

DÉBORA CARDOZO BONFIM CARBONE

**DINÂMICA DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE  
ZINCO DURANTE O TRATAMENTO DE CRIANÇAS  
PORTADORAS DE LEISHMANIOSE VISCERAL**

CAMPO GRANDE

2013

DÉBORA CARDOZO BONFIM CARBONE

**DINÂMICA DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE  
ZINCO DURANTE O TRATAMENTO DE CRIANÇAS  
PORTADORAS DE LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Lourdes Z. Z. Consolo

CAMPO GRANDE

2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

DÉBORA CARDOZO BONFIM CARBONE

**DINÂMICA DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE  
ZINCO DURANTE O TRATAMENTO DE CRIANÇAS  
PORTADORAS DE LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado \_\_\_\_\_

Campo Grande (MS), \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Professora Doutora **Lourdes Zélia Zanoni Consolo** uma grande orientadora e pesquisadora, detentora de um conhecimento inquestionável. Obrigada por ter acreditado em mim e por ter toda essa paciência comigo. Obrigada por todos os momentos de discussões científicas, acompanhados de conselhos pessoais e boas histórias para descontração.

Agradeço ao Professor **Petr Melnikov**, pelo aprendizado nas nossas discussões científicas.

Agradeço à equipe de enfermagem e médica do CTI pediátrico, grandes amigos, pelo entendimento nas ausências e em seus conselhos neste momento importante da minha vida obrigado pela ajuda cotidiana na realização da dissertação e pelo meu crescimento humano e profissional.

Agradeço a equipe de técnicos do laboratório central em especial Valdeir Silva.

Aos residentes da pediatria do ano de 2012 pela contribuição.

Obrigada a minha amiga Paula Cristhina Niz Xavier pela paciência e sempre disposta a transmitir seus conhecimentos.

Agradeço ao Anderson Fernandes da Silva um amigo leal e técnico do laboratório de minerais que tanto me auxiliou sendo nas análises, nas discussões científicas, quanto nos desabafos.

As minhas amigas e professoras da UCDB que tanto me incentivavam e apoiaram para esta realização.

Agradeço a equipe administrativa da pós-graduação, Vera, Áurea. Aos demais membros técnicos não citados destas instituições ficam o meu agradecimento.

Também agradeço a técnica Camila Bolonhesa do laboratório de pediatria que me ajudava com as técnicas realizadas no laboratório.

## DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a **Deus**, a fonte da qual procuro toda minha fé e força para encarar cada desafio, sempre buscando conforto e sabedoria nas horas necessárias. Ao meu esposo **Rafael Francisco Rosa Carbone**, meu fiel companheiro na hora da tribulação. A minha filha, **Julia Bonfim Carbone**, que muitas vezes foi privada da minha atenção. Aos meus pais, **David Viana Bonfim e Josefa Cardozo Bonfim (*in memoriam*)** que sempre me incentivaram e me deram a vida para que eu pudesse realizar todos os meus sonhos e honro pelo esforço e dedicação. Aos meus irmãos **Davis Cardozo Bonfim e Daise Cardozo Bonfim** que sempre me apoiaram e entenderam minha ausência. A minha sogra **Maria de Lourdes Rosa Carbone** que exerceu importante papel de mãe para minha filha na minha ausência.

## RESUMO

**Carbone DCB. Dinâmica das concentrações plasmáticas de zinco durante o tratamento de crianças portadoras de leishmaniose visceral.** Campo Grande; 2013 [Dissertação – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul].

O zinco é um mineral importante para o metabolismo humano e está relacionado com a função adequada do sistema imunológico, influenciando positivamente na evolução do quadro de infecção bacteriana ou viral. Devido ao seu papel central no funcionamento do sistema imune, indivíduos com deficiência deste mineral apresentam maior susceptibilidade à uma variedade de patógenos, dentre eles os parasitas intracelulares. Nos pacientes portadores de leishmaniose visceral o estado nutricional e os processos infecciosos associados atuam influenciando desfavoravelmente a evolução da doença. O presente estudo tem a finalidade de explorar a dinâmica das concentrações plasmáticas do zinco plasmático em crianças portadoras de leishmaniose visceral. Entre setembro de 2011 e novembro de 2012, 29 crianças de ambos os gêneros foram incluídas no estudo e divididas em dois grupos, de acordo com o uso de anfotericina B ou antimoniato de N-metilglucamina. Os parâmetros do estudo foram a idade, estado nutricional, concentração plasmática de zinco, concentração de hemoglobina, número de leucócitos e plaquetas, concentração de AST, ALT e hepatoesplenomegalia. Estes dados foram avaliados no primeiro (T0), sétimo (T7) e vigésimo (T20) dias da internação. Os resultados evidenciaram que, no momento da admissão, 31% dos pacientes apresentavam déficit nutricional e 24,1% apresentavam baixa concentração plasmática de zinco, que não variou significativamente entre os grupos durante o estudo. A evolução do hemograma, aminotransferases e visceromegalia foi àquela esperada para a doença. As correlações do zinco plasmático com as variáveis clínicas e laboratoriais estudadas foram de baixa a média intensidade. Na criança com leishmaniose visceral, a desnutrição e as infecções são frequentes e constituem fatores de risco



