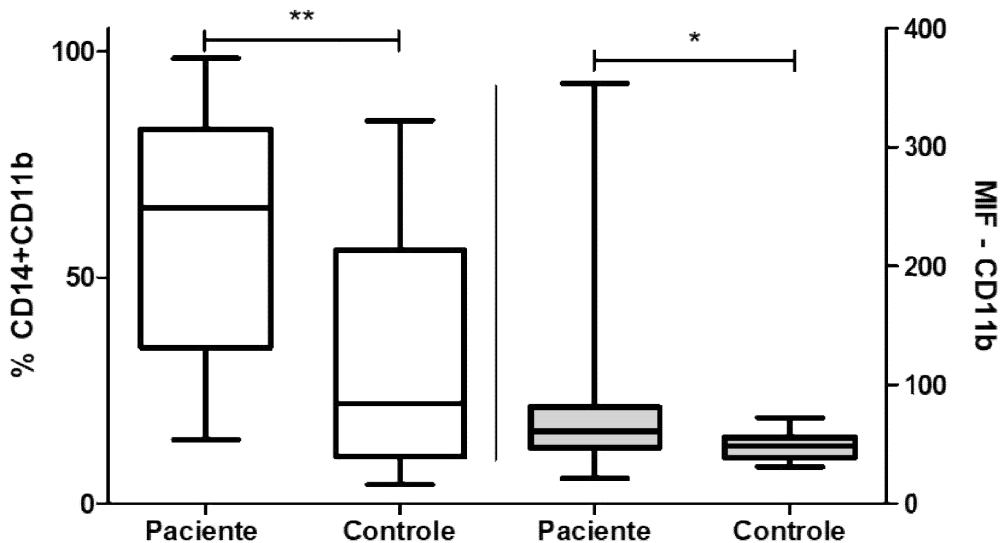
Fonte: Elaborado pelo autor. **Teste *t* ($p=0,0017$) e *Teste *t* ($p=0,0514$)

Foram analisados monócitos CD14+CD11b; indivíduos saudáveis apresentaram média de $31,85 \pm 26,34$ na frequência de células positivas para CR3 e média da MIF de $48,79 \pm 12,33$ quanto a expressão do CR3. Em pacientes a frequência de células positivas para CR3 foi de $59,17 \pm 29,17$ e média da MIF de $88,03 \pm 81,5$ na expressão do CR3.

Os resultados obtidos para o CR3 (Gráfico 9), demonstraram significado estatístico entre pacientes e indivíduos saudáveis com aumento na quantidade de células

positivas para a molécula ($p=0,0057$) e aumento da expressão do CR3 pela MIF ($p=0,0514$).

Gráfico 9 – Frequência de monócitos $CD14^+CD11b^+$ e expressão do CR3



Fonte: Elaborado pelo autor. **Teste t ($p=0,0057$) e *Teste t ($p=0,0514$)

Dentro população de monócitos $CD14^+CD11b^+CD35^+$, foi encontrada diferenças entre a expressão de CD14 em células positivas para CR1 em 5 indivíduos saudáveis. Foram observados de monócitos $CD14^{\text{high}}CD11b^+CD35^+$ e $CD14^{\text{low}}CD11b^+CD35^+$.

Para a população de monócitos $CD14^{\text{high}}CD11b^+CD35^+$ foi encontrada média de $1,1 \pm 0,91$ de células positivas e média da MIF de $22,63 \pm 2,70$ para expressão do CR1, para expressão do CR3 a média da MIF foi de $56,8 \pm 34,85$ e para expressão do CD14 a média da MIF foi de $548,7 \pm 121,2$.

Para a população de monócitos $CD14^{\text{low}}CD11b^+CD35^+$ foi encontrada média de $14,8 \pm 8,90$ de células positivas e média da MIF de $22,58 \pm 4,39$ para expressão do CR1, para expressão do CR3 a média da MIF foi de $35,58 \pm 7,79$ e para expressão do CD14 a média da MIF foi de $61,07 \pm 7,86$.

Estes resultados demonstraram diferenças entre estas populações, com significância estatística. Na população de monócitos com alta expressão de CD14, foi observada aumento na expressão de CR3; na população de monócitos com baixa expressão de CD14, foi observada baixa expressão do CR3. Quando comparados ambas

populações pela expressão do CR1, foi observado significado estatístico na quantidade de células positivas para o CR1 ($p=0,0088$).

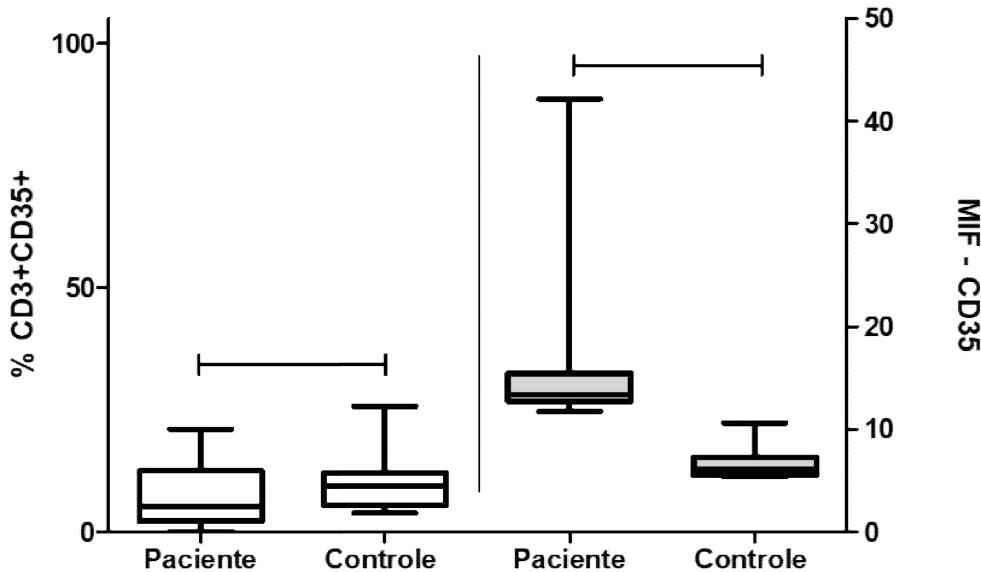
6.2.3 Linfócitos

Cinco mil eventos foram adquiridos na *gateR1* para cada paciente e indivíduos saudáveis. Foram separadas conforme marcadores de superfícies celular, população de linfócito T $CD3^+CD35^+$ e linfócitos B $CD19^+CD35^+$.

Para linfócitos T $CD3^+CD35^+$, indivíduos saudáveis apresentaram média de $9,5 \pm 5,12$ células positivas para CR1 e média da MIF de $14,02 \pm 3,06$ para a expressão do CR1 em células positivas para a molécula. Em pacientes a média de células positivas foi de $6,94 \pm 6,26$ e média da MIF de $15,95 \pm 7,14$.

Os resultados obtidos para o CR1 (Gráfico 10), não demonstraram significância estatísticas entre pacientes e indivíduos saudáveis quanto a quantidade de células positivas ($p=0,1893$) e expressão do CR1 pela MIF ($p=0,2999$).

Gráfico 10 – Frequência de linfócitos T $CD3^+CD35^+$ e expressão do CR1



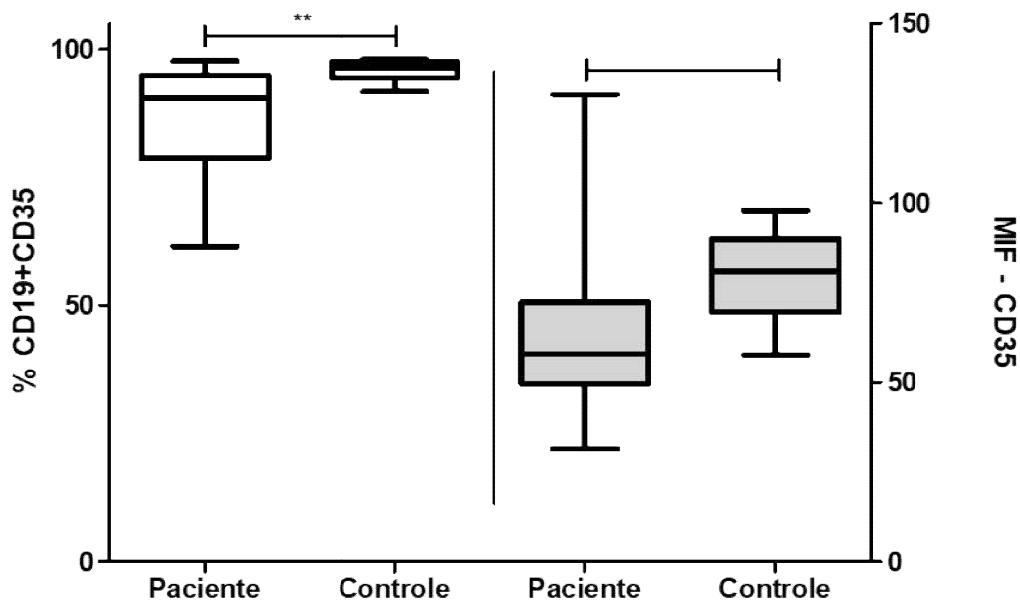
Fonte: Elaborado pelo autor. Teste t ($p=0,1893$) e Teste t ($p=0,2999$)

Para linfócitos B $CD19^+CD35^+$, indivíduos saudáveis apresentaram média de $95,84 \pm 1,83$ células positivas para CR1 e média da MIF de $55,99 \pm 8,18$ para a

expressão do CR1 em células positivas para a molécula. Em pacientes a média de células positivas foi de $86,43 \pm 10,92$ e média da MIF de $65,48 \pm 28,04$.

