

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Tânia de Cássia Moreira Soares

Leishmaniose visceral: correlação entre os achados clínicos, laboratoriais e as características imunológicas do micro ambiente da medula óssea

Montes Claros  
2018

Tânia de Cássia Moreira Soares

Leishmaniose visceral: correlação entre os achados clínicos, laboratoriais e as características imunológicas do micro ambiente da medula óssea

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, para a obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças.

Orientador: Prof. Dr Sílvio Fernando Guimarães de Carvalho

Montes Claros  
2018

S676l

Soares, Tânia de Cássia Moreira.

Leishmaniose visceral[manuscrito]: correlação entre os achados clínicos, laboratoriais e as características imunológicas do micro ambiente da medula óssea / Tânia de Cássia Moreira Soares. –2018.  
65f. : il.

Inclui Bibliografia.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes,

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde /PPGCS, 2018.

Orientador: Prof. Dr. Sílvio Fernando Guimarães de Carvalho.

1. Leishmaniose visceral. 2. *Leishmania infantum*. 3. Anemia. 4. Medula óssea. 5. Carga parasitária. 6. Inflamação. 7. Citocinas. I. Carvalho, Sílvio Fernando Guimarães de. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título. IV. Título: Correlação entre os achados clínicos, laboratoriais e as características imunológicas do micro ambiente da medula óssea.

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS-UNIMONTES

Reitor: João dos Reis Canela

Vice-reitor: Antônio Alvimar Souza

Pró-reitor de Pesquisa: Virgílio Mesquita Gomes

Coordenadoria de Acompanhamento de Projetos: Karen Torres Corres Lafetá de Almeida

Coordenadoria de Iniciação Científica: Sônia Ribeiro Arruda

Coordenadoria de Inovação Tecnológica: Dario Alves Oliveira

Pró-reitor de Pós-graduação: Juliane Leite Ferreira

Coordenadoria de Pós-graduação Stricto-sensu: Maria de Fátima Rocha Maia

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador: Prof. Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula

Subcoordenadora: Profa. Dra. Marise Fagundes Silveira



CANDIDATO: TÂNIA DE CÁSSIA MOREIRA SOARES

**TÍTULO DO TRABALHO:** "Leishmaniose Visceral: Correlação entre os achados clínicos, laboratoriais e as características imuno-morfológicas do micro ambiente da medula óssea"

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:** Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças

**LINHA DE PESQUISA:** Diagnóstico e Aspectos Clínicos das Doenças

**BANCA (TITULARES)**

PROF. DR. SÍLVIO FERNANDO GUIMARÃES DE CARVALHO - ORIENTADOR



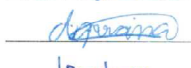

PROF.DR. ANTÔNIO PRATES CALDEIRA

PROF. DR. ELAINE VELOSO ROCHA URIAS

PROF. DR. AGOSTINHO GONÇALVES VIANA

PROF.ª DR.ª MARIANA SANTOS CARDOSO

**ASSINATURAS**

**BANCA (SUPLENTES)**

PROF.ª DR.ª JAMILLE FERNANDES LULA

PROF. DR. WELLINGTON DANILO SOARES

**ASSINATURAS**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

APROVADO(A)

REPROVADO(A)

Aos meus pais, Deli e Iêda, *in memoriam*, por tudo o que eu sou hoje! Se eu conquisto mais essa etapa, é porque lutaram e torceram por mim. Eles foram exemplo de dedicação e perseverança.

Ao Júnior, meu querido esposo, companheiro para todas as horas! Compreensivo, quando fui ausente e, amigo quando precisei de apoio. As minhas ausências foram difíceis, mas a sua paciência me ajudou a trilhar esse caminho. Sem o seu amor, carinho e incentivo eu não conseguiria caminhar tão tranqüila por essa estrada que escolhi. Obrigada por entender e abraçar os meus objetivos.

As minhas queridas filhas, meus amores, minha alegria! Obrigada pelo incentivo e compreensão em todos os momentos. Juntas somos muito mais fortes!

“Confia no Senhor de todo o teu coração, e não te estribes no teu próprio entendimento. Reconhece-O em todos os teus caminhos. E Ele endireitará as tuas veredas. Não sejas sábio a teus próprios olhos; teme ao Senhor e aparta-te do mal. Isso será saúde para a tua carne; e refrigério para os teus ossos.”

Provérbios 3:5-8

## AGRADECIMENTOS

A Deus toda a honra e toda a glória! Sem o meu Senhor esse trabalho não se concretizaria.

Ao professor Dr. Silvio Fernando Guimarães de Carvalho pelo incentivo e cuidado em guiar-me através da sua vasta experiência.

Ao professor Dr. Leandro de Freitas Teles pela contribuição decisiva na construção e nos resultados deste trabalho.

A professora Dra. Elaine Veloso Rocha Urias pelo incentivo e pela particular contribuição nesta pesquisa.

A professora Dra. Jamille Fernandes Lula pelo apoio e incentivo nos desafios enfrentados.

Ao professor Dr. Agostinho Gonçalves Viana e a Professora. Dra. Mariana Santos Cardoso pelo interesse, competência e disponibilidade em providenciar as análises das citocinas e da carga parasitária no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos/ICB/UFMG.

Ao professor Dr. Ricardo Toshio Fujiwara por disponibilizar o Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos/ICB/UFMG para a realização da análise das citocinas e da carga parasitária.

Ao professor Dr. Erivelton Pereira Santos pelo interesse e cuidado em deixar o nosso trabalho ilustrado com as imagens dos achados da medula óssea.

A Dú e Rosa que com dedicação e presteza se empenharam para o sucesso desta tarefa.

A todos os colegas e professores do doutorado pela oportunidade de convívio e aprendizado partilhado.

A Universidade Estadual de Montes Claros pelo incentivo ao desenvolvimento de pesquisas na instituição.

A minha sobrinha Luiza e a minha filha Amanda pelo auxílio precioso na construção do banco de dados.

A minha filha Fernanda pelas dicas e sugestões ao longo desse trabalho.

“Não há prazer maior, quando meu olhar encontra milhares de criaturas vivas em apenas uma gota de água.” Leeuwenhoek<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Antonie von Leeuwenhoek, viveu entre os anos de 1632 e 1723 na cidade holandesa de Delft, e quem primeiro registrou suas observações utilizando microscópios. Utilizando um microscópio de fabricação própria, foi o primeiro a observar e descrever as fibras musculares, espermatozóides e bactérias.



## RESUMO

A leishmaniose é uma doença endêmica de países tropicais e subtropicais. Está associada à desnutrição, deslocamento de populações, pobreza, imunodeficiências e falta de recursos financeiros. No Brasil, foram relatados 53.442 casos de Leishmaniose Visceral (LV) entre 2001 e 2016. Este estudo teve como objetivo correlacionar os achados clínicos, laboratoriais, as características imuno-morfológicas e a carga parasitária da medula óssea. Verificou-se a patogênese e a gravidade da anemia associada aos achados da pesquisa. A anemia foi classificada em grave  $Hb \leq 7g/dL$  e não grave  $Hb > 7g/dL$ . A carga parasitária da medula óssea foi mensurada pela microscopia óptica e através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR). As interleucinas (IL) foram analisadas à partir da medula óssea pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa por Transcrição Reversa (RT-qPCR). As crianças menores de nove anos de idade representaram a maioria dos indivíduos 15/19 (78,9%). A febre, a hepatoesplenomegalia e a anemia estavam presentes em 100% dos indivíduos. A pancitopenia foi observada em 13/19 (68,4%) dos participantes. A anemia grave foi observada em 8/19 (42,1%) e a não grave em 11/19 (57,9%). A eritropoetina (EPO) sérica estava elevada em 17/19 (89,5%) e com significância estatística entre os grupos ( $p=0,038$ ) e uma correlação negativa com a hemoglobina ( $p=0,029$ ,  $\rho=-0,519$ ). A anemia nos indivíduos analisados não era carencial e nem do tipo hemolítica auto-imune. A Proteína C-Reativa ultrasensível (PCRus) apresentou significância ( $p=0,047$ ) entre os grupos. O tamanho do fígado apresentou uma correlação positiva significativa com a Transaminase Glutâmico-Oxalacética (TGO) ( $p=0,054$ ,  $\rho=0,490$ ), o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA) ( $p=0,005$ ,  $\rho=0,648$ ) e a carga parasitária por qPCR ( $p=0,040$ ,  $\rho=0,502$ ). A Lactato Desidrogenase (LDH) estava elevada em 17/19 (89,5%) com uma correlação positiva significativa com TGO ( $p=0,000$ ,  $\rho=0,805$ ), Relação Normalizada Internacional (RNI) ( $p=0,007$ ,  $\rho=0,625$ ), TTPA ( $p=0,008$ ,  $\rho=0,621$ ) e série eritrocítica ( $p=0,005$ ,  $\rho=0,648$ ). A RNI apresentou uma correlação positiva significativa com a PCRus ( $p=0,024$ ,  $\rho=0,544$ ). O Fator Estimulante de Colônia 2 (CSF-2) apresentou significância estatística entre os grupos ( $p=0,036$ ) e uma tendência a uma correlação negativa com a hemoglobina ( $p=0,590$ ,  $\rho=-0,481$ ) e correlação positiva com a EPO ( $p=0,009$ ,  $\rho=0,647$ ). Há uma correlação positiva entre o Interferon Gama ( $IFN-\gamma$ ) e o tamanho do fígado ( $p=0,009$ ,  $\rho=0,651$ ), Interleucina-6 (IL-6) ( $p=0,000$ ,  $\rho=0,907$ ), Interleucina-10 (IL-10) ( $p=0,000$ ,  $\rho=0,778$ ) e Fator de Necrose Tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ ) ( $p=0,028$ ,  $\rho=0,549$ ) e uma correlação do  $TNF-\alpha$  com IL-6 ( $p=0,008$ ,  $\rho=0,636$ ) e IL-10 ( $p=0,000$ ,  $\rho=0,783$ ). A avaliação da medula óssea demonstrou uma carga parasitária baixa, por microscopia óptica, em 14/19 (73,7%). Observou-se uma correlação positiva entre as cargas parasitárias ( $p=0,006$ ,  $\rho=0,635$ ). A análise citológica evidenciou uma medula óssea normocelular em 14/19 (73,7%). A série eritrocítica se apresentava com hiperplasia relativa em 18/19 (94,7%) e diseritropoiética 19/19 (100%). O conhecimento das características clínicas e laboratoriais na LV pode desempenhar um papel importante no diagnóstico diferencial da hepatoesplenomegalia febril, especialmente em áreas endêmicas e em um país em desenvolvimento, onde os recursos são limitados. Ressalta-se a avaliação das características morfológicas da medula óssea através da punção aspirativa como uma ferramenta que auxilia e direciona ao diagnóstico da leishmaniose visceral. A partir dos resultados do estudo, conclui-se que a anemia não está relacionada a fatores carenciais, perda sanguínea e/ou hemólise auto-imune e que os níveis de hemoglobina nos indivíduos com LV ativa estão correlacionados com a resposta inflamatória promovida por essa patologia. O trabalho é relevante para subsidiar no desenvolvimento de novos estudos e, poderá ter como alvo, terapêuticas baseadas na imunoterapia. Palavras-chave: leishmaniose visceral; *Leishmania infantum*; anemia; medula óssea; carga parasitária; inflamação; citocinas

## ABSTRACT

Leishmaniasis is an endemic disease of tropical and subtropical countries. It is associated with malnutrition, displacement of populations, poverty, immunodeficiencies and lack of financial resources. In Brazil, 53,442 cases of Visceral Leishmaniasis (VL) were reported between 2001 and 2016. The objective of this study was to correlate the clinical and laboratory findings, immuno-morphological characteristics and parasitic load of the bone marrow. The pathogenesis and severity of anemia associated with the findings were verified. Anemia was classified as severe  $Hb \leq 7g / dL$  and not severe  $Hb > 7g / dL$ . The parasite load of the bone marrow was measured by optical microscopy and by the Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) technique. Interleukins (IL) were analyzed from the bone marrow by the qPCR technique. Children younger than 9 years of age accounted for the majority of individuals 15/19 (78.9%). Fever, hepatosplenomegaly and anemia were present in 100% of the individuals. Pancytopenia was observed in 13/19 (68.4%) of the participants. Severe anemia was observed in 8/19 (42.1%) and non-severe in 11/19 (57.9%). Serum erythropoietin (EPO) was elevated in 17/19 (89.5%) and with statistical significance between groups ( $p = 0.038$ ) and a negative correlation with hemoglobin ( $p = 0.029$ ,  $\rho = -0.519$ ). Anemia in the individuals analyzed was neither autoimmune nor hemolytic type autoimmune. The ultra-sensitive C-Reactive Protein (CRP) showed significance ( $p = 0.047$ ) between the groups. Liver size had a significant positive correlation with Glutamic Oxalacetic Transaminase (ALT) ( $p = 0.054$ ,  $\rho = 0.490$ ), Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) ( $p = 0.005$ ,  $\rho = 0.648$ ) and parasite load by qPCR ( $p = 0.040$ ,  $\rho = 0.502$ ). Lactate dehydrogenase (LDH) was elevated in 17/19 (89.5%) with a significant positive correlation with ALT ( $p = 0.000$ ,  $\rho = 0.805$ ), International Normative Relationship (INR) ( $p = 0.007$ ,  $\rho = 0.625$ ), APTT ( $p = 0.008$ ,  $\rho = 0.621$ ) and erythrocyte series ( $p = 0.005$ ,  $\rho = 0.648$ ). The RNI showed a significant positive correlation with CRP ( $p = 0.024$ ,  $\rho = 0.544$ ). The colony stimulating factor 2 (CSF-2) presented statistical significance between the groups ( $p = 0.036$ ) and a tendency to a negative correlation with hemoglobin ( $p = 0.590$ ,  $\rho = -0.481$ ) and a positive correlation with EPO ( $p = 0.009$ ,  $\rho = 0.647$ ). There is a positive correlation between Interferon Gamma ( $IFN-\gamma$ ) and liver size ( $p = 0.009$ ,  $\rho = 0.651$ ), Interleukin-6 (IL-6) ( $p = 0.000$ ,  $\rho = 0.907$ ), Interleukin-10 (IL-10) ( $p = 0.000$ ,  $\rho = 0.778$ ) and tumor necrosis factor alpha ( $TNF-\alpha$ ) ( $p = 0.028$ ,  $\rho = 0.549$ ) and a correlation of  $TNF-\alpha$  with IL-6 ( $p = 0.008$ ,  $\rho = 0.636$ ) and IL-10 ( $p = 0.000$ ,  $\rho = 0.783$ ). The evaluation of the bone marrow showed a low parasitic load, by light microscopy, in 14/19 (73.7%). There was a positive correlation between parasitic loads ( $p = 0.006$ ,  $\rho = 0.635$ ). Cytological analysis revealed normocellular bone marrow in 14/19 (73.7%). The erythrocytic series presented with relative hyperplasia in 18/19 (94.7%) and dyserythropoietic 19/19 (100%). Knowledge of clinical and laboratory characteristics in VL may play an important role in the differential diagnosis of febrile hepatosplenomegaly, especially in endemic areas and in a developing country where resources are limited. It is important to evaluate the morphological characteristics of the bone marrow through aspiration as a tool that helps and guides the diagnosis of visceral leishmaniasis. From the results of the study, it is concluded that the anemia is not related to characteristic factors, blood loss and / or autoimmune hemolysis and that the hemoglobin levels in the individuals with active VL are correlated with the inflammatory response promoted by this pathology. The work is relevant to subsidize the development of new studies and may target immunotherapy-based therapies.

**Keywords:** Leishmaniasis, visceral; anemia; bone marrow; parasite load; inflammation; cytokines

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Hb	Hemoglobina
CSF-2	Fator Estimulante de Colônia 2
GM-CSF	Fator estimulante de Colônia de Granulócitos e Monócitos
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
LDH	Lactato Desidrogenase
LV	Leishmaniose Visceral
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCRus	Proteína C Reativa Ultrassensível
qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa
RT-qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa por Transcrição Reversa
RNI	Relação Normatizada Internacional
SUS	Sistema Único de Saúde
TGO	Transaminase Glutâmico Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 OBJETIVOS .....	19
2.1 Objetivo Geral .....	19
2.2 Objetivos Específicos .....	19
3 PRODUTOS.....	20
3.1 Artigo 1: Título do artigo 1 .....	21
3.2 Artigo 2: Título do artigo 2.....	38
4 CONCLUSÕES .....	53
REFERÊNCIAS .....	54
APÊNDICES .....	57
ANEXOS .....	61

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença endêmica, presente em 97 países e territórios; e é causada por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. A leishmaniose é transmitida pela picada de inseto flebótomo, infectado, do gênero *Lutzomyia*. O cão doméstico é o reservatório mais importante e o homem, o hospedeiro final. As formas móveis e flageladas da *Leishmania spp.* são chamadas promastigotas. Elas são encontradas dentro do inseto transmissor e, após alguns estágios de diferenciação, transformam-se em formas promastigotas não divisíveis que são transmitidas durante uma picada do flebótomo. Os parasitas podem ser fagocitados por células do sistema fagocítico-mononuclear e se transformarem em formas amastigotas no hospedeiro vertebrado, se multiplicam e podem levar ao rompimento da célula infectada e posterior disseminação, infectando outras células. O flebótomo é infectado ao ingerir sangue contendo células parasitadas durante o repasto sanguíneo no hospedeiro. As formas amastigotas não possuem um flagelo exteriorizado e vivem como parasitas intracelulares em uma variedade de células de mamíferos, principalmente dentro de macrófagos (1, 2).

A distribuição da leishmaniose é determinada pelo seu vetor, seu reservatório e/ou seu hospedeiro, portanto, depende de características ambientais como as dos países tropicais e subtropicais. Sendo comum em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, a leishmaniose é uma doença negligenciada e está consequentemente associada à desnutrição, deslocamento de populações, pobreza, imunodeficiências e falta de recursos financeiros. Há a estimativa anual de 700.000 a 1 milhão de casos novos a nível mundial. Apresenta-se de três formas: a cutânea, a mucosa e a visceral (1,2).

Na forma cutânea a aparência e extensão das lesões da pele varia conforme a espécie, bem como fatores genéticos do hospedeiro e geralmente ocorre em uma área exposta acessível para flebótomos, como o rosto, pescoço e membros. Manifesta-se inicialmente como uma pápula indolor que progride ao longo de semanas a meses para um nódulo ou uma úlcera úmida que pode estar associada a linfadenite localizada ou linfadenopatia. As lesões cutâneas podem apresentar-se como lesões extensas e de tamanhos variados. A forma mucosa se manifesta como nódulos e infiltrados na cartilagem nasal levando a obstrução, destruição e colapso do septo nasal. A faringe, o palato, o lábio superior e a laringe também podem ser

envolvidos, podendo resultar em grave destruição tecidual e desfiguração grosseira da face (3).

