

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Associação entre fatores nutricionais e a resposta frente à infecção  
por *Leishmania chagasi*

Bruna Leal Lima Maciel

NATAL – RN  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Associação entre fatores nutricionais e a resposta frente à infecção  
por *Leishmania chagasi*

Bruna Leal Lima Maciel

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientadora: Selma M. B. Jerônimo

Co-orientadora: Lúcia de Fátima Campos Pedrosa

NATAL-RN  
2008

## CATALOGAÇÃO NA FONTE

M152a

Maciel, Bruna Leal Lima.

Associação entre fatores nutricionais e a resposta frente à infecção por leishmania chagasi / Bruna Leal Lima Maciel \_\_ Natal - RN, 2008.

99p.: il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. D<sup>a</sup>. Selma Maria Bezerra Jerônimo.

Co-orientadora: Lúcia de Fátima Campos Pedrosa.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. Avaliação nutricional - dissertação.
2. Vitamina A - dissertação.
3. Leishmania chagasi - dissertação. I. Jerônimo, Selma Maria Bezerra. II. Pedrosa, Lúcia de Fátima Campos. III. Título

RN-UF/BS-CCS

CDU: 612.39:616.993.161(813.3)(043.2)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Associação entre fatores nutricionais e a resposta frente à infecção por *Leishmania chagasi*

Bruna Leal Lima Maciel

**Banca Examinadora**

Presidente da Banca: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Selma Maria Bezerra Jerônimo (UFRN)

Membros da Banca

1º Membro: Prof. Dr. Edgar Marcelino Carvalho (UFBA)

2º Membro: Prof. Dr. Elizeu Antunes dos Santos (UFRN)

Suplente: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edda Lisboa Leite (UFRN)

*À minha família e esposo por todo  
o amor, incentivo, paciência, proteção e carinho*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as coisas boas em minha vida e por ter me feito tão feliz. Aos meus pais, Noélia e Aldo, por estarem sempre comigo, por me ajudarem a resolver meus problemas sempre tão pequenos de maneira tão grandiosa, pelo incentivo e amor, por me ensinarem que tudo na vida é uma questão de vontade forte, trabalho árduo e determinação. A meu esposo Saulo, que sempre foi e sempre será o grande amor da minha vida, por todas as vezes em que me acordou pela manhã, por todas as palavras de motivação, pelo companheirismo, cuidado, paixão e amizade. Aos meus queridos irmãos, Breno e Adam, que me conhecem mais do que eu mesma, por simplesmente existirem e me fazerem tão feliz.

A minha querida orientadora, prof<sup>a</sup> Selma Jerônimo, meus sinceros agradecimentos por ter me acolhido – sem me conhecer – acreditado em mim e ter, desde o início, visado meu crescimento científico, possibilitando que um grande sonho em minha vida começasse a se tornar real.

À prof<sup>a</sup> Gorete Macedo por tão generosamente ter cedido o HPLC. Ao Thyrone, pela prontidão em ajudar.

Ao prof. Roberto Dimenstein, por todo o tempo e atenção cedidos para ensinar padrões, cálculos e análises. Meus sinceros agradecimentos, sem ele, este trabalho não seria possível.

À prof<sup>a</sup> Lúcia Pedrosa pelo gentil acolhimento e orientação dispensadas, tão importantes para o delineamento e execução do trabalho.

Ao Hênio Lacerda pela ajuda em campo. Ao Sr Manoel Fernandes, pela prontidão, lealdade e trabalho dedicado.

À Juliana Galvão pela ajuda na coleta de dados, carinho e atenção. Aos amigos Iraci Duarte e Sérgio Araújo, pelo precioso apoio, ajuda e risadas. À Glória Monteiro, Daniela Martins e Olívia Nascimento pela ajuda na coleta de dados e hemogramas realizados. À Núbia Natalir pelo trabalho em realizar as dosagens de ELISA. Ao James Dary, por ter me ajudado com problemas de informática. À Eliana Tomaz, pela simpatia e carisma, por estar sempre disposta a acolher e ajudar.

Às alunas do laboratório do prof Roberto, Karla Danielle, Érica Myrna e Videanny Videnov pela ajuda e carinho. À Danielle Soares, pela ajuda e generosidade.

A todos aqueles me ajudaram a construir este trabalho. A todas as crianças que tão generosamente participaram deste estudo, meus agradecimentos, carinho e admiração.

## SUMÁRIO

<b>Índice de Figuras</b>	<b>ix</b>
<b>Índice de Tabelas</b>	<b>x</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas</b>	<b>xii</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>01</b>
1.1. Objetivos.....	04
1.1.1 Objetivo geral.....	04
1.1.2 Objetivos específicos.....	04
<b>2. Revisão da Literatura</b> .....	<b>05</b>
2.1 Aspectos gerais da leishmaniose visceral.....	05
2.1.1 Epidemiologia.....	05
2.1.2 Ciclo Biológico.....	06
2.1.3 Formas clínicas.....	07
2.1.4 Diagnóstico.....	08
2.1.5 Tratamento.....	09
2.1.6 Medidas de prevenção.....	11
2.2. A resposta imune na leishmaniose visceral.....	11
2.3. Fatores nutricionais associados à infecção por Leishmania.....	17



2.3.1 Estado nutricional e dieta.....	17
2.3.2 Micronutrientes.....	19
2.3.2.1 Cobre e zinco.....	19
2.3.2.2 Vitamina A.....	21
2.3.2.3 Suplementação de micronutrientes.....	27
2.3.3 Amamentação e peso ao nascer.....	27
<b>3. Métodos.....</b>	<b>32</b>
3.1. Considerações éticas.....	32
3.2. Tipo do estudo.....	32
3.3. Área do estudo.....	32
3.4. População estudada.....	32
3.5. Avaliação do estado nutricional.....	33
3.6. Avaliação dos níveis de vitamina A.....	34
3.6.1 Preparo e administração da dose.....	35
3.6.2 Extração de 3,4-didehidroretinol e retinol do soro.....	35
3.6.3 Preparo do padrão de 3,4-didehidroretinol.....	36
3.6.4 Preparo da curva padrão de retinol e 3,4-DR.....	38
3.6.5 Padrão interno de retinol acetato.....	38
3.6.6 Condições cromatográficas.....	38
3.6.7 Confirmação dos analitos e seus tempos de retenção nas amostras.....	39
3.6.8 Quantificação do MRDR e retinol séricos.....	39
3.6.9 Validação do método.....	40
3.7. Determinação das proteínas totais, albumina e globulinas.....	41
3.8. Determinação de proteínas de fase aguda.....	41
3.9. Medição dos anticorpos anti-SLA e anti-rK39.....	42
3.10. Teste cutâneo de Montenegro.....	42
3.11. Cálculo da amostra e análise estatística.....	43
<b>4. Resultados.....</b>	<b>45</b>
4.1. Descrição da população.....	45
4.2. Hemograma e proteínas.....	47
4.3. História de amamentação e peso ao nascer.....	52
4.4. Estado nutricional das crianças avaliadas.....	55
4.5. Avaliação do estado de vitamina A.....	58
4.6. Correlação entre infecção e estado nutricional.....	63
4.7. Fatores de risco associados à doença e infecção assintomática.....	65
<b>5. Discussão.....</b>	<b>67</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>76</b>
<b>7. Anexo.....</b>	<b>77</b>
<b>8. Apêndices.....</b>	<b>78</b>

Apêndice 1.....	78
Apêndice 2.....	83
<b>9. Referências.....</b>	<b>86</b>
<b>10. Artigo aceito para publicação no <i>American Journal of Tropical Medicine and Hygiene</i>.....</b>	<b>100</b>
<b>ABSTRACT</b>	

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp.....	07
<b>Figura 2.</b>	Fluxograma da metodologia utilizada para extração de 3,4-didehidroretinol e retinol das amostras de soro.....	37
<b>Figura 3.</b>	Cromatograma de amostra de soro analisada.....	39
<b>Figura 4.</b>	Distribuição dos grupos estudados de acordo com o retinol sérico.....	59
<b>Figura 5.</b>	Distribuição dos grupos estudados de acordo com o resultado do MRDR.....	59
<b>Figura 6.</b>	Correlação dos anticorpos anti-SLA e IMC (A), CB/altura (B) e MRDR (C).....	64

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Composição dos lanches ofertados para as crianças após a administração de 3,4-DRA.....	35
<b>Tabela 2.</b>	Classificação do estágio de infecção das crianças de acordo com as proteína C-reativa (CRP) e alfa-1-glicoproteína ácida (AGP).....	42
<b>Tabela 3.</b>	Distribuição dos grupos de crianças estudados de acordo com sexo e idade.....	46
<b>Tabela 4.</b>	Descrição da população estudada de acordo com tamanho do halo DTH ao teste cutâneo de Montenegro e presença de anticorpos anti-SLA.....	46
<b>Tabela 5.</b>	Dados do hemograma para os grupos de crianças estudados.....	49
<b>Tabela 6.</b>	Concentrações de proteínas totais, albumina, globulina e proteínas de fase aguda nos grupos estudados.....	50
<b>Tabela 7.</b>	Distribuição das crianças por grupos estudados de acordo com a classificação proposta por Thurnham <i>et al.</i> (2003).....	51
<b>Tabela 8.</b>	Média $\pm$ desvio-padrão dos tempos de amamentação e peso ao nascer das crianças por grupos estudados.....	53
<b>Tabela 9.</b>	Tempo total de amamentação dos grupos estudados.....	53
<b>Tabela 10.</b>	Tempo de amamentação exclusiva nos grupos estudados.....	54
<b>Tabela 11.</b>	Prevalência de baixo peso ao nascer nos grupos estudados.....	54
<b>Tabela 12.</b>	Índices antropométricos das crianças de acordo com grupos estudados.....	56
<b>Tabela 13.</b>	Prevalência de desnutrição nos grupos estudados de acordo com os índices Altura/Idade, Peso/Idade, Peso/Altura, CB/altura e IMC.....	57
<b>Tabela 14.</b>	Médias e desvio-padrão de retinol sérico e MRDR nos grupos estudados.....	60
<b>Tabela 15.</b>	Médias e desvio-padrão de retinol sérico e MRDR nos grupos estudados após retira de crianças convalescentes no grupo com história de LV.....	61
<b>Tabela 16.</b>	Prevalência de baixas concentrações de retinol sérico e estado de vitamina A incerto ou inadequado de acordo com	62

	MRDR.....	
<b>Tabela 17.</b>	Correlação entre tamanho do halo de induração ao teste cutâneo de Montenegro e retinol sérico, MRDR, CB/altura e IMC.....	63
<b>Tabela 18.</b>	Modelos de regressão logística multivariada para fatores nutricionais e bioquímicos associados com risco de leishmaniose visceral e infecção assintomática.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3,4-DR	3,4-didehidroretinol
3,4-DRA	3,4-didehidroretinol acetato
A/I	Altura para Idade
AGP	Alfa-1-glicoproteína ácida
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
BCR	Receptor de células B
CB/altura	Circunferência do Braço para Alltura
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CRP	Proteína C-relativa
DALY	Anos potenciais de vida perdidos ajustados para incapacidade
DAT	Teste de aglutinação direta
dp	Desvios-padrão
DTH-	<i>Negative delayed type hypersensitivity</i>
DTH+	<i>Positive delayed type hypersensitivity</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENDEF	Estudo Nacional de Despesas familiares
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
IFI	Imunofluorescência indireta
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
INF-g	Interferon gamma
IQ	Distância interquartilica
LAP	Peptídeo de latência associado
LC	Leishmaniose cutânea
LM	Leite materno
LTBP	Proteína ligadora de latência
LV	Leishmaniose visceral
MRDR	<i>Modified-relative-dose-response test</i>
NCHS	<i>National Center for Health Statistics</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
P/A	Peso para Altura
P/I	Peso para Idade
PBMCs	Células periféricas monucleares
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PKDL	Leishmaniose cutânea pós calazar
PNDS	Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde
PNSN	Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição
RAR	Receptores de ácido retinóico
RARE	Elementos de resposta ao ácido retinóico

RBP	Proteína ligadora de retinol
rK39	Proteína recombinante rK39
SLA	<i>Soluble Leishmania antigen</i>
TCR	Receptor de células T
TGF- $\beta$	<i>Tumor growth factor</i>
TLR-9	<i>Toll-like receptor 9</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
UI	Unidades internacionais de medida
$\chi^2$	Qui-quadrado

## RESUMO

A infecção por *Leishmania chagasi* apresenta diversas formas clínicas, variando de infecção assintomática e espontaneamente resolvida à manifestação clínica da doença, que é denominada leishmaniose visceral (LV). Não se conhecem os exatos mecanismos que determinam a evolução da infecção à LV. Acredita-se que a desnutrição seja um fator de risco associado ao desenvolvimento de LV, porém são poucos os estudos em humanos nesta área. Este trabalho teve como objetivo avaliar fatores nutricionais associados com a resposta à infecção por *L. chagasi* no Rio Grande do Norte. O estudo foi realizado de dezembro de 2006 a janeiro de 2008. Foram avaliadas 149 crianças, sendo 20 casos de LV ativa, 33 casos de história de LV, 40 com resposta ao teste de Montenegro positiva (DTH+) e 56 DTH-. Avaliou-se o estado nutricional através de escores-z para Peso/Idade, Altura/Idade, Peso/Altura, Índice de Massa Corporal (IMC) e circunferência do braço (CB)/altura. O estado de vitamina A foi medido através do retinol sérico e teste de dose-resposta relativa modificado (MRDR). A história de amamentação e o peso ao nascer das crianças foram avaliados. As crianças com LV ativa apresentaram estado nutricional comprometido em relação às demais crianças estudadas, segundo IMC e CB/altura, com médias  $-1,53 \pm 1,10$  e  $-1,48 \pm 1,28$  escores-z, respectivamente (ANOVA,  $p < 0,05$ ). O nível de vitamina A também foi menor nas crianças com LV aguda com 43% de prevalência de retinol sérico  $< 20 \mu\text{g/dL}$  e 15% de MRDR  $> 0,060$ . O peso ao nascer foi inversamente associado com o risco em pertencer ao grupo de crianças com LV ( $\beta = -0,00$ ; OR = 0,84; IC 95% de 0,73 - 0,99;  $p = 0,047$ ), enquanto que maior tempo de amamentação foi diretamente associado com o risco da criança em pertencer ao grupo DTH+ ( $\beta = 0,02$ ; OD = 1,16; IC 95% de 1,01 - 1,33;  $p = 0,036$ ). As variáveis nutricionais avaliadas mostraram-se associadas com a resposta à infecção por *L. chagasi*, sendo a desnutrição e o estado comprometido de vitamina A características das crianças que apresentam LV. Além disso, o maior peso ao nascer mostrou-se associado com proteção contra a doença, enquanto que o maior tempo de amamentação foi associado com maior chance de infecção assintomática. Os resultados indicam que aspectos nutricionais que podem ser modificados na população estão associados com a resposta à infecção por *L. chagasi*.

## 1. Introdução

As leishmanioses são doenças espectrais, causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, sendo três as formas clínicas principais: visceral, cutânea e cutâneo-mucosa. Todas estas formas são endêmicas no Brasil (1;2). A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, afeta anualmente cerca de meio milhão de crianças e adultos no mundo, estando distribuída principalmente na Índia, África, América Latina e sul da Europa (3;4). A infecção é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que em vertebrados, é um parasita intracelular obrigatório. As espécies capazes de visceralizar e causar a doença são a *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, encontradas na Ásia, África e Europa, enquanto no continente americano, a *Leishmania chagasi* é a principal espécie causadora da LV (5).

No Brasil, o primeiro caso de LV identificado foi em 1936 no Ceará. Nesta época, a doença era característica de zonas rurais. A LV era uma doença predominantemente uma doença de distribuição rural do nordeste do Brasil. No entanto, nos últimos 20 anos tem-se visto o aparecimento de epidemias em áreas urbanas e periurbanas no nordeste e sudeste do país. A taxa de mortalidade por LV quando tratado é entre 5 e 10% (6).

A infecção por *Leishmania chagasi* possui amplo espectro de variações clínicas, sendo, na maioria dos casos, assintomática e espontaneamente resolvida. Evidências a partir de estudos em áreas endêmicas avaliando a hipersensibilidade cutânea retardada a antígenos de *Leishmania*, proliferação de linfócitos e avaliação da presença de anticorpos anti-*Leishmania* mostram que, em crianças, apenas 1 em cada 6 infectados desenvolvem a forma clínica da doença, que se caracteriza pela presença de febre, perda de peso, anemia, hepatoesplenomegalia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia (1). Não se conhecem os mecanismos exatos que levam à evolução da infecção para a doença, sabe-se apenas que esta é dependente de interações complexas entre os tipos de parasita e sua virulência e as respostas imunes do hospedeiro humano, que são geneticamente determinadas (1;5;6). Acredita-se que outros fatores contribuem para a progressão da doença, sendo a desnutrição, infecção por vírus, neoplasias malignas e outras formas de imunossupressão importantes variáveis associadas (1;5-7).



Dentre estes fatores, a desnutrição energético-protéica é conhecida como a principal causadora de imunodeficiência, sendo considerada um fator de risco para desenvolvimento de LV (8-10). Anstead *et al.*, em estudo animal sobre a influência da desnutrição na infecção por *Leishmania*, observaram maior disseminação de *L. donovani* em camundongos BALB/c alimentados com dieta hipocalórica e hipoprotéica, sendo esta disseminação inversamente correlacionada com o peso para idade (8).

Estudos prospectivos mostraram que a amamentação possui papel protetor contra infecções diarreicas e respiratórias (11-13). Seus efeitos protetores estendem-se pela infância, sendo independentes da condição sócio-econômica, número de residentes na família e nível de instrução dos pais (11). Um outro fator bastante sensível ao estado nutricional progresso (intrauterino) é o peso ao nascer, na medida em que permite prever o prognóstico da criança a curto e longo prazos. Estudos têm consistentemente demonstrado a associação do maior peso ao nascer com crescimento e desenvolvimento saudáveis e com menor risco de morbidade perinatal e mortalidade (14;15).

Estudos de associação têm demonstrado que variações na quantidade de micronutrientes podem influenciar a evolução frente a diversos microorganismos (16-18). Dentre os micronutrientes mais estudados em relação ao seu papel protetor contra doenças infecciosas, tem-se a vitamina A, que desde 1920 é considerada a vitamina anti-infecciosa (19). Pesquisas demonstram consistentemente sua importância na redução da mortalidade infantil por doenças como o sarampo, pneumonia e diarreia, e seu efeito na melhora do prognóstico de crianças com malária (19-22).

Sabe-se que a resposta imunológica mais eficiente a microorganismos e parasitas intracelulares é a celular, mediada por macrófagos ativados, que secretam fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) e IL-12. A produção de IL-12 estimula a produção de interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) pelos linfócitos T auxiliares, sendo esta resposta protetora contra a evolução da infecção para LV (5;23). Modelos animais têm mostrado que a deficiência de vitamina A está associada com a mudança da resposta Th2 - importante para resolução de infecções não invasivas - para a resposta Th1 - importante para resolução de infecções por microorganismos intracelulares, como *L. chagasi* (24-27). A expressão do gene do interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), essencial para a resposta Th1

efetiva, é diminuída pelo ácido retinóico, a forma ativa de retinol nas células, e a deficiência de vitamina A está relacionada com aumento da produção de IFN- $\gamma$ , e diminuição da produção de IL-5 e IL-10, que são citocinas do tipo 2. A deficiência de vitamina A estimula a produção de IFN- $\gamma$  e IL-12, mas não das citocinas IL-4 e IL-10, relacionadas com a resposta tipo 2. De forma similar, a suplementação de vitamina A aumenta a produção de IL-4, IL-5, IL-10 e diminui a produção de IFN- $\gamma$  (28).

Apesar de ser comum a deficiência de vitamina A em crianças nas principais áreas endêmicas para a LV, estudos que determinem o papel ou associação da mesma em pacientes com LV são escassos. Garg *et al.* (29), em estudo realizado em hamsters infectados com *L. donovani*, verificaram que a suplementação da vitamina, quer de forma profilática ou terapêutica, promove a multiplicação do parasita. Luz *et al.* (17) e Bern *et al.* (30) encontraram valores séricos de retinol significativamente menores em pacientes com LV que em seus controles.

O tempo de incubação entre a infecção por Leishmania e o desenvolvimento de LV em humanos pode ser longo (31) e dependente de uma série de fatores individuais e ambientais que se mantêm ao longo dos anos. Embora a LV seja endêmica em várias regiões do mundo, especialmente em países subdesenvolvidos, onde as campanhas para amamentação e suplementação de micronutrientes ganharam maior incentivo nas últimas décadas (32;33), não existem estudos mostrando o impacto destas variáveis na evolução frente à infecção por *L. chagasi*.

Dessa forma, nos propomos a realizar um estudo do tipo transversal em que crianças com LV ativa e com histórico da doença foram comparadas entre si e com crianças saudáveis, expostas à infecção por *L. chagasi*, e às mesmas condições epidemiológicas e nutricionais dos casos de LV. Procuramos com o presente estudo contribuir para o esclarecimento do papel do estado nutricional pregresso e atual, da amamentação e da vitamina A na resposta frente à infecção por Leishmania.

## 1.1. Objetivos

### 1.1.1 Objetivo geral

Verificar a associação entre fatores nutricionais e a resposta frente à infecção por *Leishmania chagasi* em crianças.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o estado nutricional de crianças expostas à infecção por *L. chagasi*, com resposta DTH+, DTH- e de LV;
- Avaliar o peso ao nascer e a história de amamentação das crianças estudadas;
- Avaliar o estado de vitamina A das crianças no estudo;
- Determinar fatores nutricionais de risco associados com a resposta de doença ou infecção assintomática por *L. chagasi*.

## 2. Revisão da Literatura

### 2.1. Aspectos gerais da leishmaniose visceral

#### 2.1.1 Epidemiologia

Em 1903, Leishman e Donovan, separadamente, isolaram o protozoário hoje conhecido como *Leishmania donovani* de tecido esplênico de pacientes com hepatoesplenomegalia febril oriundos da Índia. Atualmente, a LV é endêmica em 65 países, da África, Ásia, Europa, Oriente Médio e Américas, sendo 90% dos casos distribuídos nas áreas rurais e peri-urbanas em países como Índia, Bangladesh, Etiópia, Sudão, Nepal e Brasil. Estima-se que a incidência anual da doença seja de 500.000 casos, e que 350 milhões de pessoas estão sob risco de infecção. A taxa de mortalidade por LV é de 5-10% dos casos mesmo quando instalada terapia específica. Os anos potenciais de vida perdidos ajustados para incapacidade (DALY) são estimados em 2.357.000, sendo 946.000 para o sexo masculino e 1.410.000 para o sexo feminino (34-38).

A LV remergiu em várias localidades, principalmente associada a algum tipo de imunodeficiência. A infecção pelo vírus HIV, especialmente no sul europeu e na África, tem contribuído para a emergência da doença. No sul da Europa 25-70% dos pacientes com LV apresentam infecção pelo vírus HIV. A infecção por *Leishmania* foi resultante de compartilhamento de seringas, sendo a *Leishmania* considerada um parasita oportunista (39).

Na América Latina, a doença já foi encontrada em 12 países, sendo 90% dos casos pertencentes ao Brasil, principalmente na região Nordeste. No Brasil, a doença é de notificação compulsória e, segundo o Ministério da Saúde, em 19 anos de notificação (1994-2002), foram registrados 48.455 casos, sendo 66% deles localizados na Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Nos últimos dez anos, a média anual dos casos no país foi de 3.156 casos, e a incidência de 2 casos/100.000 habitantes (40).

O primeiro caso brasileiro da doença foi descrito em 1913 por Migone no Paraguai, em necrópsia de paciente de Boa Esperança no Mato Grosso. Em 1934, a partir de estudo realizado para febre amarela, foram identificados mais

41 casos *post mortem* de LV e, em 1936, foi diagnosticado por Chagas o primeiro caso de calazar em vida no Brasil (40).

Nos últimos anos, estudos epidemiológicos têm demonstrado a transição da doença no Brasil, característica de áreas rurais, para áreas urbanas e peri-urbanas. No Rio Grande do Norte, trabalho realizado por Jerônimo *et al.* (41) demonstrou a peri-urbanização da doença no estado, e a prevalência da doença nas crianças menores de 5 anos (56%), com maior proporção de indivíduos do sexo masculino afetados (64%).

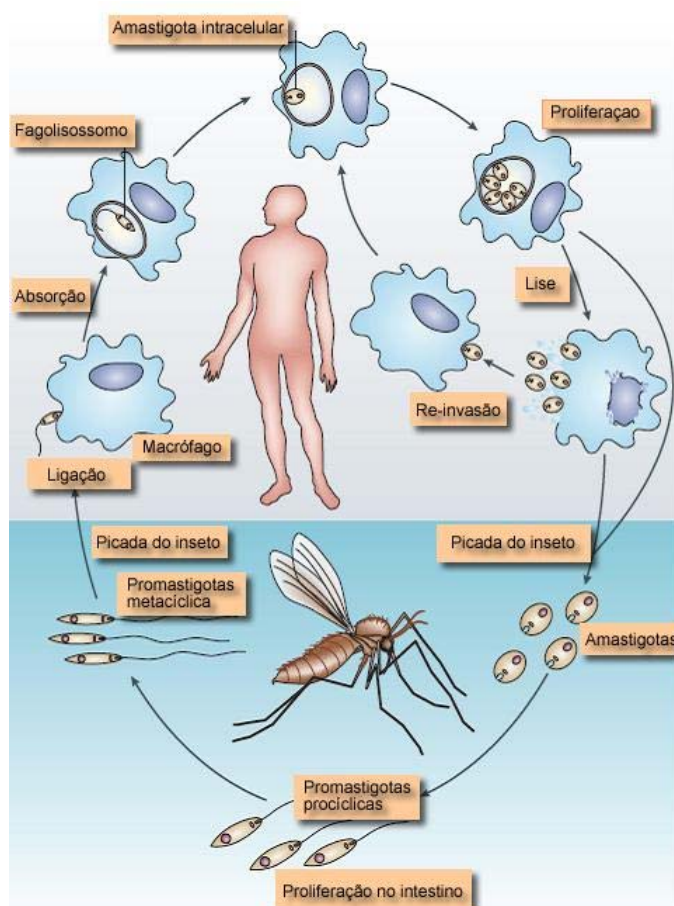
### 2.1.2 Ciclo Biológico

A infecção é causada por um protozoário do gênero *Leishmania*, da ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*. O gênero é dividido em dois subgêneros *Leishmania (Viannia) spp.* e *Leishmania (Leishmania) spp.*, sendo as espécies capazes de visceralizar pertencentes ao último subgênero. No Velho Mundo, *L. donovani* e *L. infantum* são responsáveis pela LV, sendo *L. donovani* relacionada com leishmaniose cutânea pós calazar (PKDL). No Novo Mundo, a espécie responsável pela LV é a *L. chagasi*, com genoma muito similar à *L. infantum*, sendo considerada por alguns como uma única espécie (5).

A *Leishmania* possui dois ciclos epidemiológicos: 1) o zoonótico: que inclui o animal como reservatório; e 2) o troponótico no qual o homem é o reservatório para o vetor, sendo esta a forma de infecção encontrada na Índia (34).

No Brasil, a doença é caracterizada como uma zoonose e o principal vetor responsável por sua transmissão é a fêmea do mosquito flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. A atividade do flebotomíneo é crepuscular e noturna. A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas do flebotomíneo, ao picarem e sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem magrófagos infectados com a forma amastigota de *Leishmania*. No trato digestivo do inseto, os macrófagos se rompem e as formas amastigotas reproduzem-se e diferenciam-se em formas flageladas denominadas promastigotas. Estas formas transformam-se em paramastigotas, que colonizam o epitélio do esôfago e a faringe do vetor, e se diferenciam na forma infectante, as promastigotas metacíclicas. Ao realizar novo repasto sanguíneo em um hospedeiro

vertebrado, as fêmeas liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, especialmente macrófagos. No interior dos fagolisossomos, as promastigotas perdem seu flagelo e diferenciam-se nas formas amastigotas que se reproduzem até o rompimento dos macrófagos e liberação destas formas que serão fagocitadas por novas células monocucleares fagocitárias, ocorrendo então sua disseminação para outros tecidos, como baço, fígado, medula óssea e linfonodos (Figura 1) (34;40).