Os resultados obtidos para o CR1 (Gráfico 11), demonstraram significância estatísticas entre pacientes e indivíduos saudáveis, com diminuição de células positivas para o CR1 ($p=0,001$) mas, não houve significado estatístico para expressão do CR1 pela MIF ($p=0,1774$).

Gráfico 11 – Frequência de linfócitos T CD119⁺CD35⁺ e expressão do CR1



Fonte: Elaborado pelo autor. **Teste t ($p=0,001$) e Teste t ($p=0,1774$)

7 DISCUSSÃO

A Leishmaniose Visceral é uma doença endêmica, negligenciada e acomete principalmente a população em zonas de alta vulnerabilidade social. Uma vez no hospedeiro, o parasita tem por principal célula-alvo o macrófago, onde mudam a forma inicial promastigota para a forma final amastigota, ocorre sua replicação e invasão de outras células. As interações parasita-hospedeiro definem o desenvolvimento ou não da doença. A resposta protetiva será mediada pela imunidade celular através de células do tipo Th1, com ativação de macrófagos pela citocina IFN- γ e morte do parasita; a modulação da resposta protetiva para uma resposta celular do tipo Th2 de susceptibilidade, favorecem o estabelecimento da doença. (RODRIGUES *et al.*, 2016)

Os pacientes apresentaram características clínicas comuns, como descrito na literatura (BRASIL, 2014; FALEIRO *et al.*, 2014, GRIENSVEN; DIRO, 2012) apresentando, febre, perda de peso, adinamia, falta de apetite e aumento abdominal. Em adultos a doença é mais sintomática, associada a busca tardia por atendimento médico e demora no diagnóstico, conforme relatos da maioria dos pacientes.

O acometimento quanto ao gênero, afeta ambos os gêneros, porém com maior ocorrência do gênero masculino em nosso estudo de 15 homens em relação a 3 mulheres, não diferindo de outros estudos no Nordeste (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009; GOES; GERALDO, 2013; LEITE; ARAÚJO, 2013) o que sugere que a maior exposição de homens ao adoecimento, esteja ligado as condições climáticas (calor) que provocam o hábito do não uso de camisas e por consequência maior parte do corpo fica exposta a picada do flebotomíneo (COSTA *et al.*, 1990)

O comprometimento hematológico é comum na leishmaniose visceral, onde a pancitopenia foi observada em todos os pacientes, resultando a um quadro de anemia, leucopenia e trombocitopenia. Em 88 % dos pacientes, apresentaram níveis de hemoglobina menores que 10,0 g/dl, dentro dos achados frequentes revisados por Varma e Naseem (2010) que encontraram valores entre 7-10,0 g/dl na LV, mas a patogênese na anemia não é totalmente compreendida.

A leucopenia é frequentemente encontrada em pacientes com LV. Em nosso estudo, 83% dos pacientes apresentaram leucopenia e 83% apresentaram neutropenia e linfopenia. A trombocitopenia foi observada em 77% dos pacientes, com valores inferiores a 150 mil/ mm³; acredita-se que estes valores diminuídos estejam associados

a depressão medular, sequestro esplênico, hiperesplenismo e a carga parasitária na medula (VARMA; NASEEM, 2010).

Vários estudos foram realizados, com objetivo de investigar a associação do CR1 com as doenças, devido a observação de polimorfismo, múltiplas funções na resposta imune e a relação com doenças autoimunes e infecciosas. O CR1 e CR3 estão presentes nos leucócitos realizando inúmeras funções desde a regulação da cascata do complemento, adesão e fagocitose de microrganismos por neutrófilos e monócitos e na regulação da proliferação celular de linfócitos B. (LUKÁCSI *et al.*, 2017; JAVA *et al.*, 2015)

De acordo com os nossos achados, nos pacientes com leishmaniose visceral, houve uma diminuição na frequência de neutrófilos $CD11b^+CD14^+CD35^+$ positivos para CR1 e que passaram a expressar mais CR1 na membrana; observamos também, uma redução na expressão de CR3 em neutrófilos $CD11b^+CD35^+$, sugerindo a associação destes receptores na internalização do parasita por fagocitose na fase inicial e no estabelecimento da doença. Neutrófilos são as primeiras células a chegar ao local da infecção (PETER, 2008) e quando ativados aumentam a expressão do CR1 na membrana (CHANGELIAN *et al.*, 1985).

Diversos fatores podem estar relacionados com a modulação positiva/negativa destes receptores em neutrófilos, mas aqueles que explicariam melhor seriam a expressão de LPG e a GP63, receptores de membrana do parasita comumente estudado por Cabezas *et al.*, 2015. Estes receptores atuam no processo de evasão do parasita a destruição pelo complemento. A LPG liga covalentemente ao fragmento C3b e desativa a atividade da C5 convertase e formação do complexo C5b-9 (MAC), liberando na forma solúvel; a GP63 cliva o C3b solúvel em iC3b com ligação covalente ao receptor. Opsonizado por C3b e iC3b, o parasita é reconhecido pelos receptores para complemento CR1 e CR3 em neutrófilos.

Estes receptores ativam o neutrófilo, que por sua vez, passa-os a expressar mais e ter a função da fagocitose aumentada do parasita por adesão ao CR1 e CR3 com formação do fagossoma (CHANGELIAN *et al.*, 1985; ISNARD *et al.*, 2012). Esta internalização mediada por CR1 e CR3 colabora com os nossos achados na regulação negativa destes receptores, sugerindo sua internalização junto com parasita, podendo atuar na regulação da explosão oxidativa e sobrevivência intracelular como descrito por Rosenthal e cols (1996) em estudos *in vitro* com as espécies *L. donovani* e *L. major*.

A diminuição na frequência de neutrófilos positivos para o CR1 observados sugerem a translocação de receptores atuando na regulação na internalização de mais *Leishmanias*; neutrófilos infectados, tornam-se apoptóticos através da ligação do parasita a anexina A5, que estimula a produção de TGF- β modulando a sua sobrevida, que por sua vez, aumenta a expressão de fosfatidilserina (PS) prorrogando a entrada tardia dessas células em apoptose como descrito por Van Zandberger (2002).

Monócitos possuem semelhanças no padrão de expressão do CR1 e CR3 quando não ativados, podendo ocorrer uma rápida translocação destes receptores na membrana quando ativados (VAN FURTH, 1985). Observamos um aumento na frequência de monócitos CD14 $^{+}$ CD35 $^{+}$ e de monócitos CD14 $^{+}$ CD11b $^{+}$ CD35 $^{+}$ positivos para CR1, indicando uma possível estimulação por neutrófilos apoptóticos infectados, uma vez que estes neutrófilos ligam-se ao CD14, induzindo a uma estimulação na produção acelerada de IL-10 anti-inflamatória e altamente reguladora (BYME E REEN, 2002; MIKOLAJCZYK *et al.*, 2016), favorecendo a entrada destas células apoptóticas - “Cavalo de Tróia” por endocitose e infecção indireta do parasita de forma silenciosa.

Uma vez liberadas dentro do monócito, estas células passam a servir como hospedeiras potenciais nas mudanças morfológicas da *Leishmania*. A alta produção de IL-10 estimulada pelo parasita, desativa a maquinaria oxidativa da célula, tornando-o hábil a sua replicação, até serem liberadas pelo rompimento celular e infecção em novos monócitos (ANTOINE, 1990). No meio extracelular o parasita na forma amastigota, possui maior resistência ao complemento e ainda expressa suas proteínas de membrana essenciais a sua sobrevivência.

A GP63 presente na forma amastigota cliva o C3b solúvel em iC3b, ocorrendo opsonização do parasita por ambos os fragmentos, favorecendo a ligação a receptores para complemento CR1 e CR3. Observamos diferenças entre a expressão destes receptores em monócitos CD14 $^{+}$ CD35 $^{+}$ e em monócitos CD14 $^{+}$ CD11b $^{+}$ CD35 $^{+}$ de pacientes quando comparados a indivíduos saudáveis. O CR1 tem aumento na expressão em ambas as populações e o CR3 tem um aumento em monócitos CD14 $^{+}$ CD11b $^{+}$ CD35 $^{+}$.