para complicações e óbito. Concluindo, a deficiência de zinco acompanha um número expressivo de crianças portadoras de leishmaniose visceral, evidenciando a necessidade de avaliação laboratorial e suplementação quando indicado.

Palavras chaves: Leishmaniose visceral, zinco, desnutrição, criança.

## **ABSTRACT**

**Carbone DCB. Dinâmica das concentrações plasmáticas de zinco durante o tratamento de crianças portadoras de leishmaniose visceral.** Campo Grande; 2013 [Dissertação – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul].

Zinc is an important mineral for the human metabolism and is associated with proper function of the immune system, influencing positively in the evolution of bacterial or viral infections. Due to its central role in the functioning of the immune system, individuals with deficiency of this mineral have higher susceptibility to a variety of pathogens, including intracellular parasites. In patients with visceral leishmaniasis, the association of deficit nutritional and infectious processes acts unfavorably influencing the disease progression. This study aims to explore the dynamics of plasma zinc concentrations in children with visceral leishmaniasis. Between September 2011 and November 2012, 29 children of both genders were included in the study and divided into two groups according to the usage of amphotericin B or N-methylglucamine antimoniate. The parameters evaluated were: age, nutritional status, plasma zinc concentration, hemoglobin concentration, leukocyte and platelet concentration, AST, ALT and hepatosplenomegaly. These data were evaluated in the first (T0), seventh (T7) and twenty (T20) days of admission. The results showed that, on admission, 31% of patients had malnutrition and 24.1% had low plasma zinc, which did not changed significantly between groups during the study. The evolution of the hemogram, aminotransferases and visceromegaly was the expected for the disease. The correlations between plasma zinc with clinical and laboratory variables studied were low to medium intensity. In children with visceral leishmaniasis, malnourished and infections are common and constitute risk factors for complications and death. In this context, zinc supplementation appears to be beneficial for these patients. In conclusion, zinc deficiency follows a significant number of children with visceral leishmaniasis, suggesting the need for laboratory evaluation and supplementation when indicated.

Key words: visceral leishmaniasis, zinc, malnutrition, children

## LISTA DE TABELAS

|          |                                                                                                               |    |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 | Dados demográficos dos pacientes segundo os grupos de estudos valores disposto em média e desvio padrão.....  | 46 |
| Tabela 2 | Diagnósticos nutricionais dos pacientes de ambos os grupos participantes do estudo.....                       | 47 |
| Tabela 3 | Índice de correlação da concentração plasmática de zinco com variáveis clínicas e laboratoriais grupo A ..... | 60 |
| Tabela 4 | Índice de correlação da concentração plasmática de zinco com variáveis clínicas e laboratoriais grupo G.....  | 61 |

## LISTA DE FIGURAS

|          |                                                                                   |    |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 | Esquema da medida do baço e fígado.....                                           | 41 |
| Figura 2 | Variação da concentração média do zinco (mg/L) no grupo A e no grupo G.....       | 47 |
| Figura 3 | Variação da concentração média de hemoglobina (g/dL) no grupo A e no grupo G..... | 48 |
| Figura 4 | Variação da média do número de leucócitos no grupo A e no grupo G.....            | 49 |
| Figura 5 | Variação da concentração de plaquetas no grupo A e no grupo G.....                | 51 |
| Figura 6 | Variação da concentração média de AST no grupo A e no grupo G.....                | 52 |
| Figura 7 | Variação da concentração média de ALT (U/L) no grupo A e no grupo G.....          | 53 |
| Figura 8 | Variação média da área (cm <sup>2</sup> ) do baço no grupo A e no grupo G.....    | 55 |
| Figura 9 | Variação média do tamanho (cm) do fígado no grupo A e no grupo G.....             | 56 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