## 1.2 Leishmaniose visceral

No continente americano, a *Leishmania infantum* é a espécie comumente responsável pela leishmaniose visceral (LV). A LV é a forma mais grave e, se não tratada, levará ao óbito em mais de 95% dos casos. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), ocorrerão, a nível mundial, 20.000 a 30.000 óbitos ao ano por LV. Em 2016, mais de 90% dos casos novos, notificados, ocorreram em 7 países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. A doença está distribuída nas diferentes faixas etárias, porém, ocorre com maior frequência em crianças até dez anos de idade (59%), sendo que 46% dos casos registrados são em menores de cinco anos (4). Nas Américas, a LV está presente em 12 países, sendo que 96% dos casos estão concentrados no Brasil e entre 2001 e 2016 foram relatados 53.442 casos novos. Em 2017 foram notificados 4.515 casos, sendo que 1.889 (41,8%) dos casos notificados estão na faixa etária de menores de 1 a 9 anos de idade. A LV no Brasil tem predominado na zona urbana (70%) e apresentado uma expansão territorial com um aumento na incidência em adultos maiores de 40 anos. No estado de Minas Gerais foram notificados 877 casos confirmados em 2017 (19,4%). As modificações ambientais causadas por movimentos migratórios e a ocupação urbana não planejada juntos com saneamento precário são possíveis fatores que podem estar envolvidos no processo de urbanização da LV no Brasil. Além disso, o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, adaptou-se ao peridomicílio onde há a presença de animais domésticos, como cães (5).

A LV é considerada uma doença crônica, sistêmica e que possui um período médio de incubação de 10 dias a 1 ano, quando ocorre a invasão do sistema retículo-endotelial do hospedeiro. Os parasitos do gênero *Leishmania* são capturados por fagocitose e convertidos dentro dos macrófagos no estágio replicativo de amastigotas; se reproduzem, se espalham para novos macrófagos e causam as manifestações da doença. Pode se apresentar como uma forma subclínica em 30% dos casos. Fatores de risco para o desenvolvimento da doença clínica incluem a infância, a desnutrição, o uso de medicamentos ou patologias imunossupressoras e, especialmente, a coinfeção pelo HIV. Pacientes coinfectados podem ser difíceis de diagnosticar, respondem mal ao tratamento e apresentam frequentes recaídas. A forma clínica clássica da LV é caracterizada por febre, anorexia, perda de peso, distensão abdominal e fraqueza, que progridem ao longo de semanas a meses. Haverá um acúmulo de

células fagocíticas mononucleares dentro dos órgãos invadidos manifestando-se clinicamente como hepatoesplenomegalia e palidez (6, 7, 8). A linfadenopatia é observada em algumas regiões endêmicas como o Sudão (9). No Brasil, uma forma subclínica caracterizada por febre baixa, diarréia hipodesenvolvimento e hepatoesplenomegalia foi atribuída a *Leishmania infantum* (10).

A resposta do hospedeiro ao parasita é muito complexa e não há um modelo simples para explicar a patogênese da leishmaniose. Esta complexidade pode derivar de diferenças intrínsecas nos parasitas e na resposta imune do hospedeiro. Alterações hematológicas como anemia e/ou pancitopenia são frequentes na LV (11).

### 1.3 Alterações hematológicas na leishmaniose visceral

A anemia é a alteração hematológica mais frequente na LV, com uma prevalência global superior a 90%. O grau de anemia é moderado a grave, com a média da hemoglobina em torno de 7,5 g/dL (12). Pode ser responsável por sintomas encontrados em indivíduos com LV, incluindo: fadiga, mal-estar, fraqueza e palidez. Apesar de ser um achado comum, os mecanismos responsáveis pela anemia na LV são variáveis. Observações clínicas e estudos experimentais tem demonstrado os possíveis fatores envolvidos na patogênese da anemia na LV. Esses possíveis fatores estão relacionados dentro das três categorias de classificação etiopatogênica das anemias: a perda de sangue, a redução da produção de hemácias e o aumento da destruição das hemácias (11, 13).

Em relação à perda de sangue, apesar de ser associada à anemia grave que pode levar à morte, a frequência de sangramento relatada entre os pacientes com LV é menor de 10% na maioria dos casos, tornando a perda de sangue improvável como a principal causa de anemia durante a LV (11, 14).

A eritropoiese fisiológica é dependente da capacidade multiplicativa dos eritrócitos e da intensa síntese protéica de hemoglobina. Essas características dos eritrócitos estão relacionadas à produção da eritropoietina e à quantidade de ferro no organismo. A medula óssea, maior produtora de eritrócitos, é um sítio de parasitismo e a disfunção na eritropoiese ou a chamada diseritropoiese é frequente na LV. Estudos relatam que a eritropoietina sérica está aumentada em infectados com LV em comparação aos não infectados. Quanto menores são os valores da hemoglobina maior os valores de eritropoietina, maior o número de reticulócitos e a série eritrocítica na medula óssea. Ao longo do tratamento, observam-se a diminuição da eritropoietina e a normalização dos outros achados (15, 16, 17).

A anemia na LV pode ter mecanismos semelhantes aos encontrados na anemia de doença crônica, como a retenção anormal de ferro por macrófagos. Sabemos que os microorganismos patogênicos apresentam mecanismos especializados para obter ferro do hospedeiro durante o processo infeccioso, mas, o hospedeiro mamífero também evoluiu e apresenta múltiplos mecanismos de imunidade inata, limitando a disponibilidade de ferro (18). Estudo recente demonstrou uma correlação positiva entre as concentrações séricas do heme, da hemoxygenase-1 (HO-1) e da desidrogenase láctica (LDH); bem como uma correlação negativa entre valores do heme e da contagem de neutrófilos no sangue periférico. Observou-se que a infecção *in vitro* por *L. infantum*, na presença do heme, aumenta a ativação de neutrófilos, levando a neutropenia, e promove a sobrevivência do parasita. Indicando que o heme promove a sobrevivência intracelular de *L. infantum* via ativação da função neutrofílica e estresse oxidativo, além da indução de morte celular. Os níveis séricos de ferro têm mostrado que não são tão baixos para serem relacionados à anemia da LV que apresenta ferropenia (11,19).

A hemofagocitose induzida por imunocomplexos, na medula óssea e no baço, e alterações na membrana da hemácia estão provavelmente envolvidos na patogênese da anemia e resultam em remoção de eritrócitos pelo baço. Em recente estudo em murinos, a hemofagocitose estava mais associada com a anemia na LV, em contraste com menor contribuição de anticorpos anti-eritrocitários e/ou da diseritropoiese (20).

Os mecanismos pelos quais os macrófagos hemofagocitam as células sanguíneas e as suas conseqüências permanecem desconhecidos. Pesquisa em camundongos examinou vários parâmetros hematológicos e histológicos durante uma infecção ou durante a infusão estéril de Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ). Demonstrou-se que a exposição sistêmica e contínua de camundongos a IFN- $\gamma$ , em níveis fisiológicos durante diversas infecções, é suficiente para causar uma anemia grave. Esta anemia desenvolve-se rapidamente, de forma consumptiva, diferente da anemia hipoprodutiva da doença crônica. A anemia ocorre na ausência de hemorragia, de autoanticorpos ou de hemólise e está associada à hemofagocitose, e tanto a anemia quanto a hemofagocitose são dependentes da ação do IFN- $\gamma$  nos macrófagos. Definiu-se esse novo processo patológico, como anemia consumptiva da inflamação para distingui-la da anemia hipoprodutiva das doenças crônicas. Elevações moderadas da LDH são observadas na hemofagocitose (21). É de extrema importância as pesquisas que estudam os fatores contribuintes para a anemia na LV. A hemólise e a hiperativação de macrófagos parasitados são fatores-chave para a hemofagocitose associada à LV (20, 21).



A anemia pode vir acompanhada de leucopenia, trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada. A leucopenia, demonstrada em torno de 75% dos casos de LV, é uma manifestação precoce com neutropenia e linfocitose relativa, o diferencial mostra uma quase completa ausência de eosinófilos e a presença de eosinofilia praticamente exclui o diagnóstico de LV. Estudos demonstram que o infiltrado inflamatório inicial no local da infecção pela *Leishmania* inclui os eosinófilos. Além disso sua atividade anti-*Leishmania* e a secreção de citocinas imunomoduladoras torna-os importantes na resposta imune local e sistêmica. O eosinófilo possui ação antimicrobiana direta, recruta e ativa outras células imunes, controlando o dano tecidual causado pela resposta inflamatória local, e no desenvolvimento, a longo prazo, de resposta imune adaptativa. Uma maior infiltração de eosinófilos correlaciona com a presença de granulomas ricos em eosinófilos e menor carga parasitária (11, 22).

A trombocitopenia é observada após uma doença prolongada. Há relatos que a duração média da doença foi significativamente maior em pacientes trombocitopênicos em comparação com os não trombocitopênicos. O sequestro esplênico parece ser o principal fator responsável pela trombocitopenia (11). Anormalidades da coagulação ocorrem particularmente durante as formas mais graves da doença, podendo se observar o Tempo de Protrombina/RNI e o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA) prolongados e até achados de coagulação intravascular disseminada como o Dímero-D aumentado. Disfunção hepática com deficiência de fatores da coagulação, icterícia e ascite pode ser causada diretamente pelo parasita ou indiretamente pela resposta imune do hospedeiro (23, 24).

O papel da medula óssea na patogênese da LV ainda é pouco conhecido e tem sido objeto de pesquisas recentes (23).

#### 1.4 A medula óssea na leishmaniose visceral

Os achados mais comuns da medula óssea de pacientes portadores de LV relatados na literatura são: a hiperplasia eritrocítica, a plasmocitose e a presença de formas amastigotas intracelulares de *Leishmanias*. A série eritrocítica pode apresentar megaloblastose moderada a acentuada, sinais de hemoglobinizacão deficiente e de deficiência dos estoques de ferro. As séries granulocítica e megacariocítica podem demonstrar um aumento nas suas formas imaturas. A presença de eritrofagocitose e leucofagocitose são variáveis (46%) e a presença de granulomas pode ser observada (11, 25).

As características morfológicas da medula óssea foram descritas em 27 indivíduos com LV e foram classificadas em características comuns, incomuns e atípicas para auxiliar no diagnóstico correto e precoce, especialmente em casos clinicamente atípicos. Plasmocitose e hemofagocitose foram as características citológicas comuns, enquanto mielodisplasia, presença de formas amastigotas de *Leishmanias* em células não-histiocíticas e granuloma com necrose foram características incomuns. Agregados de amastigotas em forma de anel, florete ou cinta, junto com células gigantes, constituem as características morfológicas atípicas (26).

Estudos da leishmaniose *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que os macrófagos do estroma da medula óssea são um alvo para a infecção por *Leishmania*. Os macrófagos induzem à produção seletiva de GM-CSF e TNF- $\alpha$  aumentando, conseqüentemente a mielopoiese. Na LV de evolução arrastada o parasita induz a expansão de células tronco-hematopoéticas e prejudica a diferenciação dessas células. Estudos em camundongos sugerem que o aumento da hematopoiese contribui para a patogênese da leishmaniose visceral experimental, assim como, a diminuição da expansão das células-tronco resulta em menor carga parasitária. A *Leishmania* é capaz de modificar a medula óssea do hospedeiro facilitando a persistência do parasita. Esses estudos demonstram que a gravidade das alterações hematológicas geralmente dependem da duração da doença e do tamanho do baço, e não do número de células mononucleares parasitadas (27, 28).

O envolvimento de órgãos e sistemas na LV é coerente com a alta produção de citocinas pró-inflamatórias e são típicos de uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica de desenvolvimento lento (29).

### 1.5 Parâmetros biológicos e imunológicos na leishmaniose visceral

As desidrogenases láticas (LDH) são um grupo de enzimas que catalisam o final da reação da fase anaeróbica do metabolismo dos carboidratos. Atuam na redução do ácido pirúvico para o ácido lático na ausência relativa de oxigênio, e na reação reversa do ácido pirúvico para o ácido lático, na presença de oxigênio. Estão distribuídas por vários tecidos, principalmente rim, fígado, coração, músculos e eritrócitos. Quando células e tecidos são destruídos, ocorre a liberação da LDH no sangue. Por essa razão, valores de LDH elevados no plasma podem indicar a ocorrência de lesões ou falhas teciduais (30).

A eritropoetina é o principal fator de crescimento que regula a eritropoiese e 90% de sua produção acontece no tecido renal, sendo os 10% restantes produzidos no fígado. A

eritropoetina se liga ao seu receptor expresso especificamente em precursores eritróides, estimulando a sua proliferação e diferenciação, levando a um aumento eritrocítico (31).

As interleucinas (ILs) ou Citocinas são proteínas que promovem a comunicação entre os leucócitos através da ligação a receptores específicos na membrana celular. A expressão de citocinas depende das moléculas apresentadoras de antígeno e das células T. Células T CD4+ são divididas em subconjuntos distintos de acordo com o perfil das citocinas e podem se diferenciar em células efectoras foliculares TH1, TH2, TH9, TH17, TH22 e células T efectoras. Esses subconjuntos de células T pode promover diferentes tipos de respostas inflamatórias de acordo os seus respectivos perfis de citocinas, as respostas a quimiocinas e as interações com outras células. As células TH1 produzem a citocina Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), que protege contra patógenos intracelulares e desempenha um papel na morte induzida por ativação de queratinócitos da pele, células epiteliais da mucosa e células T (32,33).

O IFN- $\gamma$  participa do controle e da replicação celular, e são modificadoras da resposta imunológica, com efeitos antiviral, antiproliferativo e imunomodulador. O Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) constitui um grupo de citocinas capazes de provocar a morte de células tumorais e possuem uma vasta gama de ações pró-inflamatórias e é secretado principalmente por macrófagos. A IL-3 é uma citocina ativadora do fator de crescimento hematopoiético, de basófilos e de eosinófilos. A IL-6 é uma citocina que estimula o fígado à síntese de proteínas de fase aguda; nos leucócitos estimula o tráfico e a ativação; nas células T estimula a diferenciação, ativação, sobrevivência; nas células B estimula a diferenciação, produção de IgG, IgM, IgA e hematopoiese e a IL-10 é responsável pela supressão imune (34,35).

Em relação à hematopoiese o Fator Estimulante de Colônia-2 (CSF-2) é uma citocina que estimula o crescimento e diferenciação de células precursoras hematopoiéticas de várias linhagens, incluindo granulócitos, macrófagos, eosinófilos e eritrócitos. Importante citocina envolvida na eritropoiese, age em cooperação com a eritropoetina ativando as vias de transdução de sinais. O IFN- $\gamma$ , o TNF- $\alpha$ , o TNF ligante indutor de apoptose (TRAIL) e a IL-1 desempenham um papel na inibição da proliferação e diferenciação de células progenitoras eritróides. Estudos têm demonstrado que as citocinas pró-inflamatórias podem desencadear a supressão da produção de eritropoietina renal e, portanto, a eritropoiese (35).

As citocinas inflamatórias são encontradas elevadas na LV não complicada e, nas formas graves, a IL-6 está associada a doença letal e as citocinas IFN- $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL-8 e o TNF- $\alpha$  também estão envolvidos com a gravidade da doença. A inibição da IL-6 é um potencial alvo de terapia adjuvante para formas graves ou pediátricas desta doença (36).

## 1.6 Diagnóstico da leishmaniose visceral

O diagnóstico da LV pode ser realizado através da demonstração do parasita em tecidos como a medula óssea, o baço, o fígado e linfonodos, da cultura *in vitro*, da inoculação em animal, de técnicas sorológicas e moleculares (37).

Devido à especificidade de 100%, os métodos de demonstração do parasita ainda são considerados padrão de referência apesar de sua sensibilidade variar na punção de medula óssea de 60% a 85%, e na punção esplênica é de 95% podendo ser indicada somente em casos extremos (37,38).

O teste imunocromatográfico baseado no antígeno rK39 é o método mais adequado para o diagnóstico imunológico de LV. A sensibilidade do teste rápido com o antígeno rK39 é em torno de 90%, enquanto a sua especificidade pode chegar a 100% (39).

Novos métodos de identificação que podem potencialmente classificar a *Leishmania* diretamente de amostras de pacientes sem a necessidade de cultura, incluem os anticorpos monoclonais e inúmeros ensaios baseados em DNA, incluindo a Reação de Cadeia da Polimerase (PCR), PCR com sequenciamento, e análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP). Mais recentemente a PCR em tempo real, uma plataforma que pode processar uma amostra em menos de uma hora, foi desenvolvida para diferenciar rapidamente mutações de nucleotídeo único dentro de um sequência de DNA. A PCR em tempo real oferece a identificação rápida da *Leishmania* e fornece uma ferramenta molecular útil para ajudar tanto clínicos como epidemiologistas. Porém, essas técnicas moleculares ainda não são acessíveis em países em desenvolvimento (40).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Correlacionar os achados clínicos, laboratoriais e as características imunológicas do micro ambiente da medula óssea na leishmaniose visceral.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as características clínicas de indivíduos com LV.
- Avaliar as alterações hematopoiéticas em sangue periférico e na medula óssea de indivíduos com LV.
- Caracterizar a anemia nos indivíduos com LV.
- Mensurar a carga parasitária da medula óssea por microscopia óptica e pela técnica de qPCR de indivíduos com LV.
- Comparar as características clínicas com a anemia e a carga parasitária da medula óssea nos indivíduos com LV.
- Quantificar a expressão das citocinas CSF-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-3, IL-10, IL-6, pela técnica de RT-qPCR, na medula óssea de indivíduos com LV.
- Correlacionar a carga parasitária realizada em microscopia óptica e a realizada por qPCR.
- Correlacionar os níveis das citocinas CSF-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-3, IL-10, IL-6 na medula óssea com as alterações hematopoiéticas no sangue periférico e na medula óssea de doentes com LV.

### 3 PRODUTOS

3.1 Produto 1: Artigo – **“Avaliação da patogênese e da gravidade da anemia em medula óssea de indivíduos com Leishmaniose Visceral”**.

Será enviado para o periodico: *Hematology, Transfusion and Cell Therapy Journal*.

3.2 Produto 2: Artigo - **“Características clínicas e laboratoriais da leishmaniose visceral e sua associação com os achados morfológicos e a carga parasitária da medula óssea”**.

Será enviado para o periodico: *Hematology, Transfusion and Cell Therapy Journal*.

### 3.1 PRODUTO 1

#### **Avaliação da patogênese e da gravidade da anemia em medula óssea de indivíduos com leishmaniose visceral.**

##### **Resumo**

**Objetivo:** Este estudo verificou a patogênese e a gravidade da anemia e a sua associação com as características clínicas, laboratoriais e imunológicas do micro ambiente da medula óssea na leishmaniose visceral (LV).

**Métodos:** Foram investigados 19 indivíduos com LV, de faixa etária variada. A anemia foi classificada em grave  $Hb \leq 7g/dL$  e não grave  $Hb > 7g/dL$ . A carga parasitária da medula óssea foi mensurada pela microscopia óptica e através da técnica de qPCR. As expressões gênicas das citocinas CSF-2, IL-3, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  foram analisadas também por RTqPCR na medula óssea.