Populações de monócitos que expressam CD14 $^{+}$ possuem aumento na expressão do CR3 em infecções por microrganismos (SERBINA *et al.*, 2008) e possuem alta relação com o receptor CR1 na internalização de *L. donovani* em ensaios *in vitro* (DA SILVA *et al.*, 1989) sugerindo que o alvo celular preferencial na leishmaniose

visceral são monócitos CD14⁺CD11b⁺CD35⁺, favorecendo a internalização do parasita e indução a diferenciação em macrófagos anti-inflamatórios.

Subpopulações de monócitos são objetos de estudo no entendimento dos processos fisiológicos e na doença. As diferenças de expressão do CD14 na membrana, desempenha inúmeras funções na fagocitose, processos inflamatórios, reparação tecidual, apresentação de antígeno, aumento na mobilidade e no comportamento de patrulhamento (PENG *et al.*, 2016; ROJAS *et al.*, 2015). O que colabora com nossos achados em indivíduos saudáveis com diferenças na expressão do CD14, observamos em 5 destes indivíduos, monócitos CD14^{high}CD11b+CD35 e monócitos CD14^{low}CD11b+CD35+ sugerindo sua importância fisiológica na homeostase, necessitando de melhor investigação e estudos adicionais.

O padrão de resposta imune desenvolvido pelo indivíduo durante a LV determina o caminho na infecção sistêmica, com a diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-12 e aumento de citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10 e TNF- α . A TNF- α é responsável pelos sintomas da febre, perda de peso, palidez e desempenha papel importante na ativação policlonal de linfócitos B (PERUHYPE-MAGALHÃES, *et al.*, 2005). A regulação da ativação policlonal está relacionado ao CR1 (KHERA *et al.*, 2008), observamos que em linfócitos B CD19+CD35+ de pacientes comparados a indivíduos saudáveis uma diminuição na frequência de células positivas para CR1, sugerindo esta possível função na regulação fisiológica no doente.

A modulação na frequência e expressão de receptores para complemento em leucócitos na leishmaniose visceral, necessita de melhor compreensão e avaliação na associação com outros receptores. O CR1 e CR3 são moléculas com valor relevante para novas pesquisas, podendo assim surgir como possíveis marcadores para o entendimento do caminho na infecção por microrganismos e suas interação parasita-hospedeiro.

8 CONCLUSÃO

- ✓ Há diferenças na expressão dos receptores CR1 e CR3 em leucócitos CD11b⁺, CD14⁺, CD3⁺, CD19⁺ em pacientes com leishmaniose visceral sem tratamento quando comparados com indivíduos saudáveis;
- ✓ Nos pacientes com leishmaniose visceral sem tratamento, a expressão de CR3 diminui na população de neutrófilos e a expressão de CR1 diminui na população de neutrófilos CD14⁺, que também se apresenta com menor frequência;
- ✓ Nesses mesmos indivíduos, tanto CR1 como CR3 tem expressão aumentada em monócitos e na população de monócitos CD11b⁺, assim como a frequência de ambas populações celulares;
- ✓ Aquelas alterações podem indicar modulação de CR1 e CR3 tanto em neutrófilos e monócitos, células-alvo da infecção, induzidas pela *Leishmania*;
- ✓ Nos pacientes com leishmaniose visceral sem tratamento, apenas a frequência dos linfócitos B CD35⁺, apresentou queda em relação aos indivíduos saudáveis, indicando um possível controle da ativação policlonal que ocorre nos indivíduos acometidos com o Calazar;
- ✓ Não foram observadas diferenças entre pacientes com leishmaniose visceral segundo a forma de tratamento, ambulatorial ou internamento, indicando não haver correlação com as diferenças na apresentação clínica da doença.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PÍLAI, Shiv. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015
- AFONSO, M.M.S.; DUARTE, R.; MIRANDA, J.C.; CARANHA, L.; RANGEL, E.F.; Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of a American visceral leishmaniasis in northeastern Brazil. **Journal of Tropical Medicine**. v.2012, article ID 858657, 5p. 2012
- ALBUQUERQUE, P. L., et al. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Rev Panam Salud Pública**. 2009; 26(4):330-3. <<http://www.scielosp.org/pdf/rpsp/v26n4/v26n4a07.pdf>> Acesso em: 02 maio. 2017
- ALI, N.; NAKHASI, H.L.; VALENZUELA, J.G.; REIS, A.B.; Targeted Immunology for prevention and cure of VL. **Frontiers in Immunology**. v.5, 2014 <<https://dx.doi.org/10.3389%2Ffimmu.2014.00660>> Acesso em: 12 jan. 2017.
- ALVAR, J.; APARICIO, P.; ASEFFA, A.; DEN BOER, M.; CAÑAVATE, C.; DEDET, J.P.; GRADONI, L.; TER HORST, R.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MORENO, J.; The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**. v.21, n.2, p.334-359, 2008 <<https://doi.org/10.1128/CMR.00061-07>> Acesso em: 12 jan. 2017.
- ANTINORI, S.; CASCIO, A.; PARRAVICINI, C.; BIANCHI, R.; CORBELLINO, M.; Leishmaniasis among organ transplant recipients. **The Lancet Infectious Diseases**. v.8, n.3, p.191-199, 2008 <[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70043-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70043-4)> Acesso em: 12 jan. 2017.
- ANTOINE, J.C.; PRINA., JOUANNE, C.; BONGRAND, P.; Parasitophorous vacuoles of *Leishmaniaamazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infect Immun** v.58, p.779-787, 1990 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1689700>> Acesso em: 02 jul. 2017
- ARORA, A. M.; JAIN, D.; DINDA A. K.; DAS, S.N.; ANAND, V.; TIWARI, S.C.; SRIVASTAVA, L.M.; *Reduced CR1 expression on erythrocytes of idiopathic focal-segmental glomerulosclerosis patients*. **Nephron.**, v.79, p.365-366, 1998. <<https://doi.org/10.1159/000045072>> Acesso em: 15 maio 2017.
- BHATTACHARY, P.; RANADHIR, D.; PRADEEP, K.D.; KRUHLAK, M; ISMAIL, N.; DRBRABANT, A.; JOSHI, A.B.; AKUE, A.; KUKURUGA, M.; TAKEDA, K.; SELVAPANDIYAN, A.; MCCOY, J.P.; NAKHASI, H.L.; Genetically modified live attenuated *Leishmania donovani* parasites induce innate immunity through classical activation of macrophages that direct the Th1 response in mice. **Infection and Immunity**. v.83, n.10, p.3800-3815, 2015 <<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00184-15>> Acesso em: 112 jan. 2017.
- BOGGIATTO, P.M.; RAMER-TAIT, A.E.; METZ, K.; KRAMER, E.E.; GIBSON-CORLEY, K.; MULLIN, K.; HOSTETTER, J.M.; GALLUP, J.M.; JONES, D.E.; PETERSEN, C.A.; Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. **Clinical Vaccine Immunology**. v.17, n.2, p.267-273, 2010. <<https://dx.doi.org/10.1128%2FCVI.00456-09>> Acesso em: 05 jun. 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose visceral, gráficos e mapas**. Ministério da Saúde, Brasília, 2015< <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/03/LV-Graficos-e-Mapas.pdf>> Acesso em: 02 jul. 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. Editora do Ministério da Saúde, 1.ed., Brasília, 2014, 812p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Editora do Ministério da Saúde, 1.ed., Brasília, 2006, 120 p.

BYRNE, A.; REEN, D.J.; Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. **Journal of Immunol.** v.168, p.1968–1977, 2002 < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC125333/>> Acesso em: 02 jul. 2017

CABEZAS, Y.; LEGENTIL.; ROBERT-GANGNEUX, F.; DALIGAULT, F.; BELAZ, S.; NUGIER-CHAUVIN, C.; TRANCHIMAND, S.; TELLIER, C.; GANGNEUX, J.; FERNERES, V.; *Leishmania* cell wall as a potent target for antiparasitic drugs. A focus on the glycoconjugates. **Organic & Biomolecular Chemistry**. v.13, p.8393-8404, 2015 < <http://dx.doi.org/10.1039/c5ob00563a>> Acesso em: 07 jun. 2017.

CARNEIRO, I.P.D.M.; **Diferenças na expressão do receptor para complemento tipo 1 (CR1/CD35) em hemácias e leucócitos de pacientes com leishmaniose visceral, antes e após o tratamento**. Dissertação de mestrado. UFC, Fortaleza – CE, 2015

CEARÁ, Secretaria de Saúde. Núcleo de Vigilância Epidemiológica. **Informe Epidemiológico Leishmaniose - 2014**. Fortaleza, p.1-12, 2014 < <http://www.saude.ce.gov.br/index.php/boletins>> Acesso em: 06 jun. 2016.

CEARÁ, Secretaria de Saúde. Núcleo de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico Leishmaniose Visceral**. Fortaleza, p.1-8, 2016 < <http://www.saude.ce.gov.br/index.php/boletins>> Acesso em: 20 jan. 2017.