**Figura 1.** Ciclo de vida da *Leishmania* spp. (34).

### 2.1.3 Formas clínicas

O clássico estudo realizado por Badaró *et al.* (1) em área endêmica para LV na Bahia permitiu a identificação das seguintes formas evolutivas da

infecção por *Leishmania*: 1) a forma assintomática; 2) a forma subclínica, na qual os indivíduos desenvolvem hepatomegalia, esplenomegalia, tosse, diarreia e febre, podendo esta forma se resolver espontaneamente ou evoluir para LV; e 3) a LV clássica, caracterizada por esplenomegalia, hepatomegalia, febre, caquexia, anorexia, anemia, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, trombocitopenia e leucopenia, manifestada principalmente por neutropenia e eosinopenia (1;34).

#### **2.1.4 Diagnóstico**

Uma vez que a manifestação da LV não apresenta sinais clínicos específicos, são necessários testes para confirmação da doença. (40). Os testes são inespecíficos e a confirmação da infecção ainda depende da confirmação parasitológica, que é realizada pela demonstração da presença de amastigotas em aspirados de medula óssea ou baço.

A resposta ao antígeno de *Leishmania* inoculado intradermicamente no Teste de Montenegro avalia a resposta cutânea de hipersensibilidade tardia (*delayed type hypersensitivity* – DTH). A positividade ao teste cutâneo de Montenegro tem sido utilizado como marcador de exposição prévia a *Leishmania* e indicação de proteção a desenvolver LV,. Indivíduos com LV em fase aguda apresentam resposta negativa ao Teste cutâneo de Montenegro (42).

A punção aspirativa de baço, medula óssea ou linfonodos é comumente realizada para diagnóstico parasitológico de *L. chagasi*. O material do aspirado pode ser colocado em lâminas para leitura direta ou em meio de cultura para isolamento *in vitro*, com o meio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN), com adição de meio NIT ou Schneider (40;44). A visualização de formas amastigotas em lâminas de aspirados de medula óssea, linfonodos ou baço têm sido a forma clássica de diagnóstico da LV, sendo considerada o padrão-ouro para diagnóstico da doença (45). Apesar da alta especificidade, a sensibilidade é variável, sendo maior em aspirados de baço (93-99%), seguidos pela medula óssea (53-86%) e linfonodos (53-65%). No entanto, os aspirados em baço apresentam risco de hemorragia aumentado e técnicos experientes são necessários para realização do procedimento. Dessa forma, apesar de ser uma técnica dolorosa para o paciente e menos sensível, o Ministério da Saúde

recomenda a utilização de aspirados de medula óssea para confirmação do diagnóstico de LV (34;40).

O diagnóstico parasitológico utilizando a técnica de PCR (amplificação do DNA do parasita) é o método mais sensível para detecção de *Leishmania*. Porém, a técnica permanece restrita a poucos centros de pesquisa, devido ao alto custo e especialização de pessoal necessária para sua realização (34;40;46).

Nos últimos anos, esforços têm sido realizados para padronização e utilização de técnicas sensíveis, específicas, não invasivas e de uso prático para o diagnóstico de LV. Teoricamente, a detecção de antígenos seria mais específica que a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, pois as reações cruzadas com anticorpos para outros parasitas seriam evitadas. Além disso, a detecção de antígenos seria útil em casos aonde há redução da produção de anticorpos, como em pacientes com AIDS. Estudos para validação de teste de aglutinação para proteínas de *Leishmania* na urina (KATEX) estão em andamento. Estudos iniciais demonstraram sensibilidade e especificidade de 68-100% e 100%, respectivamente (34;39).

Uma vez que os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* encontram-se elevados em LV, ensaios imunológicos têm sido utilizados para o seu diagnóstico, como a imunofluorescência indireta (IFI), teste de aglutinação direta (DAT) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Apesar de menos invasivos, esses testes apresentam duas limitações: 1) os títulos de alguns anticorpos, apesar de diminuírem após o tratamento, permanecem elevados por tempo indeterminado, limitando o diagnóstico de recidiva da doença; 2) em áreas endêmicas, para certos anticorpos, parte da população é positiva devido à infecções assintomáticas (3;34;39;40).

### **2.1.5 Tratamento**

As drogas de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes e existem no mercado duas formulações disponíveis: o stibogluconato de sódio e o antimoniato-N-metil glucamina. No Brasil e África, casos de resistência são raros, e o Ministério da Saúde brasileiro recomenda o tratamento, com antimoniato-N-metil glucamina por no mínimo 20 dias e no máximo 40, com dose endovenosa ou intramuscular de 20mg/Kg/dia (34;36;39;40;47).



Na Índia, foi observada resistência à terapia antimonial, em até 65% dos casos. A anfotericina B é a principal forma alternativa de tratamento, e na Índia no estado de Bihar e sudeste Europeu, devido à emergência de casos co-infectados com HIV, tem sido a droga de primeira escolha. Esta é a droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente e seu mecanismo de ação se dá através da ligação com ergosterol ou episterol presentes na membrana plasmática de *Leishmania* (34;36;40). As principais desvantagens do uso da anfotericina são o tempo prolongado de tratamento (15 dias de dose, em dias alternados) e os efeitos colaterais dose-dependentes associados à infusão que incluem febre, tremores, rigor, tromboflebite, hipocalcemia, micocardite e nefrotoxicidade. No entanto, a droga tem apresentado taxas de cura maiores que 97% e resistência ainda não foi documentada. Baixas doses têm apresentado boas taxas de cura e menor toxicidade, o Ministério da Saúde recomenda o uso de anfotericina no caso de resposta insatisfatória aos antimonials em uma dose de 1mg/kg/dia em dias alternados em adultos (máximo de 3g de dose total) e 1,5-2,5mg/kg/dia em dias alternados para crianças (40;48).

Existem formas lipídicas de anfotericina B, melhor toleradas que a preparação convencional. As duas mais acessíveis, disponíveis no mercado são a anfotericina B lipossomal (Ambisome) e anfotericina B em dispersão coloidal. As menores doses de Ambisome necessárias para taxas de 95% de cura foram, de acordo com estudo da Organização Mundial da Saúde (OMS), de 6mg/Kg, 14mg/Kg e 21mg/Kg na Índia, Quênia e Brasil, respectivamente. A eficácia das formas lipídicas de anfotericina B no Brasil e Índia já foi comprovada, porém o alto custo da medicação ainda restringe sua utilização.

No Brasil, a Anfotericina B está indicada em pacientes graves de LV que desenvolvem insuficiência renal ou toxicidade cardíaca durante o uso de antimoniato de N-metil glucamina, na dose de 1-1,5mg/Kg/dia, por 21 dias, ou 3,0mg/Kg/dia durante 10 dias (36;40;48).

Outras drogas também têm sido testadas para o tratamento da LV. A pentamidina, testada entre os anos de 1980 e 1990, tem tido seu uso abandonado devido à resistência na Índia, toxicidade e diabetes mellitus insulino dependente em 4-12% dos casos (36;48).

A paromomycin ou aminosina é um antibiótico aminoglicosídeo testado na Índia e África com boa eficácia, sem nefrotoxicidade. É ativa contra uma grande variedade de patógenos, possui baixo custo e está sendo testada em associação com o stibogluconato de sódio na África (34;48).

A miltefosine, que foi primeiramente desenvolvida como uma droga para terapia do câncer, é a primeira formulação oral com eficácia comprovada para LV. No entanto, a droga é teratogênica, possui meia vida longa (aproximadamente 150 horas) e a resistência do parasita é facilmente induzida *in vitro*, tendo sido relatados casos de resistência na Índia (48).

### **2.1.6 Medidas de prevenção**

As medidas de prevenção da LV têm sido direcionadas principalmente para o controle do vetor, eliminação do reservatório, e detecção e tratamento de novos casos. Tais medidas vêm sendo revistas pela comunidade científica e autoridades governamentais uma vez que o controle da doença não tem sido efetivo, estando a mesma em expansão nos países do Sul europeu e Brasil. Estudos na Itália, Bangladesh e Nepal têm mostrado que o uso de materiais impregnados com inseticidas, como coleiras e mosquiteiros, pode ser eficiente como medida profilática. A proteção ideal através de vacinação encontra-se em fase de experimentação, sendo vacinas seguras e eficazes ainda não conhecidas (34;36;47;48).

## **2.2. A resposta imune a Leishmania**

O entendimento da resposta imune na LV iniciou-se com os estudos em camundongos com susceptibilidade ou resistência geneticamente determinadas, variáveis de acordo com a espécie de *Leishmania* infectante. Os camundongos BALB/c, por exemplo, são susceptíveis à infecção por todas as espécies de *Leishmania*, enquanto que os de linhagem C57BL6, são resistentes à infecção por *L. major* e susceptíveis às espécies capazes de visceralizar (5).

Através desses estudos em camundongos, inicialmente investigados em relação à infecção por *L. major*, foi verificado que a produção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos e INF- $\gamma$  por células T parecia ser

necessária para o controle da infecção e desenvolvimento de resistência adquirida à infecção (49;50).

Classicamente, acreditava-se que o desenvolvimento da LV poderia ser atribuído a essa falha em produzir uma resposta imune Th1 efetora, devido à desregulação na produção de INF- $\gamma$ , em relação a uma elevada produção de citocinas da resposta imune Th2. No entanto, hamsters infectados com *L. donovani* apresentam, em amostras de baço, quantidades significativas das citocinas do tipo 1 INF- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ . Quantidades significativas de fator de transformação- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e RNA mensageiro de IL-10 também estavam presentes nestas amostras (5;51).

Sabe-se que a resposta imune do homem à infecção por Leishmania é variável, de acordo com a manifestação de diferentes formas clínicas. Células periféricas mononucleares (PBMCs) de indivíduos com infecção assintomática ou subclínica respondem à estimulação por antígenos de Leishmania com produção de IL-2, IL-12 e INF- $\gamma$ . Em contraste, células PBMCs de indivíduos com LV ativa não produzem INF- $\gamma$  ao estímulo por antígenos de Leishmania (5).

No entanto, indivíduos que se curam da doença, na maioria dos casos, não apresentam recidivas, tornam-se positivos ao teste de Montenegro e suas células periféricas montam uma resposta Th1 efetora ao estímulo *in vitro* por antígenos de Leishmania. Porém, a capacidade de proliferação destas células ao estímulo por Leishmania é perdida quando as mesmas são cultivadas com as células do mesmo indivíduo quando doente (5;51). Além disso, estudos encontraram altas concentrações de INF- $\gamma$  plasmáticas e a presença de seu RNA mensageiro em amostras esplênicas de pacientes com LV (5;52;53). Estes dados levaram à conclusão de que apesar de presente, o INF- $\gamma$  não exerce sua função estimuladora da resposta Th1 devido à presença de moléculas contra regulatórias e imunossupressoras (52;54). Dentre estas moléculas, têm-se estudado o papel da IL-10, que está relacionada com a resposta Th2 e apresenta-se em concentrações plasmáticas elevadas nos pacientes com LV. A IL-10 é uma citocina regulatória e pode ser produzida por células dendríticas, células T, células B, macrófagos e células epiteliais. Possui efeito na resposta inata e adquirida, sendo produzida como resultado de um

processo de controle da homeostase, que protege os tecidos de dano causado pela resposta inflamatória aguda. Apesar de seus níveis aumentados poderem exercer papel protetor de tecidos, como o tecido hepático, na LV, suas atividades imunossupressoras podem promover a multiplicação do parasita e progressão da doença (51).

O efeito imunossupressor da IL-10 na LV foi demonstrado por Murray *et al.* (55) em modelo utilizando camundongos BALB/c e C57BL6 deficientes em IL-10, que se mostraram resistentes à infecção por *L. donovani*. No estudo de Caldas *et al.* (52), foram encontradas altas concentrações plasmáticas de INF- $\gamma$ . O grupo verificou que as altas concentrações plasmáticas desta citocina estavam correlacionadas com baixa produção por PBMC estimuladas. Os valores encontrados para IL-10 estavam aumentados e tenderam a diminuir após o tratamento, quando as PBMCs começaram também a responder efetivamente, com produção de INF- $\gamma$ , ao estímulo por Leishmania.

Estudo realizado por Wu *et al.* (56) demonstrou multiplicação de amastigotas em macrófagos tratados com IL-10. Acredita-se que esta citocina bloqueia a produção de TNF- $\alpha$  e óxido nítrico pelos macrófagos, através da inibição de sinais de ativação nestas células, como fatores de migração. Desta forma, o parasita em sua forma amastigota multiplica-se nestas células (51;56).

Estudos têm sido realizados para determinar quais as células responsáveis pela produção de IL-10 na LV. Evidências a partir de aspirados esplênicos indicam que possivelmente as células produtoras de IL-10 são CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup>. Acreditou-se que células T regulatórias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> também poderiam produzir esta citocina, mas estudos demonstraram que estas não estão elevadas no sangue ou baço de pacientes com LV em fase aguda, e a produção de INF- $\gamma$  por PBMCs não foi recuperada pela depleção deste tipo de células (57).

Dois estudos recentes, realizados em ratos, demonstraram que células CD4<sup>+</sup> produtoras de INF- $\gamma$  eram as principais produtoras de IL-10. No estudo realizado por Jankovic *et al.* (58), ratos infectados com *Toxoplasma gondii* tiveram inflamação letal inibida pela produção de IL-10 por células T-bet<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>, também produtoras de INF- $\gamma$ . No estudo de Anderson *et al.* (59), em camundongos infectados por *L. major*, a produção de IL-10 por células

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> produtoras de INF- $\gamma$  foi suficiente para a supressão da imunidade à infecção nos camundongos resistentes.

Uma vez que as células esplênicas de pacientes com LV apresentam elevada expressão de INF- $\gamma$  e IL-10, acredita-se que uma parte das mesmas produza as duas citocinas concomitantemente, como resposta ao estímulo inflamatório. A IL-12 mostrou-se capaz de induzir a produção concomitante destas duas citocinas em células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, e estudos têm demonstrado concentrações plasmáticas elevadas de IL-12 em pacientes com LV (51).

Outro fator que vem sendo estudado em relação ao seu papel contra-regulador e imunossupressor é a produção de fator de transformação- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Modelos animais têm demonstrado aumento da produção de TGF- $\beta$  em animais infectados por *L. donovani* e *L. chagasi*. A administração de anticorpos neutralizadores e a infecção em camundongos BALB/c sem a expressão do receptor TGF- $\beta$ RII nas células CD4<sup>+</sup> diminuiu a lesão causada por *L. major* (60).

O TGF- $\beta$  é uma proteína liberada das células ligada de forma não covalente a um peptídeo de latência associado (LAP). No meio extracelular este complexo se une a uma proteína ligadora de latência (LTBP), sendo o complexo armazenado na matriz extra celular. Para a ação do TGF- $\beta$ , este precisa ser liberado destes peptídeos e isto é realizado através de meios físico-químicos ou por meio de enzimas que agem na LAP ou LTBP (60).

Estudo realizado por Gantt *et al.* (60) verificou aumento da forma livre de TGF- $\beta$  em aspirados de medula de indivíduos com LV causada por *L. chagasi* e em culturas de macrófagos infectados. Esta forma de TGF- $\beta$  prolongou a sobrevivência do parasita nos macrófagos. Os autores observaram que o aumento da forma livre de TGF- $\beta$  deu-se pela atividade de protease derivada de cisteína catépsina B e pela própria atividade da promastigota, uma vez que tanto as culturas com as promastigotas quanto os sobrenadantes das culturas foram capazes de ativar o TGF- $\beta$ . Estudo realizado por Somanna *et al.* (61) também encontrou resultados similares.

Outros fatores imunossupressores que podem contribuir para o desenvolvimento e manutenção da doença são a produção de IgE e IgG. A produção de IL-10 induz a mudança isotípica de IgG em IgG3 e IgG1, e o

desenvolvimento de complexação por sua vez contribui para o aumento da produção de IL-10 em macrófagos humanos e murinos. Resposta imune deficiente também pode ser corrigida pela adição de IL-12, o que sugere que os receptores de IL-12 estão expressos durante a infecção humana, o que não ocorre nos modelos animais (5;51).

Assim, de acordo com o padrão de resposta imune verificado em humanos, com produção de INF- $\gamma$ , IL-10, TGF- $\beta$  e possível existência de receptores para IL-12 descritos acima, o paradigma Th1/Th2 de resposta à infecção por *L. donovani* e *L. infantum/chagasi* é controverso, não se podendo aplicá-lo universalmente às leishmanioses humanas (5).

Existem ainda, em humanos, diferenças na resposta imune à infecção quanto ao sexo e idade. Estudos epidemiológicos têm consistentemente demonstrado maior prevalência de doença em crianças e em indivíduos jovens do sexo masculino (6;30). Modelos animais utilizando infecção por *L. major* têm demonstrado que animais do sexo masculino possuem maior chance de desenvolver a doença, que diminui com a castração do animal. Além disso, fêmeas tratadas com testosterona tornam-se mais susceptíveis à infecção (5).

Uma vez que a resposta imune é regulada por fatores genéticos, tem-se, nos últimos 20 anos, procurado encontrar genes associados com a proteção e susceptibilidade à infecção por Leishmania. Modelos animais têm mostrado que existem componentes genéticos ligados à susceptibilidade ou resistência dos animais, e desde o início dos primeiros experimentos isto foi observado (62).

Verificou-se que animais com susceptibilidade à *L. donovani* também eram susceptíveis à infecção por *Mycobacterium bovis* e *Salmonella typhimurium*. Estes animais apresentavam um componente em um locus do cromossomo 1, que foi inicialmente denominado LSH, BCG ou ITY, de acordo com a infecção discutida. Posteriormente, o gene foi posicionado e clonado como NRAMP1, hoje denominado SLC11A1 (5;62).

Estudos em humanos têm mostrado evidências de que fatores genéticos estão também associados com a resposta à infecção por *L. chagasi*. Estudo realizado por Jerônimo *et al.* (63) mostrou agregação familiar da infecção assintomática por *L. chagasi*, enquanto que estudo realizado por Evans *et al.* (64) mostrou agregação tanto de infecção assintomática quanto de doença.

Análises de segregação genética, que possibilitam a inferência de que tipo de regulação gênica existe em determinada doença, demonstraram que a resposta de susceptibilidade à infecção por *L. chagasi* pode ser controlada por um gene ou gene de efeito poligênico como demonstrado nos estudos de Peacock *et al.* (65) e Blackwell (66). Neste sentido, tem sido realizada pesquisa de genes candidatos relacionados aos diversos fenótipos da infecção e mapeamento do genoma de populações expostas à infecção.

O locus do TNF- $\alpha$  mostrou-se associado com o desenvolvimento de LV no estudo realizado por Karplus *et al.* (67) em população brasileira exposta à infecção por *L. chagasi*. Em estudo do genoma de indivíduos expostos à infecção por *L. chagasi* em Natal, regiões do cromossomo 15 e 19 estavam associadas ao desenvolvimento de infecção assintomática, enquanto que uma região no cromossomo 9 estava associada com o desenvolvimento de doença (63). Outros estudos de mapeamento de genoma encontraram associações entre os genes CCL1 e CCL16, ligados à produção de quimiocinas, e desenvolvimento de doença (4), e genes da região 5q23.3-q31.1 com o desenvolvimento de resposta DTH+ e DTH- (68). Estudo realizado em 63 famílias sudanesas encontrou associação de marcadores localizados no cromossomo 22q12 e desenvolvimento da doença (69).

Além de fatores genéticos e imunes relacionados ao hospedeiro, descritos acima, o parasita secreta ativamente proteases e apresenta outros fatores que afetam as células do sistema imune e a produção de citocinas do hospedeiro humano. A protease *Leishmania* GP63 cliva o complemento, moléculas CD4 e digere proteínas intracelulares. Proteases derivadas de cisteína também estão associadas com a virulência do parasita, como descrito para a ativação de TGF- $\beta$  (5;70).

A presença de lipofosfoglicano (LPG) nas formas promatigostas metacíclicas de *Leishmania* também parece influir na resposta imune do hospedeiro. Em estudo realizado por Becker *et al.* (5;71) verificou-se que a presença de LPG ativa células *natural killers* através da ativação de receptores Toll-like 2.

Nos macrófagos, a eliminação do parasita se dá através da produção de óxido nítrico a partir da arginina pela ação da óxido nítrico sintase e de superóxido gerado pela NADPH oxidase. Estas moléculas também podem agir

como moléculas sinalizadoras, sendo o óxido nítrico essencial para a sinalização da tradução da IL-12, enquanto que o superóxido e peróxido ativam NF $\kappa$ B, o TCR e a fosforilação de ERK1/2. A produção de óxido nítrico e superóxido é induzida pelo INF- $\gamma$  e um segundo sinal indutor, que pode ser a produção de TNF- $\alpha$ . Estudos vêm demonstrando a importância da produção de óxido nítrico para a destruição de *L. major* e *L. chagasi* em cultura de células humanas. Porém, o efeito do óxido nítrico parece maior em células murinas (5).

## **2.3. Fatores nutricionais associados à infecção por Leishmania**

### **2.3.1 Estado nutricional e dieta**

A associação entre infecção e estado nutricional é bem reconhecida mundialmente. Badaró *et al.* (9) evidenciaram que 45% das crianças com LV sofriam de desnutrição moderada ou grave antes do aparecimento da LV, sendo assim a desnutrição considerada fator de risco para o desenvolvimento da doença.

Harrison *et al.* (10), em estudo com crianças brasileiras expostas à infecção por *L. chagasi* avaliaram o estado nutricional das mesmas utilizando a circunferência do braço (CB) e área muscular do braço. Foi encontrado que crianças com LV, que foram seguidas após o tratamento, apresentavam área gordurosa do braço e área muscular do braço que correspondia a 66% e 81% das áreas de seus familiares saudáveis, pareados por sexo e idade, que viviam na mesma casa. O estudo encontrou ainda diferenças maiores quando comparou as crianças que apresentaram LV aos vizinhos saudáveis, pareados por sexo e idade, encontrando área gordurosa do braço e área muscular do braço correspondentes a 41% e 75% das áreas encontradas para os vizinhos saudáveis.

Cerf *et al.* (72) em estudo prospectivo também avaliaram o estado nutricional de crianças expostas à infecção por *L. chagasi* no interior da Bahia. O grupo encontrou, similarmente aos achados de Badaró *et al.* (9), alta prevalência (77%) de desnutrição nas crianças com LV, medida através de baixo peso para idade. Foi também encontrado que 82% das crianças com LV possuíam baixa altura para idade, comparado com 55% em crianças sem infecção por *L. chagasi*. Os dados neste estudo mostraram ainda que, das



crianças que após avaliação inicial desenvolveram LV, 45,5% apresentavam desnutrição grave ou moderada e, destas crianças desnutridas que desenvolveram LV, somente 22% apresentavam anticorpos anti-Leishmania no momento da avaliação nutricional.

Como comentado anteriormente, um ponto importante a ser considerado nos estudos que avaliam o estado nutricional em doenças infecciosas, como a LV, é a dificuldade em se definir a causalidade da doença, e os fatores que antecedem a infecção. No entanto, no estudo de Cerf *et al.* (72) ficou clara a existência de desnutrição antes da infecção pelo parasita, dado grande número de crianças sem infecção por *L. chagasi* que apresentavam desnutrição e desenvolveram doença.

Dye & Williams (73) observaram que a desnutrição reportada pelos estudos anteriores poderia ser falsamente interpretada como um fator de risco, uma vez que estes estudos não avaliaram se a exposição das crianças desnutridas ao parasita, representada pelo número de flebotomíneos e cães no local de moradia, diferia em relação às demais crianças não desnutridas. Assim, os autores criaram modelos estatísticos para infecção e doença utilizando os estudos publicados, com a adição dessas variáveis de exposição. Os resultados apontaram que realmente a desnutrição está relacionada ao desenvolvimento de doença, como mostrado nos estudos anteriores de Badaró *et al.* (9) e Cerf *et al.* (72).

Pérez *et al.* (74) ao avaliar o efeito de dietas hipoprotéicas em camundongos C57BL/6 submetidos à infecção por *L. mexicana* verificaram que estes não apresentaram resposta de cura espontânea à infecção, com lesões maiores que o grupo em dieta normal. Os linfócitos dos animais em dieta hipoprotéica também apresentaram resposta diminuída ao estímulo por Leishmania.

Anstead *et al.* (75) observaram o efeito da infecção por *L. donovani* em camundongos da linhagem BALB/c sob diferentes dietas. Neste estudo, de forma inédita em modelos animais com leishmanioses, foi levado em consideração o peso para idade dos camundongos estudados, à semelhança das avaliações realizadas em humanos. Outro aspecto importante do estudo foi a avaliação de componentes da resposta imune inata, uma vez que uma falha

no reconhecimento e inativação inicial do parasita pode levar à disseminação da infecção para outros órgãos, como baço e fígado.

Assim, os camundongos foram alimentados com dietas com baixo teor em proteínas, calorias, ferro e zinco, e comparados com camundongos alimentados com dieta normoproteica, normocalórica, com quantidades adequadas de zinco e ferro. Os resultados demonstraram que, nos camundongos com dieta deficiente, a disseminação de *L. donovani* era maior no fígado e baço quando comparada aos animais controle. Foi verificado também que a disseminação apresentada por estes animais estava correlacionada com o peso para idade, sendo maior naqueles que apresentavam os menores valores antropométricos. Os camundongos em dieta controle apresentaram maior retenção do parasita nos linfonodos, o que impediu a disseminação da infecção para as vísceras (75).

As células de linfonodos dos camundongos em dieta deficiente produziram níveis aumentados de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Esta prostaglandina quando bloqueada pelo uso de indometacina está associada à diminuição de lesões, aumento da produção de óxido nítrico e INF- $\gamma$  em infecção por *L. major*. Em infecção por *L. donovani*, verificou-se que o bloqueio da produção desta prostaglandina diminuiu a visceralização do parasita (75).

Anstead *et al.* (75) também verificaram que os camundongos em dieta deficiente apresentavam menor atividade da enzima óxido nítrico sintase no fígado e baço. Os dados do estudo contribuíram para o entendimento de que não só o estado nutricional, mas a dieta em seu aporte energético-protéico e de micronutrientes estão associados com a doença e produção de fatores ligados ao desenvolvimento de resposta imune efetora.

Bern *et al.* (30;75) verificaram em seu estudo associação da resposta assintomática à infecção por *L. donovani* com o consumo de carne vermelha pelo menos duas vezes ao mês.

### **2.3.2 Micronutrientes**

#### **2.3.2.1 Cobre e zinco**

O papel do zinco na manutenção da resposta imunológica e resistência a infecções é bem conhecido. Suplementação de zinco tem mostrado efeito

positivo na diminuição da incidência de diarreia, pneumonia e malária (76-78). O zinco afeta múltiplos aspectos da resposta imunológica, participando como co-fator em diversas reações no organismo e na regulação gênica de linfócitos. Possui também importante papel no desenvolvimento de células que medeiam a resposta imune não específica como neutrófilos e células *natural killers*. Sua deficiência afeta a imunidade adquirida por afetar o crescimento e funções dos linfócitos T de ativação e produção de citocinas (79).

O papel do cobre como co-fator de enzimas cobre-dependentes, que catalisam reações fisiológicas relacionadas com fosforilação oxidativa, inativação de radicais, biossíntese de colágeno e elastina, formação de melanina, coagulação sangüínea, metabolismo de ferro e síntese de catecolaminas é bem conhecido. No entanto, estudos também vêm demonstrando redução dos níveis de IL-2 em presença de sua deficiência, afetando negativamente a proliferação de linfócitos T e a resposta imune celular (80). Mais estudos são necessários para o entendimento do possível papel regulador do cobre na resposta imune para o entendimento do efeito supressor encontrado no estudo de Van *et al.* (81).