**Resultados:** Anemia grave foi constatada em 8/19 (42,1%) e não grave em 11/19 (57,9%). A eritropoetina sérica estava elevada em 17/19 (89,5%) e com significância estatística entre os grupos ( $p=0,038$ ) e uma correlação negativa com a hemoglobina ( $p=0,029$ ,  $\rho=-0,519$ ). Todos os exames para investigação de anemia carencial e hemolítica foram sem significância estatística. A Proteína C Reativa ultrasensível (PCRus) apresentou significância entre os grupos ( $p=0,047$ ). A carga parasitária por qPCR apresentou correlação forte e significativa com a carga parasitária por microscopia óptica ( $p=0,006$ ,  $\rho=0,635$ ). O CSF-2 apresentou significância estatística entre os grupos ( $p=0,036$ ) e uma correlação negativa com a hemoglobina ( $p=0,488$ ,  $\rho=-0,194$ ), correlação positiva com a eritropoetina ( $p=0,009$ ,  $\rho=0,647$ ) e IL-10 ( $p=0,064$ ,  $\rho=0,473$ ). Há uma correlação positiva entre o IFN- $\gamma$  e o tamanho do fígado ( $p=0,009$ ,  $\rho=0,651$ ), IL-6 ( $p=0,000$ ,  $\rho=0,907$ ), IL-10 ( $p=0,000$ ,  $\rho=0,778$ ) e o TNF- $\alpha$  ( $p=0,028$ ,  $\rho=0,549$ ) e uma correlação do TNF- $\alpha$  com IL-6 ( $p=0,008$ ,  $\rho=0,636$ ) e IL-10 ( $p=0,000$ ,  $\rho=0,783$ ).

**Conclusão:** A partir dos resultados do estudo, conclui-se que a anemia nos indivíduos analisados, não se relaciona a fatores carenciais, perda sanguínea e/ou hemólise auto-imune e que os níveis de hemoglobina nos indivíduos com LV ativa estão correlacionados com a resposta inflamatória promovida por essa patologia. O trabalho é relevante para subsidiar no desenvolvimento de novos estudos e, poderá ter como alvo, terapêuticas baseadas na imunoterapia.

**Palavras-chaves:** leishmaniose visceral; anemia; inflamação; citocinas; medula óssea; carga parasitária

**\*Conflito de interesse:** Os autores declaram não haver conflito de interesse

##### **Correspondência para o autor:**

Sílvio Fernando Guimarães de Carvalho

Universidade Estadual de Montes Claros-UNIMONTES

Av. Cula Mangabeira, 562 – Bairro Cândida Câmara, CEP 39401-696

Montes Claros, MG, Brasil

## Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose endêmica nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. No Brasil, foram relatados 53.442 casos de LV entre 2001 e 2016. Em 2015 foram notificados 3.556 casos, sendo que 1.425 (40,1%) dos notificados estavam na faixa etária de menores de nove anos de idade (1). Após um período de incubação que dura de dez dias a um ano, a LV apresenta sinais e sintomas caracterizados por febre, anorexia, perda de peso, fraqueza, hepatoesplenomegalia, distensão abdominal e alterações dos parâmetros hematológicos como anemia ou pancitopenia (2, 3).

A eliminação da *Leishmania* do organismo humano infectado depende de uma resposta imune do tipo Th1 adequada, onde as células apresentadoras de antígenos produzem interleucina-12 (IL-12) que induzirá os linfócitos à produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) que levará os fagócitos infectados a exterminar as formas amastigotas intracelulares através da produção de substâncias altamente eficazes como o óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (4). Porém, a doença pode progredir devido a uma infinidade de fatores que impedem uma resposta ótima. Estes incluem a ação de citocinas supressoras como a interleucina-10 (IL-10), a exaustão de células T específicas, perda de arquitetura do tecido linfóide e defeito da resposta humoral (5).

As citocinas inflamatórias são encontradas elevadas na LV não complicada e, nas formas graves, a IL-6 está associada a doença letal e as citocinas IFN- $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL-8 e o TNF- $\alpha$  também estão envolvidos com a gravidade da doença. A inibição da IL-6 é um potencial alvo de terapia adjuvante para formas graves ou pediátricas desta doença (6).

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que os macrófagos do estroma da medula óssea são um alvo para a infecção pela *Leishmania*. Os macrófagos induzem à produção seletiva de GM-CSF e TNF- $\alpha$ , aumentando, conseqüentemente a mielopoiese (7). Na LV o parasita induz a expansão de células tronco-hematopoiéticas e prejudica a diferenciação dessas células. Estudos em camundongos sugerem que a expansão das células-tronco contribui para a patogênese da LV, assim como, a diminuição da hematopoiese resulta em menor carga parasitária (8). A *Leishmania* é capaz de modificar a medula óssea do hospedeiro facilitando a persistência do parasito (9).

A gravidade das alterações hematológicas geralmente dependem da duração da doença e do tamanho do baço e não do número de células mononucleares parasitadas (10). A anemia é a alteração hematológica mais freqüente na LV e é definida como uma condição na qual há uma quantidade diminuída de eritrócitos ou hemácias circulantes. Também pode ser definida como uma diminuição da concentração de hemoglobina ou massa eritrocitária em



comparação com controles pareados por idade (11). A anemia está presente em mais de 90% dos casos de LV, e é responsável por sinais e sintomas encontrados como: fadiga, mal-estar, fraqueza e palidez (12).

Apesar de ser um achado comum, os fatores causais da anemia na LV podem ser bastante variáveis. Observações clínicas e estudos experimentais têm demonstrado os seus possíveis mecanismos. Estes mecanismos causadores de anemia na LV estão relacionados dentro das três categorias de classificação etiopatogênica das anemias: a perda de sangue, a redução da produção de hemácias e o aumento da destruição das hemácias (13).

Em uma recente revisão sobre a anemia na LV, foram descritos 55 estudos, sendo que muitos foram experimentais e alguns em humanos, em que a anemia era de intensidade moderada a grave, com a média da hemoglobina entre 6 e 8 g/dL, sendo que a hemoglobina se recuperava após o tratamento da leishmaniose (14).

Apesar de estudos prévios sugerirem que os mecanismos da anemia na LV são semelhantes aos encontrados na anemia hipoproliferativa das doenças crônicas, como a retenção anormal de ferro por macrófagos (15,16), os níveis séricos de ferro em estudos anteriores não são tão baixos para relacionarmos a anemia da LV com ferropenia. Segundo alguns experimentos, a porção heme da hemoglobina promove a sobrevivência intracelular da *Leishmania* via ativação da função neutrofílica e estresse oxidativo, além da indução de morte celular (17).

O papel da medula óssea na patogênese da LV ainda é obscuro e tem sido objetivo de pesquisas recentes. A eritropoetina é o principal fator de crescimento que regula a eritropoiese e 90% de sua produção acontece no tecido renal, sendo os 10% restantes produzidos no fígado. A eritropoetina se liga ao seu receptor expresso especificamente em precursores eritróides, estimulando a sua proliferação e diferenciação, levando conseqüentemente a um aumento eritrocítico (18).

A eritropoiese fisiológica é dependente da capacidade multiplicativa dos eritrócitos e da intensa síntese protéica de hemoglobina. Essas características dos eritrócitos estão relacionadas à produção da eritropoietina e à quantidade de ferro no organismo. A medula óssea, maior produtora de eritrócitos, é um sítio de parasitismo e a disfunção na eritropoiese ou a chamada diseritropoiese é frequente na LV (19). Estudos relatam que a eritropoetina sérica está aumentada em infectados com LV em comparação aos não infectados. Quanto menores são os valores da hemoglobina maior os valores de eritropoetina, maior o número de reticulócitos e a série eritrocítica na medula óssea. Ao longo do tratamento, observam-se a diminuição da eritropoetina e a normalização dos outros achados (20,21).

Em relação à hematopoiese o Fator Estimulante de Colônia-2 (CSF-2) e a IL-3 são citocinas que estimulam o crescimento e a diferenciação de células precursoras hematopoiéticas de várias linhagens, incluindo granulócitos, macrófagos, eosinófilos e eritrócitos. Importantes citocinas envolvidas na eritropoiese, agem em cooperação com a eritropoetina ativando as vias de transdução de sinais (22). O IFN- $\gamma$ , o TNF- $\alpha$ , o TNF ligante indutor de apoptose (TRAIL) e a IL-1 desempenham um papel na inibição da proliferação e diferenciação de células progenitoras eritróides. As citocinas pró-inflamatórias podem desencadear a supressão da produção de eritropoetina renal e, portanto, a eritropoiese (23).

Os achados morfológicos mais comuns da medula óssea de indivíduos com LV relatados na literatura são: a hiperplasia eritrocítica, a plasmocitose e a presença intracelular de formas amastigotas de *Leishmania* (8). A série eritrocítica pode apresentar megaloblastose moderada a acentuada, sinais de hemoglobinizacão deficiente e de deficiência dos estoques de ferro. As séries granulocítica e megacariocítica podem demonstrar um aumento nas suas formas imaturas. A presença de hemofagocitose e leucofagocitose são variáveis (46%) e a presença de granulomas pode também ser observada (10, 19).

A hemofagocitose induzida por imunocomplexos, na medula óssea e no baço, e alterações na membrana da hemácia estão provavelmente envolvidos na patogênese da anemia e resultam em remoção de eritrócitos pelo baço. Em recente estudo em murinos, a hemofagocitose estava mais associada com a anemia na LV, em contraste com menor contribuição de anticorpos anti-eritrocitários e/ou da diseritropoiese (24).

Os mecanismos pelos quais os macrófagos hemofagocitam as células sanguíneas e as suas conseqüências permanecem desconhecidos. A exposição sistêmica e contínua de camundongos a IFN- $\gamma$ , em níveis fisiológicos durante diversas infecções, é suficiente para causar uma anemia grave. Esta anemia desenvolve-se rapidamente, de forma consumptiva, diferente da anemia hipoprodutiva da doença crônica. A anemia ocorre na ausência de hemorragia, de autoanticorpos ou de hemólise e está associada à hemofagocitose, e tanto a anemia quanto a hemofagocitose são dependentes da ação do IFN- $\gamma$  nos macrófagos. Definiu-se esse novo processo patológico, como anemia consumptiva da inflamação para distingui-la da anemia hipoprodutiva das doenças crônicas (25). A lactato desidrogenase (LDH), marcador de hemólise, apresenta elevações moderadas na hemofagocitose (24,25). A hemólise e a hiperativação de macrófagos parasitados são fatores-chave para a hemofagocitose associada à LV.

As pesquisas que estudam os fatores contribuintes para a anemia na LV são de extrema importância, pois, a partir de novas descobertas, ações poderão ser desenvolvidas

para sanar os sinais e sintomas da LV decorrentes dessa alteração. Portanto, o objetivo desse estudo foi verificar a patogênese e a gravidade da anemia e a sua associação com as características clínicas, laboratoriais e imunológicas do micro ambiente da medula óssea na leishmaniose visceral.

### **Material e Métodos**

Este estudo transversal, analítico e descritivo foi realizado no Hospital Universitário Clemente de Faria da Universidade Estadual de Montes Claros/Unimontes, conveniado ao Sistema Único de Saúde (SUS) e localizado na cidade de Montes Claros, região norte do estado de Minas Gerais, de alta endemicidade e centro de referência em leishmaniose. A população do estudo constituiu-se de dezenove indivíduos internados entre agosto de 2015 a janeiro 2016 com medula óssea positiva para LV, de faixa etária variada e que concordaram em participar do estudo. Foram excluídos os indivíduos que tiveram o diagnóstico em outros serviços, indivíduos soropositivos para HIV, recidivados para LV e com patologias imunossupressoras.

Os sinais clínicos investigados foram: febre, icterícia, manifestações hemorrágicas, medidas do fígado e do baço. Foram analisados os seguintes exames: hemograma, plaquetas, Proteína C Reativa ultrasensível (PCRus), lactato desidrogenase (LDH), haptoglobina, bilirrubinas, teste de Coombs, ferritina, índice de saturação da transferrina, eritropoetina, vitamina B12, ácido fólico, eletroforese de hemoglobina e anti-HIV. A anemia foi classificada em grave quando a hemoglobina era  $\leq 7\text{g/dL}$  e não grave se a hemoglobina  $> 7\text{g/dL}$  (11).

Foram coletados 1 a 2 mL de medula óssea e as lâminas foram coradas pela técnica de May Grünwald-Giemsa e examinadas pela hematologista pesquisadora. O maior cuidado foi tomado para evitar qualquer diluição significativa do aspirado da medula óssea por sangue periférico e tais espécimes diluídas foram excluídas. Para avaliação da carga parasitária foram realizadas duas técnicas: a primeira técnica foi determinada segundo Stauber (1955) modificado, expressa como Leishman Donovan Units (LDU index) que corresponde ao número de amastigotas por 1000 células nucleadas da medula óssea e assim classificada: baixa densidade quando foram encontradas de 0-10 parasitos, moderada densidade de 10 a 30 parasitos e alta densidade quando maior que 30 parasitos (27).

A segunda técnica foi a determinação da carga parasitária em medula óssea pela técnica de qPCR com base em curvas padrão. As extrações de DNA foram realizadas utilizando o kit comercial NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel). A qPCR foi preparada em um volume final de 10 $\mu\text{L}$ , sendo 1 $\mu\text{L}$  dos primers (Forward + Reverse), 5 $\mu\text{L}$  de SYBR Green PCR Mastermix e 4 $\mu\text{L}$  de cDNA das amostras testadas (5ng/ $\mu\text{L}$ ). Os iniciadores para identificação dos genes analisados foram: (DNA de mini-círculo (kDNA) de *L. infantum*: 5'-

CTTTTCTGGTCCCGCG GGTAGG-3' (forward); 5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3'(reverse). As reações foram realizadas no ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, EUA) e foi iniciada após desnaturação do DNA a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 15 segundos, seguidos de anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto.

A expressão de citocinas determinadas na medula óssea foram a CSF-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-3, IL-10, IL-6. As extrações de RNAm foram realizadas utilizando o kit comercial NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel). O RNAm foi transcrito em cDNA com o kit de transcrição reversa (Thermo Fisher Scientific, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A RTqPCR foi preparada em um volume final de 10 $\mu$ L, sendo 1 $\mu$ L dos primers (Forward + Reverse), 5 $\mu$ L de SYBR Green PCR Mastermix e 4 $\mu$ L de cDNA das amostras testadas (5ng/ $\mu$ L). Os iniciadores para análise da expressão dos genes analisados estão descritos na tabela 1. As reações foram realizadas no ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, EUA) e foi iniciada após desnaturação do DNA a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 15 segundos, seguidos de anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Para a quantificação relativa dos genes específicos, foi utilizado gene endógeno beta 2 microglobulina, como normalizador (Tabela 1).

Este estudo obedeceu as Diretrizes e Normas Regulamentadoras envolvendo seres humanos, Portaria do Conselho Nacional de Saúde, resolução nº196/96. O termo de consentimento livre e esclarecido/TCLE foi obtido dos indivíduos pesquisados ou do seu responsável e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Unimontes, parecer nº 677.061.

#### Análise estatística

Os dados foram coletados e analisados utilizando software SPSS versão 18.0. Para comparação das médias entre as variáveis laboratoriais e clínicas foi utilizado o teste t de Student. Para verificar a normalidade foi usado o teste de Kolmogorov-Smirnov. As correlações entre as variáveis foram realizadas com o teste de Pearson. Neste estudo, um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

#### Resultados

Dos dezenove indivíduos incluídos no estudo, 10 (52,6%) eram do sexo masculino e 9 (47,4%) do sexo feminino sendo que, 15 (78,9%) eram crianças menores de nove anos de idade. Entre as manifestações clínicas observadas, a febre, a esplenomegalia e a hepatomegalia, estavam presentes em todos os indivíduos, porém sem uma diferença estatística entre os anêmicos graves e os anêmicos não graves (tabela 2). Havia manifestações hemorrágicas em 2 e icterícia em apenas um indivíduo.

Sobre os achados laboratoriais, todos os indivíduos eram anêmicos sendo 8/19 (42,1%) graves e 11/19 (57,9%) não graves. A média da hemoglobina dos anêmicos graves foi de  $6,15 \pm 1,10$  g/dL e dos não graves foi de  $8,66 \pm 0,69$  g/dL e com significância estatística entre os grupos ( $p=0,000$ ), (tabela 2, figura 1). A pancitopenia foi observada em 13/19 (68,4%) dos indivíduos, sendo a trombocitopenia com significância estatística entre os grupos ( $p=0,022$ ), (tabela 2).

Na possibilidade de anemia carencial foi observado que, apesar da ferritina elevada em 12/19 (63,2%) dos indivíduos, o índice de saturação da transferrina estava diminuído somente em 6/19 (31,6%), porém sem significância estatística entre os 2 grupos (Figura 2). As vitaminas B12 e o ácido fólico encontravam-se dentro dos limites da normalidade.

Na avaliação de provável hemólise associada a LV, foi observado que a LDH estava elevada em 17/19 (89,5%) dos indivíduos, a bilirrubina indireta elevada em 8/19 (42%), a haptoglobina diminuída em 7/19 (36,8%), o teste de coombs direto negativo em todos os indivíduos. O traço falciforme estava presente em 2/19 (10,5%), porém todos estes achados foram sem significância estatística entre os grupos, (Figura 2).

A eritropoetina estava acima dos valores de referência em 17/19 (89,5%) com significância estatística entre os dois grupos ( $p=0,038$ ) (Figura 2), e uma correlação negativa com a hemoglobina ( $p=0,027$ ,  $\rho = -0,519$ ) (Figura 5). A PCRus apresentou-se elevada em 18/19 (94,7%) com diferença estatística entre os grupos ( $p=0,047$ ) e uma correlação negativa com a hemoglobina ( $p=0,049$ ,  $\rho = -0,471$ ), (figura 3).

A carga parasitária na medula óssea pela microscopia óptica apresentou uma baixa densidade parasitária em 13/19 (68,4%) já em 21% (4/19) foi observada uma densidade parasitária moderada. A carga parasitária na medula óssea avaliada por qPCR mostrou uma correlação positiva significativa ( $p=0,006$ ) com a carga parasitária por microscopia óptica. Não foi observada uma significância estatística entre os grupos para a carga parasitária (figura1), e também não houve uma significativa correlação com os valores da hemoglobina, (figura3).

Na análise dos marcadores imunológicos da medula óssea, observou-se que somente o CSF-2 apresentou uma diferença estatística entre os grupos ( $p=0,036$ ), (figura 1). Há uma correlação negativa entre a hemoglobina e as citocinas IL-10 ( $\rho = -0,521$ ,  $p=0,038$ ), IL-6 ( $\rho = 0,442$ ,  $p=0,086$ ), (figura 3). Há uma correlação positiva forte entre o IFN- $\gamma$  e o tamanho do fígado ( $p=0,009$ ,  $\rho = 0,651$ ), IL-6 ( $p=0,000$ ,  $\rho = 0,907$ ) e IL-10 ( $p=0,000$ ,  $\rho = 0,778$ ) (Figura 4). Observamos uma correlação forte do TNF- $\alpha$  com IL-6 ( $p=0,008$ ,  $\rho = 0,636$ ) e

com IL-10 ( $p=0,000$ ,  $\rho=0,783$ ) (Figura 4) e também uma correlação positiva forte entre o CSF-2 e a eritropoetina ( $p=0,009$ ,  $\rho=0,647$ ) (Figura 5).