CHANGELIAN, P.S.; JACK, R.M.; FEARON, D.T.; PMA induces the ligand-independent internalization of CR1 on human neutrophils. **Journal of Immunology**. v.134, n.3, p.1851-1858, 1985. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3155775/>> Acesso em: 02 jul. 2017

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M.; Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Review Microbiology**. v.5, p.873-882, 2007 <doi:10.1038/nrmicro1748> Acesso em: 08 maio. 2017.

CHONG, S.Z.; EVRARD, M.; NG, L.G.; Lights, camera, and action: vertebrate skin sets the stage for immune cell interaction with arthropod-vectored pathogens. **Frontiers in Immunology**. v. 17, n.4, p.1-7, 2013 < <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00286>> Acesso em: 05 jun. 2017.

COLLING, L.; Blood groups in infection and host susceptibility. **Clinical Microbiology Reviews**. v.28, n.3, p.801-869, 2015 < <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-14>> Acesso em: 22 maio. 2017.

- CONTI, R.V.; LANE, V.F.M.; MONTEBELLO, L.; PINTO, V.L.J.; Visceral leishmaniasis epidemiologic evolution in tineframes, based on demographic changes and scientific achievements in Brazil. **Journal of Vector Borne Diseases.** v.53, n.2, p.99-104, 2016 < <http://www.nimr.org.in/assets/532099.pdf>> Acesso em: 06 maio. 2017.
- COSTA, C. H. N., *et al.* Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Rev. Saúde públ. S. Paulo**, v.24, p.361-72, 1990. <<http://www.revistas.usp.br/rsp/article/viewFile/23760/25796>> Acesso em: 02 jul. 2017
- COSTA, C.H.N.; Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. v.24, n.12, p.2959-2963, 2008x'<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2008001200027> Acesso em: 02 jul. 2017.
- CRICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K.; LAMBRIS, J.D.; Complement - a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**. v.11, n.9, p.785-797, 2010 <<https://doi.org/10.1038/ni.1923>> Acesso em: 31 maio. 2017.
- DA SILVA, R.P., HALL, B.F., JOINER, K.A., SACKS, D.L.; CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective Leishmania major metacyclic promastigotes to human macrophages. **Journal of immunology** v,143, p.617-622. 1989<www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2525590>Acessoem: 02 jul. 2017
- DANTAS-TORRES, F.; Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**. v.2, suppl.1, s1, 2009< <https://dx.doi.org/10.1186%2F1756-3305-2-S1-S1>> Acesso em: 02 jul. 2017
- DUARTE, M.I.S.; BADARÓ, R.S.; Leishmaniose visceral. In FOCACCIA, R. *et al.*; **Veronesi: Tratado de Infectologia**. 4.ed. v.2, p.1254-1279, 2009
- DUPUY, A.G.; CARON, E.; Integrin-dependent phagocytosis: spreading from microadhesion to news concepts. **Journal of Cell Sciense**. v.121, n.11, p.1773-1783, 2008<[doi: 10.1242/jcs.018036](https://doi.org/10.1242/jcs.018036)>Acessoem: 02 jul. 2017.
- FALEIRO, R.J.; KUMAR, R.; HAFNER, L.M.; ENGWERDA, C.R.; Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v.8, n.7, p.e2914, 2014 <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002914>> Acesso em: 21 fev. 2017.
- FREITAS, E.O.; LEORATTI, F.M.S.; LIMA, C.G.F.; MORROT, A.; FEIJÓ, D.F.; The contribution of immune evasive mechanisms to parasite persistence in visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**. v.7, p.153, 2016 <<https://dx.doi.org/10.3389%2Ffimmu.2016.00153>>Acessoem: 11 mar. 2017.
- GROSS, T.J.; KREMENS, K.; POWERS, L.S.; BRINK, B.; KNUSTSON, T.; DOMANN, F.E.; PHILIBERT, R.A.; MILHEM, M.M.; MONICK, M..M.; Epigenetic silencing of the human NOS2 gene: rethinking the role of nitric oxide in human macrophage inflammatory responses. **Journal of Immunology**. v.192, n.5, p.2326-2328, 2014 <<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301758>> Acesso em: 11 mar. 2017
- GOES, M. A. O. e JERALDO, V. L. S. Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes internados com leishmaniose visceral em hospital de referência. **Rev Bras Clin**

Med. v.11, n.3, p.227-31, 2013 <<http://files.bvs.br/upload/S/1679-1010/2013/v11n3/a3764.pdf>> Acesso em: 02 maio. 2017.

GOLLOB, K.J.; VIANA, A.G.; DUTRA, W.O.; Immunoregulation in human americanleishmaniasis: balancing pathology and protection. **Parasite Immunology.** v.36, p.367-376, 2014 <DOI: 10.1111/pim.12100>Acessoem: 25 maio. 2017.

GOMES, C.B.; SILVA, F.S.; CHARRET, K.S.; PEREIRA, A.S.P.; FINKELSTEIN, L.C.; SOUZA, R.S.; CORTES, L.M.C.; PEREIRA, M.C.S.; OLIVEIRA, F.O.R.O.; ALVES, C.R.; 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, p.28-36, 2017 <<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.11.015>> Acesso em: 17 abr. 2017.

GONTIJO, F.C. M.; MELO, M.N. Visceral leishmaniasis in Brazil: currents status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia.** v. 7, n.3, p. 338-349, 2004 <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-790X2004000300011>> Acesso em: 25 maio. 2017.

GRIENSVEN, J.V.; DIRO, E.; Visceralleishmaniasis. **InfectiousDiseaseClinics.** v.26, n.2, p.309-322, 2012 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.005>> Acesso em: 01 maio. 2017.

HAILU, T.; YIMER, M.; MULU, W.; ABERA, B.; Challenges in visceral leishmaniasis control and elimination in the developing countries: a review. **Journal of Vector Borne Diseases.** v.53, n.3, p.193-198, 2016 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27681541>>Acessoem: 30 abr. 2017.

HIRSCH, C.S.; ELLNER, J.J.; RUSSELL, D.G.; RICH, E.A.; Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor-alpha-mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. **Journal of Immunology.** v.152, p.743-753, 1994 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8283049>>Acessoem: 02 jul. 2017.

HOFFBRAND, A.V.; MOSS, H.; **Fundamentos em hematologia.** 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013

ISNARD, A., SHIO, M.T., OLIVIER, M.; Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Frontiers in cellular and infection microbiology** v.2, p.72. 2012 <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00072>>Acessoem: 02 jul. 2017

JAVA, A.; LISZEWSKI, K.; HOURCADE, D.E.; ZHANG, F.; ATKINSON, J.P.; Role of complement receptor 1 (CR1; CD35) on epithelial cells: a model for understanding complement-mediated damage in the kidney. **Molecular Immunology.** v.67, n.2, p.584-595, 2015 <doi: 10.1016/j.molimm.2015.07.016> Acesso em: 05 abr. 2017.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M.A.; KEELING, J.H.; New world and old world leishmania infections: a practical review. **DermatologicClinics.** v.33, n.3, p.579-593, 2016 <doi: 10.1016/j.det.2015.03.018> Acesso em: 14 jan. 2017.

KHADEM, F.; UZONNA, J.; Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. **Future Microbiology.** v.9, n.7, p.901-915, 2014 <doi: 10.2217/fmb.14.43.> Acesso em: 21 fev. 2017.

KHERA, R.; DAS, N. Complement Receptor 1: Disease associations and therapeutic implications. **Mol Immunol.** v.46, p.761–772, 2008. <<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.09.026>> Acesso em: 02 jul. 2017.

KUMAR, A.; MALAVIYA, A.N.; SRIVASTAVA, L.M. Malaviya A. N., Srivastava L. M.; *Lowered expression of C3b receptor (CR1) on erythrocytes of rheumatoid arthritis patients*. **Immunobiology**. v.191, n.1, p.9-20, 1994 <[https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(11\)80264-0](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(11)80264-0)> Acesso em: 21 fev. 2017.

LEITE, A. I.; ARAÚJO, L. B. Leishmaniose visceral: aspectos epidemiológicos relacionados aos óbitos em Mossoró-RN. **RevPatolTrop** v.42, p.301-308, 2013 <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/viewFile/26928/15393>> Acesso em: 02 jul. 2017.

LEVITZ, S.M.; Receptor –mediated recognition of *Cryptococcus neoformans*. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**. v.43, p.133-136, 2002 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12145626>> Acesso em: 02 jul. 2017

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M.I.; NOURSHARGH, S.; Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **NaturereviewsImmunology**. v.7, n.9, p.678-689, 2007 <<https://doi.org/10.1038/nri2156>> Acesso em: 2 de jul. 2017.

LIDANI, K.C.F.; ANDRADE, F.A.; TIZZOT, M.R.P.A.; COSTA-RIBEIRO, M.C.V.; BELTRAMA, M.H.; MESSIAS-REASON, I.J.; Visceral leishmaniasis and natural infection rates of *Leishmania* in *Lutzomyia longipalpis* in Latin America. **INTECH - The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis**. Chapter 4, 2017 <<https://doi.org/10.5772/65787>> Acesso em: 16 abr. 2017.