Em relação a estes micronutrientes em leishmanioses, encontram-se quatro estudos na literatura, três dos quais realizados por Kocyigic *et al.*, na Turquia em pacientes com leishmaniose cutânea (LC). O primeiro, de Kocyigic *et al.* (82) verificou altas concentrações séricas de cobre e baixas de zinco nos pacientes. O segundo estudo, realizado pelo mesmo grupo (83), assim como no estudo anterior, encontrou baixos valores de zinco e altos de cobre em pacientes com LC. Desta vez, o grupo verificou que, durante a terapia antimonial, os valores de zinco tenderam a aumentar e os de cobre a diminuir. Em 2002, Kocyigic *et al.* publicaram novo estudo em que ficou evidenciado que as baixas concentrações de zinco estavam negativamente correlacionadas com altos valores de IL-1beta, e as altas concentrações de cobre positivamente relacionadas a valores aumentados de IL-6 e IL-1beta. Assim, o grupo concluiu que as alterações séricas destes micronutrientes em pacientes com LC podem não ser atribuídas a baixas ingestões, mas sim ao resultado de ações imunológicas reguladas por citocinas, visando a defesa do organismo (84).

Van *et al.* (81) também verificaram que não só o zinco, mas o cobre, e a relação zinco/cobre parecem influenciar a resposta celular à leishmaniose. Foi

encontrada deficiência de zinco, aumento das concentrações plasmáticas de cobre e aumento na relação cobre/zinco nos pacientes com LV. O aumento do cobre plasmático estava significativamente relacionado com o aumento na produção de anti-Leishmania IgG, e a relação aumentada cobre/zinco estava também relacionada com o aumento da resposta Th2 à infecção.

Os autores discutem que a relação cobre/zinco poderia servir como um marcador da resposta Th1 diminuída na LV. Porém, para que esta hipótese seja comprovada, pesquisas com seguimento de pacientes durante e após tratamento seriam necessárias para que se comprovasse o restabelecimento efetivo desses micronutrientes (81).

O grupo verificou ainda que a adição de cobre em concentrações fisiológicas em meio de cultura inibiu a produção de INF- $\gamma$ , e adição de zinco não reverteu esta inibição. Mesmo assim, esses autores sugerem que a suplementação de zinco em indivíduos com LV poderia ser benéfica, uma vez que estudos *in vivo* têm demonstrado seu efeito diminuidor das concentrações de cobre (81).

Bern *et al.* (30) também encontraram em seu estudo valores diminuídos de zinco plasmático em indivíduos com LV, porém estes não diferiram significativamente dos valores encontrados para indivíduos sem infecção e com infecção assintomática. Neste estudo, indivíduos que posteriormente desenvolveram LV também foram avaliados e, apesar de também apresentarem valores diminuídos de zinco, estes não diferiram entre os grupos estudados.

Os dados encontrados nestes estudos com Leishmania relacionam-se com os dados da literatura em relação ao zinco. Prasad *et al.* (80) observaram, pela primeira vez, que a produção de INF- $\gamma$  em presença de deficiência de zinco estava diminuída, enquanto que a produção de IL-4, IL-6 e IL-10, relacionados com o estímulo da imunidade humoral, não estava afetada. Desde então, têm-se evidenciado que, a mudança da resposta celular Th1 para a resposta Th2 ocorre precocemente na presença de deficiência de zinco, agravando e/ou cronificando a infecção por microorganismos intracelulares (85).

### **2.3.2.2 Vitamina A**

Apesar de só ter sua estrutura descoberta no início do século XX, a deficiência de vitamina A foi provavelmente a primeira deficiência nutricional conhecida pela humanidade. A cegueira noturna, a mais grave consequência da sua deficiência, já era conhecida pelos antigos gregos e egípcios, que utilizavam fígado cozido e seu suco como forma de alimento e de uso tópico para a cura da deficiência (86).

A vitamina A foi a primeira vitamina a ser identificada, em 1913, quase que simultaneamente por dois grupos de pesquisadores, McCollum e Davis, na Universidade de Wisconsin, e Osborne e Mendel, na Universidade de Yale. O termo vitamina A é empregado genericamente a todos os compostos derivados da B-ionona que possuem atividade biológica de retinol. O retinol possui a fórmula empírica  $C_{20}H_{30}O$  e contém na sua estrutura química o anel B-ionona ligado a uma estrutura terpênic. Devido à sua similaridade com o retinol, os compostos dele derivados são chamados de retinóides. Os retinóides ativos da vitamina A são encontrados em três formas: a forma álcool (retinol), encontrada no soro, acoplado a proteína de ligação do retinol (RBP); a aldeído (retinal ou retinaldeído), componente dos pigmentos visuais dos cones e bastonetes; e a ácida (ácido retinóico), encontrada no meio intracelular (87).

Na natureza, o retinol é encontrado em sua forma esterificada, ou pré-formada, em alimentos de origem animal, como fígado, leite e ovos. Em alimentos de origem vegetal, não são encontrados retinóides, mas carotenóides, que podem produzir retinol no metabolismo. Por esta propriedade, se diz que os carotenóides são pró-vitamina A, podendo ser encontrados em vegetais folhosos verde-escuros e nos vegetais e frutas amarelo-alaranjados. O mais ativo destes é o betacaroteno, um dímero de retinol (86;87).

Por ser encontrada na forma esterificada, a vitamina A é solúvel em solventes orgânicos e insolúvel em soluções aquosas. Ela é sensível à oxidação na presença de luz, instável ao calor e em meio ácido, sofrendo isomerização com esses fatores (86;87).

O efeito anti-infeccioso atribuído à vitamina A vem a partir de evidências de estudos que demonstraram a associação da vitamina A na redução da mortalidade infantil por diarreia, sarampo e infecções respiratórias (19;87).

Sabe-se que a deficiência de vitamina A é mais comum em estados infecciosos que em sua ausência, sendo associada com aumento de morbidade e mortalidade, desnutrição e comprometimento do crescimento e desenvolvimento cognitivo. A deficiência de vitamina A pode ser classificada em clínica, manifestada pela cegueira noturna, mancha de Bitot, xeroftalmia e queratomalacia, ou subclínica, quando as concentrações séricas de retinol se encontram inferiores a 20µg/dL (0,7µmol/L). Porém, dados na literatura têm sugerido que valores de retinol sérico inferiores a 30µg/dL (1,05µmol/L) estão associados com disfunção biológica e são responsivos à suplementação (19;87;88). Estudo em crianças menores de 5 anos de populações com deficiência de vitamina A têm demonstrado que sua suplementação pode reduzir a mortalidade em torno de 30% (89;90).

Neste sentido, a maioria dos países em desenvolvimento tem adotado o protocolo da Organização Mundial da Saúde de suplementação para diminuir as conseqüências de sua deficiência. O protocolo recomenda a suplementação de 200.000 UI para mulheres no pós-parto imediato, e suplementação de vitamina A para crianças de 6 até 59 meses, com uma dose a cada seis meses. São recomendados 100.000 UI para crianças de 6 a 11 meses e 200.000 UI para crianças de 12 a 59 meses (89-92).

Em países em desenvolvimento se estima que concentrações plasmáticas de retinol < 20µg/dL (0,7µmol/L) variem de 11 a 40% em crianças menores de 5 anos (93). No Brasil, a deficiência de vitamina A varia de 21 a 49% em crianças pré-escolares, e a Organização Mundial da Saúde classifica o país com alto índice de deficiência subclínica da vitamina (93-97).

O efeito protetor desta vitamina contra doenças infecciosas pode ser em parte atribuído ao papel de manutenção da integridade de mucosas e estímulo da proliferação e diferenciação das células epiteliais (20;98;99).

Rahman *et al.* (98), em estudo randomizado com 800 crianças entre 12-35 meses em Bangladesh encontraram diminuição significativa da incidência de diarreia em crianças suplementadas com vitamina A em comparação com o grupo placebo. Este efeito foi ainda maior em relação ao placebo quando comparado ao efeito da suplementação simultânea de vitamina A e zinco.

Publicações têm mostrado que o baixo nível sérico desta vitamina é fator de risco para transmissão de HIV materno-fetal (100), e que suplementação da

vitamina acarreta em melhora do prognóstico de pacientes com malária *falciparum* (22).

Outro importante papel atribuído ao ácido retinóico é o de ativação de células T efectoras e de memória mesentéricas. Iwata *et al.* (101) ao estudarem ratos deficientes em vitamina A verificaram diminuição das células T efectoras e de memória na mucosa intestinal. Experimentos *in vitro* realizados pelo grupo demonstraram que a presença do ácido retinóico induziu, mesmo na ausência de células dendríticas, a expressão de receptores que promovem a migração de células T à mucosa intestinal, o CCR9 e  $\alpha 4\beta 7$ . As células dendríticas mesentéricas por sua vez apresentaram alta produção da enzima retinaldeído desidrogenase, importante para a formação do ácido retinóico. O bloqueio desta enzima nas células dendríticas ou de receptores de ácido retinóico nas células T diminuiu significativamente a expressão de CCR9 e  $\alpha 4\beta 7$ , essenciais para a migração das células T à mucosa intestinal.

Alguns estudos em células humanas têm mostrado que o ácido retinóico pode apresentar diferentes efeitos na resposta imune, dependentes do antígeno estimulante, tipo e origem das células e da via de estimulação das mesmas. Em estudo, utilizando como via de estimulação os receptores de células B (BcR) e cepas de *Staphylococcus aureus*, foi observada ação inibitória do ácido retinóico no processo de proliferação das células B, com inibição do sistema de ativação do ciclo celular. Estudos que utilizaram células B isoladas de tonsila e baço em murinos também verificaram efeito inibidor do ácido retinóico na diferenciação celular, mas sem efeito inibidor da proliferação (102;103).

No entanto, estudo utilizando células B de memória humanas estimuladas via toll-like receptor 9 (TLR-9) por meio de CpG-DNA, um antígeno policlonal presente em bactérias e vírus, mostrou um aumento da proliferação e diferenciação destas células, com maior produção de IL-10 e IgG em presença de ácido retinóico, a forma ativa de retinol nas células (104).

O papel da vitamina A na ativação ou inibição de genes é exemplo bem caracterizado de regulação direta na expressão gênica por nutrientes. No núcleo celular, o ácido retinóico influencia a ativação de genes através da ligação a receptores específicos, pertencentes à superfamília de receptores tiróides e esteróides. Na sua forma *all-trans*, o ácido retinóico liga-se a

receptores de ácido retinóico (RAR), que agem como ativadores transcripcionais de genes específicos. Os RAR's são expressos nas isoformas RAR- $\alpha$ , RAR- $\beta$  e RAR- $\gamma$ . Outro metabólito ativo da vitamina A no núcleo celular é o ácido 9-*cis* retinóico, que se liga a receptores X retinóides no núcleo celular (RXR). Estes receptores também apresentam as isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Cada receptor RAR e RXR possui domínios específicos no DNA, através dos quais a atividade de transcrição pode ser afetada. Estes domínios do DNA são chamados de elementos de resposta ao ácido retinóico, ou RARE (87). Apesar da expressão de muitos genes parecerem associados com a regulação por vitamina A, apenas alguns RARE foram caracterizados até o momento.

A expressão do gene do IFN- $\gamma$ , essencial para a resposta Th1 efetiva, é diminuída pelo ácido retinóico. Cippitelli *et al.* (105) demonstraram em PBMC humanas, que o estímulo por ácido retinóico em diferentes concentrações inibiu a expressão de RNAm de IFN- $\gamma$  de 10 a 17%. Os autores verificaram em células T linfoblásticas humanas que esta diminuição estava relacionada ao efeito inibidor do ácido retinóico na região ligadora USF/EGR-1 do promotor.

Modelos animais, têm mostrado que a deficiência de vitamina A está associada à promoção da resposta Th1 em detrimento da resposta Th2. Cantorna *et al.* (25) demonstraram em animais deficientes que havia maior número de fatores de transcrição de IFN- $\gamma$  e IL-12 e que quando suas células T foram estimuladas, via receptor de células T, houve maior produção destas interleucinas e baixa produção de IL-10 e IL-4. Neste estudo, a suplementação de ácido retinóico diminuiu a produção de fatores de transcrição de IFN- $\gamma$  e IL-12.

No estudo realizado por Cantorna *et al.* (106) ratos deficientes em vitamina A apresentaram a mesma frequência de células produtoras de IFN- $\gamma$  que ratos controles. No entanto, a produção de IFN- $\gamma$  nos ratos deficientes apresentou-se seis vezes mais rápida após estímulo, e a adição de ácido retinóico diminuiu em 50% esta velocidade. Ao contrário, as células secretoras de IL-5 estavam mais presentes nos ratos controles, e velocidades de produção destas citocinas foi a mesma para ambos os grupos. A adição de vitamina A dobrou a frequência destas células em ambos os grupos. As células apresentadoras de antígenos no grupo dos animais deficientes estimularam



maior produção de IFN- $\gamma$  que as células dos animais controle e a adição de ácido retinóico diminuiu esta produção em 50%. Desta forma, os autores concluíram que a vitamina A pode aumentar a resposta Th2 através da regulação dos seguintes mecanismos: diminuição da taxa de produção de IFN- $\gamma$  e da atividade de células apresentadoras de antígenos, e aumento da proliferação de células Th2.

No entanto, são poucos os estudos em humanos que comprovem esta tendência. Jason *et al.* (27) em estudo realizado em Malawi, região endêmica para tuberculose e HIV, encontraram níveis de vitamina A reduzidos nas crianças doentes e significativamente correlacionados com maior número de células *natural killers* e relação IL-10/TNF- $\alpha$  diminuída em monócitos estimulados. O grupo encontrou ainda associação inversa da cicatriz da vacina BCG, que foi utilizada como marcador de resposta celular, e valores séricos de retinol.

Apesar de a LV apresentar relação com a resposta imune celular e humoral, e da deficiência de vitamina A ser comum nas áreas endêmicas para a doença, estudos que procurem elucidar a interação desta vitamina com a resposta de doença ou infecção assintomática são escassos.

Luz *et al.* (17) ao estudar crianças com LV em um desenho experimental tipo caso-controle verificaram que estas crianças apresentavam baixas concentrações séricas de retinol, ao serem comparadas com seus irmãos saudáveis.

Apesar dos mecanismos que levam a diminuição do retinol em processos infecciosos não serem bem entendidos, acredita-se que a mesma deve-se ao aumento da excreção renal de retinol e da proteína ligadora de retinol (RBP) associada a processos infecciosos febris. Acredita-se que, nestes episódios, não existe defeito na função glomerular, uma vez que proteínas com peso molecular  $\geq 65$ kDa não entram nos túbulos renais. No entanto, possivelmente, existe defeito na reabsorção realizada pelas células do túbulo proximal, o que acarreta em defeito na reabsorção de proteínas de baixo peso molecular, como a RBP com massa molecular de 21kDa. Isso leva a um aumento da excreção urinária de RBP e de retinol ligado à RBP. Aproximadamente 85% da RBP no soro está complexada à proteína transtiretina. Esta proteína não foi encontrada na urina de indivíduos com

processos infecciosos agudos, o que reforça a hipótese de que a excreção aumentada de RPB e retinol na urina seja causada por defeito na função tubular (107;108).

Bern *et al.* (30) também encontraram concentrações séricas de retinol diminuídas em indivíduos com LV em Bangladesh. Neste estudo, indivíduos saudáveis que após três meses da coleta desenvolveram LV também apresentaram valores diminuídos de retinol sérico, apesar dessa diminuição não se mostrar estatisticamente significativa em relação aos grupos saudáveis que desenvolveram infecção assintomática e que não apresentavam infecção por *L. donovani*.

### **2.3.2.3 Suplementação de micronutrientes**

Até o momento, não existem estudos na literatura que demonstrem o efeito da suplementação de micronutrientes na resposta à infecção por Leishmania em humanos.

Garg *et al.* (29), no único estudo realizado em camudongos, verificaram que suplementação profilática de vitamina C em 15 doses diminuiu significativamente a visceralização de *L. donovani*, e aumentou o efeito terapêutico do stibogluconato de sódio. No entanto a suplementação desta vitamina após o estabelecimento da infecção, diminuiu a ação da droga.

A suplementação de ferro e das vitaminas A, B e E, quer utilizadas de maneira profilática ou terapêutica, promoveram a multiplicação do parasita. Estes dados sugerem que a suplementação de micronutrientes deve ser observada e estudada, de acordo com as doenças endêmicas existentes na área a ser beneficiada (29;32).

### **2.3.3 Amamentação e peso ao nascer**

A amamentação é mundialmente reconhecida pelo seu efeito protetor contra infecções diarreicas, respiratórias, urinárias e otites em crianças. Este efeito protetor mostra-se nos estudos de forma prospectiva e é independente de condições sócio-econômicas, número de residentes na família e grau de instrução dos pais (11-13).

O leite materno apresenta diversos fatores bioativos responsáveis pelo efeito protetor contra doenças infecciosas. Dentre as proteínas encontradas,

têm-se imunoglobulinas, lactoferrina, lisosimas, alfa-lactoalbumina e caseína (109).

As imunoglobulinas existentes no leite materno são a IgM, IgG e, em maior quantidade IgA secretória. Estas funcionam ligando-se ativamente a antígenos microbianos, bloqueando a ligação de microrganismos no trato gastrointestinal, aumentando a fagocitose de células imunes e promovendo o desenvolvimento do sistema imune da criança. A lactoferrina atua principalmente na quelação de íons de ferro, o que inibe sua utilização por bactérias, desfavorecendo assim seu crescimento. As lisosimas promovem a quebra da parede celular de bactérias, ligam-se às endotoxinas, aumentam a produção IgA e contribuem para a ativação de macrófagos. A alfa-lactoalbumina é carreadora de cálcio e promove o crescimento de bifidobactérias. A caseína inibe a adesão bacteriana ao trato gastrintestinal e também promove o crescimento de bifidobactérias (109).

Existem outros fatores bioativos no leite materno, tais como: carboidratos, especialmente oligossacarídeos que estimulam o crescimento de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, associados com proteção do trato gastrintestinal à colonização por microorganismos patogênicos, e fatores de crescimento, como o TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , fator de crescimento insulina-símile (IGF), que atuam no crescimento das células intestinais, maturando as células, o que leva à menor permeabilidade à patógenos (109).

Além da presença desses fatores, estudos têm demonstrado que alimentos complementares contaminados são a principal rota de transmissão de diarreia em crianças, razão pela qual se verifica aumento da incidência da doença no segundo semestre de vida, que coincide com o aumento da ingestão destes alimentos. Assim, crianças exclusivamente amamentadas apresentam menor risco de doenças veiculadas por alimentos (110;111).

Estudos têm mostrado tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento ação protetora da amamentação na morbidade e mortalidade infantis por doenças infecciosas, especialmente por infecções diarreicas.

Chen & Rogan (112), ao avaliar nos Estados Unidos dados de mortalidade infantil, verificaram que crianças que haviam sido amamentadas, independentemente do tempo, apresentaram risco de 0.79 (IC 0,67 – 0,93) de morte ao serem comparadas com crianças nunca amamentadas. O estudo

demonstrou ainda que a duração da amamentação estava associada com menor risco de mortalidade, com crianças com três meses ou mais de amamentação com risco medido através da *odds ratio* (OR) de 0,62 de morte.

Estudo prospectivo realizado em Bangladesh demonstrou que crianças com ausência de amamentação ou amamentação parcial (juntamente com leite que não o materno e alimentos complementares) apresentavam risco de mortalidade 2,23 vezes maior que crianças amamentadas exclusivamente. O risco de morte por diarreia e infecção respiratória aguda nas crianças não amamentadas/parcialmente amamentadas foi, respectivamente, 3,94 e 2,40 vezes maior que nas crianças que receberam amamentação exclusiva.

Estudo realizado por Ruiz-Palacios *et al.* (113) em crianças mexicanas verificou que as crianças que eram amamentadas permaneceram sem episódios de diarreia por mais tempo após o nascimento em comparação à crianças que não receberam leite materno, sendo de 68% versus 26% aos três meses de idade, e 48% versus 13% aos seis meses.

López-Alarcón *et al.* (13) ao estudar crianças recém nascidas por seis meses verificaram efeito protetor da amamentação na incidência e prevalência de infecções respiratórias agudas e episódios de diarreia. O grupo verificou também que nas crianças exclusivamente amamentadas houve diminuição dos dias em que a criança permaneceu doente, com episódios de doença de menor duração.

Em relação à associação da amamentação e deficiência de vitamina A, de acordo com a OMS (114), o padrão de amamentação até os 18 meses com introdução de alimentos fonte de vitamina A partir dos 6 meses é protetor contra a deficiência clínica de vitamina A. A OMS afirma ainda que a alimentação complementar ou suplementação da vitamina é necessária a partir dos seis meses, especialmente em crianças de mães desnutridas. Para análise de populações, segundo a OMS (114), onde a desnutrição materna é prevalente, há risco de deficiência de vitamina A quando 50% das crianças não recebem LM aos 6 meses e quando menos de 75% das crianças de 6 a 17 meses não recebem alimentos ricos em vitamina A ao menos 3 vezes/semana.

A recomendação do tempo apropriado de amamentação exclusiva foi controversa até o ano de 2001, após a 54<sup>a</sup> Assembléia Mundial da Saúde, quando a Organização Mundial da Saúde, recomendou a introdução de

alimentos complementares a partir dos 6 meses em substituição à recomendação anterior, de 4 a 6 meses. Esta mudança foi então integrada na recomendação para a saúde pública global. No entanto, só em 2002, se atingiu o consenso mundial de que não há benefício que possa ultrapassar os riscos e desvantagens da introdução precoce de alimentos complementares antes dos 6 meses de vida (111;115).

O Ministério da Saúde do Brasil (116) recomenda que o aleitamento materno exclusivo deva ser praticado até os 6 meses de vida, quando deve ser iniciada a introdução de alimentos complementares, mantendo o leite materno até 2 anos ou mais.

Apesar de estudos comprovarem o efeito benéfico da amamentação exclusiva até os 6 meses na morbidade e mortalidade infantis, e de ter ocorrido nas últimas duas décadas maior incentivo ao aleitamento materno, e aumento do tempo de amamentação, foi demonstrado que a prevalência desta prática ainda é baixa nos países em desenvolvimento com média de 39%. Na África esta prática é realizada em 25% da população, na Ásia, 45% e, na América Latina e Central, em 31% (33;117).

O peso ao nascer é um outro fator associado à morbidade e mortalidade infantis, que representa o estado nutricional intrauterino da criança, o estado nutricional materno e pode ser interpretado como um marcador de morbidade e mortalidade prospectivo (118-121).

O baixo peso ao nascer é definido como peso inferior a 2500g, e ainda é considerado, mundialmente, como problema de saúde pública. Apesar de 50% das crianças nascidas com baixo peso em países desenvolvidos serem nascidas pré-termo, em países em desenvolvimento, a maioria dessas crianças nascem a termo, sendo afetadas pela restrição intrauterina no crescimento que se inicia no início da gestação (14).

Estima-se que a prevalência de baixo peso ao nascer varia de 25%, no sul asiático – onde mais de 50% das crianças com baixo peso ao nascer nascem – a 10 e 12% na África e América Latina, respectivamente. Apesar dessas porcentagens serem superiores às estabelecidas como meta mundial de < 10% em 1990, acredita-se que estes dados estão subestimados. Estima-se que mais de dois terços do peso ao nascer não são registrados em países em desenvolvimento da África, Ásia e América Latina (14).

No entanto, acredita-se que houve melhora deste indicador em algumas regiões, uma vez que houve diminuição da desnutrição na infância, o que sugere diminuição da prevalência de baixo peso ao nascer (121).

Foi demonstrado que fatores nutricionais maternos tanto antes quanto durante a gestação são responsáveis por 50% dos casos de baixo peso ao nascer em países em desenvolvimento. Na realidade, o baixo peso ao nascer está interligado com o estado nutricional materno, em uma dinâmica que se perpetua, afetando futuras gerações. No padrão clássico, crianças do sexo feminino nascidas com baixo peso, continuam a apresentar falha no crescimento durante a infância e adolescência e tendem a procriar ainda na adolescência. Este fato faz com que estas adolescentes sejam gestantes antes de atingirem tamanho corporal e reservas de nutrientes adequadas à gestação. Assim, estas gestantes geram recém-nascidos de baixo peso ao nascer (122).

Este fato foi reforçado em recente meta análise realizada por Victora *et al.* (15). Neste estudo ficou evidenciado que o baixo peso ao nascer também é preditor de baixa altura na vida adulta, baixa escolaridade e diminuição da capacidade produtiva. Além disso, estudos têm demonstrado a associação do baixo peso ao nascer com maior risco de aumento das concentrações de glicose, aumento da pressão arterial, perfil lipídico alterado e maior risco de doença cardiovascular na vida adulta (15;118). Acredita-se que as últimas associações descritas possam ser explicadas pelo rápido ganho de peso na infância, que pode estar ligado a este processo. No entanto, são necessários estudos que esclarecem as vias metabólicas que expliquem as associações encontradas (118).

Apesar dos estudos na literatura demonstrarem o efeito da amamentação e peso ao nascer na proteção contra morbidade e mortalidade por doenças infecciosas, inexistem estudos que elucidem essa interação em leishmanioses, sendo necessária a elucidação desta associação.

### **3. Métodos**

#### **3.1. Considerações éticas**

Este estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, segundo protocolo 088/06 – CEP-UFRN, CAAE 0079.0.051.000-06 (Anexo).

#### **3.2. Tipo do estudo**

Foi realizado estudo do tipo transversal de dezembro de 2006 a janeiro de 2008, no qual crianças com leishmaniose visceral e com histórico da doença foram comparadas entre si e com crianças saudáveis, sem histórico da doença, expostas à infecção por *Leishmania chagasi*.

#### **3.3. Área do Estudo**

O estudo foi realizado em oito municípios do Rio Grande do Norte: Natal, Paranamirim, Nísia Floresta, Macaíba, Ceará Mirim, São Gonçalo, Touros e Extremoz.

#### **3.4. População estudada**

Foram estudados quatro grupos de crianças: 1) 20 crianças com leishmaniose visceral ativa, 2) 33 crianças com história de leishmaniose visceral, 3) 40 crianças com infecção por *L. chagasi* assintomática (DTH+), e 4) 56 crianças sem sinais de infecção por *L. chagasi*. Destas crianças, 50,4% moravam em região peri-urbana ou urbana e 49,6% em região rural.

Foram considerados como critérios de inclusão para cada grupo:

- 1) Leishmaniose visceral sintomática: crianças com sinais e sintomas de LV, com diagnóstico confirmado por aspirado de medula óssea e presença de anticorpos anti-rk39 e anti-antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA).
- 2) História de leishmaniose visceral: crianças com história de tratamento para LV há mais de um ano, acompanhadas pela equipe do laboratório de Imunogenética da UFRN;

- 3) DTH+: crianças com resposta cutânea de hipersensibilidade tardia (DTH) positiva ao teste cutâneo de Montenegro sem história da doença;
- 4) Crianças sem infecção por *L. chagasi* ou DTH-: crianças com teste de Montenegro e sorologia anti-SLA negativos, parentes de um caso de LV.

Os critérios de exclusão utilizados em todos os grupos foram: a) crianças doentes com febre > 38°C no momento da coleta – exceto LV ativa; b) crianças mental ou fisicamente deficientes; c) crianças maiores de 14 anos; e d) crianças que não consentiram e/ou os pais ou responsáveis não consentiram a participação no estudo.

Os casos ativos de LV foram arrolados no Hospital infantil Varela Santiago. As crianças com história de leishmaniose visceral, infecção assintomática e sem infecção por *L. chagasi*, foram acompanhadas pelo Laboratório de Imunogenética da UFRN durante e após o tratamento. Estas famílias foram visitadas em suas casas, onde os dados foram coletados.

Todas as crianças tiveram sua participação consentida no estudo pelos pais ou responsáveis, formalizada através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Foi aplicado um questionário semi-estruturado para coleta de dados sócio-econômicos e investigação da história de amamentação, peso ao nascer, presença de co-morbidades, tempo de tratamento para a LV (no caso de crianças com história da doença) e uso de medicação e/ou suplementos nutricionais (Apêndices 1 e 2).

Para cada indivíduo, foram coletados cerca de 10mL de sangue para realização das seguintes dosagens: hemograma, proteínas totais, albumina, globulinas, ELISA para anticorpo anti-SLA e rK39, retinol sérico e MRDR, proteína C-reativa e alfa-1-glicoproteína ácida.