### **Discussão**

Sabemos que a *Leishmania* estabelece uma infecção crônica na medula óssea, local predominante da hematopoiese, e está associada à pancitopenia e pode levar à falha na sua produção (28). Entretanto o papel da medula óssea na patogênese da LV permanece obscuro.

Apesar da perda de sangue ser associada à anemia grave, podendo levar à morte, a frequência de sangramento observada entre os indivíduos com LV foi mínima, tornando-a improvável como causa de anemia nesses indivíduos em concordância com relatos da literatura (14).

A eritropoiese fisiológica é dependente da capacidade multiplicativa e da intensa síntese protéica dos eritrócitos. Essas características dos eritrócitos estão relacionadas à produção da eritropoietina e à quantidade de ferro no organismo. A eritropoietina elevada nos indivíduos estudados correspondeu à queda da hemoglobina e à hiperplasia eritrocítica na medula óssea e está coerente com os estudos prévios (21).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que a *leishmania* altera a hematopoiese do hospedeiro para manter a sua própria expansão. Parasitos do gênero *Leishmania* desenvolveram múltiplos mecanismos para sobreviver dentro de seus alvos, os macrófagos, e para promover o recrutamento de mais monócitos para o local da infecção. Os mecanismos pelos quais os macrófagos hemofagocitam as células sanguíneas e as suas conseqüências permanecem desconhecidas. A hemólise e a hiperativação de macrófagos parasitados são fatores-chave para o mecanismo da hemofagocitose associada à LV (24,25).

As células progenitoras hematopoéticas expressam receptores para citocinas pró-inflamatórias e vários estudos já demonstraram que uma ação direta das citocinas sobre as células hematopoéticas *in vitro* podem prejudicar o desenvolvimento eritróide e o número de células progenitoras (23). O IFN- $\gamma$  suprime a eritropoiese diretamente ou induzindo a expressão do TNF- $\alpha$ , que inibe a eritropoiese. No entanto, os achados imunológicos do nosso estudo não apresentaram uma diferença estatística significativa entre as expressões gênicas da IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  entre os grupos anêmicos graves e não graves. Mas, apesar de não termos observado diferenças entre as médias dessas citocinas entre os grupos, observou-se que há uma correlação negativa com os níveis de hemoglobina, sinalizando que a LV é caracterizada por um processo inflamatório levando a um quadro de anemia do tipo consumptiva (7,24).

Em nosso estudo, em concordância com a literatura, o CSF-2 aumenta proporcionalmente ao aumento da eritropoetina, provavelmente na tentativa de compensar a queda da hemoglobina ( $p < 0,05$ ).

### **Conclusões**

A partir dos resultados do estudo, conclui-se que os níveis de hemoglobina nos indivíduos com LV ativa estão correlacionados com a resposta inflamatória promovida por essa patologia. Essa afirmação se baseia nos achados das correlações negativas entre as expressões gênicas das citocinas na medula óssea e a redução da hemoglobina. O trabalho é relevante para subsidiar no desenvolvimento de novos estudos e, tendo como alvo, terapêuticas baseadas na imunoterapia.

## Referências

1. MS - Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação – disponível em <http://portalsinan.saude.gov.br/sinan-net>
2. Guerin PJ et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases*. 2002; Vol 2.
3. Pace D. Leishmaniasis. *J Infect* 69 S10-18 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016> PMID:25238669, 2014
4. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(8):604–15.
5. Rodrigues et al. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection *Parasites & Vectors* (2016) 9:118
6. Costa DL et al. Serum cytokines associated with severity and complications of Kala-azar. *Pathogens and Global Health*. 2013;107(2).
7. Cotterell SJE, Engwerda CR, Kaye PM. *Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF- $\alpha$ . *Blood*. 2000;95:1642–1651.
8. Daneshbod Y, Dehghani SJ, Daneshbod K. Bone Marrow Aspiration Findings in Kala-Azar. *Acta Cytologica*. 2010;54(1).
9. Abidin B.M. et al. Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis. *PLOS Pathogens* | <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006422> August 7, 2017
10. Varma N, Naseem S. Hematologic Changes in Visceral Leishmaniasis/Kala Azar *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2010; 26(3):78–82.
11. WHO. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO/NMH/NHD/MNM/11.1) <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>, acessado [30/11/2018]
12. Osman OF, Kager PA, Oskam L. Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects. *Trop Med Int Health* 2000; 5: 553–62.
13. Wintrobe's clinical hematology. — 13th ed. / edited by John P. Greer — [et al.]
14. Goto Y, Cheng J, Omachi S, Morimoto A. Prevalence, severity, and pathogenesis of anemia in visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* DOI 10.1007/s00436-016-5313-x, 2016.
15. Ganz T. Iron and infection. *Int J Hematol*. 2018;107:7–15.
16. Barber MF, Elde NC. Buried Treasure: Evolutionary Perspectives on Microbial Iron Piracy. *Trends in Genetics*. 2015;31(11), 627–636.
17. Quintela-Carvalho G. et al. Heme drives oxidative stress-associated cell death in human neutrophils infected with *Leishmania infantum*. *Frontiers in Immunology*. 2017; (8):Article 1620.
18. Zago, MA, Falcão, RP, Pasquini, R. Tratado de Hematologia. Editora Atheneu, 2014.
19. Dhingra K.K. et al. Morphological findings in bone marrow biopsy and aspirate smears of visceral kala azar: A review. 2010;(53):1,96-100.



20. Lafuse WP et al. Leishmania donovani Infection Induces Anemia in Hamsters by Differentially Altering Erythropoiesis in Bone Marrow and Spleen. *www.plosone.org*. 2013;8(3).
21. Saeed AM, Khalil EA, Elhassan AM, Hashim FA, Fandrey J, Jelkmann W. Serum erythropoietin concentration in anaemia of visceral leishmaniasis (kala-azar) before and during antimonial therapy. *Br J Haematol*. 1998;100:720–724
22. AKDIS M. et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-g: Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;701-721.
23. Morceau F, Dicato M, Diederich M. Pro-inflammatory cytokine-mediated anemia: regarding molecular mechanisms of erythropoiesis Hindawi Publishing Corporation *Mediators of Inflammation*. Volume 2009, Article ID 405016, 11 pages.
24. Morimoto A et al. Hemophagocytosis in experimental visceral Leishmaniasis by *Leishmania donovani*. *PLoS Negl Trop Dis* 10:e0004505. doi:10.1371/journal.pntd.0004505, 2016.
25. Zoller EE et al. Hemophagocytosis causes a consumptive anemia of inflammation *The Journal of Experimental Medicine*. 2011;208(6).

Tabela 1 - Primers utilizados nas análises de expressões gênicas medulares

<b>Alvos</b>	<b>Sequência do <i>Primer</i></b>	<b>Fonte</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	5'GTTTTGGGTCTCTTGGCTGTTA3'	Boeuf, P, <i>et al.</i> ,2005
	5'AAAAGAGTTCCATTATCCGCTACATC3'	
<b>CSF-2</b>	5'CACTGCTGCTGAGATGAATGAAA3'	Baxter et al., 2012
	5'GTCTGTAGGCAGGTCGGCTC3'	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	5'CCCAGGCAGTCAGATCATCTTC3'	Banda, R, et al.,2012
	5'GTACAACATCGTTTGGGAGTTCG3'	
<b>IL-03</b>	5'GGACTTCAACAACCTCAATGGG3'	Baxter et al., 2012
	5'TTGAATGCCTCCAGGTTTGG3'	
<b>IL-10</b>	5'GCT GGA GGA CTT TAA GGG TTA CCT3'	Boeuf, P, <i>et al.</i> ,2005
	5'CTT GAT GTC TGG GTC TTG GTT CT 3'	
<b>IL-6</b>	5'CCTGAGAAAGGAGACATGTAACAAGA3'	Joo, J.H. and Jetten, A. M., 2008
	5'GGCAAGTCTCCTCATTGAATCC3'	

Tabela 2 - Dados clínicos e laboratoriais dos indivíduos com LV com anemia grave e não grave.

<b>Parâmetros</b>	<b>Anêmico Grave N=8</b>	<b>Anêmico não grave N=11</b>	<b>p valor</b>
<b>Tamanho de Baço (cm)</b>	5,7±3,2	7,2±3,0	0,322
<b>Tamanho de Fígado (cm)</b>	4,8±3,1	5,6±2,7	0,605
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	6,15±1,10	8,66±0,69	0,000
<b>Plaquetas (mm<sup>3</sup>)</b>	89888±29420	1561810±111533	0,022
<b>Leucócitos (mm<sup>3</sup>)</b>	2472±1215	4079±2230	0,061

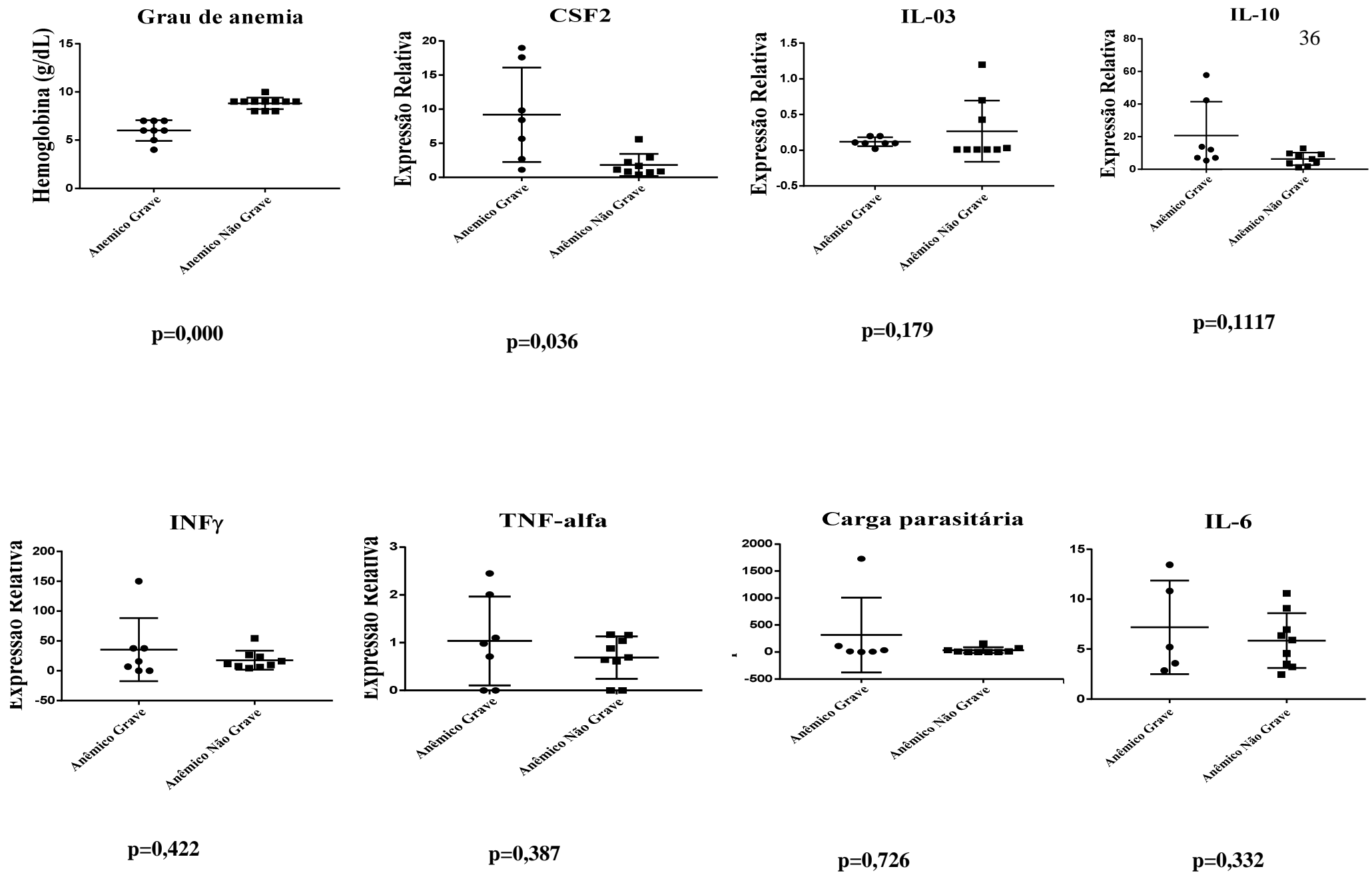


Figura 1 Comparação dos níveis de hemoglobina, carga parasitária e expressão gênica de citocinas entre pacientes com LV anêmico grave e não grave. A expressão de RNAm das citocinas foi analisada através de normalização para o gene endógeno beta 2 microglobulina usando a fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . \* p valor para os grupos anêmico grave e não grave.

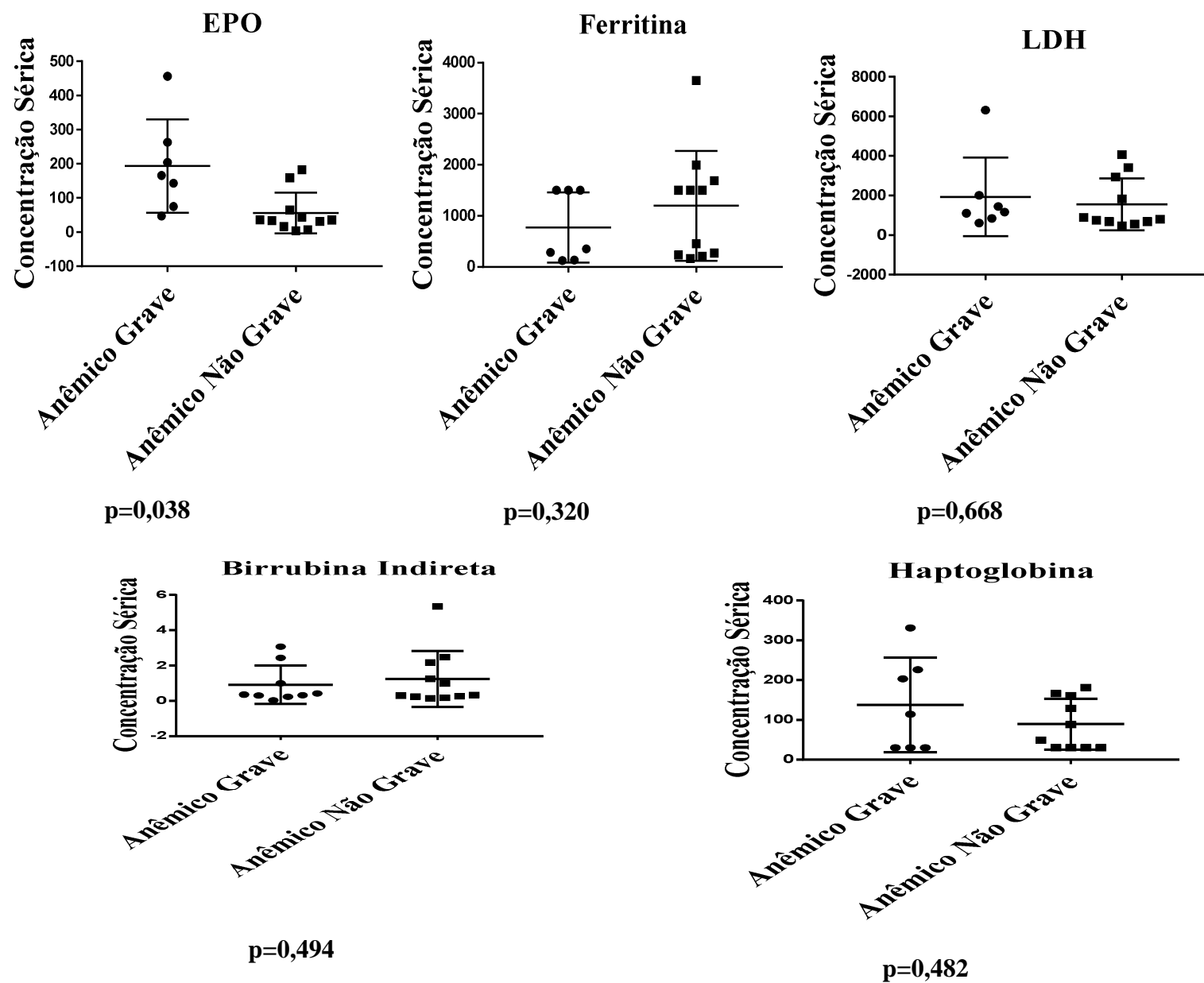


Figura 2. Comparação de parâmetros laboratoriais ente indivíduos com LV anêmico grave e não grave.