LUKÁCSI, S.; NAGY-BALÓ, Z.; ERDEI, A.; SÁNDOR, N.; BAJTAY, Z.; The role of CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in complement-mediated phagocytosis and podosome formation by human macrophages. **Immunology Letters**. pii. S0165-2478, 2017 <[10.1016/j.imlet.2017.05.014](https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.05.014)> Acesso em: 12 de jun. 2017

MAGILL, A.J.; Epidemiology of the leishmaniasis. **DermatologicClinics**. v.13, n.3, p.505-523, 1995 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7554500>> Acesso em: 09 abr. 2017.

MARCONDES, M.; ROSSI, C.N.; Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.50, n.5, p.341-352, 2013 <<http://dx.doi.org/10.11606/issn.2318-3659.v50i5p341-352>> Acesso em: 09 abr. 2017.

MAYADAS, T.N.; CULLARE, X.; LOWELL, C.A.; The multifaceted functions of neutrophils. **Annual Review of Pathology**. v.9, p.181-218, 2014 <[doi:10.1146/annurev-pathol-020712-164023](https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-164023)> Acesso em: 12 abr. 2017.

MENON, S.S.; ROSSI, R.; NSHIMYUMUKIZA, L.; ZINSZER, K.; Decentralized control of human visceral leishmaniasis in endemic urban areas of Brazil: a literature review. **Tropical Medicineand Health**. v.44, n.9, 2016 <DOI 10.1186/s41182-016-0011-z> Acesso em: 30 abr. 2017.

MISSAWA, N.A.; VELOSO, M.A.E.; MACIEL, G.B.M.L.; MICHALSKY, E.M.; DIAS, E.S.; Evidências de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyiacruzino*

município de Jaciara, estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.44, n.1, p.76-78, 2011 <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822011000100017> Acesso em: 01 de jun. 2017

MOAL, V.L.; LOISEAU, P.M.; *Leishmania hijacking of the macrophage intracellular compartments.* **The FEBS Journal.** v.283, n.4, p.598-607, 2016 <<https://doi.org/10.1111/febs.13601>> Acesso em: 15 abr. 2017.

MORENO, I.; DOMÍNGUEZ, M.; CABAÑES, D.; AIZPURUA, C.; TORAÑO, A.; *Kinetic analysis of ex vivo human blood infection by Leishmania.* **PLoS Neglected Tropical Diseases.** v.4, n.7, p.e743, 2010 <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000743>> Acesso em: 25 maio. 2017.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N.; *Cell biology and immunology of Leishmania.* **Immunological Reviews.** v.240, p.286-296, 2011 <<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00983.x>> Acesso em: 01 maio. 2017.

MOUHOUB, A.; DELIBRIAS, C.C.; FISCHER, E.; BOYER, V.; KAZATCHKINE, M.D.; *Ligation of CR1 (C3b receptor, CD35) on CD4+ T lymphocytes enhances viral replication in HIV infected cells.* **Clinical and Experimental Immunology.** v.106, n.2, p.297-303, 1996 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8918576>> Acesso em: 01 maio. 2017.

MOULDS, J.M.; REVEILLE, J.D.; ARNETT, F.C.; *Structural polymorphism of complement receptor 1 (CR1) in systemic lupus erythematosus (SLE) patient and normal controls of three ethnic groups.* **Clinical and Experimental Immunology.** v.105, n.2, p.302-305, 1996 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8706338>> Acesso em: 01 maio. 2017.

MIKOLAJCZYK, T.P.; OSMENDA, G.; BATKO, B.; WILK, G.; KREZELOK, M.; SKIBA, D.; SILWA, T.; PRYJMA, J.R.; GUZIK, T.J.; *Heterogeneity of peripheral blood monocytes, endothelial dysfunction and subclinical atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus.* **Lupus.** v.25, p.18-27, 2016 <doi: 10.1177/0961203315598014> Acesso em: 02 jul. 2017.

MURPHY, Kenneth. **Imunobiologia de Janeway.** 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

MUKHOPADHYAY, D.; MUKHERJEE, S.; ROY, S.; DALTON, J.E.; KUNDU, S.; SARKAR, A.; DAS, N.K.; KAYE, P.M.; CHATTERJEE, M.; *M2 polarization of monocytes-macrophages is a hallmark on Indian post kala-azar dermal leishmaniasis.* **PLoS Neglected Tropical Diseases.** v.9, n.10, p.e0004145, 2015 <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004145>> Acesso em: 10 mar. 2017.

O'BRIEN, X.M.; HEFLIN, K.E.; LAVIGNE, L.M.; YU, K.; KIM, M.; SALOMON, A.R.; REICHNER, J.S.; *Lectin site ligand of CR3 induces conformational changes and signaling.* **Journal of Biological Chemistry.** v.287, n.5, p.3337-3348, 2012 <<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.298307>> Acesso em: 10 de jul. 2017

OPAS, Organização Mundial da Saúde - Américas. **Informe Epidemiológico das Américas: Leishmanioses.** Organização Pan-Americana da Saúde. n.5, 2017. <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=6721&Itemid=40754&lang=en> Acesso em: 01 jun. 2017.

OPAS, Organização Mundial da Saúde - Américas. **Neglected infectious diseases in the Americas: success stories and innovation to reach the neediest.** Organização Pan-Americana da Saúde. Washington, DC, 2016. <<http://www.paho.org/neglected-infectious-diseases-stories/>> Acesso em: 25 maio. 2017

OPS, Organização Mundial da Saúde. Leishmaniasis en las Américas recomendaciones para el tratamiento. Organização Pan-Americana da Saúde, Washington, DC. 2013. <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22226&itemid&Itemid=270> Acesso em: 25 maio. 2017.

PACE, D.; Leishmaniasis. **Journal of Infection.** v.69, s.10-8, 2014 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>> Acesso em: 13 mar. 2017.

PARK, H.J.; GUARENTO, M.; MACIEJEWSKI, M.; HAUHART, R.; THAM, W.H.; COWMAN, A.F.; SCHMIDT, C.Q.; MERTENS, H.D.; LISZEWSKI, M.K.; HOURCADE, D.E; BARLOW, P.N; ATKINSON, J.P.; Using mutagenesis and structural biology to map the binding site for the *Plasmodium falciparum* merozoite protein PfRh4 on the human immune adherence receptor. **The Journal of Biological Chemistry.** v.289, n.1, p.450-463, 2014 <<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.520346>> Acesso em: 13 mar. 2017.

PENG, A.; KE, P.; ZHAO, R.; LU, X.; ZHANG, C.; HUANG, X.; TIAN, G.; HUANG, J.; WANG, J.; INVERNIZZI, P.; CHEN, Q.; ZHUANG.; Elevated circulation CD14lowCD16+ monocyte subset in primary biliary cirrhosis correlates with liver injury and promotes Th1 polarization. **Clinical Experimental Medical.** v.16, p.511-521, 2016 <<https://doi.org/10.1007/s10238-015-0381-2>> Acesso em: 02 jul. 2017

PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; MARTINS-FILHO, O. A.; PRATAZ, A.; SILVAZ, L. A.; RABELLO, A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; FIGUEIREDO, R. M.; GUIMARÃES-CARVALHO, S. F.; FERRARIYY, T. C. A.; CORREA-OLIVEIRA, R. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. **Scand J Immunol.** v.62, p. 487-495, 2005. ,<<https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2005.01686.x>> Acesso em: 02 jul. 2017.

PETERS, N.C.; EGEN, J.G.; SECUNDINO, N.; DEBRANBRANT, A.; KIMBIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M.P.; GERMAIN, R.N.; SACKS, D.; In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science** v.321, p.970-974, 2008 <<https://doi.org/10.1126/science.1159194>> Acesso em: 02 jul. 2017

PONTE, C.B.; SOUZA, N.C.; CAVALCANTE, M.N.; BARRAL, A.M.P.; AQUINO, D.M.C.; CALDAS, A.J.M.; Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an endemic area in Raposa State of Maranhão, Brazil. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.44, n.6,p.717-721 2011 <<https://doi.org/10.1590/S0037-868220110050000059>> Acesso em: 30 abr. 2017.

RODRIGUES, V.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; LAFORGE, M.; SILVESTRE, R.; ESTAQUIER, J.; Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasites & Vectors.** v.9, p.118, 2016 <DOI 10.1186/s13071-016-1412-x> Acesso em: 02 jul. 2017

ROCHOWIAK, A.; NIEMIR, Z.I; The role of CR1 complement receptor in pathology. **PolskiegoTowarzystwaLekarskiego.** v.163, p.84-88, 2015 <:
<https://www.researchgate.net/publication/43048153> Acesso em: 05 abr. 2017.