### **3.5. Avaliação do estado nutricional**

Foram coletados dados de peso, altura, idade e sexo das crianças estudadas. Uma vez que o peso poderia mostrar-se positivamente afetado pela hepatoesplenomegalia nas crianças com LV ativa, a medida da circunferência do braço foi realizada como medida adicional de perda ponderal. Para avaliação do estado nutricional, foram utilizados os índices Peso/Idade (P/I),



Altura/Idade (A/I), Peso/Altura (P/A), Índice de Massa Corporal (IMC) e Circunferência do Braço/Altura (CB/Altura). Foram consideradas eutróficas crianças com índices entre +2 e -2 escores z, e desnutridas crianças com índices < -2 escores z (123). O cálculo dos índices e escores z foi realizado através do programa Epi Info versão 3.4.1. Foi utilizada como referência a tabela do Centers for Disease Control (CDC) de 2000, disponível no programa.

Para coleta dos dados antropométricos, foi utilizada balança digital marca Plenna<sup>®</sup> com capacidade para 150Kg, sensibilidade de 100g e estadiômetro portátil marca Invicta Education<sup>®</sup> com capacidade para 2m e sensibilidade de 0,1cm. Para crianças menores de dois anos, o comprimento foi aferido utilizando antropômetro com capacidade para 120cm e sensibilidade de 0,1cm. A altura/comprimento foi aferida duas vezes com erro padrão permitido de  $\pm 0,5$ cm. A circunferência do braço foi medida utilizando fita métrica com capacidade para 150cm e sensibilidade de 0,1cm. Todas as medidas antropométricas foram realizadas por um único pesquisador treinado.

### **3.6. Avaliação dos níveis de vitamina A**

A vitamina A foi avaliada pela dosagem de retinol sérico e pelo método de dose-resposta relativa modificado ou *modified-relative-dose-response test* (MRDR), uma vez que o retinol sérico apresenta-se diminuído em infecções e só declina após depleção das reservas hepáticas. O MRDR avalia quantitativamente as reservas hepáticas de vitamina A. Para o teste, o 3,4-didehidroretinol acetato (3,4-DRA), um análogo de retinol sem função metabólica conhecida no organismo humano, encontrado em peixes e sintetizado artificialmente, é administrado oralmente. Esta substância é hidrolizada no intestino a 3,4-didehidroretinol, que é incorporado aos quilomícrons sob a forma ésteres de 3,4-didehidroretinol. Estes são capturados pelo fígado a partir dos remanescentes de quilomícrons e hidrolizados a 3,4-didehidroretinol (3,4-DR). Se o indivíduo apresenta reservas adequadas de vitamina A, o DR será armazenado sob a forma de ésteres de 3,4-DR no fígado. Se as reservas hepáticas estiverem baixas, o 3,4-DR se liga a RBP acumulada e circula pelo organismo (124;125). O teste utiliza a relação entre 3,4-DR e retinol no soro, sendo considerados indivíduos com estado de vitamina A inadequado os que apresentam relação  $\geq 0,060$  (124).

### 3.6.1 Preparo e administração da dose

O 3,4-didehidroretinol acetato (DRA) foi obtido na Universidade de Wisconsin, Estados Unidos. A síntese de DRA foi realizada segundo Tanumihardjo *et al.* (126) e a substância foi imediatamente solubilizada em óleo de milho. A solução foi armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Foi administrada uma dose única de DRA em óleo de milho de acordo com a idade, sendo as seguintes doses utilizadas: 1,5mg ( $5,3\mu\text{mol}$ ) para crianças menores de 6 anos; 2,0mg ( $7,0\mu\text{mol}$ ) para crianças entre 6 e 12 anos e 2,5mg ( $8,8\mu\text{mol}$ ) para crianças maiores de 12 anos (127).

Após a administração do DRA, foi oferecido um lanche com baixa quantidade de retinol, contendo aproximadamente 10g de gordura para maximizar a absorção do DRA (Tabela 1). O sangue foi coletado após 4-5 horas, em tubos para coleta protegidos da luz e armazenado em bolsas térmicas até a chegada ao laboratório. As amostras foram centrifugadas a 4000rpm por 10 minutos e o soro aliquoteado, banhado com nitrogênio, selado e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Tabela 1.** Composição dos lanches ofertados para as crianças após administração de 3,4-DRA.

Lanche	Quantidade (g)	Valor Energético (Kcal)	Proteínas (g)	Lipídios (g)	Carboidratos (g)	Retinol (mcg)
Castanha de caju torrada com sal	25	143	4,75	11,5	7,25	0
Biscoito doce tipo wafer, recheado com chocolate	40	201	2,4	10	27,2	<LQ

LQ: limite de quantificação de  $10\mu\text{g}/100\text{g}$

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) (128)

### 3.6.2 Extração de 3,4-didehidroretinol e retinol do soro

Em  $400\mu\text{L}$  de soro foram adicionados  $500\mu\text{L}$  de etanol 95% para desnaturação de proteínas. As amostras foram homogeneizadas por 30 segundos. Em seguida, foram adicionados  $500\mu\text{L}$  de hexano, sendo as amostras homogeneizadas por 1 minuto e centrifugadas a 4000rpm por 10

minutos. A fase orgânica, que contém o hexano, foi extraída e reservada para evaporação sob nitrogênio em banho-maria a 37°C. Foram realizadas mais duas extrações com hexano conforme descrito acima. Após a evaporação sob nitrogênio, as amostras foram reconstituídas em 100µL de metanol grau HPLC, sendo aplicados 50µL no HPLC.

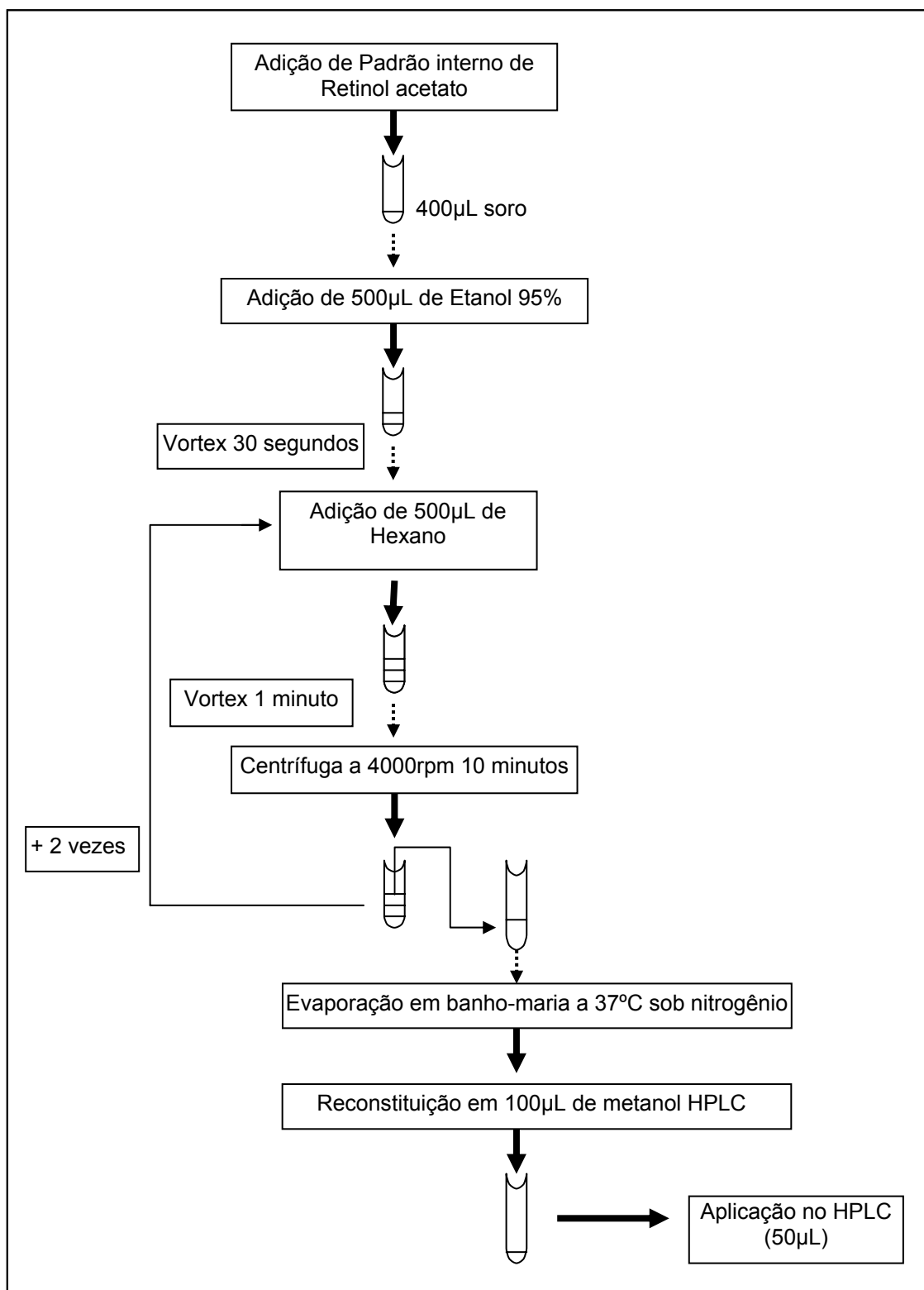
Em todas as amostras, antes da desnaturação com etanol 95%, foi acrescentado padrão interno de retinol acetato (RA) em uma concentração que conferisse após a reconstituição 1µg/mL. Este procedimento foi realizado de forma a se manter sistematicamente o controle da eficiência das extrações. A Figura 2 mostra o fluxograma das extrações das amostras (125).

Todos os procedimentos foram realizados em duplicata, em ambiente escuro e em tubos de vidro protegidos com papel alumínio.

### **3.6.3 Preparo do padrão de 3,4-didehidroretinol**

A partir da solução de 3,4-DRA em óleo de milho foram retirados 10µL e adicionados 1,5mL de etanol 95%, sendo a amostra homogeneizada. Adicionou-se 0,75mL de KOH a 50% para saponificação da substância. A amostra foi homogeneizada e colocada em banho-maria com agitação a 45°C por uma hora. Foram então acrescentados 1mL de água destilada e 1,5mL de hexano, sendo a amostra homogeneizada e centrifugada a 4000rpm por 10 minutos. A fase contendo hexano foi extraída e reservada para evaporação sob nitrogênio em banho-maria a 37°C. Foram realizadas mais duas extrações com hexano conforme descrito acima. Após a evaporação sob nitrogênio, as amostras foram reconstituídas em 200µL de metanol HPLC.

Foram aplicados no HPLC 50µL da amostra e o pico de 3,4-DR foi coletado ao ser analisado pelo aparelho. O 3,4-DR purificado foi então lido em espectrofotômetro a 350nm e diluído com metanol grau HPLC até que uma leitura de aproximadamente 0,15 fosse atingida. Para verificação da pureza, foi realizada leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 a 400nm (125).



**Figura 2.** Fluxograma da metodologia utilizada para extração de 3,4-didehidroretinol e retinol das amostras de soro.

A fórmula para determinação da concentração do padrão de 3,4-DR foi a mesma utilizada para o retinol e retinol acetato, utilizando o coeficiente de extinção ( $E^{1\%}$ ) e comprimento de onda ( $A^\circ$ ) específico para cada substância, segundo manual MERCK (129).

#### **3.6.4 Preparo da curva padrão de retinol e 3,4-DR**

As curvas padrão de retinol e 3,4-DR foram realizadas periodicamente a partir de soluções de seus respectivos padrão estoque. Foram realizadas 6 diluições de concentrações conhecidas para aplicação no HPLC.

As curvas foram construídas colocando os valores de massa injetada no eixo das abscissas e suas respectivas áreas no eixo das ordenadas. Foi calculada a equação da reta e o coeficiente de correlação entre as variáveis, sendo considerados válidos valores próximos de +1.

#### **3.6.5 Padrão interno de retinol acetato**

Para o preparo do padrão interno de retinol acetato, foram realizadas duas diluições do seu padrão estoque em etanol absoluto retirando-se 100 $\mu$ L de cada solução. Da segunda diluição, foram retirados 25 $\mu$ L (aproximadamente 0,1 $\mu$ g) e adicionados ao soro analisado antes do processo de desnaturação com etanol 95%. Esta quantidade adicionada conferiu uma concentração de 1 $\mu$ g/mL (50ng/50 $\mu$ L) após o processo de extração para aplicação no HPLC.

A confirmação da recuperação do padrão interno de retinol acetato foi realizada preparando padrão para aplicação no HPLC a partir de duas diluições do padrão estoque. Este padrão continha concentração igual à encontrada nas amostras de, aproximadamente, 50ng/50 $\mu$ L.

#### **3.6.6 Condições cromatográficas**

A determinação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), também conhecida como *high pressure liquid chromatography* (HPLC) no Laboratório de Engenharia Bioquímica da UFRN. Foi utilizado cromatógrafo da marca SHIMADZU, constituído de seis bombas de cromatografia líquida LC-10ADVP SHIMADZU, desgaseificador modelo DGU-2<sup>a</sup>, detector UV-VIS modelo SPD-10AV SHIMADZU, sistema de integração C-R6A SHIMADZU. Foi utilizada coluna Microsorb MV<sup>TM</sup>, C18 (fase reversa), 4,6 x 150mm, com poro

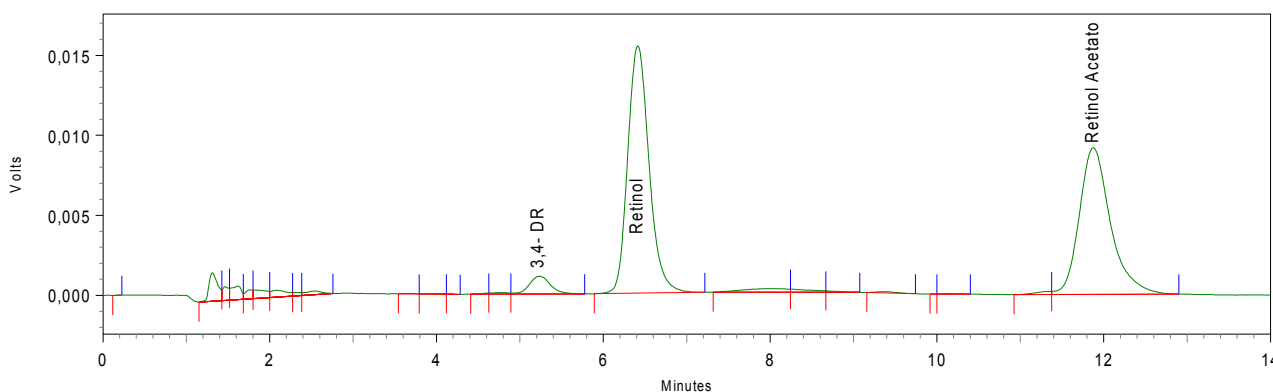
de 100 Å e pré-coluna MPLC<sup>®</sup> NewGuard<sup>®</sup> Holder complete C18 (fase reversa), 3,2 x 15mm.

A fase móvel foi composta de 90% metanol grau HPLC e 10% água deionizada. Foi utilizado *looping* de 50µL, e o fluxo de 1ml/min. O comprimento de onda para detecção foi de 350nm para maximizar a leitura do 3,4-DR.

### 3.6.7 Confirmação dos analitos e seus tempos de retenção nas amostras

A confirmação da identidade do 3,4-DR, retinol, e RA nas amostras de soro foi determinada após adição de padrões de concentrações conhecidas em uma amostra. A sobreposição dos picos (amostra + [padrão conhecido]) e conseqüente aumento da área do pico no cromatograma foi então observada. O tempo de retenção da amostra foi confirmado ao comparar-se com o do padrão.

Os tempos de retenção das substâncias analisadas foram 5,2min, 6,4min e 11,8min para 3,4-DR, retinol e retinol acetato, respectivamente. A Figura 3 mostra um cromatograma típico de uma amostra de soro de uma criança avaliada.



**Figura 3.** Cromatograma de amostra de soro analisada.

### 3.6.8 Quantificação do MRDR e retinol séricos

Para quantificação das concentrações no soro de 3,4-DR e retinol foram utilizadas as curvas padrão descritas anteriormente e suas respectivas equações de reta. O resultado do MRDR foi calculado pela seguinte relação:

$$\text{Resultado MRDR} = \frac{\text{Concentração no soro de 3,4-DR } (\mu\text{g/dL})}{\text{Concentração no soro de Retinol } (\mu\text{g/dL})}$$

Foram considerados valores de estado normal de vitamina A MRDR  $\leq$  0,030; indefinidos entre 0,030 e 0,060 e inadequados  $\geq$  0,060 (127). O retinol sérico foi considerado baixo ou responsivo ao maior consumo quando  $<$   $30\mu\text{g/dL}$ , indadequado quando entre  $20 - 10\mu\text{g/dL}$  e deficiente quando  $<$   $10\mu\text{g/dL}$  (88;130).

### 3.6.9 Validação do método

A reprodutibilidade do método foi verificada através da exatidão e precisão que foram avaliadas pelo teste de recuperação e repetibilidade, respectivamente.

O teste de recuperação foi realizado em cada análise através da adição do padrão interno de retinol acetato. A recuperação do padrão interno foi medida comparando-a com o padrão para HPLC de mesma concentração. Valores de recuperação entre 80-100% foram considerados como satisfatórios (131).

Para análise de precisão, foi aplicado padrão com concentração conhecida de retinol acetato em cada dia de análise. Foi também realizada aplicação de 1 mesma amostra no início e final das análises. Os coeficientes de variação encontrados foram inferiores a 5%.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados utilizando a curva de calibração para cada analito, de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\text{LD} = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad \text{e} \quad \text{LQ} = 10 \times \frac{s}{S}$$

Onde  $s$  é o desvio padrão do coeficiente linear da equação e  $S$  é o coeficiente de angulação da reta (131;132).

Os valores encontrados para o LD foram de 0,19ng e 15,52ng, e LQ de 0,58ng e 47,04ng, para 3,4-DR e retinol, respectivamente. Estes valores asseguraram que a leitura pelo HPLC foi realizada com precisão e exatidão

uma vez que as médias de 3,4-DR e retinol nas amostras estavam acima destes limites, sendo de 1,46ng/50µL e 81,04ng/50µL, respectivamente.

### **3.7. Determinação das proteínas totais, albumina e globulinas**

A determinação de proteínas totais (PT) foi realizada quantitativamente pelo método de biureto, a de albumina através do método do verde de bromocresol. Os kits utilizados foram: Proteínas Totais Cat. 19/Labtest<sup>®</sup> Diagnóstica S.A e Albumina Cat. 19/Labtest<sup>®</sup> Diagnóstica S.A. A determinação quantitativa de globulinas foi determinada através da diferença entre proteínas totais e albumina.

### **3.8. Determinação das proteínas de fase aguda**

Sabe-se que as infecções são acompanhadas por resposta de fase aguda, que leva ao aumento de determinadas proteínas no plasma, denominadas proteínas de fase aguda. Para monitoramento da resposta de fase aguda foram utilizadas duas dessas proteínas, com diferentes respostas à infecção: a proteína C-reativa (CRP) e alfa-1-glicoproteína ácida (AGP). A primeira tem sua concentração aumentada nas primeiras 6 horas de infecção, com seus níveis máximos atingidos após 24 a 48 horas, sendo que estes decaem imediatamente após o final do estímulo. A segunda tem sua concentração máxima atingida após 2 a 5 dias de infecção, permanecendo alta após o término do estímulo (133).

Dessa forma, estas duas proteínas foram utilizadas para a avaliação da resposta de fase aguda, por meio de teste imunoturbidimétrico. Os pontos de corte utilizados para CRP e AGP foram de 5mg/dL e 100mg/dL, respectivamente. As crianças foram classificadas de acordo com Thurnham *et al.* (133) (Tabela 2). Foram utilizados os kits CRP/AUT-000 BioSys<sup>®</sup> e AGP/AUT-000 BioSys<sup>®</sup>, respectivamente.



**Tabela 2.** Classificação do estágio de infecção das crianças de acordo com as proteína C-reativa (CRP) e alfa-1-glicoproteína ácida (AGP).

<b>Classificação</b>	<b>CRP / AGP</b>
Saudável	< 5mg/dL / < 100mg/dL
Período de incubação	> 5mg/dL / < 100mg/dL
Infecção ou início de convalescença	> 5mg/dL / > 100mg/dL
Convalescença	< 5mg/dL / > 100mg/dL

### 3.9. Medição dos anticorpos anti-SLA e anti-rK39

A presença de anticorpos contra o antígeno solúvel de promastigotas de *L. chagasi* (SLA) e antígeno recombinante K39 (rK39) foram determinados pelo método de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), segundo Braz *et al.* (3). As placas foram sensibilizadas com o antígeno rK39 ou SLA, sendo incubadas por 18 horas a 4°C. Para o rK39 foram pipetados 50ng/poço do antígeno em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 e para a fração solúvel 500ng/poço no mesmo tampão. Em seguida, as placas foram bloqueadas, adicionando-se PBSTween 1% (200µL/poço) e incubadas à temperatura ambiente por 1 hora. Os soros foram diluídos em PDSTween 0,1% nas diluições 1:100, 1:500, 1:1000, 1:10000. Após o bloqueio, as placas foram lavadas com PBSTween por 4 vezes (200µL/poço). Os soros foram plaqueados da diluição maior para a menor, em duplicata e encubados 1 hora à temperatura ambiente, para então serem lavados com PBSTween 0,1% por 4 vezes. Para o antígeno rK39 foi adicionado como anticorpo conjugado a proteína A-HRP na diluição de 1:10000 com PBSTween 0,1% e para o SLA foi adicionado anti-IgG humana na diluição 1:5000 com PBSTween 0,1%. Após 1 hora, as placas foram lavadas com PBSTween 0,1% por 4 vezes. Em seguida, foi adicionado o cromógeno ABTS e substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100µL/poço) diluídos em tampão citrato-fosfato pH 4,2, sendo a placa envolvida com papel laminado e encubada ao abrigo da luz por 1 a 2 horas até a reação ser interrompida pela adição de 100µL/poço de SDS 5%. A densidade óptica utilizada para leitura foi a 405nm (3).

### 3.10. Teste cutâneo de Montenegro

O Teste cutâneo de Montenegro, que é a resposta DTH ao antígeno de Leishmania, foi realizado utilizando 25µg de proteína de Leishmania com administração intradérmica. Os antígenos foram obtidos do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) da Secretaria de Saúde do Paraná. A leitura foi realizada após 48 – 72 horas. Foi conferido resultado DTH+ para os indivíduos que apresentaram enduração  $\geq 5\text{mm}$  (134).

### 3.11. Cálculo da amostra e análise estatística

O cálculo da amostra foi realizado utilizando como parâmetro as concentrações séricas de retinol de estudo piloto com 15 casos ativos de LV e 60 crianças da área endêmica para leishmaniose visceral (20 com infecção assintomática, 20 com história de leishmaniose visceral e 20 sem infecção por *L. chagasi*). O tamanho da amostra para detectar uma diferença significativa entre os grupos, com poder de 90% e 5% de nível de significância foi de 20 crianças por grupo.

Para detectar diferenças entre os grupos para as variáveis categóricas foi utilizado o teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para determinação da normalidade das variáveis quantitativas. As variáveis que seguiram distribuição normal foram apresentadas na forma de média e desvios-padrão, enquanto que as variáveis sem distribuição normal foram apresentadas na forma de mediana e distância interquartílica (IQ). Para as variáveis que seguiram a distribuição normal, *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey foram utilizados para detecção de diferenças entre os grupos. Para variáveis sem distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

Para avaliação do peso ao nascer, tempo de amamentação e tempo de amamentação exclusiva, as crianças com LV ativa e história de LV foram consideradas conjuntamente, uma vez que estes parâmetros não estão associados com resposta de fase aguda. Neste estudo, a prevalência foi adotada como medida de ocorrência.

O coeficiente linear de Pearson foi utilizado para testar a correlação das variáveis dependentes anticorpos anti-SLA e tamanho da enduração ao teste cutâneo de Montenegro, e as variáveis independentes IMC, CB/altura, retinol sérico e resultado do MRDR.

Foram utilizados dois modelos de regressão logística multivariada para avaliar fatores de risco nutricionais e bioquímicos associados com a resposta de leishmaniose visceral e infecção assintomática. Nestes modelos, são apresentados os valores de  $\beta \pm dp$ , que demonstram a interação, se positiva ou negativa, entre determinada variável e a resposta avaliada. Os valores de odds ratio (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) são apresentados para avaliação do risco apresentado entre cada variável analisada e a resposta à infecção.

A análise estatística foi realizada utilizando o Statistical Package for Social Sciences, versão 11.5 (SPSS Inc. Chicago, IL). Os resultados foram considerados significativos para valores de  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1. Descrição da população

Um total de 149 crianças foram avaliadas, sendo 20 com LV ativa, 33 com história de LV, 40 com infecção assintomática e 56 sem infecção por *L. chagasi*.

O tempo médio de estudo dos responsáveis pelas crianças arroladas foi de  $3,8 \pm 3,4$  anos, com valor mínimo de 0 anos e máximo de 15 anos. A renda das famílias das crianças foi em média R\$  $390,1 \pm 349,6$ , com valor mínimo de R\$ 50,0 e máximo de R\$ 3500,0. O número médio de pessoas residentes nas casas das crianças foi de  $6,4 \pm 2,8$ , com valor mínimo de 3 e máximo de 15.

A Tabela 3 mostra a distribuição dos grupos estudados de acordo com a idade e sexo. A idade média para as crianças estudadas foi  $8,9 \pm 3,8$  anos (ANOVA,  $p < 0,0005$ ). As crianças com LV ativa apresentaram as menores médias de idade ( $4,7 \pm 4,0$ ), seguidas pelas crianças DTH- ( $8,1 \pm 3,4$ ), crianças com história de LV ( $10,1 \pm 3,3$ ) e crianças DTH+ ( $11,2 \pm 2,4$ ).

Não foi verificada diferença entre os grupos por sexo ( $\chi^2$ ,  $p > 0,05$ ) sendo no total 45,6% das crianças pertencentes ao sexo feminino e 54,4% ao sexo masculino.

A enduração média em resposta ao teste cutâneo de Montenegro foi de  $11,4 \pm 4,0$  mm nas crianças com história de LV,  $7,6 \pm 3,5$  mm nas crianças DTH+ e  $1,8 \pm 1,8$  mm nas crianças DTH- (Tabela 4).

As crianças com LV ativa apresentaram-se positivas ao anticorpo anti-SLA. Três crianças com história de LV (9,1%) apresentaram anticorpos anti-SLA positivos. Das crianças DTH+ ( $n = 40$ ), 7 (17,5%) também apresentaram anticorpos anti-SLA positivos (Tabela 4).

**Tabela 3.** Distribuição dos grupos de crianças estudados de acordo com sexo e idade.

	Total	LV ativa	História de LV	DTH+	DTH-	P**
	n = 149	n = 20	n = 33	n = 40	n = 56	Valor
Idade (anos) (média ± dp)	8,9 ± 3,8	4,7 ± 3,9*	10,1 ± 3,3 <sup>§</sup>	11,2 ± 2,4 <sup>▫</sup>	8,1 ± 3,4	< 0,0005
Sexo n (%)						
Masculino	68 (45,6)	9 (45,0)	14 (42,4)	20 (50,0)	25 (44,6)	0,925
Feminino	81 (54,4)	11 (55,0)	19 (57,6)	20 (50,0)	31 (55,4)	

\*\*Para testar as diferenças de idade entre os grupos foi utilizado ANOVA. Para testar diferença de sexo, foi utilizado o teste do Qui-quadrado.

\*O pós-teste de Tukey indicou diferença significativa entre o grupo LV ativa e os grupos história de LV, DTH+ e DTH- ( $p < 0,0005$ )

<sup>§</sup>O pós-teste de Tukey indicou diferença significativa entre o grupo história de LV e DTH- ( $p < 0,028$ )

<sup>▫</sup>O pós-teste de Tukey indicou diferença significativa entre o grupo DTH+ e DTH- ( $p < 0,0005$ )  
Os demais grupos não apresentaram diferença significativa entre si

**Tabela 4.** Descrição da população estudada de acordo com tamanho da endureção ao teste cutâneo de Montenegro e presença de anticorpos anti-SLA.