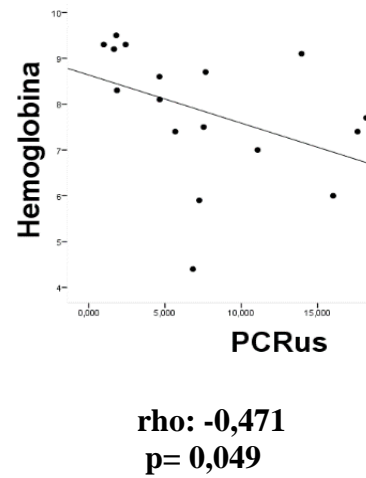
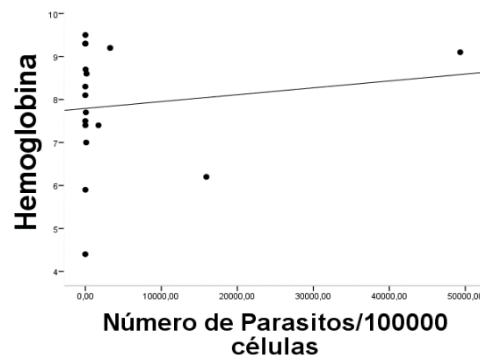
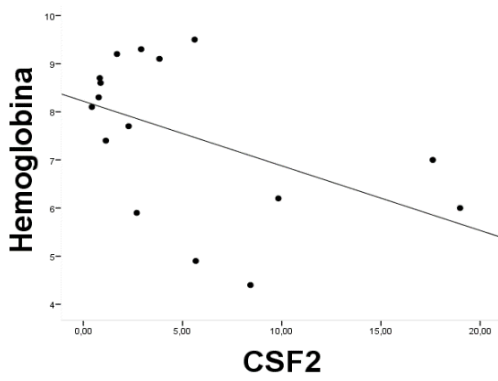
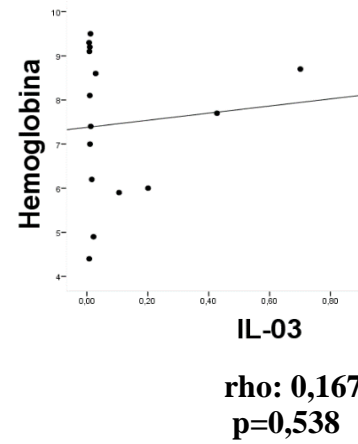
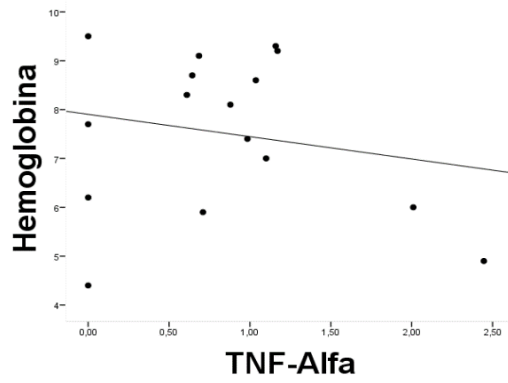
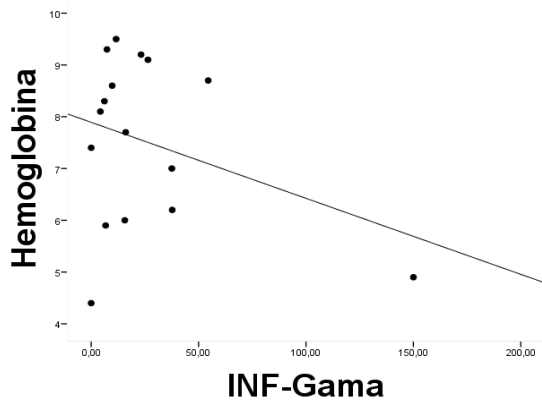
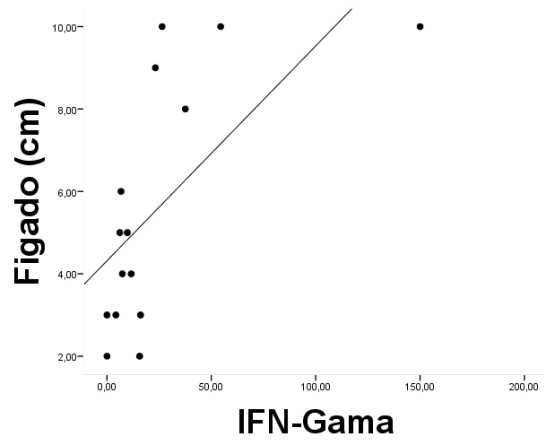
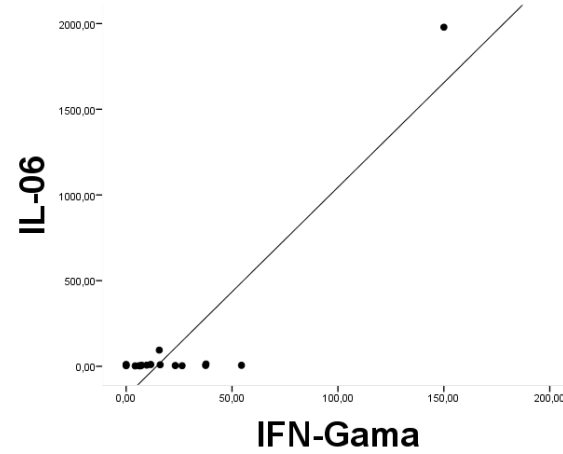


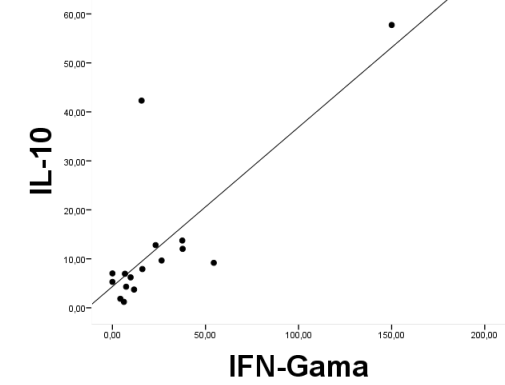
Figura 3. Correlação da hemoglobina com a expressão gênica das citocinas e a carga parasitária por qPCR-RT



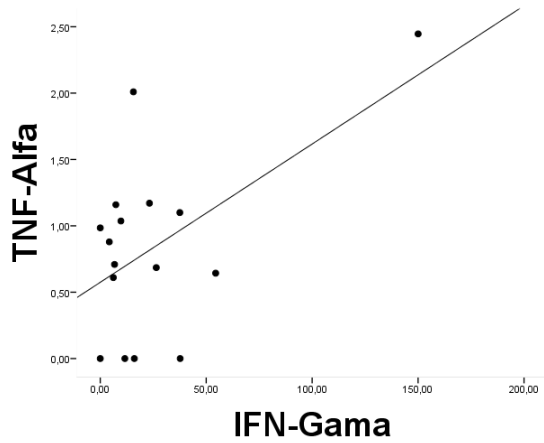
$\rho = 0,651$   $p = 0,009$



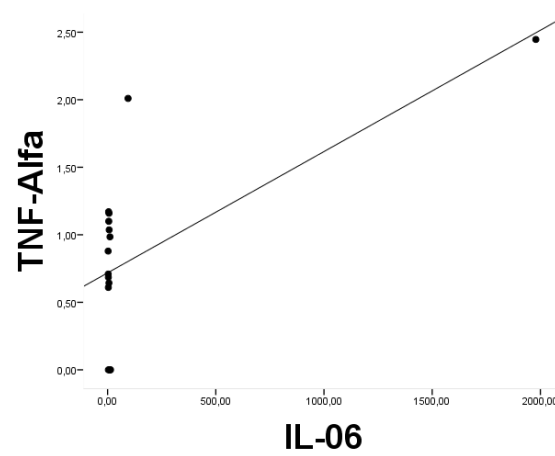
$\rho = 0,907$   $p = 0,000$



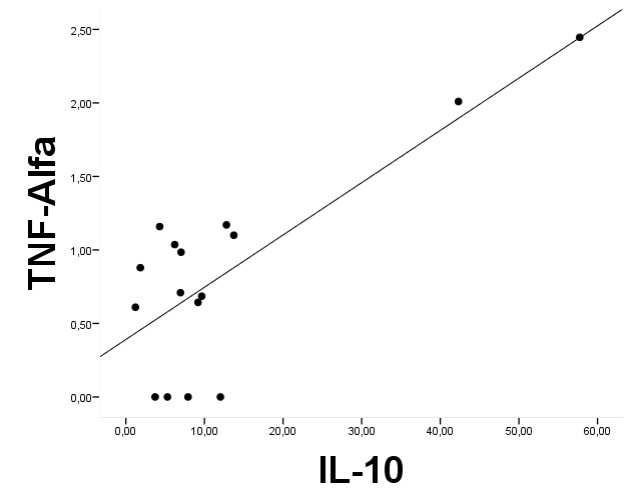
$\rho = 0,778$   $p = 0,000$



$\rho = 0,549$   $p = 0,028$



$\rho = 0,636$   $p = 0,008$



$\rho = 0,783$   $p = 0,000$

Figura 4. Correlações entre expressão gênica medular de citocinas e correlação do IFN- $\gamma$  com o tamanho do fígado.

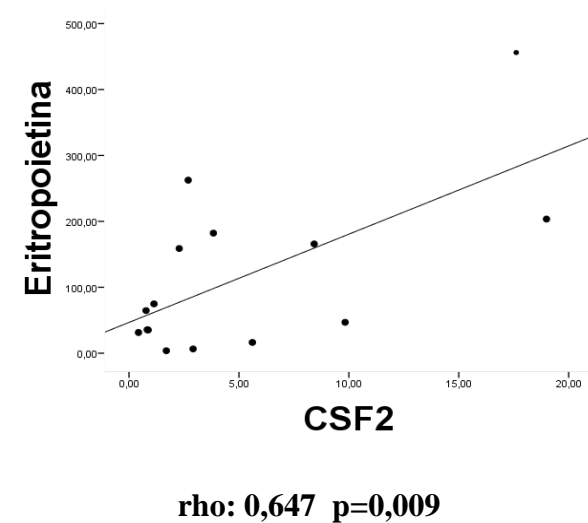
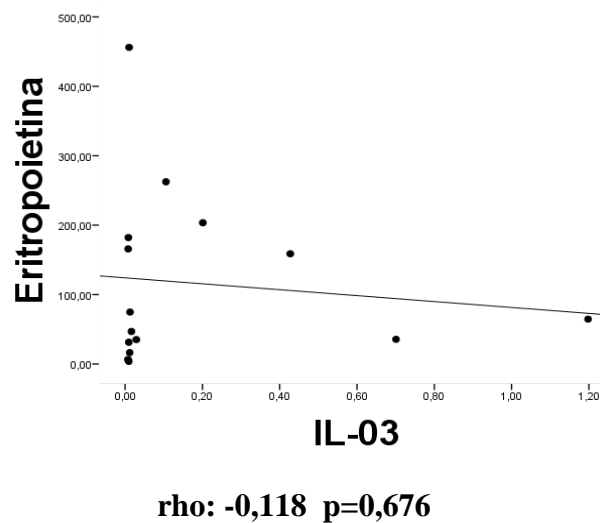
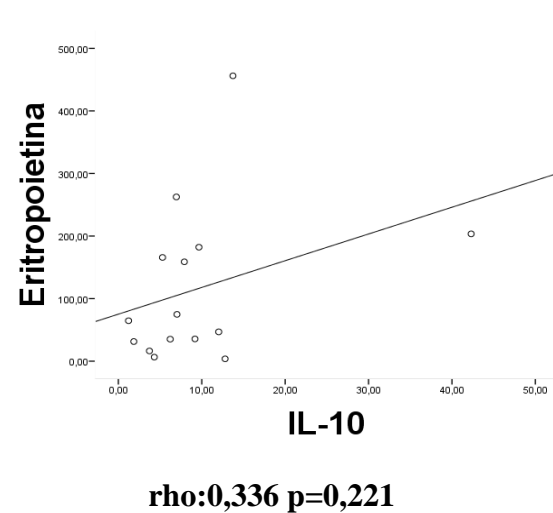
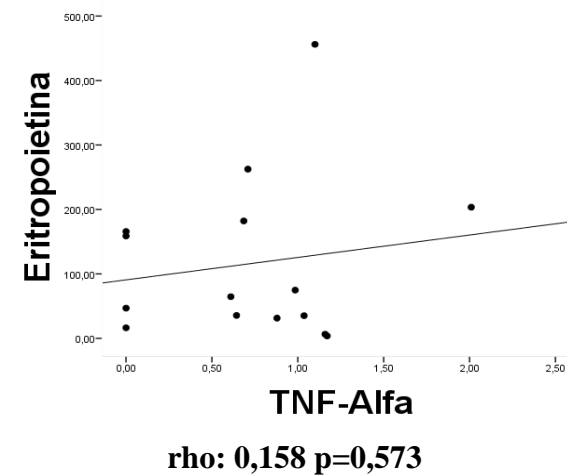
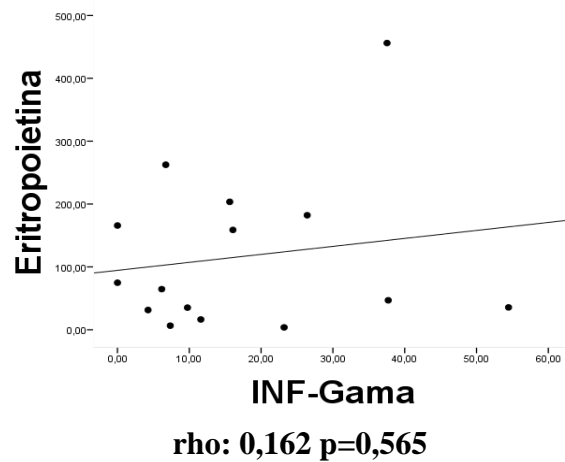
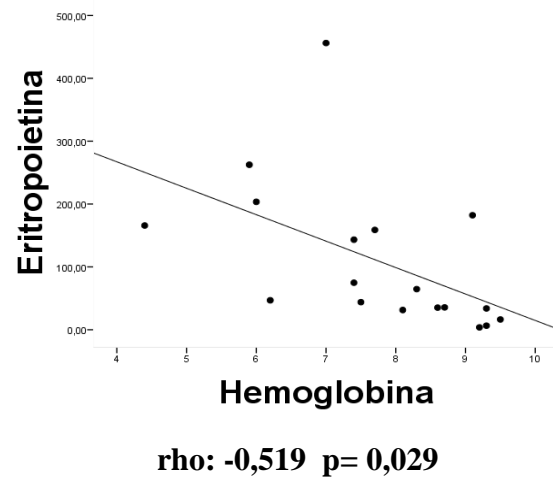


Figura 5 Correlação dos níveis séricos de eritropoietina com a hemoglobina plasmática e a expressão gênica medular de citocinas



### 3.2 PRODUTO 2

#### **Associação das características clínico-laboratoriais, achados morfológicos e a carga parasitária da medula óssea na leishmaniose visceral**

##### **Resumo**

**Objetivo:** Este estudo analisou as características clínicas e laboratoriais da leishmaniose visceral e sua associação com os achados morfológicos e a carga parasitária da medula óssea por microscopia óptica e pela qPCR.

**Métodos:** Foram investigadas as características clínicas e laboratoriais em 19 indivíduos com LV, de faixa etária variada. A carga parasitária da medula óssea foi mensurada pela microscopia óptica e através da técnica de qPCR.

**Resultados:** As crianças menores de nove anos de idade representaram a maioria dos indivíduos 15/19 (78,9%). A febre e a hepatoesplenomegalia estavam presentes em 100% dos indivíduos, sendo que o tamanho do fígado apresentou uma correlação positiva significativa com a TGO ( $p=0,054$ ,  $\rho=0,490$ ), TTPA ( $p=0,005$ ,  $\rho=0,648$ ) e carga parasitária por qPCR-RT ( $p=0,040$ ,  $\rho=0,502$ ). A anemia estava presente em 100% dos indivíduos e a pancitopenia foi observada em 13/19 (68,4%). A LDH estava elevada em 17/19 (89,5%) com uma correlação positiva significativa com a TGO ( $p=0,000$ ,  $\rho=0,805$ ), RNI ( $p=0,007$ ,  $\rho=0,625$ ), TTPA ( $p=0,008$ ,  $\rho=0,621$ ) e série eritrocítica ( $p=0,005$ ,  $\rho=0,648$ ). A RNI apresentou uma correlação positiva significativa com a PCRus ( $p=0,024$ ,  $\rho=0,544$ ). A avaliação da medula óssea demonstrou uma carga parasitária baixa, por microscopia óptica, em 14/19 (73,7%). Observou-se uma correlação positiva entre as cargas parasitárias ( $p=0,006$ ,  $\rho=0,635$ ). A análise citológica evidenciou uma medula óssea com celularidade estimada normocelular em 14/19 (73,7%). A série eritrocítica se apresentava com hiperplasia relativa em 18/19 (94,7%) e diseritropoiética 19/19 (100%). Observaram-se parasitas intra e extracelulares, isolados ou em agrupamentos e hemofagocitose somente em 3/19 (15,8%) dos indivíduos.

**Conclusão:** O conhecimento das características clínicas e laboratoriais na LV pode desempenhar um papel importante no diagnóstico diferencial da hepatoesplenomegalia febril, especialmente em áreas endêmicas e em um país em desenvolvimento, onde os recursos são limitados. Ressalta-se a avaliação das características morfológicas da medula óssea através da punção aspirativa como uma ferramenta que auxilia e direciona ao diagnóstico da leishmaniose visceral.

**Palavras-chaves:** leishmaniose visceral; *Leishmania infantum*; medula óssea; carga parasitária

**\*Conflito de interesse:** Os autores declaram não haver conflito de interesse

##### **Correspondência para o autor:**

Sílvio Fernando Guimarães de Carvalho

Universidade Estadual de Montes Claros-UNIMONTES Montes Claros, MG, Brasil

Av. Cula Mangabeira, 562 – Bairro Cândida Câmara, CEP 39401-696

Montes Claros, MG, Brasil

## Introdução

A leishmaniose é uma zoonose de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento e, conseqüentemente, está associada à desnutrição, deslocamento de populações, pobreza, imunodeficiências e falta de recursos financeiros. É causada por protozoário do gênero *Leishmania spp* e no continente americano, a *Leishmania infantum* é a espécie responsável pela leishmaniose visceral (LV) e transmitida pela picada de inseto infectado, do gênero *Lutzomyia*. Em 2015 mais de 90% dos casos novos, notificados, ocorreram em 7 países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. A doença está distribuída nas diferentes faixas etárias, porém, ocorre com maior frequência em crianças até dez anos de idade (59%), sendo que, 46% dos casos registrados ocorrem em menores de cinco anos (1). No Brasil, foram relatados 53.442 casos de LV entre 2001 e 2016, sendo que a maioria está na faixa etária de menor de 1 a 9 anos de idade (2, 3).

A LV é considerada uma doença crônica, sistêmica e possui um período médio de incubação de 10 dias a 1 ano, quando ocorrerá a invasão do sistema retículo endotelial do hospedeiro. Parasitos do gênero *Leishmania* são capturados por fagocitose e convertidas dentro dos macrófagos no estágio replicativo de amastigotas; se reproduzem, se espalham para novos macrófagos e causam as manifestações da doença. A forma clínica clássica da LV em zonas endêmicas é caracterizada por febre, anorexia, perda de peso, distensão abdominal e fraqueza, que progridem ao longo de semanas a meses. As formas amastigotas são encontradas dentro de neutrófilos e células fagocíticas mononucleares, ou livres nos órgãos, principalmente no baço e na medula óssea, que podem abrigar a maior carga de parasitas. Haverá um acúmulo de células fagocíticas mononucleares dentro dos órgãos invadidos manifestando-se clinicamente com palidez e hepatoesplenomegalia (4, 5).

A LV causa alterações morfológicas e funcionais no fígado. O envolvimento hepático tem sido relacionado ao parasitismo e a ativação das células de Kupffer com alterações fibróticas, principalmente quando o parasitismo é de longa duração. A patogênese do dano hepático não é clara, mas pode ter uma base imunológica. Alterações fibróticas foram relatadas após o tratamento da LV podendo levar à persistência da hepatomegalia (6, 7).

A LV sintomática, se não tratada, progredirá para comprometimento de múltiplos órgãos, manifestações hemorrágicas, infecções secundárias e óbito dentro de 2 a 3 anos em mais de 95% dos casos. Estudo de caso-controle demonstrou que crianças menores de 1 ano e idosos, desnutrição, duração da febre e presença de vômitos, diarreia, anemia grave, icterícia, esplenomegalia e trombocitopenia são fatores de risco para morte. Nesse mesmo estudo, a carga parasitária foi associada a anemia grave e sangramento fatal (8). Em outro estudo foi

encontrado uma forte correlação entre a doença grave e uma maior carga parasitária em sangue periférico sugerindo que a desnutrição pode levar à imunossupressão permitindo a replicação do parasita, maior produção de citocinas inflamatórias, inflamação e morte (9).