ROJAS, J.; SALAZAR, J.; MARTINEZ, M.S.; PALMA, J.; BAUTISTA, J.; CHÁVEZ-CASTILHO, M.; GÓMEZ, A.; BERMUDEZ, V.; Macrophage heterogeneity and plasticity: impact of macrophage biomarkers on atherosclerosis. **Scientifica.** v.2015; 851252, 2015 <<https://doi.org/10.1155/2015/851252>>Acessoem: 11 mar. 2017.

ROMERO, G.A.S.; BOELEART, M.; Control of visceral leishmaniasis in Latin America – a systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases.** v.4, n.1, p.e584, 2010<<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000584>> Acesso em: 11 mar. 2017.

ROSEN, H.; LAW, S.K.; The leukocyte cell surface receptor (s) for the iC3b product of complement. **Current Topics Microbiology and Immunology.** v.153, p.99-122, 1990.<https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-74977-3_6>Acessoem: 11 mar. 2017

ROSENTHAL, L.A., SUTTERWALA, F.S., KEHRLI, M.E., MOSSER, D.M.; Leishmania major human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. **Infection and immunity** v.64, p.2206-2215, 1996 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC174057/>>Acessoem: 02 jul. 2017.

ROSS, G.D.; VETVICKA, V.; CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. **Clinical & Experimental Immunology.** v.92, n.2, p.181-184, 1993 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1554824/>> Acesso em: 11 mar. 2017

ROSS, G. D., YOUNT, W.J.; WALPORT, M. J.; WINFIELD, J.B.; PARKER, C.J.; FULLER, C.R.; TAYLOR, R.P; MYONES, B.L.; LACHMANN, P.J.; Disease-associated loss of erythrocyte complement receptors (CR1, C3b receptors) in patients with systemic lupus erythematosus and other diseases involving autoantibodies and/or complement activation. **Journal of Immunology.** v.135, n.3, p.2005-2014, 1985 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4020137>>Acessoem: 11 mar. 2017.

ROY, S.; MULHOPADHYAY, D.; MUKHERJEE, S.; GHOSH, S.; KUMAR, S.; SARKAR, K.; PAL, D.; BHOWMILK, P.; MANDAL, K.; MODAK, D.; GUHA, S.K.; PRAMANIK, N.; GOSWAMI, R.P.; SAHA, B.; CHATTERJEE, M.; A defective oxidative burst and impaired antigen presentation are hallmarks of human visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Immunology.** v.35, n.1, p.56-67, 2015 <<https://doi.org/10.1007/s10875-014-0115-3>>Acessoem: 11 mar. 2017.

SANDOR, N.; LUKÁCSI, S.; UNGAI-SALÁNKI, R.; ORGOVÁN, N.; SZABÓ, B.; HORVÁTH, R.; ERDEI, A.; BAJTAY, Z.; CD11c/CD18 dominates adhesion of human monocytes, machophages and dendritic cells over CD11b/CD18. **PLOS One.** v.11, p.e0163120, 2016.<<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163120>> Acesso em: 20 de maio. 2017

SANTOS, W.L.C.; PAGLIARI, C.; SANTOS, L.G.; ALMEIDA,V.A.; SILVA, T.L.V.; COUTINHO, J.J.; DUARTE, M.I.S.; FREITAS, L.A.R.; COSTA, C.H.N.; A case ofconventional treatment failure in visceral leishmaniasis: leukocytedistributionandcytokineexpression in spleniccompartments. **BioMed Central**

InfectiousDiseases. v.14, p.1-7, 2015< <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-491>>
Acesso em: 20 maio. 2017.

SERBINA, N.V.; JIA, T.; TOBIAS, M.H.; PAMER, E.G.; Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Annu. Rev. Immunology.** v.26, p.421-452, 2008, <doi:10.1146/nanurev.immunol.26.021607.090326> Acesso em: 02 jul. 2017

SCHLESINGER, L.S.; HORWIT, M.A.; Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. **Journal of Immunology.** v.147, p.1983-1994, 1991<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1679838>> Acessoem: 12 demaio. 2017

SHI, C.; PAMER, E.G.; Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology.** v.11, n.11, p.762-774, 2011 <<https://dx.doi.org/10.1038%2Fnri3070>> Acessoem: 28 maio. 2017.

SINGH, O. P.; SUNDAR, S. Whole blood assay and visceral leishmaniasis: Challenges and promises. **Immunobiology.** v. 219, p.323–328, 2014 <<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.01.005>> Acesso em: 28 maio. 2017.

SILVA, R.A.; SANTOS, F.K.; SOUSA, L.C.; RANGEL, E.F.; BEVILAGUA, C.M.; Ecology of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei* in a endemic area for visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.** v.23, n.3, p.320-327, 2014 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25271451>> Acesso em: 28 maio. 2017.

SPIEGEL, C.N.; DIAS, D.B.S.; ARAKI, A.S.; HAMILTON, J.G.C.; BRAZIL, R.P.; JONES, T.M.; The *Lutzomyia longipalpis* complex: a brief natural history of aggregation sex pheromone communication. **Parasite Vectors.** v.9, p.580, 2016<<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1866-x>> Acesso em : 28 de maior. 2017

SOARES, E.N.L.; LIMA, F.A.L.; SILVA, A.R.M.; SILVA, J.C.R.; COIMBRA, A.C.; ALMEIRA, L.P.; Perfil epidemiológico da leishmaniose visceral humana nas regiões de saúde do estado de Pernambuco no período de 2004 a 2013. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde.** v.14, n.1, p.908-920, 2016 <<http://dx.doi.org/10.5892/ruvrd.v14i1.2585>> Acessoem: 29 demaio. 2017

SOONG, L.; HENARD, C.A.; MELBY, P.C.; Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. **Seminars in Immunopathology.** v.34, n.6, p.735-751, 2012 <<https://doi.org/10.1007/s00281-012-0350-8>> Acessoem: 20 maio. 2017.

STOUTE, J.A.; Complement receptor 1 and malaria. **Cellular Microbiology.** v.13, n.10, p.1441-1450, 2011 <<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01648.x>> Acessoem: 20 maio. 2017.

STEBUT, E.V.; Leishmaniasis. **Journal der DeutschenDermatologischenGesellschaft.** v.13, n.3, p.191-201, 2015 <doi:10.1111/ddg.12595> Acesso em: 13 mar. 2017. <doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01648.x> Acesso em: 14 jan. 2017.

THIEBLEMONT, N.; HAEFFNER-CAVAILLON, N.; LEDUR, A.; L'AGE-STEHR, J.; ZIEGLER-HEITBROCK, L.; KAZATCHKINE, M.D.; CR1 (CD35) and CR3 (CD11b/CD18) mediate infection of human monocytes and monocytic cell lines with complement-opsonized HIV independently. **Clinical & Experimental Immunology.** v.92, n.1, p.106-113, 1995 < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1554886/> Acesso em: 20 maio. 2017.

UENO, N.; Host and parasite determinants of *Leishmania* survival following phagocytosis by macrophages. The University of Iowa. 2011 <<http://ir.uiowa.edu/etd/1186/>> Acessoem: 20 maio. 2017.

UENO, N.; WILSON, M.E.; Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends in parasitology.** v.28, n.8, p.335-344, 2012 <<https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.05.002>> Acessoem: 12 abr. 2017.

VARMA, N.; NASEEM, S. Hematologic changes in visceral leishmaniasis/kala azar. Indian. **J HematolBloodTransfus.** v.26, p.78-82, 2010. <<https://dx.doi.org/10.1007%2Fs12288-010-0027-1>> Acesso em: 02 jul. 2017

VAN FURTH, R. Mononuclear Phagocytes: characteristics, physiology and function. **Springer Netherlands.** p. 158-160, 1985. < <http://www.springer.com/us/book/9780898387322>> Acessoem: 02 jul. 2017

VAN-ZANDBERGER, G.; HERMANN, N.; LAUIS, H.; SOLBACH, W.; LASKAY, T.; Leishmania promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukina-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. **Infection and Immunity.** v.70, n.8, p.4177-4184, 2002. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12117926>> Acessoem: 02 jul. 2017.

WAGNER, C.; OCHMANN, C.; SCHOELS, M.; GIESE, T.; STEGMAIER, S.; RICHTER, R.; HUG, F.; HANSCH, G.M.; The complement receptor 1, CR1 (CD35), mediates inhibitory signals in human T-lymphocytes. **Molecular Immunology.** v.43, p.643-651, 2006 <<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.04.006>> Acesso em: 31 maio. 2017.

WALKER, D.M.; OGHUMU, S.; GUPTA, G.; MCGWIRE, B.S.; DREW, M.E.; SATOSKAR, A.R.; Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cellular and Molecular Life Sciences.** v.71, p.1245-1263, 2014 <DOI 10.1007/s00018-013-1491-1> Acessoem: 12 abr. 2017.

WHO, Expert Committee on the Control of Leishmaniases. **Control of the leishmaniases.** World Health Organization. TRS, n.949, 2010, 186p. < http://www.who.int/neglected_diseases/resources/who_trs_949/en/> Acesso em: 22 fev. 2017.