Grupo	Endureção	Anti-SLA	
	(mm)	Positivo	Negativo
	Média ± dp	n (%)	n (%)
LV ativa	*	20 (100,0)	0 (0,0)
História de LV	11,4 ± 4,0	3 (9,1)	30 (90,9)
DTH+	7,6 ± 3,5	7 (17,5)	33 (82,5)
DTH-	1,8 ± 1,8	0 (0,0)	56 (100,0)

\*Não realizado neste grupo

## 4.2. Hemograma e proteínas

Foram disponíveis amostras de sangue para 145 crianças (97,3%), para as demais 4 crianças (2,7%), a coleta de sangue não foi realizada devido a não aceitação da criança ao procedimento. Destas 145 crianças, 20 crianças apresentavam LV ativa, 32 história de LV, 39 infecção assintomática e 54 não apresentavam infecção por *L. chagasi*.

Os dados do hemograma estão demonstrados na Tabela 5. As crianças com LV ativa apresentaram os menores, valores de hematócrito, hemoglobina, leucócitos, eosinófilos e linfócitos, com medianas de 23%, 7,3g/dL, 3250, 1% e 2008, respectivamente (Kruskal Wallis,  $p < 0,0005$ ), conforme já conhecido (9) As plaquetas também se apresentaram significativamente reduzidas no grupo das crianças com LV, com média de contagem de  $113.611 \pm 55.650$  (ANOVA,  $p < 0,0005$ ).

A Tabela 6 indica as concentrações de proteínas séricas nas crianças estudadas. Verificou-se menor concentração de albumina e aumento das concentrações de globulinas nas crianças com LV ativa, com média de  $2,8 \pm 0,5$  g/dL e  $5,7 \pm 1,2$  g/dL, respectivamente. As concentrações de proteínas totais não diferiram entre os grupos estudados, sendo a média de  $8,3 \pm 1,4$  g/dL.

Verificou-se maior concentração das proteínas de fase aguda CRP e AGP nas crianças com LV ativa, com média de  $5,7 \pm 5,9$  mg/dL e  $144,9 \pm 43,6$  mg/dL, respectivamente, indicando estado infeccioso, de acordo com a classificação proposta por Thurnham *et al.* (133) (Tabela 6). Os demais grupos estudados não apresentaram alteração dos valores séricos de proteínas de fase aguda, sendo as médias de CRP encontradas de  $0,9 \pm 0,5$  mg/dL para crianças com história de LV,  $0,8 \pm 0,7$  mg/dL para crianças DTH+ e  $1,0 \pm 0,5$  mg/dL para crianças DTH-. As médias de AGP encontradas foram de  $78,8 \pm 22,3$  mg/dL para crianças com história de LV,  $78,1 \pm 24,7$  para crianças DTH+ e  $67,3 \pm 19,2$  mg/dL para crianças DTH-. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos saudáveis estudados para as médias de CRP e AGP encontradas (Tukey,  $p > 0,05$ ).

As crianças foram distribuídas de acordo com grupo a que pertenciam, utilizando a classificação de Thurnham *et al.* (133) (Tabela 7). De acordo com a mesma, percebe-se a maior quantidade de crianças em estado de infecção

(45,0%) e convalescença (55,0%) no grupo das crianças com LV ativa (Qui-quadrado,  $p < 0,0005$ ). Nos demais grupos, não foram encontradas crianças com estado de infecção. Porém, o grupo de crianças com história de LV apresentou 12,5% ( $n = 4$ ) de crianças em convalescença, enquanto que os grupos DTH+ e DTH- apresentaram 5,1% ( $n = 2$ ) e 14,8%, respectivamente.

**Tabela 5.** Dados do hemograma para os grupos de crianças estudados.

<b>Hemograma</b>	<b>Total (n = 145)</b>	<b>LV ativa (n = 20)</b>	<b>História de LV (n = 32)</b>	<b>DTH+ (n = 39)</b>	<b>DTH- (n = 54)</b>
Hematócrito (%)					
Mediana (IQ)	36 (6,3)	23 (7,0)*	37 (5)	37 (3,8)	37 (4,5)
Hemoglobina (g/dL)					
Mediana (IQ)	12,1 (1,95)	7,3 (2,3)*	12,5 (1,6)	12,4 (1,2)	12,0 (1,5)
Leucócitos (n° absoluto)					
Mediana (IQ)	8300 (4325)	3250 (1700)*	8000 (2950)	9600 (5150)	8500 (3900)
Eosinófilos (%)					
Mediana (IQ)	7 (12,0)	1 (1,0)*	6 (9,5)	10 (14,5)	10 (10,0)
Linfócitos (n° absoluto)					
Mediana (IQ)	4122 (2183)	2008 (1103)*	4094 (1494)	4669 (1946)	4063 (1763)
Plaquetas (n°)					
Média ± dp	311786 ± 130008	113611 ± 55650**	359413 ± 119210	321138 ± 114056	352882 ± 94326

Dados com distribuição não-paramétrica ( $p < 0,05$ ) segundo teste de Kolmogorov-Smirnov estão apresentados sob a forma de mediana e distância interquartilica (IQ). Os dados de plaquetas apresentaram distribuição normal e estão apresentados sob a forma de média ± dp

\*Teste de Kruskal Wallis para dados de distribuição não-paramétrica e ANOVA para dados com distribuição normal indicaram  $p < 0,0005$

\*\*ANOVA,  $p < 0,0005$ . pós-teste de Tukey indicou diferença significativa entre o grupo LV ativa e grupos com história de LV, DTH+ e DTH- ( $p < 0,0005$ )

Os demais grupos não apresentaram diferença significativa entre si



**Tabela 6.** Concentrações de proteínas totais, albumina, globulina e proteínas de fase aguda nos grupos estudados.

	<b>Total</b>	<b>LV ativa</b>	<b>História de LV</b>	<b>DTH+</b>	<b>DTH-</b>	<b>p valor,</b>
	<b>(n = 145)</b>	<b>(n = 20)</b>	<b>(n = 32)</b>	<b>(n = 39)</b>	<b>(n = 54)</b>	<b>ANOVA</b>
<b>Proteínas séricas</b>	<b>Média ± dp</b>	<b>Média ± dp</b>	<b>Média ± dp</b>	<b>Média ± dp</b>	<b>Média ± dp</b>	
Proteínas totais (g/dL)	8,3 ± 1,4	8,5 ± 1,3	8,4 ± 1,3	8,3 ± 1,0	8,1 ± 1,6	0,592
Albumina (g/dL)	4,2 ± 0,9	2,8 ± 0,5*	4,3 ± 0,5	4,3 ± 0,9	4,3 ± 0,8	< 0,0005
Globulinas (g/dL)	4,1 ± 1,2	5,7 ± 1,2*	4,1 ± 1,3	3,9 ± 0,7	3,8 ± 1,0	< 0,0005
Proteína C-reativa (mg/dL)	1,6 ± 2,7	5,7 ± 5,9*	0,9 ± 0,5	0,8 ± 0,7	1,0 ± 0,5	< 0,0005
AGP (mg/dL)	84,3 ± 35,7	144,9 ± 43,6*	78,8 ± 22,3	78,1 ± 24,7	67,3 ± 19,2	< 0,0005

<sup>§</sup>p valor para o teste ANOVA

\*Pós-teste de Tukey demonstrou diferença entre o grupo LV ativa e os demais grupos com p < 0,0005

Os demais grupos não apresentaram diferença significativa entre si

**Tabela 7.** Distribuição das crianças por grupos estudados de acordo com a classificação proposta por Thurnham *et al.* (2003).

	<b>Total</b>	<b>LV ativa</b>	<b>História de LV</b>	<b>DTH+</b>	<b>DTH-</b>
<b>Classificação de acordo com proteínas de fase aguda</b>	<b>(n = 145)</b>	<b>(n = 20)</b>	<b>(n = 32)</b>	<b>(n = 39)</b>	<b>(n = 54)</b>
	<b>n (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
Saudável	111 (76,6)	0 (0,0)	28 (87,5)	37 (94,9)	46 (85,2)
Período de incubação	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Infecção ou início de convalescença	9 (6,2)	9 (45,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Convalescença	25 (17,2)	11 (55,0)	4 (12,5)	2 (5,1)	8 (14,8)
<b>TOTAL</b>	<b>145 (100,0)</b>	<b>20 (100,0)</b>	<b>32 (100,0)</b>	<b>39 (100,0)</b>	<b>54 (100,0)</b>

Qui-quadrado,  $p < 0,0005$

### 4.3. História de amamentação e peso ao nascer

Foram coletados dados de 122 crianças (81,9%) em relação à história de amamentação. Para as demais 27 crianças (18,1%), as mães ou responsáveis não sabiam informar sobre o tempo de amamentação das crianças. O tempo de amamentação total não diferiu entre os grupos estudados, apesar das crianças com LV tenderem a apresentar média inferior em relação aos demais grupos, de  $9,4 \pm 12,1$  meses, comparada ao DTH+ de  $12,9 \pm 14,1$  meses e DTH- de  $12,5 \pm 11,2$  meses (ANOVA,  $p > 0,05$ ). O tempo de amamentação exclusiva também não diferiu entre os grupos estudados, sendo a média total de  $3,6 \pm 3,7$  meses (Tabela 8).

Verificou-se que 53,3% ( $n = 65$ ) das crianças estudadas tiveram tempo total de amamentação igual ou inferior a 6 meses (Tabela 9). Apesar deste percentual ser maior nas crianças que apresentaram LV (58,7%), e de somente 6,5% das crianças com LV apresentarem tempo de amamentação de 24 meses, não foi verificada diferença significativa entre os grupos estudados (Qui-quadrado,  $p = 0,807$ ).

Ressalta-se ainda, mesmo sem diferença significativa (Qui-quadrado,  $p = 0,257$ ), que a maioria das crianças com LV (80,4%) apresentaram tempo total de amamentação igual ou menor a 12 meses comparadas à 65,5% em crianças DTH+ e 68,1% nas crianças DTH-.

Em relação ao tempo de amamentação exclusiva, verificou-se que 43,4% das crianças estudadas tiveram entre 2 e 4 meses de amamentação exclusiva (Tabela 10). Observa-se pela Tabela 10, que a maioria das crianças (68,8%) não permaneceram em amamentação exclusiva até os 6 meses de idade. Não foi observada diferença entre os grupos estudados (Qui-quadrado,  $p = 0,777$ ).

Os dados de peso ao nascer estavam registrados nos cartões de vacina de 87 crianças (58,4%). O peso ao nascer também não variou entre os grupos estudados, sendo em média  $3404 \pm 619$  gramas (Tabela 9). A prevalência de crianças com peso ao nascer inferior a 2500g foi de 5,7% ( $n = 5$ ). Não foi observada diferença entre os grupos estudados (Qui-quadrado,  $p = 0,417$ ) (Tabela 11).

**Tabela 8.** Média  $\pm$  desvio-padrão dos tempos de amamentação e peso ao nascer das crianças por grupos estudados.

<b>História nutricional</b>	<b>Total (n = 122) Média <math>\pm</math> dp</b>	<b>LV (n = 46) Média <math>\pm</math> dp</b>	<b>DTH+ (n = 29) Média <math>\pm</math> dp</b>	<b>DTH- (n = 47) Média <math>\pm</math> dp</b>	<b>p valor, ANOVA</b>
Tempo de amamentação (meses)	11,4 $\pm$ 12,2	9,4 $\pm$ 12,1	12,9 $\pm$ 14,1	12,5 $\pm$ 11,2	0,307
Tempo de amamentação exclusiva (meses)	3,6 $\pm$ 3,7	3,5 $\pm$ 3,9	4,0 $\pm$ 4,4	3,5 $\pm$ 2,9	0,804
Peso ao nascer* (g)	3404 $\pm$ 619	3430 $\pm$ 747	3408 $\pm$ 402	3379 $\pm$ 607	0,946

\* 87 crianças avaliadas (75 LV, 19 DTH+, 13 DTH-)

**Tabela 9.** Tempo total de amamentação dos grupos estudados.

<b>Tempo de amamentação (meses)</b>	<b>Total (n = 122) n (%)</b>	<b>LV (n = 46) n (%)</b>	<b>DTH+ (n = 29) n (%)</b>	<b>DTH- (n = 47) n (%)</b>
$\leq 6$	65 (53,3)	27 (58,7)	16 (55,2)	22 (46,8)
7 - 12	23 (18,8)	10 (21,7)	3 (10,3)	10 (21,3)
13 -23	6 (4,9)	2 (4,4)	2 (6,9)	2 (4,2)
até 24	14 (11,5)	3 (6,5)	4 (13,8)	7 (14,9)
> 24	14 (11,5)	4 (8,7)	4 (13,8)	6 (12,8)
<b>TOTAL</b>	<b>122 (100,0)</b>	<b>46 (100,0)</b>	<b>29 (100,0)</b>	<b>47 (100,0)</b>

Qui-quadrado, p = 0,807

**Tabela 10.** Tempo de amamentação exclusiva nos grupos estudados.

	<b>Total</b>	<b>LV</b>	<b>DTH+</b>	<b>DTH-</b>
<b>Tempo de amamentação exclusiva (meses)</b>	<b>(n = 122)</b>	<b>(n = 46)</b>	<b>(n = 29)</b>	<b>(n = 47)</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
0,0 - 2,0	53 (43,4)	19 (41,3)	12 (41,4)	22 (46,8)
2,1 - 4,0	26 (21,3)	14 (30,4)	5 (17,2)	7 (14,9)
4,1 - 5,9	5 (4,1)	1 (2,2)	2 (7,0)	2 (4,3)
até 6	28 (23,0)	9 (19,6)	7 (24,1)	12 (25,5)
> 6	10 (8,2)	3 (6,5)	3 (10,3)	4 (8,5)
<b>TOTAL</b>	<b>122 (100,0)</b>	<b>46 (100,0)</b>	<b>29 (100,0)</b>	<b>47 (100,0)</b>

Qui-quadrado, p = 0,777

**Tabela 11.** Prevalência de baixo peso ao nascer nos grupos estudados.

	<b>Total</b>	<b>LV</b>	<b>DTH+</b>	<b>DTH-</b>
<b>Peso ao nascer</b>	<b>(n = 87)</b>	<b>(n = 75)</b>	<b>(n = 19)</b>	<b>(n = 13)</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
< 2500g	5 (5,7)	2 (6,2%)	0 (0,0)	3 (8,6)
≥ 2500g	82 (94,3)	30 (93,8)	20 (100,0)	32 (91,4)
<b>Total</b>	<b>87 (100,0)</b>	<b>32 (100,0)</b>	<b>20 (100,0)</b>	<b>35 (100,0)</b>

Qui-quadrado, p = 0,417

#### 4.4. Estado nutricional das crianças avaliadas

As médias encontradas para os índices A/I, P/I e P/A foram de  $-1,06 \pm 0,84$ ,  $-0,72 \pm 0,92$ , e  $0,17 \pm 0,92$  escores-z, respectivamente. Em relação a estes índices, não foi encontrada diferença entre os grupos estudados (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Tabela 12).

No entanto, o escore-z para o IMC foi significativamente menor nas crianças com LV em fase aguda (ANOVA,  $p < 0,001$ ), com média de  $-1,48 \pm 1,28$  escores-z. O índice CB/altura também foi inferior no grupo das crianças com LV em fase aguda (ANOVA,  $p = 0,022$ ), sendo a média encontrada de  $-1,53 \pm 1,10$  (Tabela 12).

Em relação à prevalência de desnutrição, medida através do percentual dos indicadores antropométricos  $< -2$  escores z (Tabela 13), percebeu-se que a baixa Altura/Idade, ou *stunting*, estava presente em 10,1% ( $n = 15$ ) da população estudada, não sendo encontradas diferenças entre os grupos (Qui-quadrado,  $p = 0,567$ ).

O percentual de crianças com baixo Peso/Idade no grupo estudado foi de 6% ( $n = 9$ ) e de crianças com baixo Peso/Altura, ou *wasting*, de 2,0% ( $n = 1$ ). Também não foi encontrada diferença entre os grupos estudados para estes dois indicadores (Qui-quadrado,  $p > 0,05$ ). O percentual de crianças com baixa CB/altura também não diferiu entre os grupos estudados, sendo no total 10,1% ( $n = 15$ ) (Tabela 13).

No entanto, o percentual de crianças com baixo IMC foi maior no grupo das crianças com LV ativa, de 40,0% (Qui-quadrado,  $p < 0,0005$ ), indicando maior prevalência desnutrição neste grupo (Tabela 13).

**Tabela 12.** Índices antropométricos das crianças de acordo com grupos estudados.

	<b>Total</b> <b>(n = 149)</b>	<b>LV ativa</b> <b>(n = 20)</b>	<b>História de LV</b> <b>(n = 33)</b>	<b>DTH+</b> <b>(n = 40)</b>	<b>DTH-</b> <b>(n = 56)</b>	<b>p valor,</b> <b>ANOVA</b>
<b>Índices antropométricos (escores z)</b>	<b>Média ± dp</b>	<b>Média ± dp</b>	<b>Média ± dp</b>	<b>Média ± dp</b>	<b>Média ± dp</b>	
Altura/Idade	-1,06 ± 0,84	-0,86 ± 1,02	-1,09 ± 0,74	-1,13 ± 0,81	-1,04 ± 0,87	0,765
Peso/Idade	-0,72 ± 0,92	-0,52 ± 1,01	-0,85 ± 0,91	-0,92 ± 0,83	-0,60 ± 0,94	0,259
Peso/Altura**	0,17 ± 0,92	0,22 ± 1,56	0,87 ± 0,38	-0,49 ± 0,96	0,24 ± 0,77	0,219
CB/altura	-0,87 ± 1,02	-1,53 ± 1,10 <sup>§</sup>	-0,89 ± 1,18	-0,99 ± 0,93	-0,62 ± 0,89	0,022
IMC***	-0,30 ± 1,07	-1,48 ± 1,28*	-0,29 ± 1,11	-0,36 ± 0,77	0,11 ± 0,89	< 0,0005

\*\* Para o indicador Peso/Altura, um total de 49 crianças foram avaliadas (13 com LV ativa, 2 com história de LV, 6 DTH+ e 28 DTH-) uma vez que as tabelas do CDC 2000 permitem o cálculo deste indicador apenas para crianças de 45 a 121cm

\*\*\* IMC é calculado apenas para crianças > de 2 anos. No grupo LV ativa, 5 crianças eram < de 2 anos

<sup>§</sup>Pós-teste de Tukey indicou diferença significativa entre o grupo com LV ativa e DTH- (p = 0,014)

\*Pós-teste de Tukey indicou diferença significativa entre os grupos com LV ativa e história de LV, DTH+ e DTH- (p < 0,0005)

Os demais grupos não apresentaram diferença significativa entre si

**Tabela 13.** Prevalência de desnutrição nos grupos estudados de acordo com os índices Altura/Idade, Peso/Idade, Peso/Altura, CB/altura e IMC.

	<b>Total</b> <b>(n = 149)</b>	<b>LV ativa</b> <b>(n = 20)</b>	<b>História de LV</b> <b>(n = 33)</b>	<b>DTH+</b> <b>(n = 40)</b>	<b>DTH-</b> <b>(n = 56)</b>	<b>p valor, <math>\chi^2</math></b>
<b>Índices antropométricos</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
<b>Altura/Idade</b>						
< -2 escore z	15 (10,1)	2 (10,0)	1 (3,0)	5 (12,5)	7 (12,5)	0,567
≥ -2 escore z	134 (89,9)	18 (90,0)	32 (97,0)	35 (87,5)	49 (87,5)	
<b>Peso/Idade</b>						
< -2 escore z	9 (6,0)	0 (0,0)	3 (9,1)	4 (10,0)	2 (3,6)	0,235
≥ -2 escore z	140 (94,0)	20 (100,0)	30 (90,9)	36 (90,0)	54 (96,4)	
<b>Peso/Altura*</b>						
< -2 escore z	1 (2,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (16,7)	0 (0,0)	0,062
≥ -2 escore z	48 (98,0)	13 (100,0)	2 (100,0)	5 (83,3)	28 (100,0)	
<b>CB/altura</b>						
< -2 escore z	15 (10,1)	4 (20,0)	3 (9,1)	4 (10,0)	4 (7,1)	0,263
≥ -2 escore z	134 (89,9)	16 (80,0)	30 (90,9)	36 (90,0)	52 (92,9)	
<b>IMC**</b>						
< -2 escore z	12 (8,4)	6 (40,0)	2 (6,1)	3 (7,5)	1 (1,8)	< 0,0005
≥ -2 escore z	132 (91,6)	9 (60,0)	31 (93,9)	37 (92,5)	55 (98,2)	

\* Para o indicador Peso/Altura, um total de 49 crianças foram avaliadas (13 com LV ativa, 2 com história de LV, 6 DTH+ e 28 DTH-) uma vez que as tabelas do CDC 2000 permitem o cálculo deste indicador apenas para crianças de 45 a 121cm

\*\*IMC calculado apenas para > de 2 anos. No grupo LV ativa, 5 crianças eram < de 2 anos



#### 4.5. Avaliação do estado de vitamina A

As concentrações de retinol sérico foram significativamente menores nas crianças com LV ativa (ANOVA,  $p = 0,035$ ) (Figura 4). As médias de retinol sérico encontradas foram de  $23,3 \pm 13,2 \mu\text{g/dL}$  nas crianças com LV ativa,  $30,9 \pm 9,7 \mu\text{g/dL}$  nas crianças com história de LV,  $32,0 \pm 11,6 \mu\text{g/dL}$  nas crianças DTH+ e  $31,7 \pm 12,3 \mu\text{g/dL}$  nas crianças DTH-. O pós-teste de Tukey indicou diferença estatisticamente significativa entre o grupo com LV ativa e o grupo de crianças DTH+ ( $p = 0,037$ ) e DTH- ( $p = 0,034$ ) (Tabela 14).

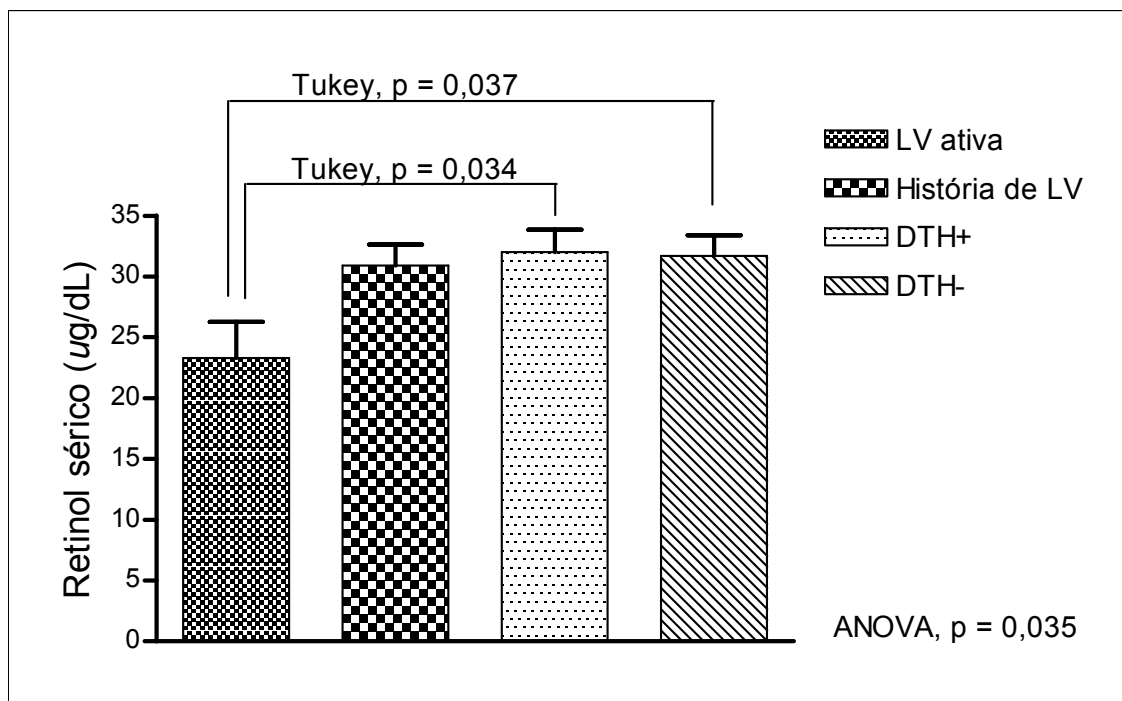
O MRDR mostrou-se significativamente aumentado em crianças com LV ativa (ANOVA,  $p = 0,009$ ), indicando pior estado de vitamina A neste grupo (Figura 5). As médias encontradas foram de  $0,036 \pm 0,030$  para o grupo de crianças com LV ativa,  $0,022 \pm 0,018$  para as crianças com história de LV,  $0,021 \pm 0,016$  para o grupo DTH+ e  $0,019 \pm 0,019$  para as crianças DTH-. O pós-teste de Tukey indicou diferença estatisticamente significativa entre o grupo com LV ativa e os grupos DTH+ ( $p = 0,023$ ) e DTH- ( $p = 0,005$ ) (Tabela 14).

Para verificação da ausência de diferença significativa entre o grupo com LV ativa e o grupo com história de LV, as médias foram novamente comparadas entre os grupos, retirando da análise as crianças que apresentaram estado de convalescença, conforme indicado pela classificação das proteínas de fase aguda. Como se pode perceber na Tabela 15, a média deste grupo não se alterou significativamente, com pós-teste de Tukey não indicando diferença entre o grupo com história de LV e os demais grupos.

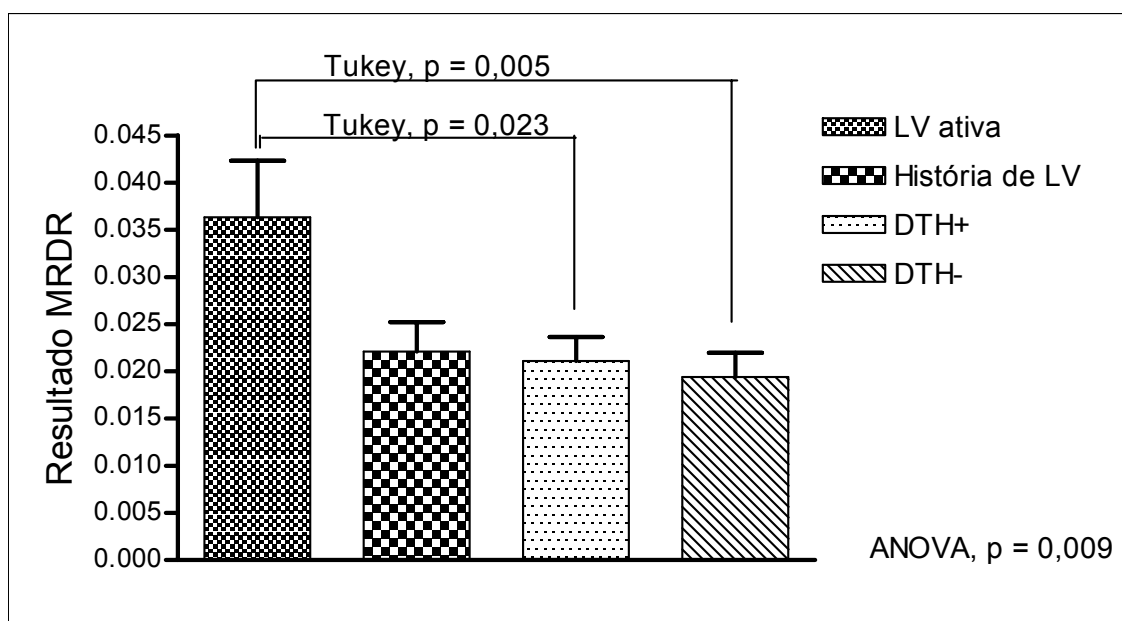
A prevalência de baixas concentrações de retinol ( $< 30\mu\text{g/dL}$ ) foi alta em todos os grupos (Tabela 16), principalmente nas crianças com LV ativa: 63,0% apresentavam baixos valores de retinol, comparadas a 43,8% nas crianças com história de LV, 46,0% no grupo com infecção assintomática e 50% nas crianças sem infecção por *L. chagasi* ( $X^2$ ,  $p = 0,001$ ).