Os métodos de pesquisa direta da *Leishmania*, no baço e na medula óssea, são considerados para o diagnóstico de LV, ressaltando-se o risco da punção esplênica. Nos últimos anos, a reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) tem sido relatada como uma ferramenta precisa para detecção e quantificação de vários parasitas e está sendo aplicada com sucesso para detectar e quantificar a *Leishmania spp* (10, 11).

O objetivo desse estudo foi analisar as características clínicas e laboratoriais na leishmaniose visceral e sua associação com os achados morfológicos e a carga parasitária da medula óssea por microscopia óptica e pela qPCR.

### **Métodos**

Estudo transversal, analítico e descritivo realizado em dezenove indivíduos com leishmaniose visceral em Montes Claros, cidade localizada no norte do estado de Minas Gerais, região de alta endemicidade e centro de referência em leishmaniose. Foram excluídos indivíduos soropositivos para HIV, apresentando recidiva e com patologias imunossupressoras.

Os sinais clínicos investigados foram febre, icterícia, manifestações hemorrágicas, medidas do fígado e do baço. Foram analisados os seguintes exames: hemograma, PCR ultrasensível, desidrogenase láctica (LDH), proteínas totais e frações, transaminases, Protrombina/Relação Normalizada Internacional (RNI), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA), anti-HIV.

Foram coletados 1 a 2 mL de medula óssea e as lâminas foram coradas pela técnica de May Grünwald-Giemsa e examinadas pela hematologista pesquisadora. O maior cuidado foi tomado para evitar qualquer diluição significativa do aspirado da medula óssea por sangue periférico e tais espécimes diluídas foram excluídas. Para avaliação da carga parasitária foram realizadas duas técnicas: a primeira técnica foi determinada segundo Stauber modificado, expressa como *Leishman Donovan Units* (LDU *index*) que corresponde ao número de amastigotas por 1000 células nucleadas da medula óssea e assim classificada: baixa densidade quando foram encontradas de 0-10 leishmanias, moderada densidade de 10 a 30 leishmanias e alta densidade quando maior que 30 leishmanias, (12).

A segunda técnica foi a determinação da carga parasitária em medula óssea pela técnica de qPCR com base em curvas padrão. As extrações de DNA foram realizadas utilizando o kit comercial NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel). A qPCR foi preparada em um volume final de 10µL, sendo 1µL dos primers (Forward + Reverse), 5µL de SYBR Green PCR Mastermix e

4 $\mu$ L de cDNA das amostras testadas (5ng/ $\mu$ L). Os iniciadores para identificação dos genes analisados foram: (DNA de mini-círculo (kDNA) de *L. infantum*: 5'-CTTTTCTGGTCCCGCG GGTAGG-3' (sense); 5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3'(anti-sense). As reações foram realizadas no ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, EUA) e foi iniciada após desnaturação do DNA a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 15 segundos, seguidos de anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto.

Os dados foram coletados e analisados utilizando software SPSS versão 18.0. Para comparação das médias entre as variáveis laboratoriais e clínicas foi utilizado o teste t de Student. Para verificar a normalidade foi usado o teste de Kolmogorov-Smirnov. As correlações entre as variáveis foram realizadas com o teste de Pearson. Neste estudo, um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## Resultados

Dos dezenove indivíduos do estudo, 10/19 (52,6%) eram do sexo masculino sendo que 15/19 (78,9%) eram crianças menores de 9 anos de idade. Entre as manifestações clínicas observadas, a febre e a hepatoesplenomegalia estavam presentes em todos os indivíduos (Tabela 1), sendo que o tamanho do fígado apresentou uma correlação positiva significativa com a TGO ( $p=0,054$ ), o TTPA ( $p=0,005$ ) e carga parasitária por qPCR ( $p=0,040$ ) (Figura1). As manifestações hemorrágicas em 2/19 (10,5%) e a icterícia 1/19 (5,3%).

O hemograma evidenciou anemia em 100% dos indivíduos. A hemoglobina estava  $< 7,0$  g/dL em 8/19 (42,1%) e  $> 7,0$ g/dL em 11/19 (57,9%). A leucopenia estava presente em 14/19 (73,7%) considerando a contagem de leucócitos com valor de referência  $> 4.000/mm^3$  e 13/19 (68,4%) apresentaram trombocitopenia considerando a contagem de plaquetas com valor de referência  $> 150.000/mm^3$  (Tabela 1). A pancitopenia foi observada em 68,4% dos indivíduos.

Em relação aos achados laboratoriais observamos que a LDH estava elevada em 17/19 (89,5%) dos indivíduos com uma correlação positiva significativa com a TGO ( $p=0,000$ ,  $\rho=0,805$ ), RNI ( $p=0,007$ ,  $\rho=0,625$ ), o TTPA ( $p=0,008$ ,  $\rho=0,621$ ) e série eritrocítica ( $p=0,005$ ,  $\rho=0,648$ ) (Figura 2). As transaminases estavam elevadas na maioria dos indivíduos sendo que a TGO apresentou uma correlação positiva significativa com a TGP ( $p=0,001$ ,  $\rho=0,688$ ) e o TTPA ( $p=0,012$ ,  $\rho=0,577$ ) (Figura 3). A RNI apresentou uma correlação positiva significativa com a PCRus ( $p=0,024$ ,  $\rho=0,544$ ) (Figura 3).

A avaliação da medula óssea demonstrou uma carga parasitária, por microscopia óptica, com baixa densidade parasitária em 14/19 (73,7%), moderada em 4/19 (21,0%) e alta em 1/19 (5,3%). Observou-se uma correlação positiva da carga parasitária por microscopia óptica com a carga parasitária por qPCR ( $p=0,006$ ,  $\rho=0,635$ ). A análise citológica evidenciou uma medula

óssea com celularidade estimada normocelular em 14/19 (73,7%), hipercelular em 2/19 (10,5%) e hipocelular em 3/19 (15,8%). Apresentava hiperplasia eritrocítica relativa em 18/19 (94,7%) e diseritropoiética 19/19 (100%). A diseritropoiese foi caracterizada pela presença de sinais de hemoglobinação deficiente, binucleação, pontes intercitoplasmáticas e figuras de mitose. Observaram-se parasitas intra e extracelulares, isolados ou em agrupamentos. A hemofagocitose estava presente em 3/19 (15,8%). Não observamos alterações no número de plasmócitos e de células reticulares, (Tabela 2), (Figuras 5, 6, 7).

### **Discussão**

Nesse estudo há uma predominância da LV na infância como relatado em pesquisas em regiões endêmicas (3, 4). As correlações do tamanho do fígado com as elevações das transaminases, do TTPA estão possivelmente relacionadas aos distúrbios morfológicos e funcionais do fígado e fibrose focal como já relatado na literatura (6, 7). Assim como a PCRus que é uma proteína produzida pelo fígado e geralmente tem suas concentrações séricas elevadas principalmente em processos inflamatórios e/ou infecciosos, podemos inferir que o fato de a PCRus apresentar correlação positiva com a RNI pode demonstrar que o processo inflamatório hepático pode refletir em sua disfunção. A PCRus e o tamanho do fígado apresentaram uma correlação positiva com a carga parasitária demonstrando que, quanto maior a densidade parasitária na medula óssea, pode significar um maior tempo de instalação da doença e do processo inflamatório conforme alguns estudos (8, 13).

Não houve diferença entre os outros achados laboratoriais e a carga parasitária, seja por microscopia óptica ou por qPCR, semelhante ao encontrado na literatura e podendo significar que não é possível prever a carga parasitária por outro parâmetro de avaliação laboratorial (14).

A presença de anemia em todos os indivíduos e de uma medula óssea com hiperplasia eritrocítica e diseritropoiética está coerente com a literatura. Esse tecido, maior produtor de eritrócitos, é um sítio de parasitismo e a diseritropoiese é frequente na LV. Em estudos experimentais em hamsters aumenta o número de populações progenitoras eritróides no baço e na medula óssea, inibe a eritropoiese pela apoptose de eritroblastos mediada por citocinas. Análise de biópsias da medula óssea de pacientes com LV indicam hiperplasia celular com muitas alterações nos eritroblastos, que incluem eritroblastos grandes e multinucleares com núcleos irregulares e núcleos em brotamento. Estas alterações displásicas resultam em eritropoiese ineficaz. Eritrócitos que são produzidos durante a LV também são mais suscetíveis a danos oxidativos e diminuição na sua sobrevivência que pode estar associada à hemofagocitose (15, 16).

Em estudos prévios há relatos de uma alta frequência de achados de hemofagocitose e plasmocitose diferindo dos achados da presente pesquisa. Ressalta-se que o estudo foi realizado por punção aspirativa da medula óssea e hipotetizamos que a biópsia de medula óssea poderia melhor evidenciar a hemofagocitose (17, 18).

### **Conclusões**

O conhecimento das características clínicas, laboratoriais e da medula óssea na LV pode desempenhar um papel importante no diagnóstico diferencial da hepatoesplenomegalia febril, especialmente em áreas endêmicas e em um país em desenvolvimento, onde os recursos são limitados. O mielograma é uma ferramenta que auxilia no diagnóstico na LV.

## Referências

1. Leishmaniasis disponível em: [www.who.int/leishmaniasis](http://www.who.int/leishmaniasis)
2. Brasil. Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação – disponível em <http://portalsinan.saude.gov.br/sinan-net>
3. Reis LL, Balieiro AAS, Fonseca FR, Ferreira MG. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017, 50(5):638-645.
4. Brasil. Ministério da Saúde/SVS. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120 p
5. Pace D. Leishmaniasis. *J Infect* 69 S10-18 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016> PMID:25238669, 2014
6. El Hag IA, Hashim FA, El Toum IA, Homeida M, El Kalifa M, El Hassan AM. Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). *Jf Clin Pathol.* 1994;47:547-551.
7. Duarte MIS, Andrade Jr, Takamura CFH, Sesso A, Tuon FF. TGF-beta and mesenchymal hepatic involvement after visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2009;104:1129-1136.
8. Costa CHN et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? – A case control study. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2010;43(4):386-392.
9. Silva JM et al. Bone Marrow Parasite Burden among Patients with New World Kala-Azar Is Associated with Disease Severity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014;90(4):621-626.
10. Sakkas H, Gartzonika C, Levidiotou S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Vector Borne Dis.* 2016;53:8-16.
11. Wortmann G. Rapid identification of leishmania complexes by a real-time PCR assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005;73(6):999–1004.
12. Stauber LA. *Leishmaniasis* in the hamster. In: Cole WH (Ed.). *Some physiological aspects and consequence of parasitism.* New Brunswick, NJ: Rutgers Uni. Press, 1995. P.77-90
13. Seaman J, Mercer AJ, Sondorp HE, Herwaldt BL. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. *Ann Intern Med.* 1996;124: 664-672.
14. Mourão MVA, Toledo Jr A, Gomes LI, Freire VV, Rabello A. Parasite load and risk factors for poor outcome among children with visceral leishmaniasis. A cohort study in Belo Horizonte, Brazil, 2010-2011. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro;*2014:1-7.
15. Morimoto A. et al. Hemophagocytosis in experimental visceral Leishmaniasis by *Leishmania donovani*. *PLoS Negl Trop Dis* 10:e0004505. doi:10.1371/journal.pntd.0004505, 2016.
16. Chandra H, Chandra S, Kaushik RM. Visceral Leishmaniasis with Associated Common, Uncommon, and Atypical Morphological Features on Bone Marrow Aspirate Cytology in Nonendemic Region. *Journal of Tropical Medicine.* Vol. 2013, Article ID 861032, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/861032>
17. Dhingra KK, Gupta P, Saroha V, Setia N, Khurana N, Singh T. Morphological findings in bone marrow biopsy and aspirate smears of visceral kalaazar: A review. *Indian Journal of pathology and Microbiology.* 2010;53(1):96-100.
18. Bhatia P, Haldar D, Varma N, Marwaha RK, Marwaha RK, Varma S. A Case Series Highlighting the Relative Frequencies Atypical/Unusual Hematological Findings Visceral Leishmaniasis. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2011; 3; Open Journal System

Tabela 1. Parâmetros clínicos e laboratoriais em indivíduos com leishmaniose visceral.

---

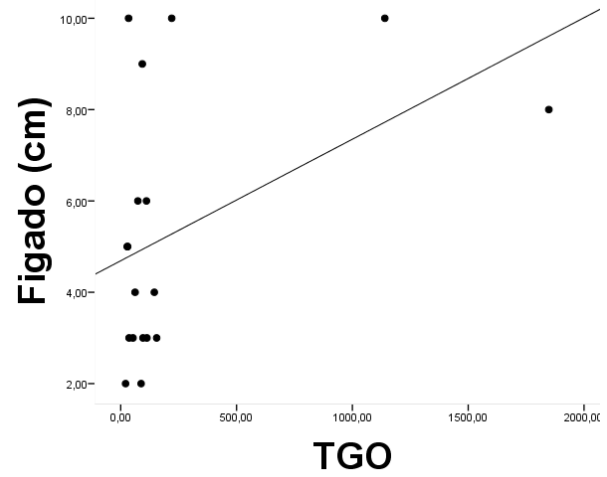
<b>Parâmetros</b>	<b>LV</b>
<b>Gênero (M/F)</b>	(10/9)
<b>Idade</b>	12,45±18,99
<b>Tamanho de Baço (cm)</b>	6,66±3,08
<b>Tamanho de Fígado (cm)</b>	5,33±2,86
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	7,61±1,54
<b>Plaquetas (mm<sup>3</sup>)</b>	117.315±97.160
<b>Leucócitos (mm<sup>3</sup>)</b>	3402±2000
<b>Albumina</b>	3,2±0,62

---

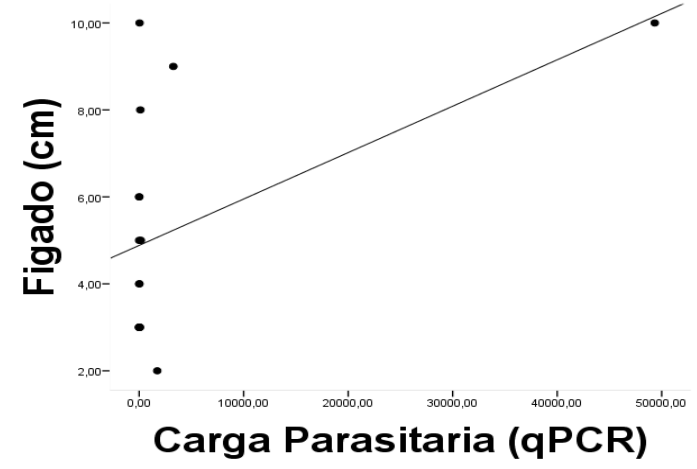


Tabela 2. Achados da medula óssea em indivíduos com leishmaniose visceral.

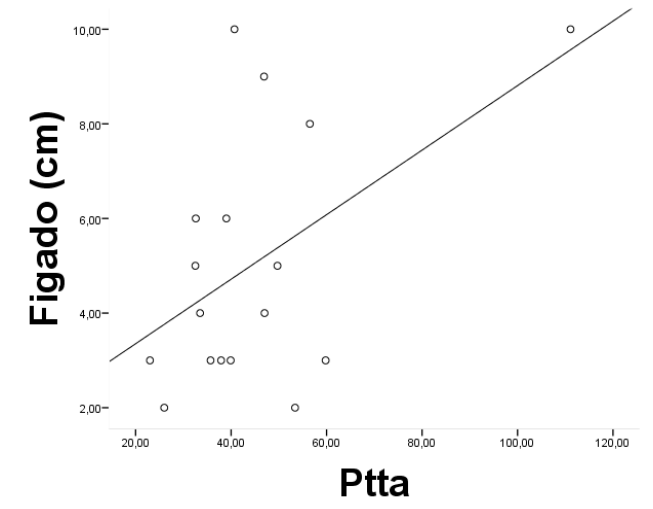
<b>Parâmetros</b>	<b>N=19</b>	<b>%</b>
Normocelular	14	73,7
Relação G:E <2,0	18	94,7
Diseritropoiese	19	100,0
Carga parasitária por microscopia óptica	Baixa-14	73,7
	Moderada-04	21,0
	Alta-01	5,3
Plasmócitos <5%	19	100,0
Hemofagocitose	3	15,8



**rho:0,490**  
**p= 0,054**



**rho: 0,502**  
**p= 0,040**



**rho: 0,648**  
**p= 0,005**

Figura 1. Correlação do tamanho do fígado com TGO, Ptta e carga parasitária.