WHO, Third WHO report on neglected tropical diseases. **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases.** World Health Organization, 2015 190p. <http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564861/en/> Acessoem: 22 fev. 2017.

YAO, C.; WILSON, M.E.; Dynamics of Sterol Synthesis During Development of *Leishmania* spp. Parasites to Their Virulent Form. **Parasites & Vectors.** v.9, p.200, 2016 < <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1470-0>> Acessoem: 22 fev. 2017

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado pela Dra. Lilia Maria Carneiro Câmara para participar da pesquisa: ESTUDOS DA EXPRESSÃO CR1 EM CÉLULAS SANGUÍNEAS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS COM *LEISHMANIA INFANTUM*. 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. A pesquisa tem por objetivo estudar a quantidade da molécula CR1 presente nas células do sangue, que é responsável pela retirada de impurezas no seu sangue e iremos verificar se esses valores refletem no desenvolvimento da doença Calazar. Serão colhidas duas amostras de 5ml de sangue de uma veia do braço no momento do seu internamento. Isto não trará risco à sua vida, mas poderá ocasionar um desconforto e dor no local da coleta. Não haverá mudança em qualquer tratamento que você esteja fazendo. 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 retirados do prontuário. Você não pagará e nem receberá qualquer valor em dinheiro pela participação neste estudo. A sua participação estará contribuindo para novas estratégias no controle do Calazar. Destacamos que a qualquer momento o participante poderá recusar a continuar a pesquisa e também poderá retirar o seu consentimento sem que isso lhe traga qualquer prejuízo. Garantimos que as informações conseguidas através de sua participação não permitirão a identificação de sua pessoa, exceto aos responsáveis da pesquisa, e que a divulgação das informações mencionadas só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto. 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/PROPESQ na Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

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, ____ / ____ / ____

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		
Nome:		
Idade:	Data de nascimento:	
Endereço:		
Telefone (incluir dois ou mais):		
Prontuário:	Data de admissão:	
Início dos sintomas (em semanas/meses):		
Diagnóstico: clínico (<input type="checkbox"/>) laboratorial (<input type="checkbox"/>)		
Biopsia: medula óssea (<input type="checkbox"/>) figado (<input type="checkbox"/>) baço (<input type="checkbox"/>)		
Mielograma:		
Cultura para leishmania: não realizada (<input type="checkbox"/>) realizada (<input type="checkbox"/>): positiva (<input type="checkbox"/>) negativa (<input type="checkbox"/>)		
Sorologia para calazar: não realizada (<input type="checkbox"/>) realizada (<input type="checkbox"/>): positiva (<input type="checkbox"/>) negativa (<input type="checkbox"/>)		
Início quadro: Febre (<input type="checkbox"/>) Perda de peso (<input type="checkbox"/>) Aumento do vol. abdominal (<input type="checkbox"/>)		
Alterações do apetite: Conservado (<input type="checkbox"/>) Aumentado (<input type="checkbox"/>) Diminuido (<input type="checkbox"/>)		
Gengivorragia (<input type="checkbox"/>) Palidez cutâneo-mucosa (<input type="checkbox"/>) Tosse (<input type="checkbox"/>) Diarréia (<input type="checkbox"/>)		
Início do tratamento:		
Tipo de tratamento (drogas utilizadas, posologia e duração em dias):		
Teve complicações? Não (<input type="checkbox"/>) Sim (<input type="checkbox"/>)		
Quais complicações:		
DADOS LABORATORIAIS:		
Sorologias:		
Hemoglobina:	Hematórito:	Leucócitos totais:
Leucograma (% e totais):		
Provas de função hepática: Bilirrubina total (<input type="checkbox"/>) Bilir. Direta (<input type="checkbox"/>) Bilir. Ind (<input type="checkbox"/>)		
TGO/AST (<input type="checkbox"/>) TGP/ALT (<input type="checkbox"/>) Fosfatase alcalina (<input type="checkbox"/>)		
Albumina (<input type="checkbox"/>) Globulina (<input type="checkbox"/>) Rel. albumina/globulina (<input type="checkbox"/>)		
Radiografias/ultrassonografias:		
COLETA DE AMOSTRAS:		
Data da 1 ^a Coleta de sangue: Sangue (/ /) Soro (/ /)		
Data da 2 ^a Coleta de sangue: Sangue (/ /) Soro (/ /)		
OBSERVAÇÕES (no verso):		

APÊNDICE C – PLANILHA COM BANCO DE DADOS

PCT	IDADE	GÊNERO	Linfócitos T CD3 ⁺ CD35 ⁺		Linfócitos B CD19 ⁺ CD35 ⁺		Neutrófilos CD11b ⁺ CD35 ⁺			Neutrófilos CD11b ⁺ CD14 ⁺ CD35 ⁺			Monócitos CD14 ⁺ CD35 ⁺			Monócitos CD14 ⁺ CD11b ⁺ CD35 ⁺		
			%	MIF CD35	%	MIF CD35	%	MIF CD35	MIF CD11b	%	MIF CD35	MIF CD11b	%	MIF CD35	MIF CD14	%	MIF CD35	MIF CD11b
5	42	Fem	2,2	12,86	87,6	56,23	99,3	67,93	38,54	26,4	70,01	35,55	51	39,6	410,47	18,2	53,21	61,31
7	39	Masc	4,2	12,24	66,7	35,39	93,9	33,98	34,91	6,5	47,69	50,48	41,1	24,58	153,99	9,5	43,89	34,7
10	44	Masc	6,1	12,75	76,2	51,4	99,2	46,14	81,31	6,8	52,78	58,56	72,5	46,98	352,27	52,5	63,17	52,55
12	72	Masc	6,1	11,76	79,5	57,51	87,9	43,71	93,06	73,1	45,59	105,54	35,4	34,29	784,39	35,9	39,66	105,51
13	40	Fem	18,1	19,46	95,3	127,49	92,8	36,19	27,63	11,5	40,29	31,34	29,8	17,0	176,24	1,4	29,44	56,76
17	27	Masc	12,2	13,46	97,6	130,39	96,8	33,38	40,32	93,0	35,91	40,32	29,9	30,78	1074,61	7,2	43,53	44,38
19	18	Fem	2,1	12,63	90,9	58,82	94,9	46,14	25,95	9,2	76,35	17,15	53,5	28,9	385,42	6,6	248,47	54,56
20	74	Masc	0,1	18,77	72,9	55,23	93,3	45,73	17,15	25,0	53,52	15,4	79,8	24,69	323,42	11,9	33,49	21,23
22	20	Masc	13,3	13,1	93,89	96,47	97,1	44,91	25,48	1,7	116,58	26,18	32,5	19,99	355,45	5,7	33,26	38,08
24	31	Masc	6,3	13,95	96,41	63,78	99,6	52,33	124,09	54,4	55,09	130,97	71,8	46,98	471,88	56,2	59,32	68,26
26	55	Masc	7,1	42,17	82,32	58,29	99,0	46,56	101,82	98,9	44,91	552,32	37,0	40,32	943,21	37,9	131,01	353,71
27	44	Masc	1,4	13,82	94,8	66,71	96,5	27,38	45,73	54,3	31,61	57,77	15,1	30,78	1084,32	6,1	47,4	48,03
28	20	Masc	3,9	14,39	87,5	60,43	98,8	42,17	42,17	49,3	49,82	35,23	68,5	41,05	552,32	49,8	54,78	61,56
30	35	Masc	1,3	13,04	97,0	44,71	98,8	40,32	134,56	1,3	55,83	235,01	62,8	48,26	336,78	64,6	56,3	230,53
32	31	Masc	2,4	12,69	90,0	41,42	98,9	47,4	67,93	62,8	58,05	72,34	15,3	28,13	547,37	8,4	45,51	72,91
35	18	Masc	21	22,47	93,4	88,96	92,9	34,91	71,69	61,8	42,31	75,67	43,2	35,55	604,3	36,2	45,52	71,28
39	54	Masc	14,8	14,33	92,38	54,0	99,3	54,74	207,21	42,6	88,49	186,01	66,2	36,52	378,55	64,6	39,71	137,75
40	49	Masc	2,4	13,22	61,44	31,34	98,8	38,89	70,41	58,7	48,28	74,99	28,9	34,29	685,39	12,2	52,73	71,34

PCT - pacientes.