A prevalência de retinol sérico inadequado ( $< 20 \mu\text{g/dL}$ ) foi de 43% nas crianças com LV ativa, 12,5% nas crianças com história de LV, 18% nas DTH+ e 13% nas DTH-. O grupo de crianças com LV ativa foi o único que apresentou crianças deficientes em vitamina A (retinol sérico  $< 10 \mu\text{g/dL}$ ), sendo este percentual de 15%.

A prevalência de estado de vitamina A inadequado medida através de valores de MRDR  $\geq 0,060$  não diferiu entre os grupos estudados, apesar de 15,0% das crianças com LV ativa terem apresentado estado inadequado da vitamina e 40% terem apresentado estado incerto de vitamina A (Tabela 16).



**Figura 4.** Distribuição dos grupos estudados de acordo com retinol sérico.



**Figura 5.** Distribuição dos grupos estudados de acordo com resultado do MRDR.

**Tabela 14.** Médias e desvio-padrão de retinol sérico e MRDR nos grupos estudados.

	<b>Total (n = 145) Média ± dp</b>	<b>LV ativa (n = 20) Média ± dp</b>	<b>História de LV (n = 32) Média ± dp</b>	<b>DTH+ (n = 39) Média ± dp</b>	<b>DTH- (n = 54) Média ± dp</b>	<b>p valor, ANOVA</b>
Retinol (µg/dL)	30,4 ± 11,9	23,3 ± 13,2 <sup>§</sup>	30,9 ± 9,7	32,0 ± 11,6	31,7 ± 12,3	0,035
Resultado MRDR	0,023 ± 0,019	0,036 ± 0,030*	0,022 ± 0,018	0,021 ± 0,016	0,019 ± 0,019	0,009

<sup>§</sup>Pós-teste de Tukey indicou diferença significativa entre o grupo LV ativa e grupos DTH+ (p = 0,037) e DTH- (p = 0,034). Entre grupo LV ativa e história de LV, p = 0,110

\*Pós-teste de Tukey indicou diferença significativa entre o grupo LV ativa e grupos DTH+ (p = 0,023) e DTH- (p = 0,005). Entre grupo LV ativa e história de LV, p = 0,050

Os demais grupos não apresentaram diferença entre si (p > 0,05)

**Tabela 15.** Médias e desvio-padrão de retinol sérico e MRDR nos grupos estudados após retirada de crianças convalescentes.

	<b>Total</b> <b>(n = 145)</b> <b>Média ± dp</b>	<b>LV ativa</b> <b>(n = 20)</b> <b>Média ± dp</b>	<b>História de LV</b> <b>(n =28)</b> <b>Média ± dp</b>	<b>DTH+</b> <b>(n = 37)</b> <b>Média ± dp</b>	<b>DTH-</b> <b>(n = 46)</b> <b>Média ± dp</b>	<b>p valor,</b> <b>ANOVA</b>
Retinol (µg/dL)	31,0 ± 12,2	23,3 ± 13,2 <sup>§</sup>	30,4 ± 10,1	32,5 ± 11,7	33,5 ± 12,1	0,012
Resultado MRDR	0,023 ± 0,020	0,036 ± 0,030*	0,024 ± 0,018	0,021 ± 0,016	0,019 ± 0,019	0,008

<sup>§</sup> Pós-teste de Tukey indicou diferença significativa entre grupo LV ativa e grupo DTH+ (p = 0,030) e DTH- (p = 0,008). Entre o grupo LV ativa e história de LV, p = 0,170. O grupo com história de LV não diferiu do grupo DTH+ (Tukey, p = 0,972) e DTH- (Tukey, p = 0,701)

\* Pós-teste de Tukey indicou diferença significativa entre grupo de LV ativa e grupos DTH+ (p = 0,028) e DTH- (p = 0,005). Entre grupo LV ativa e história de LV, p = 0,129. O grupo com história de LV não diferiu do grupo DTH+ (Tukey, p = 0,947) e DTH- (Tukey, p = 0,665)

**Tabela 16.** Prevalência de baixas concentrações de retinol sérico e estado de vitamina A incerto ou inadequado de acordo com MRDR.

	<b>Total</b> <b>(n = 145)</b> <b>n (%)</b>	<b>LV ativa</b> <b>(n = 20)</b> <b>n (%)</b>	<b>História de LV</b> <b>(n = 32)</b> <b>n (%)</b>	<b>DTH+</b> <b>(n = 39)</b> <b>n (%)</b>	<b>DTH-</b> <b>(n = 54)</b> <b>n (%)</b>	<b>P valor, <math>\chi^2</math></b>
Retinol 30 - 20 µg/dL	45 (31,0)	4 (20,0)	10 (31,3)	11 (28,2)	20 (37,0)	0,001
Retinol 20 -10 µg/dL	25 (17,2)	7 (28,0)	4 (12,5)	7 (18,0)	7 (13,0)	
Retinol < 10 µg/dL	3 (2,1)	3 (15,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
MRDR incerto (0,030 - 0,06)	34 (23,4)	8 (40,0)	9 (28,1)	7 (17,9)	10 (18,5)	0,085
MRDR inadequado ( $\geq 0,06$ )	8 (5,5)	3 (15,0)	2 (6,3)	2 (5,1)	1 (1,9)	

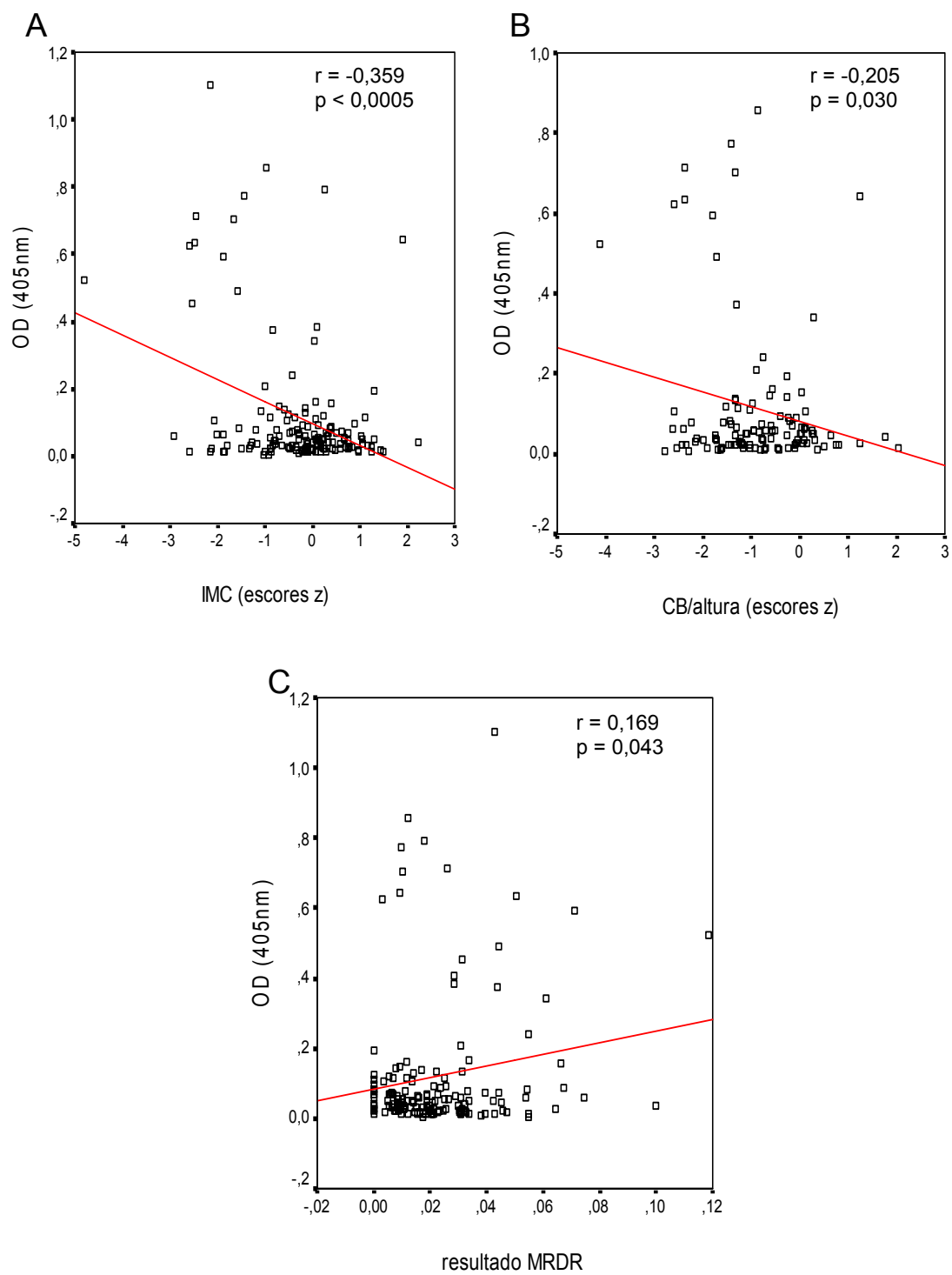
#### 4.6. Correlação entre infecção e estado nutricional

A presença de anticorpos anti-SLA mostrou-se negativamente correlacionada com o IMC ( $r = -0,359$ ,  $p < 0,0005$ ) e CB/altura ( $r = -0,205$ ,  $p = 0,030$ ), e positivamente correlacionada com o MRDR ( $r = 0,169$ ;  $p = 0,043$ ), como pode ser visto na Figura 6. Não foi encontrada correlação com os valores destes anticorpos e o retinol sérico ( $r = -0,098$ ,  $p = 0,243$ ).

Uma vez que a positividade ao teste cutâneo de Montenegro indica infecção prévia e reflete a resposta celular do indivíduo ao antígeno de Leishmania (42), foi realizada análise de correlação entre o tamanho da enduração ao teste cutâneo de Montenegro e IMC, CB/altura, MRDR e retinol. Não foi encontrada correlação entre estas variáveis, como pode ser visto na Tabela 17.

**Tabela 17.** Correlação entre tamanho da enduração ao teste cutâneo de Montenegro e IMC, CB/altura, MRDR e retinol sérico.

<b>Tamanho da enduração (mm)</b>		
<b>Variáveis</b>	<b>Coefficiente de Pearson (r)</b>	<b>p valor</b>
IMC (escores z)	-0,125	0,166
CB/altura (escores z)	-0,165	0,105
Resultado MRDR	0,029	0,751
Retinol (ug/dL)	-0,019	0,834



**Figura 6.** Correlação entre anticorpos anti-SLA e IMC (A), CB/altura (B) e MRDR (C).

#### 4.7. Fatores de risco associados à doença e infecção assintomática

Para investigação de fatores de risco associados com o desenvolvimento de doença, foram construídos dois modelos de regressão logística multivariada, o primeiro que procura verificar fatores de risco associados com a resposta de doença (sim ou não) e o segundo com resposta de infecção assintomática, espontaneamente resolvida (sim ou não), que corresponde, neste estudo ao grupo DTH+. Para este último modelo, os indivíduos DTH- foram excluídos da análise.

A regressão logística multivariada (Tabela 18) demonstrou que o peso ao nascer estava inversamente associado com a LV – demonstrado pelo valor de  $\beta$  negativo, de  $-0,00 \pm 0,00$  – com cada aumento em 100g representando diminuição do risco de doença em 15% (OR = 0,85; IC 95% de 0,73 - 0,99). A albumina sérica também mostrou-se inversamente associada com a doença ( $\beta = -2,31 \pm 1,13$ ), com cada aumento de 1g/dL representando redução no risco de doença em 90% (OR = 0,10; IC 95% 0,01 - 0,90).

Ao contrário, no modelo de regressão para infecção assintomática (Tabela 18), as concentrações de albumina mostraram-se positivamente associadas com o teste cutâneo de Montenegro positivo ( $\beta = 3,1 \pm 1,31$ ). Foi encontrada associação positiva da idade ( $\beta = 0,64 \pm 0,31$ ) com o desenvolvimento de infecção assintomática, com cada aumento em 1 ano de idade representando um aumento em 90% de chance de resolução da infecção por *L. chagasi* de forma espontânea (OR = 1,90; IC 95 de 1,03 - 3,52).

O tempo de amamentação também se mostrou positivamente associado com maior risco de resolução da infecção de maneira assintomática ( $\beta = 0,15 \pm 0,07$ ), com cada incremento de 1 mês de amamentação correspondendo a aumento da chance de pertencer ao grupo que desenvolve infecção assintomática em 16% (OR = 1,16; IC de 95% = 1,01 - 1,33).

Valores maiores de escores z para Altura/Idade, apesar de apresentar intervalo de confiança de 95% extenso (0,01 - 0,98) estavam inversamente associados com a infecção assintomática ( $\beta = -0,69 \pm 0,69$ ). Este resultado pode ser explicado pelo fato de que um teste cutâneo de Montenegro positivo indica infecção prévia por *Leishmania*, que pode ter levado a um comprometimento do crescimento linear (135).



**Tabela 18.** Modelos de regressão logística multivariada para fatores nutricionais e bioquímicos associados com risco de leishmaniose visceral e infecção assintomática.

Variável	Resposta à infecção			Leishmaniose visceral			Infecção assintomática		
	$\beta \pm$ Erro padrão	OR (IC 95%)	<i>P</i>	$\beta \pm$ SE	OR (IC 95)	<i>P</i>	$\beta \pm$ SE	OR (IC 95)	<i>P</i>
Idade (anos)	-0,03 $\pm$ 0,17	0,97 (0,70 - 1,35)	0,868	0,64 $\pm$ 0,31	1,90 (1,03 - 3,52)	0,041			
Peso ao nascer (g)	< -0,01	0,85 (0,73 - 0,99)	0,047	< -0,01	1,00 (0,99 - 1,00)	0,435			
Tempo de amamentação (m)	-0,02 $\pm$ 0,04	0,98 (0,91 - 1,05)	0,498	0,15 $\pm$ 0,07	1,16 (1,01 - 1,33)	0,036			
Tempo de amamentação exclusiva (m)	0,08 $\pm$ 0,16	1,09 (0,80 - 1,48)	0,604	-0,18 $\pm$ 0,21	0,84 (0,55 - 1,27)	0,400			
Altura/Idade (escores-z)	0,61 $\pm$ 0,60	1,83 (0,57 - 5,92)	0,311	-2,19 $\pm$ 1,11	0,11 (0,01 - 0,98)	0,048			
CB/altura (escores-z)	-0,46 $\pm$ 0,52	0,63 (0,23 - 1,75)	0,379	-0,69 $\pm$ 0,69	0,50 (0,13 - 1,92)	0,315			
Resultado MRDR	26,02 $\pm$ 26,96	< 0,00	0,335	-27,34 $\pm$ 37,15	< 0,00	0,462			
Hemoglobina (g/dL)	1,20 $\pm$ 1,25	3,33 (0,29 - 38,19)	0,335	8,2 $\pm$ 4,7	> 1000	0,081			
Hematócrito (%)	-0,33 $\pm$ 0,46	0,72 (0,29 - 1,78)	0,476	-2,93 $\pm$ 1,65	0,05 (0,00 - 1,35)	0,076			
Albumina (g/dL)	-2,31 $\pm$ 1,13	0,10 (0,01 - 0,90)	0,040	3,1 $\pm$ 1,31	22,19 (1,71 - 287,33)	0,018			

## 5. Discussão

A LV, até meados da década de 70, era uma doença de ocorrência rural, do Nordeste brasileiro, acometendo, sobretudo, crianças. A doença hoje é encontrada principalmente nas áreas periurbanas de cidades como Teresina, São Luis, Natal, Fortaleza e Belo Horizonte (41;136;137). Observa-se também, nas novas áreas endêmicas, mudança na distribuição da faixa etária da doença, que agora ocorre entre 20-49 anos em até 43% dos indivíduos que apresentam LV (Nascimento *et al.* 2008, submetido).

No entanto, no Brasil, a doença ainda é prevalente em crianças (137), e, no Rio Grande do Norte, estudo realizado por Jeronimo *et al.* (6;137) verificou que os casos de LV apresentavam idade média de 9,3 anos, com 56% dos casos com idade inferior a 5 anos. Neste estudo, apenas foram observados dados referentes às crianças. No entanto, o maior percentual de indivíduos com LV ativa com idade inferior a 5 anos (70,0%) e a média de idade encontrada para os casos de LV (8,9 anos), estão de acordo com o descrito em estudos anteriores (137;138).

De acordo com o modelo de regressão logística, foi encontrado que crianças com maior idade apresentavam maior risco ( $\beta = 0,64 \pm 0,31$ ; OR = 1,90; IC 95% de 1,03 - 3,52;  $p = 0,041$ ) de apresentar infecção assintomática. Este dado está de acordo com os dados na literatura que demonstram que indivíduos com maior idade apresentam maior chance de desenvolver infecção assintomática (73;138).

Os estudos na literatura demonstram exposição à infecção por *L. chagasi* em populações menos favorecidas sócio-economicamente. Os dados encontrados de renda familiar (R\$ 390,1  $\pm$  349,6) e tempo em anos de estudo (3,8  $\pm$  3,4) corroboram esses achados (30;138-140).

Em relação aos dados bioquímicos encontrados neste estudo, os resultados do hemograma estão de acordo com os dados na literatura que demonstram diminuição dos valores de hemoglobina, hematócrito, plaquetas, linfócitos, leucócitos e eosinófilos em indivíduos com LV (6;41;141;142).

Estes resultados também indicam que houve diferença nas frações protéicas de albumina e globulina entre os grupos estudados. No entanto, a diminuição do valor de albumina nos indivíduos com LV foi compensada pelo aumento dos valores de globulina, mantendo a dosagem de proteínas totais inalterada. Este dado corrobora os achados de inversão da relação albumina:globulina encontrada nos pacientes com LV (142).

Um resultado interessante encontrado foi que concentrações maiores de albumina estavam associadas com proteção à doença e maior risco de apresentação de infecção assintomática. No entanto, os intervalos de 95% de confiança foram amplos, não permitindo assim, que se interprete de forma conclusiva o efeito protetor de maiores valores de albumina.

O padrão de urbanização da LV vem acompanhando o processo de transição demográfica e nutricional vivenciado pelo país. Neste processo, tem-se observado uma diminuição da mortalidade por doenças infecciosas e um aumento da mortalidade causada por doenças cardiovasculares (143;144).

O estado nutricional da população brasileira também vem se modificando. Ao comparar os dados do Estudo Nacional de Despesas Familiares – ENDEF, realizado em 1974/75, com a Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição – PNSN, realizada em 1989 e a Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde – PNDS, realizada em 1995/96, percebe-se a diminuição da desnutrição infantil e o aumento da obesidade, especialmente em mulheres com nível sócio econômico desfavorável. A desnutrição (medida através de baixo P/I no ENDEF) em menores de 5 anos, mostrava-se prevalente em 20,1% das crianças. Este valor sofreu diminuição para 5,6%, segundo dados da PNDS (143;144).

Em pesquisa realizada pelo Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome em 2005 com crianças menores de 5 anos do semi-árido brasileiro foi também verificada uma diminuição dos déficits ponderais. No Rio Grande do Norte, a baixa Altura/Idade foi prevalente em 5,5% das crianças, enquanto o baixo Peso/Idade foi de 2,3% e o baixo Peso/Altura de 1,6% (145).

No presente estudo, foram encontradas maiores prevalências de desnutrição segundo os indicadores Altura/Idade (10,1%), Peso/Idade (6,0%) e

Peso/Altura (2,0%), quando comparados às encontradas pelo Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome. No entanto, os dados de prevalência de A/I menor que 20%, P/I menor que 10% e P/A menor que 5%, indicam que a prevalência destes déficits é baixa, segundo a OMS (123). Estes resultados podem ser atribuídos ao processo de transição nutricional do país, e relativa melhora no poder aquisitivo da população (143;144).

Em relação ao estado nutricional das crianças com LV avaliadas, percebeu-se que o mesmo estava comprometido, conforme demonstrado por escores-z diminuídos de IMC e CB/altura. No estudo de Badaró *et al.* (9) as crianças expostas à infecção por *Leishmania* foram avaliadas de acordo com o peso para a idade, utilizando a classificação de Gomez. Esta classificação caracteriza como desnutridas leves ou em grau I aquelas com peso para idade entre 95 e 76% do peso ideal, com desnutrição moderada ou em grau II aquelas com peso para idade entre 75 e 61% do peso padrão, e com desnutrição grave aquelas com peso para idade inferior a 60% do padrão. Normalmente, o padrão de peso utilizado para esta análise é do National Center for Health Statistics – NCHS da Organização Mundial da Saúde (OMS) (1979) (146). Atualmente, o NCHS/OMS recomendam a utilização dos escore-z para a classificação do estado nutricional de crianças, sendo consideradas desnutridas as que apresentam escore-z < -2 para determinado indicador (123).

Badaró *et al.* (9) e Cerf *et al.* (72) encontraram em seu estudo 45% e 77%, respectivamente, de crianças desnutridas utilizando a classificação de Gomez. No presente estudo, resultado semelhante (40%) ao de Badaró *et al.* (9) foi encontrado para crianças desnutridas segundo o IMC.

Apesar de Cerf *et al.* (72) terem encontrado a prevalência de 82% de baixa estatura para idade nas crianças com LV estudadas, isto não foi observado no presente estudo. Cerf *et al.* (72) também encontraram alta prevalência de baixa Altura/Idade nas crianças saudáveis estudadas (55%). No presente estudo, apenas 10% das crianças com LV apresentaram baixa Altura/Idade, e o percentual de crianças saudáveis com baixa Altura/Idade não ultrapassou 12,5%. As baixas prevalências de Altura/Idade comprometida encontradas neste estudo, que

indicam baixa prevalência de desnutrição crônica ou pregressa, também podem ser atribuídas ao momento de transição nutricional vivenciado pelo país, que diminuiu de forma geral a prevalência de nanismo (143;144). A baixa prevalência de déficit na A/I no grupo das crianças com LV ativa estudadas pode também ser atribuída a uma melhora nos serviços de saúde locais, que com a implantação do Programa Saúde da Família têm maior agilidade no diagnóstico e encaminhamento para tratamento das crianças, diminuindo assim o comprometimento do crescimento linear gerado pela infecção prolongada.

O escore-z diminuído encontrado para CB/altura no grupo das crianças com LV, está de acordo com os dados encontrados por Harrison *et al.* (10), que encontraram valores diminuídos de área gordurosa e muscular do braço inferior nas crianças com LV em relação a seus irmãos ou vizinhos saudáveis.

Sabe-se da influência do estado nutricional e de micronutrientes no risco de desenvolvimento de doenças infecciosas (141;147;148). Apesar de ser sabido que o estado nutricional pode influenciar o aparecimento de diversas infecções, são poucos os dados na literatura que enfatizem a influência da nutrição no risco de desenvolvimento de LV em humanos.

A interação da história nutricional, representada pelo tempo de amamentação e peso ao nascer, podem ser determinantes prospectivos do risco de desenvolvimento de LV. Neste estudo, o maior tempo de amamentação mostrou-se associado com maior risco de apresentação de infecção assintomática ( $\beta = 0,15 \pm 0,07$ ; OR = 1,16; IC 95% de 1,01 - 1,33), enquanto que o menor peso ao nascer mostrou-se associado com maior chance de apresentação de LV ( $\beta = -0,00 \pm 0,00$ ; OR = 0,84; IC 95% de 0,73 - 0,99).

Esses dados reforçam os resultados encontrados por Badaró *et al.* (9) e Cerf *et al.* (72) de que a desnutrição ocorre antes da infecção por *L. chagasi*, como demonstrado, nos estudos citados, por piores indicadores antropométricos antes da infecção por *L. chagasi* nas crianças que desenvolveram LV.

A presença de anticorpos anti-SLA mostrou-se correlacionada com menores índices antropométricos e pior estado de vitamina A, indicado por maiores resultados de MRDR. No entanto, não é possível determinar se a

diminuição dos indicadores antropométricos no grupo com LV pode ser atribuída à infecção por si ou se esta diminuição foi progressiva e contribuinte para a evolução da infecção à doença. Esta questão poderia ser melhor respondida em estudo de coorte em crianças expostas à infecção por *L. chagasi*. Porém, os casos de LV no Rio Grande do Norte estão distribuídos em uma grande área geográfica, o que dificulta sobremaneira o acompanhamento de todos os focos endêmicos. Além disso, o número absoluto de casos de LV por ano é baixo (sendo de 61 em 2006, por exemplo) (149) o que levaria a um tamanho amostral grande e de difícil acompanhamento.

No entanto, o risco encontrado de doença e peso ao nascer, e infecção assintomática com tempo de amamentação, que refletem o estado nutricional progressivo da criança, parecem indicar que as crianças que apresentam LV têm pior estado nutricional prévio à infecção em relação às demais crianças saudáveis. Dessa forma, pode-se dizer que estes fatores nutricionais precedentes à infecção por *L. chagasi*, podem contribuir para o desenvolvimento de doença ou infecção assintomática, sendo o estado nutricional prévio à infecção importante variável associada com a resposta à mesma.

Percebeu-se ainda que o total de crianças amamentadas até os dois anos de idade ainda é baixo (11,5%) e que são poucas as crianças (23%) que permanecem em aleitamento materno exclusivo até os seis meses, com média de  $3,6 \pm 3,7$  meses. Este dado é ainda inferior ao encontrado no estudo de Lauer *et al.* (33) para a América Latina e Central de 31% de crianças amamentadas exclusivamente até os 6 meses.

Em relação à vitamina A, as crianças com história de LV tenderam a apresentar menores valores de retinol e maiores de MRDR, mesmo após um ano de tratamento, quando não há mais sinais de resposta inflamatória, evidenciado por concentrações normais de proteína C-reativa e AGP. Apesar dos resultados de retinol sérico e MRDR do grupo com história de LV não diferirem em relação aos grupos saudáveis, estes valores também não diferiram do grupo com LV ativa. Isto indica que estas crianças apresentam tendência a permanecer com estado de vitamina A comprometido. O mesmo fenômeno pode ter ocorrido antes do

aparecimento da doença, e isto foi visto em estudo prospectivo conduzido por Bern *et al.* (30) em Bangladesh, em uma comunidade altamente endêmica para LV. A média de retinol sérico encontrada nesse estudo em crianças que após pelo menos três meses da coleta desenvolveram LV foi muito similar à média encontrada no presente estudo para crianças com história de LV (29,1µg/dL versus 30,9µg/dL, respectivamente). Estes resultados podem reforçar ainda mais os dados de que a desnutrição precede a infecção pelo parasita.

Assim, os resultados obtidos em relação à vitamina A levam à discussão das seguintes hipóteses: 1) o estado de vitamina A nas crianças que apresentam LV pode ser regulado por fatores biológicos e/ou imunogenéticos ainda desconhecidos; 2) as crianças com LV possuem dieta pobre em vitamina A, quer seja por fatores sócio-econômicos ou de ingestão individual; 3) a infecção por si leva a depleção da vitamina A; ou 4) uma combinação desses fatores.

Reguladores genéticos do retinol sérico ainda são desconhecidos. Um estudo de caso de duas irmãs alemãs mostrou concentrações de retinol sérico muito baixas (de aproximadamente 5 µg/dL) devido a duas mutações pontuais no gene codificador da RBP que resultaram em substituição de asparagina por isoleucina na posição 41 do exon 3 e aspartato por glicina na posição 74 do exon 4 (150). Outro estudo encontrou baixas concentrações de RBP no plasma em indivíduos com mutação na posição 84 da molécula de transtiretina, a qual o RBP se complexa na circulação (151). Verificou-se que uma mutação no gene codificador do STRA-6, o receptor de proteína ligadora de retinol, está relacionada com a síndrome de Matthew-Wood, que se caracteriza por anolftalmia e hipoplasia pulmonar (152;153). Dessa forma, não se pode descartar a possibilidade de diminuição no retinol sérico devido a mecanismos induzidos por genes que podem ser regulados por fatores imunológicos. No entanto, são necessários estudos que comprovem esta hipótese.