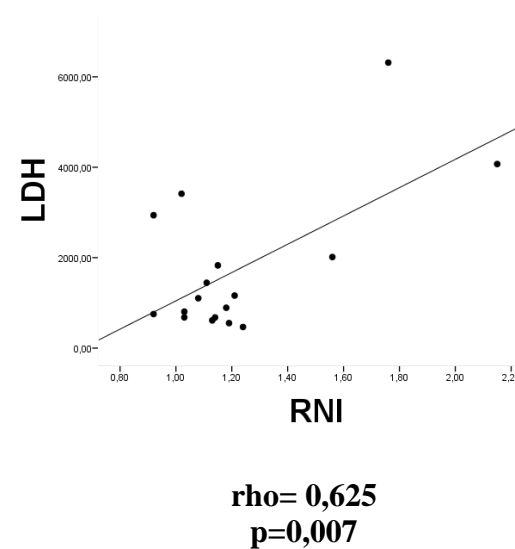
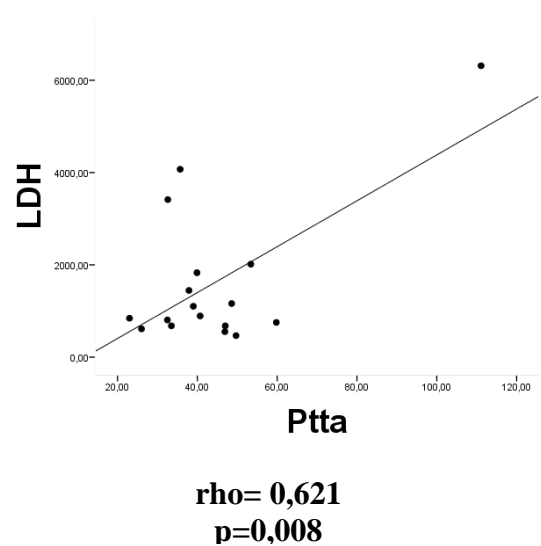
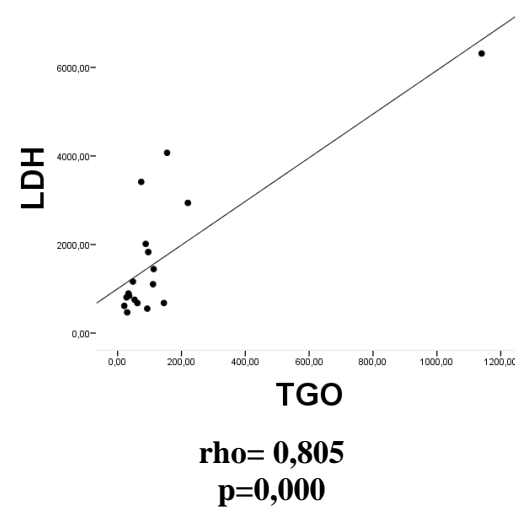
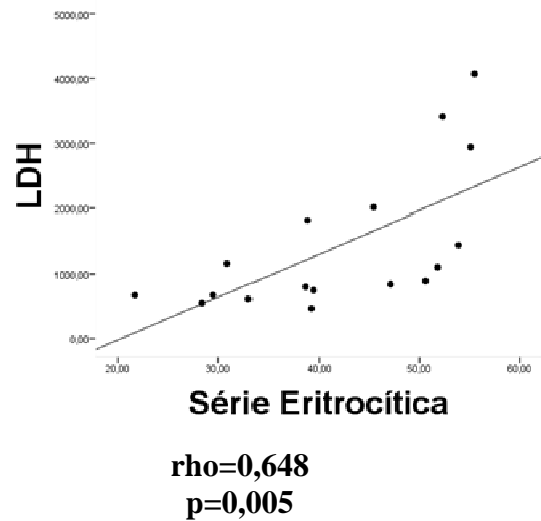


Figura 2. Correlação da LDH com a série eritrocítica, TGO, TTPA e RNI

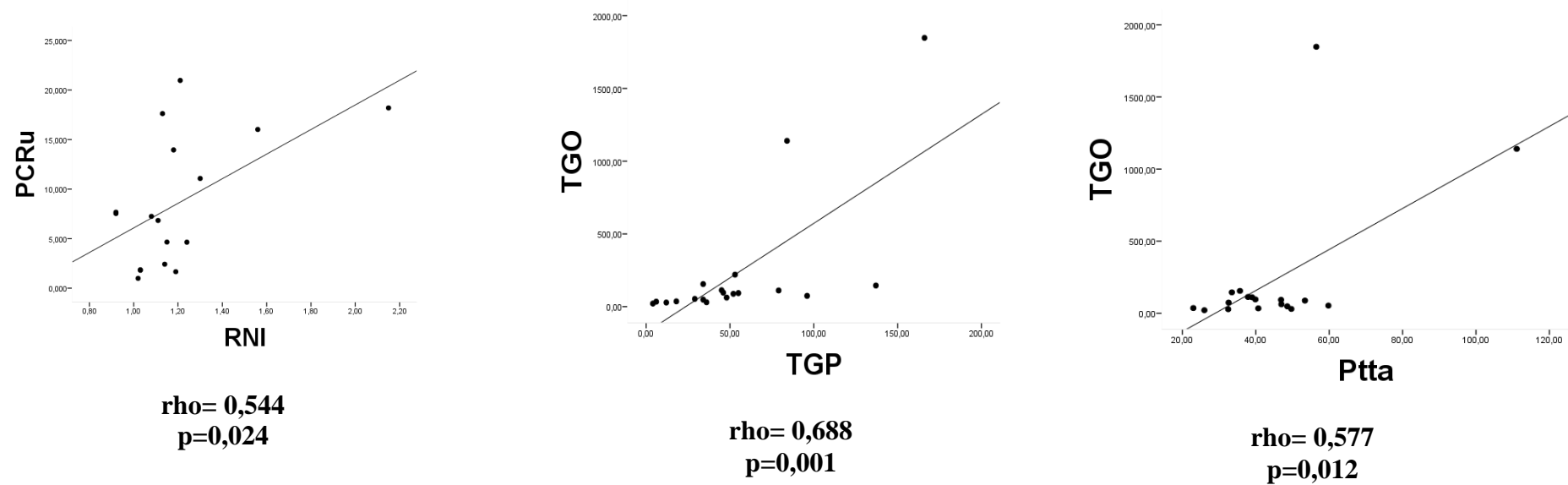


Figura 3 Correlações das concentrações séricas de PCRus com o RNI, TGO com TGP e TGO com Ptta.

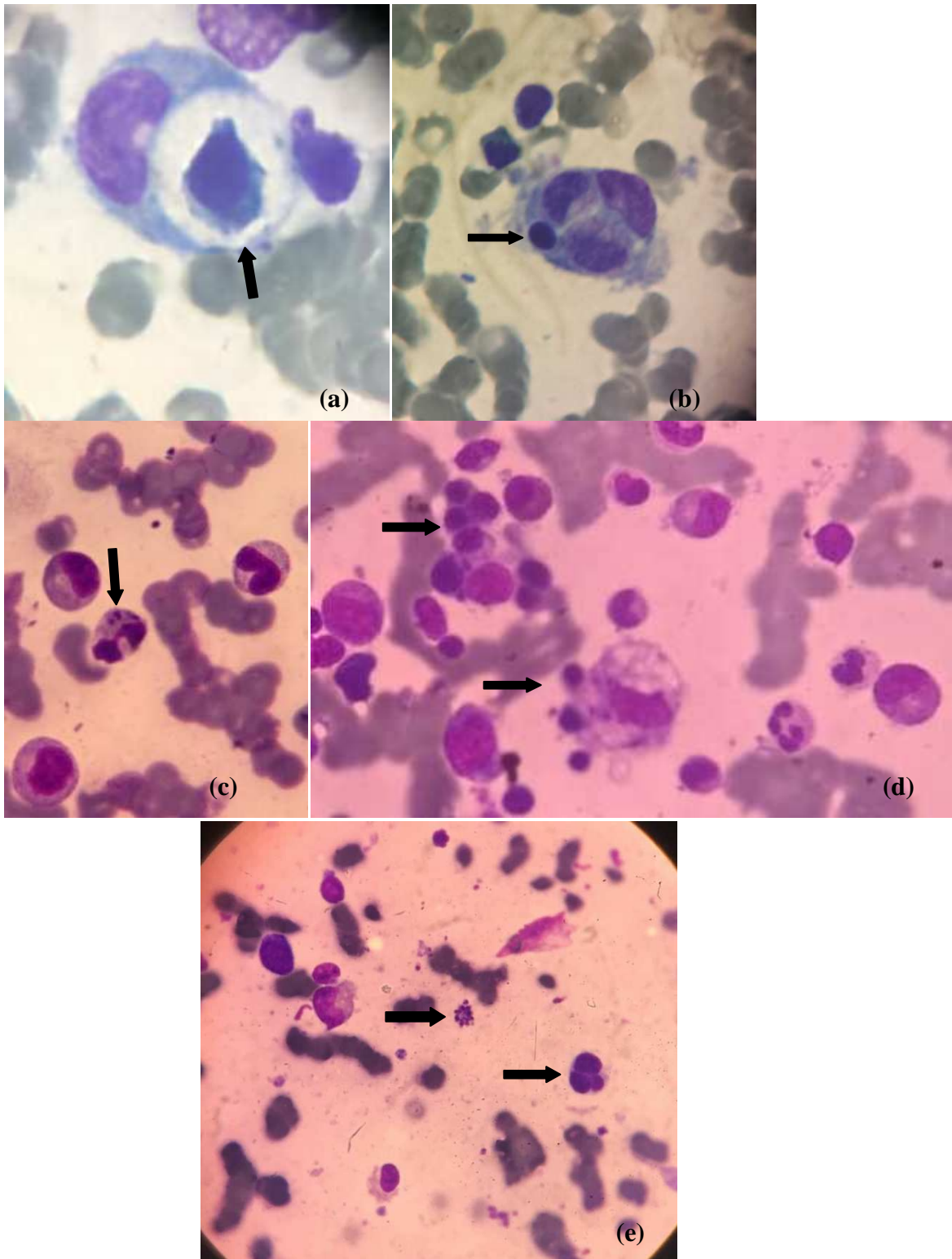


Figura 4 Aspirado de medula óssea mostrando (a) macrófago fagocitando eritroblasto, (b) macrófago fagocitando eritroblasto e granulócitos, (c) neutrófilo com corpos de *Leishmania* (d) “ninhos” de eritroblastos com diseritropoiese, (e) corpos de *Leishmania* em “florete” e eritroblasto multinucleado.

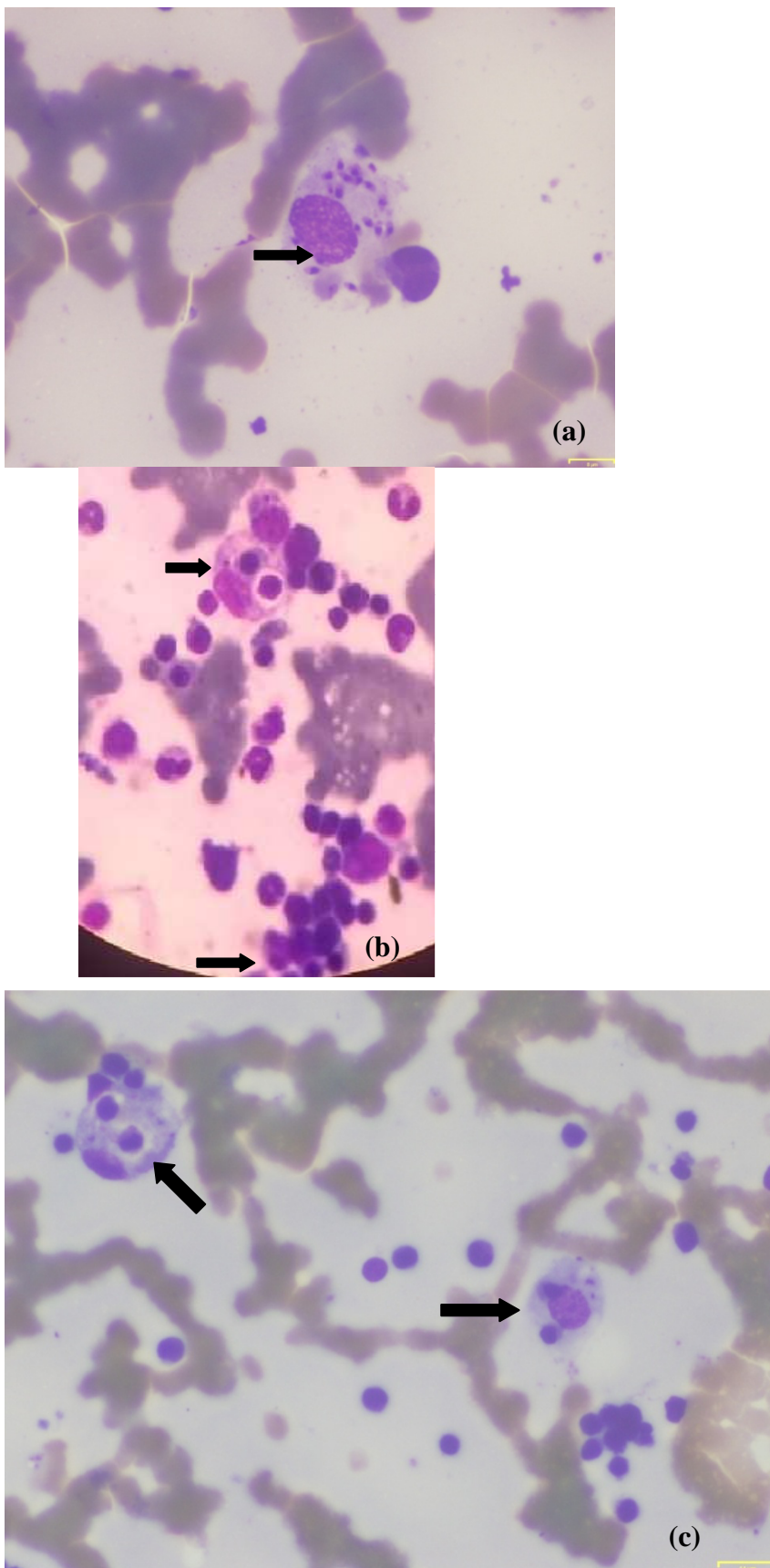


Figura 5. Aspirado de medula óssea mostrando (a) macrófago com corpos de *Leishmania*, (b) macrófago fagocitando eritroblastos e ninhos de eritroblastos diseritropoiéticos, (c) macrófagos fagocitando eritroblastos e corpos de *Leishmania*.

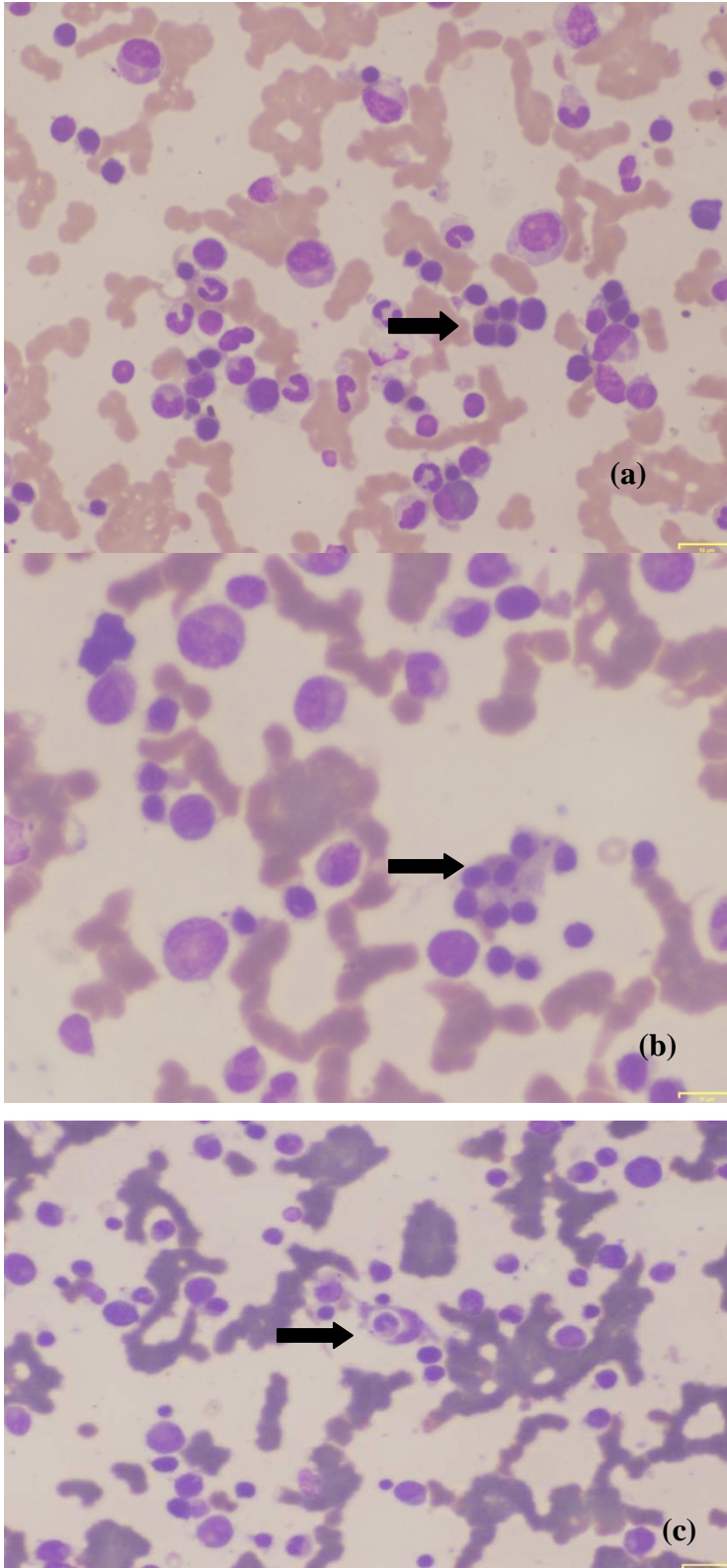


Figura 6 Aspirado de medula óssea mostrando (a) e (b) “ninhos” de eritroblastos diseritropoiéticos e (c) macrófago fagocitando um neutrófilo bastonete.

#### 4 CONCLUSÕES

O conhecimento das características clínicas e laboratoriais na LV pode desempenhar um papel importante no diagnóstico diferencial da hepatoesplenomegalia febril, especialmente em áreas endêmicas e em um país em desenvolvimento, onde os recursos são limitados. Ressalta-se a avaliação das características morfológicas da medula óssea através da punção aspirativa como uma ferramenta que auxilia e direciona ao diagnóstico da leishmaniose visceral. A partir dos resultados do estudo, conclui-se que a anemia não está relacionada a fatores carenciais, perda sanguínea e/ou hemólise auto-imune e que os níveis de hemoglobina nos indivíduos com LV ativa estão correlacionados com a resposta inflamatória promovida por essa patologia. O trabalho é relevante para subsidiar no desenvolvimento de novos estudos e, poderá ter como alvo, terapêuticas baseadas na imunoterapia.



## REFERÊNCIAS

1. Leishmaniasis disponível em: [www.who.int/leishmaniasis](http://www.who.int/leishmaniasis) Acessado em 29/11/2018
2. BRASIL - Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação – disponível em <http://portalsinan.saude.gov.br/sinan-net>. Acessado em 29/11/18
3. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007.
4. GUERIN PJ et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases*. 2002;(2).
5. REIS LL et al. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017;50(5):638-645.
6. PACE D. Leishmaniasis. *J.Infect* 69 S10-18 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016> PMID:25238669, 2014. Acessado em 29/11/18
7. EL HAG IA, HASHIM FA, EL TOUM IA, HOMEIDA M, EL KALIFA M, EL HASSAN AM. Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). *Jf Clin Pathol*. 1994;47:547-551.
8. DUARTE MIS, ANDRADE JR, TAKAMURA CFH, SESSO A, TUON FF. TGF-beta and mesenchymal hepatic involvement after visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*. 2009;104:1129–1136.
9. ZIJLSTRA EE, EL HASSAN AM. Leishmaniasis in Sudan. Visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001;95(1):S27-58.
10. BADARO R. et al. A Prospective Study of Visceral Leishmaniasis in an Endemic Area of Brazil. *The Journal of Infectious Diseases*. 1986;154(4).
11. GOTO Y, CHENG J, OMACHI S, MORIMOTO A. Prevalence, severity, and pathogenesis of anemia in visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* DOI 10.1007/s00436-016-5313-x, 2016.