% - quantidade de células positivas para CR1

MIF - Intensidade de Fluorescência do CR1 (CD35) e CR3 (CD11b)

CTL	IDADE	GÊNERO	Linfócitos T CD3 ⁺ CD35 ⁺		Linfócitos B CD19 ⁺ CD35 ⁺		Neutrófilos CD11b ⁺ CD35 ⁺		Neutrófilos CD11b ⁺ CD14 ⁺ CD35 ⁺			Monócitos CD14 ⁺ CD35 ⁺			Monócitos CD14 ⁺ CD11b ⁺ CD35 ⁺			
			%	MIF CD35	%	MIF CD35	%	MIF CD35	MIF CD11b	%	MIF CD35	MIF CD11b	%	MIF CD35	MIF CD14	%	MIF CD35	MIF CD11b
CF1	22	Fem	5,4	12,75	96,5	64,36	94	29,16	34,60	23,6	29,89	35,71	18,3	14,69	523,5	3,8	29,95	49,15
CF2	60	Fem	4,4	13,1	98,1	49,14	99,6	26,66	93,90	48,7	26,72	104,6	54	24,14	305,05	25,3	34,31	40,88
CF3	26	Fem	8,3	13,95	92,8	66,12	98,4	26,42	76,35	88,8	27,79	78,44	15,2	16,11	449,1	5,9	21,15	44,75
CF4	30	Fem	8,7	22,27	95,5	46,14	99,9	63,21	198,10	23,8	56,16	177,83	42,8	29,16	813,12	30,9	36,58	68,05
CF5	59	Fem	12,3	15,12	95,3	57,25	98,7	50,03	119,71	89,6	51,23	119,71	10,1	18,6	661,17	5,2	24,27	33,51
CF6	71	Fem	13,1	19,63	94,5	51,86	99,8	46,98	155,38	93,7	48,43	155,38	4,2	17,23	469,75	1,2	23,08	31,15
CM1	23	Masc	4,1	11,7	93,7	68,54	99,8	46,56	138,24	70,1	48,5	140,75	12,7	17,31	626,43	11,2	22,5	72,54
CM2	22	Masc	6,0	11,34	95,9	66,71	96,1	27,38	91,40	44,4	29,11	92,22	4,2	15,12	518,61	1,9	21,95	38,97
CM3	24	Masc	6,7	12,08	97,3	61,53	99,9	50,48	104,60	88,5	52,04	107,46	8,4	15,61	743,18	5,8	36,58	52,31
CM4	40	Masc	25,7	14,33	96,9	56,74	99,7	36,19	117,57	80,4	37,68	118,64	9,1	14,46	417,92	3,9	19,7	47,96
CM5	61	Masc	3,9	12,41	95,2	47,4	99,8	48,26	135,77	69,3	50,17	138,24	30,4	20,72	509,37	19,8	26,5	53,44
CM6	31	Masc	10,0	11,55	97,4	50,48	99,7	50,48	196,32	65,8	39,16	209,08	6,5	12,19	403,15	2,0	16,93	53,25
CM7	30	Masc	5,4	11,44	97,4	47,4	88,4	30,51	179,43	49,6	33,07	199,89	11	15,96	388,91	9,1	21,06	34,26
CM8	44	Masc	11,0	11,55	94,3	40,32	99,7	48,26	137,00	44,7	49,71	139,49	6,4	18,35	445,08	3,4	26,96	37,23
CM9	32	Masc	10,2	11,6	97,6	57,0	99,7	40,32	87,38	76,0	40,9	92,22	2,3	16,18	425,51	1,2	25,79	39,84
CM10	23	Masc	12,4	14,72	97,5	60,98	99,9	42,55	74,32	66,8	43,48	77,74	3,0	16,25	417,92	1,5	27,98	59,34
CM11	27	Masc	11,3	16,62	91,8	53,28	99,9	34,29	140,75	93,7	34,99	145,9	0,8	24,14	469,76	0,3	25,26	65,9
CM12	29	Masc	12,1	16,25	97,4	62,64	99,7	31,34	110,40	93	32,31	112,4	6,4	22,67	495,81	1,8	30,3	55,6

CTL -controles

% - quantidade de células positivas para CR1

MIF - Intensidade de Fluorescência do CR1 (CD35) e CR3 (CD11b)

CTL	IDADE	GÊNERO	Monócitos CD14 ⁺ CD11b ⁺ CD35 ⁺			Monócitos CD14 ^{high} CD11b ⁺ CD35 ⁺				Monócitos CD14 ^{low} CD11b ⁺ CD35 ⁺			
			%	MIF CD35	MIF CD11b	%	MIF CD35	MIF CD11b	MIF CD14	%	MIF CD35	MIF CD11b	MIF CD14
CF5	59	Fem	5,2	24,27	33,51	1,4	26,5	44,29	763,51	20,6	23,65	30,42	67,93
CF6	71	Fem	1,2	23,08	31,15	0,4	23,75	28,9	518,61	4,3	22,73	31,3	66,12
CM6	31	Masc	2,0	16,93	53,25	0,2	19,38	117,68	482,61	7,1	16,78	49,22	66,12
CM7	30	Masc	9,1	21,06	34,26	2,5	22,46	48,39	500,29	25,2	20,87	32,18	50,94
CM8	44	Masc	3,4	26,96	37,23	1	21,05	44,73	478,29	17,2	28,87	34,8	54,25

CTL -controles

% - quantidade de células positivas para CR1

MIF - Intensidade de Fluorescência do CR1 (CD35), CR3 (CD11b) e CD14

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESSQ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDOS DA EXPRESSÃO CR1 EM CÉLULAS SANGUÍNEAS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS COM LEISHMANIA INFANTUM

Pesquisador: Lília Maria Carneiro Câmara

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 52870716.1.0000.5054

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.482.462

Apresentação do Projeto:

Serão avaliados trinta pacientes com diagnóstico positivo de Leishmaniose visceral, considerando aspectos clínicos, parasitológico e sorológico em pacientes atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas, referência em doenças infecciosas do Estado do Ceará, sem critérios de sexo, idade e regiões endêmicas.

Objetivo da Pesquisa:

Serão avaliados trinta pacientes com diagnóstico positivo de Leishmaniose visceral, considerando aspectos clínicos, parasitológico e sorológico em pacientes atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas, referência em doenças infecciosas do Estado do Ceará, sem critérios de sexo, idade e regiões endêmicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O presente trabalho 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:

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

Continuação do Parecer: 1.482.462

O Leishmaniose visceral ou Calazar é uma das doenças com maior prevalência no estado do Ceará, gerando alto custo nas ações de combate ao vetor, controle e vigilância humano e canino. Análises epidemiológicas a partir dos números de casos de leishmaniose visceral demonstram uma alta crescente durante os últimos dez anos com aumento da letalidade nos 184 municípios do Estado. Este trabalho irá contribuir na compreensão do papel da cinética de infecção em pacientes doentes com leishmaniose visceral, 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 repensadas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados e estão de acordo com a Resolução 466/12.

Recomendações:

Sem comentários.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem comentários.

Considerações Finais a critério do CEP:

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 07 de Abril de 2016

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
 (Coordenador)

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 E PESQUISA DO HOSPITAL
SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECIOSAS**

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDOS DA EXPRESSÃO CR1 EM CÉLULAS SANGUÍNEAS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS COM LEISHMANIA INFANTUM

Pesquisador: Lília Maria Carneiro Câmara

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 52870716.1.3001.5044

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.598.261

Apresentação do Projeto:

As leishmanioses estão entre as principais doenças negligenciadas e entre as seis doenças infecto parasitárias de maior importância no mundo. A leishmania é um patógeno intracelular obrigatório com pelo menos 11 espécies de importância médica, destacando a Leishmania infantum no nordeste do país, contribuindo com 50% dos casos de leishmaniose visceral. O estudo a ser desenvolvido é do tipo caso controle, prospectivo e composta por 30 indivíduos sadios e 30 pacientes com diagnóstico positivo de Leishmaniose visceral.

Objetivo da Pesquisa:

Compreender a dinâmica da expressão do receptor para complemento tipo 1 (CR1) em células sanguíneas de pacientes com leishmaniose visceral e sua correlação com invasão celular por Leishmania infatum.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos se limitam ao desconforto e dor no local da coleta de sangue. A contribuição dar-se-á pelo conhecimento sobre a compreensão da cinética de infecção em pacientes acometidos pela doença e sua associação na mudança no padrão de resposta imunológica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A evolução da leishmaniose depende de uma série de fatores envolvidos entre hospedeiros e

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

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



Continuação do Parecer: 1.598.261

patógenos, principalmente das diversas estratégias de escape do parasita, capaz de modular a resposta imune e regular as principais funções da célula hospedeira. Estudos mostram a importância do CR1 nas interações parasita com o sangue do hospedeiro. Parece que a ligação de formas promastigotas ao CR1 de eritrócitos relaciona-se com o perfil de resposta antes e após o tratamento. Espera-se que essa análise contribua para melhorar estratégias no controle da doença e aprofunde sua influência no agravo e prevalência da doença em áreas endêmicas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O referido projeto apresentou todos os termos e compromissos necessários para aprovação e viabilidade ética.

Recomendações:

Há necessidade de melhor definir os casos de pacientes acometidos pela doença. Diante de muitos métodos diagnósticos é preciso definir o teste padrão ouro que caracterizará o indivíduo acometido pela doença.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José ANALISOU e NÃO INDICOU PENDÊNCIAS concluindo parecer favorável à realização do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 20 de Junho de 2016

Assinado por:
Melissa Soares Medeiros
(Coordenador)