Ao contrário do que se poderia inferir a partir dos estudos conduzidos em animais (25;26;106), o estado de vitamina A não se mostrou correlacionado com a resposta celular humana, medida neste estudo através do tamanho da enduração ao teste de Montenegro. A prevalência de retinol sérico < 30 µg/dL também não

diferiu entre os grupos de crianças DTH+ e DTH-, o que também está de acordo com os dados de Bern *et al.* (30), e contribui ainda mais para a demonstração que os achados em estudos humanos não são os mesmos encontrados em estudos animais para regulação da resposta imunológica.

No presente estudo, crianças com LV foram comparadas com seus parentes ou com uma população em condições sócio-econômicas similares, para que o fator alimentação ofertada fosse controlado. No entanto, no estudo realizado por Bern *et al.* (30), o consumo de carne vermelha ao menos 2 vezes ao mês estava associado com proteção à doença. Além disso, o estudo conduzido por Anstead *et al.* (8) verificou que camudongos em dieta deficiente em proteína, zinco e ferro estava relacionada com maior visceralização da infecção por *L. donovani*. Estes estudos indicam que, possivelmente, a dieta pode ser um fator preponderante na evolução da infecção.

Apesar dos níveis de retinol sérico apresentarem-se diminuídos na infecção, possivelmente devido à excreção aumentada de RBP e retinol na urina, o MRDR é uma relação entre o análogo de vitamina A administrado e o retinol sérico, portanto, espera-se que esta relação não sofra a mesma diminuição vista para o retinol sérico em estados infecciosos, uma vez que a concentração de RBP hepática é a mesma para as duas substâncias dosadas (124;154;155). Apesar de ser sabido que estados infecciosos depletam o retinol sérico em torno de 24%, e que a convalescença depleta o retinol sérico em cerca de 11%, conforme discutido por Thurman *et al.* (133), mesmo após a correção das análises retirando crianças convalescentes, os indivíduos com história de LV continuam a apresentar estado de vitamina A que tende a ser inferior aos demais grupos. Portanto, é precipitado afirmar que a tendência observada neste grupo seja somente devido ao estado infeccioso pregresso.

Vale ainda ressaltar que a prevalência de retinol sérico inadequado (< 20 µg/dL) nas crianças saudáveis neste estudo (12,5 – 18%) foi um pouco inferior a encontrada para crianças em estudos brasileiros. Os estudos no país têm mostrado diferentes prevalências de retinol sérico < 20 µg/dL, sendo estas maiores em populações rurais que urbanas. Graebner *et al.* (93), encontraram



prevalência de 34% de retinol inadequado em crianças de 5 a 18 anos em meio rural, próximo à Brasília. Santos *et al.* (97), em crianças de 6 a 14 anos, em meio rural de Minas Gerais encontraram prevalência de 29%. No entanto, Paiva *et al.* (96), ao estudar crianças de 3 a 7 anos em Teresina, encontraram prevalência de 15,4% de retinol sérico inadequado. Martins *et al.* (95), ao estudar crianças de 6 meses a 5 anos, sendo 68,8% da zona urbana e 31,2% da zona rural, encontraram cerca de 32% de crianças com retinol sérico inferior a 20 µg/dL. Apesar do presente estudo avaliar crianças tanto em meio rural (49,6%) quanto urbano/peri-urbano (50,4%), percebe-se que os valores encontrados aproximam-se mais dos encontrados para estudos em meios urbanos, o que pode refletir melhor estado nutricional na população estudada.

No entanto, os resultados encontrados indicam, segundo a OMS (114), que a prevalência encontrada de retinol sérico < 20 µg/dL, maior de 10%, caracteriza a hipovitaminose A como um problema de saúde pública na população estudada. Vale ressaltar que, apesar da melhora no estado nutricional da população brasileira em geral, a deficiência de micronutrientes permanece oculta nas crianças estudadas.

Os resultados deste estudo enfatizam a importância do estado nutricional atual e prévio na resposta à infecção por Leishmania. Fatores imunogenéticos estão claramente associados com o desenvolvimento da forma sintomática da infecção (4;67). É possível que estes fatores imunogenéticos, a idade, o estado nutricional e a alimentação deficiente em micronutrientes co-existam, contribuindo todos para a evolução da infecção à forma clínica de doença.

No entanto, conforme discutido por Bern *et al.* (30), o monitoramento da oferta de micronutrientes na dieta é de relevante importância, uma vez que faz parte de hábitos, que podem ser modificados – uma vez vistos sob o aspecto sócio-econômico e cultural de uma população. Os dados neste estudo adicionam a esta observação que não só a provisão de micronutrientes na dieta, mas também o estímulo à amamentação e o monitoramento do peso ao nascer podem contribuir para a proteção à doença.

Finalmente, observa-se que medidas de intervenção para a prevenção de LV podem ser tomadas com base nos achados deste estudo. Estas medidas devem visar a manutenção do estado nutricional adequado de gestantes, a promoção do estado nutricional de vitamina A e o incentivo a prática do aleitamento materno.

## 6. Conclusões

- O estado nutricional de crianças com LV aguda encontra-se comprometido, quando considerados os indicadores IMC e CB/altura;
- A prevalência de desnutrição na população sadia estudada é baixa de acordo com indicadores antropométricos avaliados;
- O tempo de amamentação total e exclusiva das crianças estudadas foi baixo, e a maioria das crianças estudadas apresentou peso adequado ao nascer;
- A prevalência de retinol sérico inferior a 20 µg/dL nas crianças saudáveis indica a existência de hipovitaminose A na população estudada;
- O estado de vitamina A nas crianças com LV em fase aguda mostrou-se significativamente comprometido;
- As crianças com história de LV apresentaram tendência a pior estado de vitamina A;
- O estado de vitamina A não se mostrou correlacionado com a resposta celular à *L. chagasi*, medida através da enduração ao teste de Montenegro;
- O maior peso ao nascer e maiores concentrações de albumina sérica mostraram-se associados com menor risco de apresentação de LV;
- O maior tempo total de amamentação mostrou-se como fator associado com maior risco de apresentação de infecção assintomática à LV.

## 7. Anexo



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO  
(Final)

<b>Prot. nº</b>	088/06 – CEP-UFRN
<b>Projeto de Pesquisa</b>	Determinantes Nutricionais e Metabólicos Influenciadores na Evolução Frente à Infecção por <i>Leishmania</i>
<b>Área de Conhecimento</b>	Ciências da Saúde – Medicina – Grupo II
<b>Área Temática Especial</b>	Genética Humana
<b>Pesquisador Responsável</b>	Selma Maria Bezerra Jerônimo
<b>Instituição Onde Será Realizada</b>	UFRN Centro de Biociências Departamento de Bioquímica Laboratório de Imunogenética
<b>Instituição Colaboradora</b>	Universidade de São Paulo – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
<b>Instituições Sediadoras</b>	Hospital Giselda Trigueiro Hospital Infantil Varela Santiago Hospital de Pediatria da UFRN
<b>Finalidade</b>	Obtenção do grau de Mestre
<b>Período de Realização</b>	<b>Início</b> Abril/06 - Coleta de dados: julho/06 <b>Término</b> - setembro/07
<b>Revisão Ética em</b>	05 de setembro de 2006

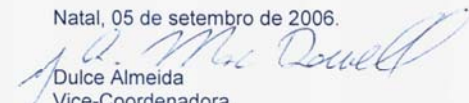
RELATO

Considerando que as pendências expostas por este Comitê, foram adequadamente cumpridas, o Protocolo de Pesquisa em pauta enquadra-se na categoria de APROVADO.

**Orientações ao Pesquisador:** em conformidade com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) através do Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa (Brasília, 2002-p.65) e Resol. 196/96 – CNS o pesquisador responsável deve:

1. Entregar ao sujeito da pesquisa uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), na íntegra, por ele assinada (Resol. 196/96 – CNS – item IV.2d);
2. Desenvolver a pesquisa conforme foi delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após a análise das razões da descontinuidade pelo CEP/UFRN (Resol. 196/96 – CNS – item III.3z);
3. Apresentar ao CEP/UFRN eventuais emendas ou extensões ao protocolo original, com justificativa (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa – CONEP – Brasília – 2002 – p.41);
4. Apresentar ao CEP/UFRN relatório final (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa – CONEP – Brasília – 2002 – p.65);
5. Os formulários para os Relatórios Parciais e Final estão disponíveis na página do CEP/UFRN ([www.etica.ufrn.br](http://www.etica.ufrn.br)).

Natal, 05 de setembro de 2006.

  
Dulce Almeida  
Vice-Coordenadora  
CEP-UFRN

## 8. Apêndices

### Apêndice 1

#### Formulário de coleta para de casos de LV em fase aguda

1. Nome | \_\_\_\_\_ | 2. Apelido | \_\_\_\_\_ |  
 3. Nome Pai | \_\_\_\_\_ | 4. Apelido | \_\_\_\_\_ |  
 5. Nome Mãe | \_\_\_\_\_ | 6. Apelido | \_\_\_\_\_ |

#### ENDEREÇO

1. Rua | \_\_\_\_\_ | 2. Bairro | \_\_\_\_\_ |  
 3. Cidade | \_\_\_\_\_ | 4. Fone | \_\_\_\_\_ |  
 5. FNS c | \_\_\_\_\_ | 6. Quadra | \_\_\_\_\_ |  
 7. Referência | \_\_\_\_\_ |

#### PARA CONFERÊNCIA NO LABORATÓRIO (0=Não; 1= Sim)

1. TCLE | \_\_\_\_ | 5. Sangue para MRDR | \_\_\_\_ | \_\_\_\_ mL  
 2. QUESTIONÁRIO | \_\_\_\_ | 6. Sangue PCR, lipídios | \_\_\_\_ | \_\_\_\_ mL  
 3. EXAME FÍSICO | \_\_\_\_ | 7. PENDÊNCIAS | \_\_\_\_\_ |  
 4. Sangue dosagem Zn/Cu | \_\_\_\_ | \_\_\_\_ mL

Intercorrências: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Definições: Urbano (cidade), periurbano (periferia com habitações intercaladas com áreas desabitadas) e rural (habitações isoladas ex. granjas ou fazendas).

Critérios de inclusão: pacientes diagnosticados com LV por aspirado de medula óssea positivo

Critérios exclusão: neoplasias, HIV, doenças auto-imunes, não preenchimento TCLE

Responsável pela coleta dos dados | \_\_\_\_\_ | Data | \_\_\_\_ | \_\_\_\_ | \_\_\_\_ |

## QUESTIONÁRIO - Enfermaria

DATA: \_\_\_\_|\_\_\_\_|\_\_\_\_| HGT |\_\_\_\_| HIVS |\_\_\_\_| HOSPED |\_\_\_\_| Outro  
|\_\_\_\_\_|

## IDENTIFICAÇÃO

1. DN |\_\_\_\_|\_\_\_\_|\_\_\_\_| 4. Procedência |\_\_\_\_\_|  
2. Sexo |\_\_\_\_| (1=M; 2=F) 5. Data de Internamento |\_\_\_\_|\_\_\_\_|\_\_\_\_|  
3. Naturalidade |\_\_\_\_\_|

## DADOS EPIDEMIOLÓGICOS (88= NÃO SABE; 99= NÃO ADEQUA)

1. Moradia |\_\_\_\_|anos e |\_\_\_\_| meses 11. Onde |\_\_\_\_| |\_\_\_\_| |\_\_\_\_|  
domicílio peridomicílio Outros \_\_\_\_\_  
2. Profissão |\_\_\_\_\_| 12. Parentesco com o último caso LV |\_\_\_\_\_|  
mãe/responsável  
3. Escolaridade (anos) |\_\_\_\_| 13. Nº casos de LV na família? |\_\_\_\_|  
mãe/responsável  
4. Local |\_\_\_\_| 1=Rural, 2=Urban, 3=Periur 14. Nº casos de LV na vizinhança? |\_\_\_\_|  
5. Número sal. mín fam |\_\_\_\_\_| 15. Contato com cão |\_\_\_\_| 0 = não , 1 = sim  
6. Tipo de residência |\_\_\_\_| (1=alvenaria, 2=taipa, 3=tijolo) 16. Onde |\_\_\_\_| domicílio |\_\_\_\_| peridomicílio  
7. Número de residentes |\_\_\_\_| Outros \_\_\_\_\_  
8. Número de familiares |\_\_\_\_| 17. Saúde do Cão |\_\_\_\_| 0=sadio, 1=doente  
9. Procedência 24 meses |\_\_\_\_\_| 18. Data do ultimo caso LV |\_\_\_\_|\_\_\_\_|\_\_\_\_|  
|\_\_\_\_\_|  
10. Contato com calazar humano |\_\_\_\_| 0 = não , 1 = sim

## HISTÓRICO NUTRICIONAL (0= NÃO; 1= SIM ; 88= Não Sabe)

Peso ao nascer: \_\_\_\_\_g

Mamou: |\_\_\_\_|

Tempo de amamentação: |\_\_\_\_| meses

Amamentação exclusiva: |\_\_\_\_| meses

Primeiro alimento introduzido:

1. |\_\_\_\_| Mingau de leite integral + massa  
2. |\_\_\_\_| Mingau leite em pó integral + massa  
3. |\_\_\_\_| Leite em pó integral  
4. |\_\_\_\_| Leite integral  
5. |\_\_\_\_| Fruta  
6. |\_\_\_\_| Suco de fruta  
7. |\_\_\_\_| Sopa  
8. |\_\_\_\_| NAN I  
9. |\_\_\_\_| Chá ou água de côco  
10. |\_\_\_\_| Outro: \_\_\_\_\_

Nº refeições/dia: |\_\_\_\_|

7. Dieta habitual:

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

8. Recordatório 24h:

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

**QUEIXAS (0= NÃO; 1= SIM, 2= NÃO PERGUNTADO; 88= NÃO SABE)** Tempo de doença \_\_\_\_\_

1. <input type="checkbox"/> Febre	6. <input type="checkbox"/> Distúrbios visuais	11. <input type="checkbox"/> Vômitos	16. <input type="checkbox"/> Disúria
2. <input type="checkbox"/> Anorexia	7. <input type="checkbox"/> Fraqueza	12. <input type="checkbox"/> Diarréia	17. <input type="checkbox"/> Polaciúria
3. <input type="checkbox"/> Fadiga	8. <input type="checkbox"/> Torpor	13. <input type="checkbox"/> Icterícia	18. <input type="checkbox"/> Sangramentos
4. <input type="checkbox"/> Palidez	9. <input type="checkbox"/> Aumento do abdômen	14. <input type="checkbox"/> Tosse	
5. <input type="checkbox"/> Perda de peso _____Kg	10. <input type="checkbox"/> Dor abdominal	15. <input type="checkbox"/> Artralgia	

**USO DE MEDICAÇÃO (0= NÃO, 1= SIM, 2= NÃO PERGUNTADO; 88= NÃO SABE; 99= NÃO ADEQUA)**

1. <input type="checkbox"/> Anti hipertensivo	3. <input type="checkbox"/> Anti inflamatórios	5. <input type="checkbox"/> Esteróides	7. <input type="checkbox"/> Suplemento mineral
2. <input type="checkbox"/> Drogas anti lipídêmicas	4. <input type="checkbox"/> Antibióticos	6. <input type="checkbox"/> Anti ácidos	8. <input type="checkbox"/> Suplemento vitamínico

Outras: \_\_\_\_\_

**ANTECEDENTES PESSOAIS (0=Não; 1= Sim; 88= Não Sabe)**

2. Pneumonia <input type="checkbox"/> vezes	Idade último internamento <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> vezes	Idade último internamento <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> vezes
3. Diarréia <input type="checkbox"/> vezes	Idade último internamento <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> vezes	Idade último internamento <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> vezes
4. Asma <input type="checkbox"/> vezes	Idade último internamento <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> vezes	Idade último internamento <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> vezes
5. Infecção resp <input type="checkbox"/> vezes	Idade último internamento <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> vezes	Idade último internamento <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> vezes

**VACINAÇÃO/SUPLEMENTO (0= NÃO; 1= SIM; 2= NÃO PERGUNTADO; NÃO SABE=88)**

**CARTÃO**

Vacina	Última Dose	Doses	Vacina	Última Dose	Doses
1. <input type="checkbox"/> Pólio	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	4. <input type="checkbox"/> BCG	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. <input type="checkbox"/> DPT	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5. <input type="checkbox"/> Sarampo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. <input type="checkbox"/> Hepat B	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	6. <input type="checkbox"/> Febre amarela	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
			7. <input type="checkbox"/> Vitamina A	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Outras: \_\_\_\_\_

**EXAME FÍSICO ADMISSÃO (0= NÃO; 1= SIM; 999= SEM INFORMAÇÃO)**

**Data:**

Geral	Cardiovascular	Abdome	Neuro (0=NL, 1=ALT)
1. Temperatura : ____°C	11. FC: _____bpm	19. <input type="checkbox"/> Fígado 20. <input type="checkbox"/> cm	30. <input type="checkbox"/> MEO
		RCD	
4. PA: ____/____ mmHg	12. <input type="checkbox"/> NL	21. <input type="checkbox"/> Baço: 22. <input type="checkbox"/> cm	31. <input type="checkbox"/> Reflexos
		RCE	
5. <input type="checkbox"/> Petéquias	Indicar alterações:	23. <input type="checkbox"/> Ascite: 24. Grau <input type="checkbox"/>	32. <input type="checkbox"/> Força
6. <input type="checkbox"/> Icterícia	13. <input type="checkbox"/> Sopro	<b>Cabeça/pescoço</b>	33. <input type="checkbox"/> Alteração de Sensibilidade
		25. <input type="checkbox"/> Sopro Carotídeo	<b>MMII</b>
7. <input type="checkbox"/> Palidez (1+,2+,3+,4+)	14. <input type="checkbox"/> Extra-sístole	26. <input type="checkbox"/> Tireoidomegalia	34. <input type="checkbox"/> Edema:
8. <input type="checkbox"/> Cicatriz BCG, <input type="checkbox"/> mm	<b>Pulmão</b>	27. <input type="checkbox"/> Saúde bucal (0=bom estado; 1= encaminhar para TTT; 2 = Prótese)	35. Grau <input type="checkbox"/>
9. <input type="checkbox"/> Xantoma	15. <input type="checkbox"/> NL		
10. <input type="checkbox"/> Ganglios região, _____	16. <input type="checkbox"/> Creptos		
	17. <input type="checkbox"/> Sibilos		
	18. <input type="checkbox"/> Roncos		

**EXAMES LABORATORIAIS** (0= NÃO; 1= SIM=1; 9= SEM INFORMAÇÃO) Data: |\_|\_|\_|\_|

1.  _  HT	_ _  %	1.  _  TGO	_ _ _  u/ml	<b>Outros Exames</b> _____ _____
2.  _  Hb	_ _  gr	2.  _  TGP	_ _ _  u/ml	
3.  _  Leuco	_ _ _ _ _ _  total	3.  _  PT	_ _  gr/dl	
4.  _  Seg	_ _ _ _ _ _  cels	4.  _  Albu	_ _  gr/dl	
5.  _  Eos	_ _ _ _  cels	5.  _  Glob	_ _  gr/dl	
6.  _  Bast	_ _ _ _  cels	7.  _  Uréia	_ _  mg/dl	
7.  _  Linfo	_ _ _ _ _ _  cels	8.  _  Creat	_ _  mg/dl	
8.  _  Plaq	_ _ _ _ _ _ _	9.  _  Amil	_ _ _ _  u/l	

**|\_| EAS** (0 = AUSENTE, 1 = PRESENTE, 9=SEM INFORMAÇÃO) Data: |\_|\_|\_|\_|

1. Proteínas	_ _ _	6. Urobilinogênio	_ _ _	10. Cristais	_ _ _
2. Glicose	_ _ _	7. Nitrito	_ _ _	11. Cilindros	_ _ _
3. Corpos cetôn.	_ _ _	8. Sangue	_ _ _	12. Fios mucosos	_ _ _
4. Bilirrubina	_ _ _	9. Plócitos (p/cam)	_ _ _	13. Cél. Epiteliais de descamação	_ _ _
5. Hemácias	_ _ _			14. Leucócitos	_ _ _

**|\_| Urocultura** (0= AUSENTE, 1= PRESENTE, 9=SEM INFORMAÇÃO) Data: |\_|\_|\_|\_|

Se positiva para |\_\_\_\_\_|

**|\_| FEZES** (0 = AUSENTE, 1 = PRESENTE, 9=SEM INFORMAÇÃO) Data: |\_|\_|\_|\_|

Se positiva para |\_\_\_\_\_|

**|\_| CULTURA** (0 = AUSENTE, 1 = PRESENTE, 9=SEM INFORMAÇÃO) Data: |\_|\_|\_|\_|

1. |\_| Sangue      2. |\_| Pele      3. |\_| Urina |\_|      4. |\_| Ouvido      5. Outro \_\_\_\_\_

Resultado: \_\_\_\_\_

**|\_| ULTRASONOGRAFIA ABDOMINAL** (0=NÃO; 1=SIM, 9=SEM INFORMAÇÃO) Data: |\_|\_|\_|\_|

1. Tamanho Fígado: _____ cm	3. Adenomegalia:  _  sim  _  não
2. Tamanho baço: _____ cm	4. Descrever achados: _____

**|\_| ECG** (0=NÃO; 1=SIM) Data: |\_|\_|\_|\_|

Laudo: \_\_\_\_\_

**|\_| RAIOS-X DE TÓRAX** (0=NÃO; 1=SIM, 9=SEM INFORMAÇÃO) Data: |\_|\_|\_|\_|

Laudo: \_\_\_\_\_

**|\_| ASPIRADO DE MEDULA** Data: |\_|\_|\_|\_|

Laudo: \_\_\_\_\_



**DADOS ANTROPOMÉTRICOS (0= NÃO; 1= SIM; 999= NÃO SE APLICA)**

1. Peso	_____  Kg	5. Tríceps	_____ mm  _____ mm
2. Altura	_____ cm  _____ cm	6. Bíceps	_____ mm  _____ mm
3. Circ Abdominal	_____ cm  _____ cm	7. Ascite	_____  9 Cicatriz BCG ____mm
4. Circunferência braço	_____ cm  _____ cm	8. Edema MMII	_____

**MEDICAÇÃO INTERNAMENTO**

Data início tratamento: |\_|\_|\_|\_|

Data fim tratamento: |\_|\_|\_|\_|

|\_|\_| Antimonial LISTAR:|\_\_\_\_\_

|\_|\_| Antibióticos LISTAR:|\_\_\_\_\_

Outras LISTAR:|\_\_\_\_\_





3. Diarréia |\_\_| Idade último internamento |\_\_| \_\_\_\_\_ |\_\_| vezes Idade último internamento |\_\_| vezes  
 4. Asma |\_\_| vezes Idade último internamento |\_\_| \_\_\_\_\_ |\_\_| vezes Idade último internamento |\_\_| vezes

#### VI. ANTECEDENTES FAMILIARES (0=Não; 1= Sim; 88= Não Sabe)

1. LV |\_\_| Parentesco \_\_\_\_\_ 4. DM |\_\_| Parentesco |\_\_\_\_\_|  
 2. TB |\_\_| Parentesco \_\_\_\_\_ 4. ICC |\_\_| Parentesco |\_\_\_\_\_|  
 3. HAS |\_\_| Parentesco |\_\_\_\_\_| 5. |\_\_| \_\_\_\_\_  
 Outras \_\_\_\_\_

#### VII. VACINAÇÃO (0=Não; 1= Sim; 88= Não Sabe) CARTÃO |\_\_|

1. Pólio |\_\_| doses |\_\_| 3. Sarampo |\_\_| doses |\_\_| 5. BCG |\_\_| data: |\_\_|\_|\_|\_|\_|  
 2. DPT |\_\_| doses |\_\_| 4. Hepatite B |\_\_| doses |\_\_| 6. Vitamina A |\_\_| doses  
 |\_\_| Data última dose: |\_\_|\_|\_|\_|\_|  
 7. Outras |\_\_\_\_\_|

#### VIII. EXAME FÍSICO (se 0=sem alterações, 1=alterações indicar)

1. PA: \_\_\_\_|\_\_\_\_| mmHg 5. FÍGADO \_\_\_\_\_ |\_\_| cm RCD  
 2. FC: \_\_\_\_\_ bpm 6. BAÇO \_\_\_\_\_ |\_\_| cm RCE  
 3. Cicatriz BCG |\_\_| \_\_\_\_\_ mm 7. LINFONODOS |\_\_| Região \_\_\_\_\_ Tamanho  
 \_\_\_\_\_ cm  
 4. Exame físico geral |\_\_| 8. ALTERAÇÕES EXAME FÍS. |\_\_\_\_\_|  
 |\_\_\_\_\_|  
 |\_\_\_\_\_|

#### IX. DADOS ANTROPOMÉTRICOS (0= Não; 1= Sim)

1. Peso \_\_\_\_\_ Kg 4. Circunferência \_\_\_\_\_ cm |\_\_\_\_\_| cm  
 braço  
 2. Altura \_\_\_\_\_ cm |\_\_\_\_\_| cm 5. Tríceps \_\_\_\_\_ mm |\_\_\_\_\_| mm  
 3. Circ Abdominal \_\_\_\_\_ cm |\_\_\_\_\_| cm 6. Bíceps \_\_\_\_\_ mm |\_\_\_\_\_| mm

#### X. PROCEDIMENTOS (0=Não; 1= Sim)

1. Montenegro |\_\_| Leitura 48 / 72 \_\_\_\_\_ |\_\_| mm 4. Plasma \_\_\_\_\_  
 hs \_\_\_\_\_ Cu/ZN \_\_\_\_\_ mL  
 2. PPD |\_\_| Leitura 48 / 72 \_\_\_\_\_ |\_\_| mm 6. FEZES |\_\_|  
 3. MRDR |\_\_| Soro: \_\_\_\_\_ |\_\_| mL 7. DNA |\_\_|

#### IV. OUTRAS INFORMAÇÕES

Responsável pelas informações

Assinatura

Data: |\_\_|\_|\_|\_|\_|

## 9. Referências

- (1) Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1986 Dec;154(6):1003-11.
- (2) Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi JG, Momen H, Mahon-Pratt D, Ribeiro de JA, et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 1991 May;44(5):536-46.
- (3) Braz RF, Nascimento ET, Martins DR, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 2002 Oct;67(4):344-8.
- (4) Jamieson SE, Miller EN, Peacock CS, Fakiola M, Wilson ME, Bales-Holst A, et al. Genome-wide scan for visceral leishmaniasis susceptibility genes in Brazil. *Genes Immun* 2007 Jan;8(1):84-90.
- (5) Wilson ME, Jeronimo SM, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog* 2005 Apr;38(4):147-60.
- (6) Jeronimo SM, Duggal P, Braz RF, Cheng C, Monteiro GR, Nascimento ET, et al. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *Scand J Infect Dis* 2004;36(6-7):443-9.
- (7) Davies MK. Stamps in paediatrics. Infectious diseases. *Arch Dis Child* 2000 May;82(5):340.
- (8) Anstead GM, Chandrasekar B, Zhao W, Yang J, Perez LE, Melby PC. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun* 2001 Aug;69(8):4709-18.
- (9) Badaro R, Jones TC, Lorencó R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis* 1986 Oct;154(4):639-49.
- (10) Harrison LH, Naidu TG, Drew JS, de Alencar JE, Pearson RD. Reciprocal relationships between undernutrition and the parasitic disease visceral leishmaniasis. *Rev Infect Dis* 1986 May;8(3):447-53.