12. WHO. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO/NMH/NHD/MNM/11.1)  
<http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>, acessado [30/11/2018])
13. VARMA N. NASEEM S. Hematologic Changes in Visceral Leishmaniasis/Kala Azar  
Indian J Hematol Blood Transfus. 2010;26(3):78–82.
14. COURA-VITAL W, ARAUJO VE, REIS IA, AMANCIO FF, REIS AB, CARNEIRO M. Prognostic factors and scoring system for death from visceral leishmaniasis: an historical cohort study in Brazil. PLoS Negl Trop Dis 8:e3374. (2014)  
doi:[10.1371/journal.pntd.0003374](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003374)
15. DHINGRA KK et al. Morphological findings in bone marrow biopsy and aspirate smears of visceral kala azar: A review. 2010;53:(1),96.
16. LAFUSE WP et al. Leishmania donovani Infection Induces Anemia in Hamsters by Differentially Altering Erythropoiesis in Bone Marrow and Spleen. [www.plosone.org](http://www.plosone.org)  
March 2013 | Volume 8 | Issue 3 | e59509
17. COSTA CHN et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? – A case control study. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2010;43(4):386-392.
18. GANZ T. Iron and infection. Int J Hematol. 2018;107:7–15.
19. QUINTELA-CARVALHO G. et al. heme Drives Oxidative stress-associated cell Death in human neutrophils infected with *Leishmania infantum*. Frontiers in Immunology. 2017;8:(1620).
20. MORIMOTO A. et al. Hemophagocytosis in experimental visceral Leishmaniasis by *Leishmania donovani*. PLoS Negl Trop Dis 10:e0004505.  
doi:[10.1371/journal.pntd.0004505](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004505), 2016.
21. ZOLLER E. E. *et al.* Hemophagocytosis causes a consumptive anemia of inflammation  
The Journal of Experimental Medicine. 2011;208(6).
22. RODRÍGUEZ NE, WILSON ME. Eosinophils and mast cells in leishmaniasis. Immunol Res. 2014;59:129–141.
23. LOMTADZE ML et al. Study of intravascular coagulation activation markers in patients with visceral leishmaniasis. Georgian Med News. 2005;p.47-50.

24. BARANWAL AK, MANDAL RN, SINGH R. Fulminant hepatic failure complicating visceral leishmaniasis in an apparently immunocompetent child. *Indian J Pediatr.* 2007; 74:489-491.
25. DANESHBOD Y, DEGHANI SJ, DANESHBOD K. Bone Marrow Aspiration Findings in Kala-Azar. *Acta Cytologica.* 2010;54(1).
26. CHANDRA H, CHANDRA S, KAUSHIK RM. Visceral Leishmaniasis with Associated Common, Uncommon, and Atypical Morphological Features on Bone Marrow Aspirate Cytology in Nonendemic Region. *Journal of Tropical Medicine.* Vol. 2013, Article ID 861032, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/861032>.
27. COTTERELL SJE, ENGWERDA CR, KAYE PM. *Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF- $\alpha$ . *Blood.* 2000;95:1642–1651.
28. SILVA J.M. et al. Bone Marrow Parasite Burden among Patients with New World Kala-Azar Is Associated with Disease Severity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014;90(4):621–626.
29. ABIDIN BM et al. Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis. *PLOS Pathogens* | <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006422> August 7, 2017.
30. NAOUM PC. Doenças que alteram os exames bioquímicos. *Academia de ciência e tecnologia de São José do Rio Preto (Ed.), SP.* 2007: p.157
31. ZAGO, MA, FALCÃO, RP, PASQUINI, R. *Tratado de Hematologia.* Editora Atheneu, 2014.
32. HURST SD et al. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol* 2002;169:443-53.
33. FORT MM et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 2001;15: 985-95.
34. AKDIS M. et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol.*2011;701-721.
35. MORCEAU F, DICATO M, DIEDERICH M. Pro-inflammatory cytokine-mediated anemia: regarding molecular mechanisms of erythropoiesis Hindawi Publishing Corporation *Mediators of Inflammation.* Volume 2009, Article ID 405016, 11 pages.

36. COSTA DL et al. Serum cytokines associated with severity and complications of Kala-azar. *Pathogens and Global Health*. 2013;107(2).
37. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento e Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009. 816 p.
38. SAKKAS H, GARTZONIKA C, LEVIDIOTOU S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Vector Borne Dis*. 2016;53:pp. 8–16.
39. LEMOS EM, CARVALHO SFG, COREY R, DIETZE R. Avaliação do Teste Rápido Utilizando o Antígeno Recombinante k39 no Diagnóstico da Leishmaniose Visceral no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. VII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses. 2003;36(2).
40. WORTMANN G. Rapid identification of *leishmania* complexes by a real-time PCR assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2005;73:(6),pp999–1004.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A –

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

**Título da pesquisa:** Leishmaniose Visceral: Correlação entre os achados clínico - laboratoriais e as características imuno - morfológicas do micro ambiente da medula óssea.

**Instituição promotora:** UNIMONTES

**Atenção:** Antes de aceitar participar desta pesquisa, é importante que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos. Esta declaração descreve o objetivo, metodologia/procedimentos, benefícios, riscos e confidencialidade das informações.

#### 1-Objetivo

O objetivo desse trabalho é correlacionar os achados clínico - laboratoriais e as características imuno - morfológicas do micro ambiente da medula óssea em pacientes portadores de Leishmaniose visceral internados no Hospital Universitário Clemente de Faria.

#### 2-Metodologia/procedimentos

Serão coletados dados do exame físico e exames laboratoriais requisitados a você pelo seu médico para dar continuidade ao seu tratamento. A medula óssea que será utilizada para confirmar o diagnóstico da leishmaniose visceral será coletada pela pesquisadora. Este exame que se chama mielograma é um exame do “tutano do osso”, ou da medula óssea. Ele é realizado com uma pequena quantidade de sangue, que é colhido no interior do osso. O procedimento da coleta é realizado com o paciente deitado. Aplica-se uma pequena anestesia no local da coleta, que pode ser de frente no tórax (na região chamada esterno) em adultos ou na parte posterior da bacia (crianças e adultos). A agulha para a coleta do mielograma é colocada na pele anestesiada e introduzida até alcançar o interior do osso. Quando atingido este local, coloca-se uma seringa na parte posterior da agulha e aspiram-se algumas gotas do material do interior do osso. Essas gotas de medula são examinadas em lâminas e utilizadas para outras análises no laboratório. Esse exame pode ser realizado em consultório médico ou em laboratórios. Possui duração aproximada de 10 minutos. As amostras de sangue, soro e medula óssea serão utilizados para realização da pesquisa e a seguir armazenados para futuras pesquisas.

#### 3-Justificativa

A compreensão dos fatores que podem predispor alguns indivíduos a desenvolverem a Leishmaniose e dos fatores que podem controlar a infecção é de extrema importância para o controle da doença e de sua mortalidade e para o desenvolvimento de futuras vacinas.

#### 4-Benefícios

Além da relevância científica do estudo e sua originalidade, os sujeitos analisados poderão beneficiar outros pacientes portadores quanto ao tratamento.

#### 5-Riscos

O procedimento da coleta de medula óssea pode ocasionar dor local suportável, apesar da anestesia, e de curta duração, extravasamento sanguíneo e excepcionalmente hematoma, que às vezes pode ser evitado comprimindo o local da punção por alguns minutos. Em pacientes com doenças debilitantes raramente pode ocorrer infecções locais e generalizadas, e na literatura são citados raríssimos casos de hemorragias internas.

#### 6-Confidencialidade das informações

Todos os pacientes terão o direito de terem sua identificação, assim como todos os seus dados devidamente preservados.

#### 7-Consentimento:

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando meu consentimento para participar nesta pesquisa, até que eu decida o contrário. Receberei uma cópia assinada deste consentimento.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante/responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante/responsável

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Nome da testemunha

\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha

\_\_\_\_\_  
Data

Tânia de Cássia Moreira Soares

\_\_\_\_\_  
Nome do coordenador da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do coordenador da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Data

**ENDEREÇO DO PESQUISADOR:** rua: Dr. Walter Ferreira Barreto 525 Bairro: Ibituruna Montes Claros/MG CEP-39401347 **TELEFONE:** (38)32227733 (38)91361427

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - PARA PAIS OU**

**RESPONSÁVEIS DE PACIENTES MENORES DE 18 ANOS**

**Título da pesquisa:** Leishmaniose Visceral: Correlação entre os achados clínico - laboratoriais e as características imuno - morfológicas do micro ambiente da medula óssea.

**1.NOME:** \_\_\_\_\_ **DOCUMENTO**  
**DE IDENTIDADE Nº:** \_\_\_\_\_ **SEXO:** M  F   
**DATANASCIMENTO(dd/mm/aaaa)** \_\_\_\_\_  
**ENDEREÇO:** \_\_\_\_\_ **.Nº** \_\_\_\_\_  
**BAIRRO:** \_\_\_\_\_ **CIDADE** \_\_\_\_\_ **CEP** \_\_\_\_\_  
**TEL:** ( ) \_\_\_\_\_

**2.PAIS** \_\_\_\_\_ **OU** \_\_\_\_\_ **RESPONSÁVEL** \_\_\_\_\_ **LEGAL:** \_\_\_\_\_  
**GRAU DE PARENTESCO:** \_\_\_\_\_

**DOCUMENTO DE IDENTIDADE:** \_\_\_\_\_ **SEXO:** M -- F—  
**DATA** \_\_\_\_\_ **NASCIMENTO:** \_\_\_\_\_ **(dd/mm/aaaa)** \_\_\_\_\_  
**ENDEREÇO:** \_\_\_\_\_ **.Nº** \_\_\_\_\_  
**BAIRRO:** \_\_\_\_\_ **CIDADE** \_\_\_\_\_  
**CEP** \_\_\_\_\_ **TEL:** ( ) \_\_\_\_\_

**Instituição:** Universidade Estadual de Montes Claros

**Pesquisador(a) Responsável:** Tânia de Cássia Moreira Soares

**Data de preenchimento:** (dd/mm/aaaa) \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

**Assinatura do pesquisador responsável**

**INFORMAÇÕES PARA OS PAIS OU RESPONSÁVEL LEGAL DOS VOLUNTÁRIOS MENORES DE 18 ANOS**

Estamos convidando o seu filho (a)/menor sob sua responsabilidade para participar como voluntário de um projeto de pesquisa desenvolvido por pesquisadores desta instituição.

**A pesquisa tem como objetivo:** correlacionar os achados clínico - laboratoriais e as características imuno - morfológicas do micro ambiente da medula óssea em portadores de leishmaniose visceral. A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é uma doença causada por um micróbio chamado Leishmania que infecta o ser humano por meio da picada de um inseto chamado flebótomo (também conhecido como mosquito palha). O doente apresenta febre, palidez, emagrecimento, cansaço e crescimento do abdome. O diagnóstico é feito através de exames de sangue e da medula óssea, que é a parte interior de um dos ossos do corpo, geralmente da bacia, do tórax ou da tíbia (osso da perna). A doença tem cura, mas pode ser grave e pode matar se não for tratada. No Brasil, o tratamento é fornecido pelo Ministério da Saúde, sem custo para o paciente.

**Descrição do estudo:** Serão convidados a participar desta pesquisa homens, mulheres e crianças com diagnóstico de leishmaniose visceral. Não poderão participar mulheres que estejam amamentando ou gestantes, pacientes portadores de outra infecção ou de doenças imunossupressoras.

**Armazenamento de amostras biológicas para uso em pesquisas futuras:**

As amostras de sangue, soro e medula óssea que serão utilizadas para confirmar o diagnóstico da leishmaniose visceral serão guardadas para que possam ser utilizadas em novas pesquisas que precisem de amostras de pacientes com diagnóstico confirmado de leishmaniose.

**Esclarecimentos sobre as garantias dos pacientes que quiserem participar do estudo:**

1. **Você pode pedir esclarecimento** aos profissionais de saúde, em qualquer momento, se tiver alguma dúvida em relação à participação do seu filho (a)/menor sob sua responsabilidade na pesquisa, ou sobre riscos, benefícios e resultados.
2. **A participação nesta pesquisa é totalmente voluntária**, ou seja, nem você e nem o seu filho (a)/menor sob sua responsabilidade receberão nenhuma gratificação pela participação no estudo.
3. **Todas as informações da pesquisa serão sigilosas.** Ninguém divulgará o nome dos participantes e os resultados dos exames identificados com o nome dos participantes, a não ser para os pais ou responsáveis, no caso dos menores de idade. Se for solicitado por lei, somente os Comitês de Ética terão acesso às informações confidenciais que identificam o paciente pelo nome. Você não será identificado em qualquer relatório ou publicação que resulte deste estudo.
4. **Você deverá avisar ao médico imediatamente** sobre qualquer problema relacionado a este estudo:

Nome: Centro de Pesquisa em Doenças Parasitárias e Infecciosas HUCF/UNIMONTES

Telefone: (38)3224-8373

e-mail: (38)32224010 e-mail [taniamoreiracs@hotmail.com](mailto:taniamoreiracs@hotmail.com)

5. **Metodologia/procedimentos:** Serão coletados dados do exame físico e exames laboratoriais requisitados a você pelo seu médico para dar continuidade ao seu tratamento. A medula óssea que será utilizada para confirmar o diagnóstico da leishmaniose visceral será coletada pela pesquisadora. Este exame que se chama mielograma é um exame do “tutano do osso”, ou da medula óssea. Ele é realizado com uma pequena quantidade de sangue, que é colhido no interior do osso. O procedimento da coleta é realizado com o paciente deitado. Aplica-se uma pequena anestesia no local da coleta, que pode ser de frente no tórax (na região chamada esterno) em adultos ou na parte posterior da bacia (crianças e adultos). A agulha para a coleta do mielograma é colocada na pele anestesiada e introduzida até alcançar o interior do osso. Quando atingido este local, coloca-se uma seringa na parte posterior da agulha e aspiram-se algumas gotas do material do interior do osso. Essas gotas de medula são examinadas em lâminas e utilizadas para outras análises no laboratório. Esse exame pode ser realizado em consultório médico ou em laboratórios. Possui duração aproximada de 10 minutos. As amostras de sangue, soro e medula óssea serão utilizados para realização da pesquisa e a seguir armazenados para futuras pesquisas.
6. **Benefícios:** Além da relevância científica do estudo e sua originalidade, os sujeitos analisados poderão beneficiar outros pacientes portadores quanto ao tratamento.
7. **Riscos:** O procedimento da coleta de medula óssea pode ocasionar dor local suportável, apesar da anestesia, e de curta duração, extravasamento sanguíneo e excepcionalmente hematoma, que às vezes pode ser evitado comprimindo o local da punção por alguns minutos. Em pacientes com doenças debilitantes raramente pode ocorrer infecções locais e generalizadas, e na literatura são citados raríssimos casos de hemorragias internas.
8. **O uso das amostras de sangue e outras** que serão guardadas no laboratório só serão utilizadas para novos estudos após a aprovação dos respectivos comitês de ética em pesquisa e o sigilo sobre as informações particulares de cada pessoa que participou da pesquisa será mantido.
9. **Se você não quiser permitir** que o seu filho (a)/menor sob sua responsabilidade continue participando da pesquisa, você pode retirar seu consentimento a qualquer momento. Isto não vai trazer nenhum prejuízo ao atendimento rotineiro a que ele tem direito na unidade de saúde aonde vem sendo tratado e acompanhado.

**CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu, \_\_\_\_\_, antes de dar o consentimento assinando este documento, afirmo que fui suficientemente informado (a) de todo o estudo. Eu conversei diretamente com profissional de saúde envolvido no estudo que respondeu todas as minhas perguntas satisfatoriamente em relação ao estudo e voluntariamente autorizo o meu filho (a)/menor sob minha responsabilidade \_\_\_\_\_ a participar da pesquisa.

Eu autorizo os pesquisadores a utilizarem as anotações médicas do meu filho (a)/menor sob minha responsabilidade para obterem a informação necessária. Autorizo ainda o armazenamento de amostras biológicas obtidas durante este estudo para a realização de pesquisas a serem realizadas após a finalização do presente estudo.

Localidade: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome do pai/mãe ou do responsável legal pelo menor

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pai/mãe ou do responsável legal pelo menor

Caso os pais ou responsável legal não sejam alfabetizados:

Localidade: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome da testemunha

\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha

Localidade: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Tânia de Cássia Moreira Soares

\_\_\_\_\_  
Nome do profissional responsável pelo TCLE

\_\_\_\_\_  
Assinatura do profissional responsável pelo TCLE



## ANEXO

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
MONTES CLAROS -  
UNIMONTES



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Leishmaniose Visceral: Correlação entre os achados clínico - laboratoriais e as características imuno - morfológicas do micro ambiente da medula óssea.

**Pesquisador:** Tânia de Cassia Moreira Soares

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 30869314.9.0000.5146

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual de Montes Claros - UNIMONTES

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 677.061

**Data da Relatoria:** 05/06/2014

**Apresentação do Projeto:**

A Leishmaniose é uma enfermidade provocada por mais de 20 espécies do gênero Leishmânia e é transmitida aos seres humanos por 30 diferentes espécies de flebotomíneos. No Brasil, o principal vetor é o *Lutzomyia longipalpis*. Esta zoonose é endêmica em 98 países sendo que, 90% dos casos novos estão concentrados na Índia, Nepal, Sudão, Bangladesh, Etiópia e Brasil. O Brasil detém 90% dos casos humanos de Leishmaniose das Américas.

**Objetivo da Pesquisa:**

Correlacionar os achados clínico - laboratoriais e as características imuno - morfológicas do micro ambiente da medula óssea em portadores de Leishmaniose Visceral.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos e desconfortos:** O procedimento da coleta de medula óssea pode ocasionar dor local suportável e de curta duração, extravasamento sanguíneo e excepcionalmente hematoma, que às vezes pode ser evitado comprimindo o local da punção por alguns minutos. Em pacientes com doenças debilitantes raramente pode ocorrer infecções locais e generalizadas, e na literatura são citados raríssimos casos de hemorragias internas.

**Benefícios:**

A compreensão dos fatores que podem predispor alguns indivíduos a desenvolverem a LV e dos

**Endereço:** Av. Dr. Rui Braga s/n - Camp. Univers. Prof. Darcy Rib  
**Bairro:** Vila Mauricéia **CEP:** 39.401-089  
**UF:** MG **Município:** MONTES CLAROS  
**Telefone:** (38)3229-8180 **Fax:** (38)3229-8103 **E-mail:** smelocosta@gmail.com

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
MONTES CLAROS -  
UNIMONTES



Continuação do Parecer: 677.061

fatores que podem controlar a infecção é de extrema importância para o controle da doença e de sua letalidade e para o desenvolvimento de imunoprofilaxia.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante acerca de zoonose endêmica no Brasil. O estudo poderá contribuir para o maior conhecimento de correlação entre os achados clínicos, laboratoriais e características imunomorfológicas da medula óssea de pessoas com Leishmaniose Visceral.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados.

**Recomendações:**

Apresentação de relatório final por meio da plataforma Brasil, em "enviar notificação".

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O projeto respeita os preceitos éticos da pesquisa em seres humanos, sendo assim somos favoráveis à aprovação do mesmo.

MONTES CLAROS, 06 de Junho de 2014

---

Assinado por:  
**SIMONE DE MELO COSTA**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. Dr. Rui Braga s/n-Camp. Univers. Prof. Darcy Rib  
**Bairro:** Vila Mauricéia **CEP:** 39.401-089  
**UF:** MG **Município:** MONTES CLAROS  
**Telefone:** (38)3229-8180 **Fax:** (38)3229-8103 **E-mail:** smelocosta@gmail.com