- (11) Ellestad-Sayed J, Coodin FJ, Dilling LA, Haworth JC. Breast-feeding protects against infection in Indian infants. *Can Med Assoc J* 1979 Feb 3;120(3):295-8.
- (12) Howie PW, Forsyth JS, Ogston SA, Clark A, Florey CD. Protective effect of breast feeding against infection. *BMJ* 1990 Jan 6;300(6716):11-6.
- (13) Lopez-Alarcon M, Villalpando S, Fajardo A. Breast-feeding lowers the frequency and duration of acute respiratory infection and diarrhea in infants under six months of age. *J Nutr* 1997 Mar;127(3):436-43.
- (14) Ramakrishnan U. Nutrition and low birth weight: from research to practice. *Am J Clin Nutr* 2004 Jan;79(1):17-21.
- (15) Victora CG, Adair L, Fall C, Hallal PC, Martorell R, Richter L, et al. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *Lancet* 2008 Jan 26;371(9609):340-57.
- (16) Bhaskaram P. Micronutrient malnutrition, infection, and immunity: an overview. *Nutr Rev* 2002 May;60(5 Pt 2):S40-S45.
- (17) Luz KG, Succi RCdM, Torres E. Nível sérico da vitamina A em crianças portadoras de leishmaniose visceral. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2001 Jul 1;34(4):381-4.
- (18) Taylor CE, Higgs ES. Micronutrients and infectious diseases: thoughts on integration of mechanistic approaches into micronutrient research. *J Infect Dis* 2000 Sep;182 Suppl 1:S1-S4.
- (19) Semba RD. Vitamin A as "anti-infective" therapy, 1920-1940. *J Nutr* 1999 Apr;129(4):783-91.
- (20) Rahmathullah L, Tielsch JM, Thulasiraj RD, Katz J, Coles C, Devi S, et al. Impact of supplementing newborn infants with vitamin A on early infant mortality: community based randomised trial in southern India. *BMJ* 2003 Aug 2;327(7409):254.
- (21) Shankar AH. Vitamin A and malaria. *Am J Clin Nutr* 1995 Oct;62(4):842-3.
- (22) Shankar AH, Genton B, Semba RD, Baisor M, Paino J, Tamja S, et al. Effect of vitamin A supplementation on morbidity due to *Plasmodium falciparum* in young children in Papua New Guinea: a randomised trial. *Lancet* 1999 Jul 17;354(9174):203-9.
- (23) Long KZ, Nanthakumar N. Energetic and nutritional regulation of the adaptive immune response and trade-offs in ecological immunology. *Am J Hum Biol* 2004 Sep;16(5):499-507.

- (24) Cantorna MT, Nashold FE, Hayes CE. In vitamin A deficiency multiple mechanisms establish a regulatory T helper cell imbalance with excess Th1 and insufficient Th2 function. *J Immunol* 1994 Feb 15;152(4):1515-22.
- (25) Cantorna MT, Nashold FE, Hayes CE. Vitamin A deficiency results in a priming environment conducive for Th1 cell development. *Eur J Immunol* 1995 Jun;25(6):1673-9.
- (26) Cantorna MT, Nashold FE, Chun TY, Hayes CE. Vitamin A down-regulation of IFN-gamma synthesis in cloned mouse Th1 lymphocytes depends on the CD28 costimulatory pathway. *J Immunol* 1996 Apr 15;156(8):2674-9.
- (27) Jason J, Archibald LK, Nwanyanwu OC, Sowell AL, Buchanan I, Larned J, et al. Vitamin A levels and immunity in humans. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002 May;9(3):616-21.
- (28) Long KZ, Santos JI. Vitamins and the regulation of the immune response. *Pediatr Infect Dis J* 1999 Mar;18(3):283-90.
- (29) Garg R, Singh N, Dube A. Intake of nutrient supplements affects multiplication of *Leishmania donovani* in hamsters. *Parasitology* 2004 Dec;129(Pt 6):685-91.
- (30) Bern C, Haque R, Chowdhury R, Ali M, Kurkjian KM, Vaz L, et al. The epidemiology of visceral leishmaniasis and asymptomatic leishmanial infection in a highly endemic Bangladeshi village. *Am J Trop Med Hyg* 2007 May;76(5):909-14.
- (31) Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa AA, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Infect Dis* 1992 Nov;166(5):1124-32.
- (32) Doherty CP, Weaver LT, Prentice AM. Micronutrient supplementation and infection: a double-edged sword? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002 Apr;34(4):346-52.
- (33) Lauer JA, Betran AP, Victora CG, de OM, Barros AJ. Breastfeeding patterns and exposure to suboptimal breastfeeding among children in developing countries: review and analysis of nationally representative surveys. *BMC Med* 2004 Jul 1;2:26.
- (34) Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 2007 Nov;5(11):873-82.
- (35) Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004 Sep;27(5):305-18.

- (36) Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2002 Aug;2(8):494-501.
- (37) Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999 Oct 2;354(9185):1191-9.
- (38) Malla N, Mahajan RC. Pathophysiology of visceral leishmaniasis - some recent concepts. *Indian J Med Res* 2006 Mar;123(3):267-74.
- (39) Sundar S, Rai M. Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 2002 Dec;15(6):593-8.
- (40) Brasil.Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 3 ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
- (41) Jeronimo SM, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994 Jul;88(4):386-8.
- (42) Reed SG, Badaro R, Masur H, Carvalho EM, Lorencó R, Lisboa A, et al. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1986 Jan;35(1):79-85.
- (43) Montenegro J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. *Archives Dermatol Syphilis* 1926;13:187-94.
- (44) Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002 Sep;9(5):951-8.
- (45) Lockwood DN, Sundar S. Serological tests for visceral leishmaniasis. *BMJ* 2006 Oct 7;333(7571):711-2.
- (46) Maurya R, Singh RK, Kumar B, Salotra P, Rai M, Sundar S. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. *J Clin Microbiol* 2005 Jul;43(7):3038-41.
- (47) Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005 Oct 29;366(9496):1561-77.
- (48) Olliaro PL, Guerin PJ, Gerstl S, Haaskjold AA, Rottingen JA, Sundar S. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. *Lancet Infect Dis* 2005 Dec;5(12):763-74.
- (49) Bacellar O, D'oliveira A, Jr., Jeronimo S, Carvalho EM. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine* 2000 Aug;12(8):1228-31.



- (50) Murray HW, Rubin BY, Rothermel CD. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *J Clin Invest* 1983 Oct;72(4):1506-10.
- (51) Nylen S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol* 2007 Sep;28(9):378-84.
- (52) Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, Van WJ, Brodskyn C, et al. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis* 2005;5:113.
- (53) Peruhype-Magalhaes V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva LA, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol* 2006 Oct;146(1):124-32.
- (54) Sundar S, Rosenkaimer F, Lesser ML, Murray HW. Immunochemotherapy for a systemic intracellular infection: accelerated response using interferon-gamma in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1995 Apr;171(4):992-6.
- (55) Murray HW, Moreira AL, Lu CM, DeVecchio JL, Matsushashi M, Ma X, et al. Determinants of response to interleukin-10 receptor blockade immunotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 2003 Aug 1;188(3):458-64.
- (56) Wu J, Cunha FQ, Liew FY, Weiser WY. IL-10 inhibits the synthesis of migration inhibitory factor and migration inhibitory factor-mediated macrophage activation. *J Immunol* 1993 Oct 15;151(8):4325-32.
- (57) Nylen S, Maurya R, Eidsmo L, Manandhar KD, Sundar S, Sacks D. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. *J Exp Med* 2007 Apr 16;204(4):805-17.
- (58) Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, et al. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med* 2007 Feb 19;204(2):273-83.
- (59) Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks D. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 2007 Feb 19;204(2):285-97.

- (60) Gantt KR, Schultz-Cherry S, Rodriguez N, Jeronimo SM, Nascimento ET, Goldman TL, et al. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *J Immunol* 2003 Mar 1;170(5):2613-20.
- (61) Somanna A, Mundodi V, Gedamu L. Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from *Leishmania donovani* complex. Evidence for the activation of latent transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 2002 Jul 12;277(28):25305-12.
- (62) Lipoldova M, Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat Rev Genet* 2006 Apr;7(4):294-305.
- (63) Jeronimo SM, Duggal P, Ettinger NA, Nascimento ET, Monteiro GR, Cabral AP, et al. Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genomewide scan. *J Infect Dis* 2007 Oct 15;196(8):1261-9.
- (64) Evans TG, Teixeira MJ, Sousa AQ, Pearson RD. Short report: extended follow-up of the natural history of persons infected with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 1995 Oct;53(4):360-1.
- (65) Peacock CS, Collins A, Shaw MA, Silveira F, Costa J, Coste CH, et al. Genetic epidemiology of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil. *Genet Epidemiol* 2001 Apr;20(3):383-96.
- (66) Blackwell JM. Genetics of host resistance and susceptibility to intramacrophage pathogens: a study of multicase families of tuberculosis, leprosy and leishmaniasis in north-eastern Brazil. *Int J Parasitol* 1998 Jan;28(1):21-8.
- (67) Karplus TM, Jeronimo SM, Chang H, Helms BK, Burns TL, Murray JC, et al. Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. *Infect Immun* 2002 Dec;70(12):6919-25.
- (68) Jeronimo SM, Holst AK, Jamieson SE, Francis R, Martins DR, Bezerra FL, et al. Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. *Genes Immun* 2007 Oct;8(7):539-51.
- (69) Bucheton B, Abel L, El-Safi S, Kheir MM, Pavek S, Lemainque A, et al. A major susceptibility locus on chromosome 22q12 plays a critical role in the control of kala-azar. *Am J Hum Genet* 2003 Nov;73(5):1052-60.
- (70) Gantt KR, Schultz-Cherry S, Rodriguez N, Jeronimo SM, Nascimento ET, Goldman TL, et al. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*:

- importance for parasite survival in macrophages. *J Immunol* 2003 Mar 1;170(5):2613-20.
- (71) Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, et al. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 2003 Aug 31;130(2):65-74.
- (72) Cerf BJ, Jones TC, Badaro R, Sampaio D, Teixeira R, Johnson WD, Jr. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1987 Dec;156(6):1030-3.
- (73) Dye C, Williams BG. Malnutrition, age and the risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revisited. *Proc Biol Sci* 1993 Oct 22;254(1339):33-9.
- (74) Perez H, Malave I, Arredondo B. The effects of protein malnutrition on the course of *Leishmania mexicana* infection in C57Bl/6 mice: nutrition and susceptibility to leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 1979 Dec;38(3):453-60.
- (75) Anstead GM, Chandrasekar B, Zhang Q, Melby PC. Multinutrient undernutrition dysregulates the resident macrophage proinflammatory cytokine network, nuclear factor-kappaB activation, and nitric oxide production. *J Leukoc Biol* 2003 Dec;74(6):982-91.
- (76) Bhutta ZA, Black RE, Brown KH, Gardner JM, Gore S, Hidayat A, et al. Prevention of diarrhea and pneumonia by zinc supplementation in children in developing countries: pooled analysis of randomized controlled trials. Zinc Investigators' Collaborative Group. *J Pediatr* 1999 Dec;135(6):689-97.
- (77) Richard SA, Zavaleta N, Caulfield LE, Black RE, Witzig RS, Shankar AH. Zinc and iron supplementation and malaria, diarrhea, and respiratory infections in children in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 2006 Jul;75(1):126-32.
- (78) Shankar AH, Genton B, Baisor M, Paino J, Tamja S, Adiguma T, et al. The influence of zinc supplementation on morbidity due to *Plasmodium falciparum*: a randomized trial in preschool children in Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg* 2000 Jun;62(6):663-9.
- (79) Shankar AH, Prasad AS. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr* 1998 Aug;68(2 Suppl):447S-63S.
- (80) Prasad AS, Beck FW, Grabowski SM, Kaplan J, Mathog RH. Zinc deficiency: changes in cytokine production and T-cell subpopulations in patients with head and neck cancer and in noncancer subjects. *Proc Assoc Am Physicians* 1997 Jan;109(1):68-77.

- (81) Van WJ, Santana G, D'oliveira A, Jr., Santos AF, Jr., Costa CH, Carvalho EM, et al. Zinc/copper imbalance reflects immune dysfunction in human leishmaniasis: an ex vivo and in vitro study. *BMC Infect Dis* 2004 Nov 17;4:50.
- (82) Kocyigit A, Erel O, Gurel MS, Avci S, Aktepe N. Alterations of serum selenium, zinc, copper, and iron concentrations and some related antioxidant enzyme activities in patients with cutaneous leishmaniasis. *Biol Trace Elem Res* 1998 Dec;65(3):271-81.
- (83) Kocyigit A, Erel O, Seyrek A, Gurel MS, Aktepe N, Avci S, et al. Effects of antimonial therapy on serum zinc, copper and iron concentrations in patients with cutaneous Leishmaniasis in Turkey. *J Egypt Soc Parasitol* 1998 Apr;28(1):133-42.
- (84) Kocyigit A, Gur S, Erel O, Gurel MS. Associations among plasma selenium, zinc, copper, and iron concentrations and immunoregulatory cytokine levels in patients with cutaneous leishmaniasis. *Biol Trace Elem Res* 2002;90(1-3):47-55.
- (85) Spietsma JE. Zinc-controlled Th1/Th2 switch significantly determines development of diseases. *Med Hypotheses* 1997 Jul;49(1):1-14.
- (86) Combs GFJ. Vitaminas. In: Mahan LK, Escott-Stump S, editors. *Krause. Alimentos, Nutrição e Dietoterapia*. 10<sup>a</sup> ed. 2002. p. 65-105.
- (87) Semba RD. Vitamin A, immunity, and infection. *Clin Infect Dis* 1994 Sep;19(3):489-99.
- (88) Pilch SM. Analysis of vitamin A data from the health and nutrition examination surveys. *J Nutr* 1987 Apr;117(4):636-40.
- (89) Fawzi WW, Chalmers TC, Herrera MG, Mosteller F. Vitamin A supplementation and child mortality. A meta-analysis. *JAMA* 1993 Feb 17;269(7):898-903.
- (90) Glasziou PP, Mackerras DE. Vitamin A supplementation in infectious diseases: a meta-analysis. *BMJ* 1993 Feb 6;306(6874):366-70.
- (91) World Health Organization, UNICEF. *Vitamin A supplements: a guide to their use in the treatment and prevention of vitamin A deficiency and xerophthalmia*. Geneva: World Health Organization; 1997.
- (92) World Health Organization. *Integration of vitamin A supplementation with immunization: policy and programme implications*. New York: UNICEF; 1998.

- (93) Graebner IT, Saito CH, de Souza EM. Biochemical assessment of vitamin A in schoolchildren from a rural community. *J Pediatr (Rio J)* 2007 May;83(3):247-52.
- (94) Ferraz IS, Daneluzzi JC, Vannucchi H, Jordao AA, Jr., Ricco RG, Del Ciampo LA, et al. Detection of vitamin A deficiency in Brazilian preschool children using the serum 30-day dose-response test. *Eur J Clin Nutr* 2004 Oct;58(10):1372-7.
- (95) Martins M, Santos L, Assis A. Prevalência da hipovitaminose A em pré-escolares no Estado de Sergipe, 1998. *Rev Saúde Pública* 2004 Jan 1;38(4):537-42.
- (96) Paiva A, Rondó P, Gonçalves-Carvalho C, Illison V, Vaz-de-Lima L, Oliveira C, et al. Prevalência de deficiência de vitamina A e fatores associados em pré-escolares de Teresina, Piauí, Brasil. *Cad Saude Publica* 2006 Jan 7;22(9):1979-87.
- (97) Santos M, Rezende E, Lamounier J, Galvão M, Bonomo E, Leite R. Hipovitaminose A em escolares da zona rural de Minas Gerais. *Rev Nutr* 2005 Jan 6;18(3):331-9.
- (98) Rahman MM, Vermund SH, Wahed MA, Fuchs GJ, Baqui AH, Alvarez JO. Simultaneous zinc and vitamin A supplementation in Bangladeshi children: randomised double blind controlled trial. *BMJ* 2001 Aug 11;323(7308):314-8.
- (99) Sommer A, Davidson FR. Assessment and control of vitamin A deficiency: the Annecy Accords. *J Nutr* 2002 Sep;132(9 Suppl):2845S-50S.
- (100) Stephensen CB. Vitamin A, beta-carotene, and mother-to-child transmission of HIV. *Nutr Rev* 2003 Aug;61(8):280-4.
- (101) Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song SY. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 2004 Oct;21(4):527-38.
- (102) Blomhoff HK, Smeland EB, Erikstein B, Rasmussen AM, Skrede B, Skjonsberg C, et al. Vitamin A is a key regulator for cell growth, cytokine production, and differentiation in normal B cells. *J Biol Chem* 1992 Nov 25;267(33):23988-92.
- (103) Naderi S, Wang JY, Chen TT, Gutzkow KB, Blomhoff HK. cAMP-mediated inhibition of DNA replication and S phase progression: involvement of Rb, p21Cip1, and PCNA. *Mol Biol Cell* 2005 Mar;16(3):1527-42.
- (104) Ertesvag A, Engedal N, Naderi S, Blomhoff HK. Retinoic acid stimulates the cell cycle machinery in normal T cells: involvement of retinoic acid

- receptor-mediated IL-2 secretion. *J Immunol* 2002 Nov 15;169(10):5555-63.
- (105) Cippitelli M, Ye J, Viggiano V, Sica A, Ghosh P, Gulino A, et al. Retinoic acid-induced transcriptional modulation of the human interferon-gamma promoter. *J Biol Chem* 1996 Oct 25;271(43):26783-93.
- (106) Cantorna MT, Nashold FE, Hayes CE. In vitamin A deficiency multiple mechanisms establish a regulatory T helper cell imbalance with excess Th1 and insufficient Th2 function. *J Immunol* 1994 Feb 15;152(4):1515-22.
- (107) Mitra AK, Alvarez JO, Stephensen CB. Increased urinary retinol loss in children with severe infections. *Lancet* 1998 Apr 4;351(9108):1033-4.
- (108) Mitra AK, Wahed MA, Chowdhury AK, Stephensen CB. Urinary retinol excretion in children with acute watery diarrhoea. *J Health Popul Nutr* 2002 Mar;20(1):12-7.
- (109) Lawrence RM, Pane CA. Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2007 Jan;37(1):7-36.
- (110) Brown KH, Black RE, Lopez de RG, Creed de KH. Infant-feeding practices and their relationship with diarrheal and other diseases in Huascar (Lima), Peru. *Pediatrics* 1989 Jan;83(1):31-40.
- (111) Monte CM, Giugliani ER. [Recommendations for the complementary feeding of the breastfed child]. *J Pediatr (Rio J)* 2004 Nov;80(5 Suppl):S131-S141.
- (112) Chen A, Rogan WJ. Breastfeeding and the risk of postneonatal death in the United States. *Pediatrics* 2004 May;113(5):e435-e439.
- (113) Ruiz-Palacios GM, Calva JJ, Pickering LK, Lopez-Vidal Y, Volkow P, Pezzarossi H, et al. Protection of breast-fed infants against *Campylobacter* diarrhea by antibodies in human milk. *J Pediatr* 1990 May;116(5):707-13.
- (114) World Health Organization. Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes. Geneva: World Health Organization; 1996.
- (115) Kramer MS, Kakuma R. Optimal duration of exclusive breastfeeding. *Cochrane Database Syst Rev* 2002;(1):CD003517.
- (116) Brasil.Ministério da Saúde. Guia Alimentar para crianças menores de dois anos. Brasília: Ministério da Saúde; 2002.

- (117) Perez-Escamilla R. Breastfeeding and the nutritional transition in the Latin American and Caribbean Region: a success story? *Cad Saude Publica* 2003;19 Suppl 1:S119-S127.
- (118) Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 1993 Apr 10;341(8850):938-41.
- (119) Ho JJ. Late onset infection in very low birth weight infants in Malaysian Level 3 neonatal nurseries. Malaysian Very Low Birth Weight Study Group. *Pediatr Infect Dis J* 2001 Jun;20(6):557-60.
- (120) Lima MC, Motta ME, Santos EC, Pontes da Silva GA. Determinants of impaired growth among hospitalized children: a case-control study. *Sao Paulo Med J* 2004 May 6;122(3):117-23.
- (121) Victora CG, Smith PG, Vaughan JP, Nobre LC, Lombardi C, Teixeira AM, et al. Influence of birth weight on mortality from infectious diseases: a case-control study. *Pediatrics* 1988 Jun;81(6):807-11.
- (122) Kramer MS. Determinants of low birth weight: methodological assessment and meta-analysis. *Bull World Health Organ* 1987;65(5):663-737.
- (123) World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva: World Health Organization; 1995.
- (124) Surles RL, Li J, Tanumihardjo SA. The modified-relative-dose-response values in serum and milk are positively correlated over time in lactating sows with adequate vitamin A status. *J Nutr* 2006 Apr;136(4):939-45.
- (125) Tanumihardjo SA, Cheng JC, Permaesih D, Muherdiyantiningsih, Rustan E, Muhilal, et al. Refinement of the modified-relative-dose-response test as a method for assessing vitamin A status in a field setting: experience with Indonesian children. *Am J Clin Nutr* 1996 Dec;64(6):966-71.
- (126) Tanumihardjo SA, Barua AB, Olson JA. Use of 3,4-didehydroretinol to assess vitamin A status in rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1987;57(2):127-32.
- (127) Valentine AR, Tanumihardjo SA. Adjustments to the modified relative dose response (MRDR) test for assessment of vitamin A status minimize the blood volume used in piglets. *J Nutr* 2004 May;134(5):1186-92.
- (128) Núcleo de Estudos e Pesquisa em Alimentação - NEPA. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO. Campinas: NEPA-UNICAMP; 2006.
- (129) MERCK. The MERCK Index. 11 ed. Rahway, New Jersey, USA: MERCK & Co., Inc; 1989.

- (130) Ballew C, Bowman BA, Sowell AL, Gillespie C. Serum retinol distributions in residents of the United States: third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Clin Nutr* 2001 Mar;73(3):586-93.
- (131) Aquino F, Amorim A, Prata L, Nascimento R. Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos* 2004;24(1):32-8.
- (132) Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* 2004;27(5):771-80.
- (133) Thurnham DI, McCabe GP, Northrop-Clewes CA, Nestel P. Effects of subclinical infection on plasma retinol concentrations and assessment of prevalence of vitamin A deficiency: meta-analysis. *Lancet* 2003 Dec 20;362(9401):2052-8.
- (134) Sokal JE. Editorial: Measurement of delayed skin-test responses. *N Engl J Med* 1975 Sep 4;293(10):501-2.
- (135) Kolsteren PW, Kusin JA, Kardjati S. Morbidity and growth performance of infants in Madura, Indonesia. *Ann Trop Paediatr* 1997 Sep;17(3):201-8.
- (136) Costa CH, Pereira HF, Araujo MV. [Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980-1986]. *Rev Saude Publica* 1990 Oct;24(5):361-72.
- (137) Silva E, Gontijo C, Pacheco R, Fiuzza V, Brazil R. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96(3):285-91.
- (138) Jeronimo SM, Teixeira MJ, Sousa A, Thielking P, Pearson RD, Evans TG. Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: long-term follow-up. *Clin Infect Dis* 2000 Mar;30(3):608-9.
- (139) Bern C, Amann J, Haque R, Chowdhury R, Ali M, Kurkjian KM, et al. Loss of leishmanin skin test antigen sensitivity and potency in a longitudinal study of visceral leishmaniasis in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 2006 Oct;75(4):744-8.
- (140) Bern C, Chowdhury R. The epidemiology of visceral leishmaniasis in Bangladesh: prospects for improved control. *Indian J Med Res* 2006 Mar;123(3):275-88.
- (141) Evans T, Reis MF, de Alencar JE, Naidu TG, de Jesus JA, McAuliffe JF, et al. American visceral leishmaniasis (kala-azar). *West J Med* 1985 Jun;142(6):777-81.



- (142) Pastorino AC, Jacob CM, Oselka GW, Carneiro-Sampaio MM. [Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects]. *J Pediatr (Rio J)* 2002 Mar;78(2):120-7.
- (143) Batista-Filho M, Rissin A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Cad Saúde Pública* 2008;19(S1):181-91.
- (144) Schram J, Oliveira A, Leite I, Valente J, Gadelha A, Portela M, et al. Transição epidemiológica e o estudo de carga de doença no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva* 2004;9(4):897-908.
- (145) Brasil.Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome. Chamada nutricional: um estudo sobre a situação nutricional das crianças do semi-árido brasileiro. Brasília, DF: Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome, Secretaria de Avaliação e Gestão da Informação; 2005.
- (146) Vasconcelos FAG. Avaliação nutricional de coletividades. 2 ed. Florianópolis: DAUFSC; 2000.
- (147) Friedman JF, Kwena AM, Mirel LB, Kariuki SK, Terlouw DJ, Phillips-Howard PA, et al. Malaria and nutritional status among pre-school children: results from cross-sectional surveys in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 2005 Oct;73(4):698-704.
- (148) Pelletier DL, Frongillo EA, Jr., Schroeder DG, Habicht JP. The effects of malnutrition on child mortality in developing countries. *Bull World Health Organ* 1995;73(4):443-8.
- (149) Brasil.SINAN.CVS.MS. Casos confirmados de leishmaniose visceral, segundo UF de residência. Brasil, grandes regiões e unidades. Portal da Saúde 2007 September 18 [cited 2008 Jan 3];Available from: URL: [www.portal.saude.gov.br](http://www.portal.saude.gov.br)
- (150) Biesalski HK, Frank J, Beck SC, Heinrich F, Illek B, Reifen R, et al. Biochemical but not clinical vitamin A deficiency results from mutations in the gene for retinol binding protein. *Am J Clin Nutr* 1999 May;69(5):931-6.
- (151) Waits RP, Yamada T, Uemichi T, Benson MD. Low plasma concentrations of retinol-binding protein in individuals with mutations affecting position 84 of the transthyretin molecule. *Clin Chem* 1995 Sep;41(9):1288-91.
- (152) Golzio C, Martinovic-Bouriel J, Thomas S, Mougou-Zrelli S, Grattagliano-Bessieres B, Bonniere M, et al. Matthew-Wood syndrome is caused by truncating mutations in the retinol-binding protein receptor gene STRA6. *Am J Hum Genet* 2007 Jun;80(6):1179-87.

- (153) Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, et al. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* 2007 Feb 9;315(5813):820-5.
- (154) Tanumihardjo SA, Furr HC, Erdman JW, Jr., Olson JA. Use of the modified relative dose response (MRDR) assay in rats and its application to humans for the measurement of vitamin A status. *Eur J Clin Nutr* 1990 Mar;44(3):219-24.
- (155) Tchum SK, Tanumihardjo SA, Newton S, de BB, Owusu-Agyei S, Arthur FK, et al. Evaluation of vitamin A supplementation regimens in Ghanaian postpartum mothers with the use of the modified-relative-dose-response test. *Am J Clin Nutr* 2006 Dec;84(6):1344-9.

## ABSTRACT

*Leishmania chagasi* infection presents a wide spectrum of clinical outcomes, ranging from asymptomatic self resolving infection to disease, visceral leishmaniasis (VL). The exact mechanisms that lead the evolution of infection to disease are not understood. It is believed that malnutrition is a risk factor associated with VL development, although there are few human studies in the area. We aimed to assess the nutritional factors associated with the response to *L. chagasi* infection in Rio Grande do Norte. The study was conducted from December 2006 to January 2008. 149 children were assessed: 20 active VL cases, 33 children with VL history, 40 DTH+ asymptomatic children and 56 DTH-. Nutritional status was assessed using z scores for Weight/Age, Weight/Height, Height/Age, Body Mass Index (BMI), and mid-upper arm circumference/height (MUAC/height). Vitamin A status was determined by serum retinol concentrations and the modified-relative-dose-response test (MRDR). Breastfeeding time and birth weight were also evaluated. VL children presented compromised nutritional status when compared to the other groups using BMI and MUAC/age, with means  $-1,53 \pm 1,10$  and  $-1,48 \pm 1,28$  z scores, respectively (ANOVA,  $p < 0,05$ ). VL children also showed lower vitamin A levels: 43% presented serum retinol  $< 20 \mu\text{g/dL}$  and 15% MRDR  $> 0,060$ . Birth weight was inversely associated with the risk to belong the VL group ( $\beta = -0,00$ ; OR = 0,84; 95% CI 0,73 - 0,99;  $p = 0,047$ ), whereas more breastfeeding time was directly associated with the risk to belong to the DTH+ group ( $\beta = 0,02$ ; OD = 1,16; 95% CI 1,01 - 1,33;  $p = 0,036$ ). The nutritional variables evaluated were associated with the response to the *L. chagasi* infection, with malnutrition and compromised vitamin A status as markers of children who present with VL. Higher birth weight was associated with protection to disease, and higher breastfeeding time was associated with increased likelihood of an asymptomatic infection. The results show that modifiable nutritional aspects in the study population are associated with the response to the *L. chagasi* infection.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)