|                |                                  |
|----------------|----------------------------------|
| A/I            | ALTURA EM RELAÇÃO À IDADE        |
| AST            | ASPARTATO AMINOTRANSFERASE       |
| ALT            | ALANINA AMINOTRANSFERASE         |
| Ca             | CÁLCIO                           |
| Cu             | COBRE                            |
| DNA            | ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO        |
| Fe             | FERRO                            |
| IL             | INTERLEUCINA                     |
| IFN – $\alpha$ | FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA    |
| IFN- $\Gamma$  | FATOR DE NECROSE TUMORAL GAMA    |
| L.V            | LEISHMANIOSE VISCERAL            |
| L              | LEISHMANIA                       |
| $\mu$ l        | MICROLITRO                       |
| mg             | MILIGRAMA                        |
| g              | GRAMA                            |
| NHU            | NÚCLEO DE HOSPITAL UNIVERSITÁRIO |
| OMS            | ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE     |
| P/I            | PESO EM RELAÇÃO À IDADE          |
| P/A            | PESO EM RELAÇÃO À ALTURA         |

|        |                                         |
|--------|-----------------------------------------|
| RNA    | ÁCIDO RIBONUCLÉICO                      |
| RDI    | RECOMENDAÇÃO DE INGESTÃO DIÁRIA         |
| T0     | TEMPO 0                                 |
| T7     | TEMPO 7                                 |
| T20    | TEMPO 20                                |
| T      | LINFÓCITO TIMO DEPENDENTE               |
| CD4    | RECEPTOR CLUSTER OF DIFFERENCIATION 4   |
| CD8    | RECEPTOR CLUSTER OF DIFFERENCIATION 8   |
| Th1    | LINFÓCITO HELPER TIPO 1                 |
| Th2    | LINFÓCITO HELPER TIPO 2                 |
| UNICEF | FUNDO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A INFÂNCIA |
| Zn     | ZINCO                                   |
| ZIP4   | TRANSPORTADOR DE ZINCO                  |
| ZrT    | IRT-LIKE PROTEIN                        |

## SUMÁRIO

|          |                                            |           |
|----------|--------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                     | <b>16</b> |
| <b>2</b> | <b>REFERENCIALTEÓRICO.....</b>             | <b>19</b> |
|          | <b>2.1 Zinco.....</b>                      | <b>19</b> |
|          | 2.1.1 Zinco e sistema imunológico .....    | 23        |
|          | 2.2 Leishmaniose visceral.....             | 27        |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                      | <b>34</b> |
|          | 3.1 Objetivo geral.....                    | 34        |
|          | 3.2 Objetivos específicos.....             | 34        |
| <b>4</b> | <b>CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>           | <b>35</b> |
|          | 4.1 Tipo de estudo.....                    | 35        |
|          | 4.2 Período e local da pesquisa.....       | 35        |
|          | 4.3 Aspectos éticos.....                   | 35        |
|          | 4.4 Sujeitos da pesquisa .....             | 36        |
|          | 4.5 Coleta de dados.....                   | 36        |
|          | 4.5.1 Avaliação do estado nutricional..... | 36        |
|          | 4.5.2 Dados demográfico e clínicos.....    | 38        |
|          | 4.6 Análises laboratoriais.....            | 39        |
|          | 4.6.1 Amostras de sangue.....              | 39        |

|           |                                                                                                               |           |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|           | 4.6 Análise estatística.....                                                                                  | 42        |
| <b>5</b>  | <b>RESULTADOS.....</b>                                                                                        | <b>43</b> |
|           | 5.1 Caracterização das variáveis nutricionais.....                                                            | 44        |
|           | 5.2 Caracterização das variáveis laboratoriais.....                                                           | 45        |
|           | 5.2.1 Análise da concentração plasmática do zinco.....                                                        | 45        |
|           | 5.2.3 Análise da concentração plasmática de hemoglobina.....                                                  | 47        |
|           | 5.2.4 Análise do número de leucócitos.....                                                                    | 49        |
|           | 5.2.5 Análise do número de plaquetas.....                                                                     | 50        |
|           | 5.2.6 Análise da concentração plasmática de AST.....                                                          | 51        |
|           | 5.2.7 Análise da concentração plasmática de ALT.....                                                          | 53        |
|           | 5.3 Caracterização das variáveis clínicas.....                                                                | 54        |
|           | 5.3.1 Análise da área do baço entre os grupos.....                                                            | 54        |
|           | 5.3.2 Análise do tamanho do fígado entre os grupos.....                                                       | 55        |
|           | 5.4 Análise correlativa da concentração plasmática de zinco com as variáveis<br>clínicas e laboratoriais..... | 56        |
| <b>6</b>  | <b>DISCUSSÃO.....</b>                                                                                         | <b>59</b> |
| <b>7</b>  | <b>CONCLUSÃO.....</b>                                                                                         | <b>68</b> |
| <b>8</b>  | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                        | <b>69</b> |
| <b>9</b>  | <b>APÊNDICE .....</b>                                                                                         | <b>81</b> |
| <b>10</b> | <b>ANEXO.....</b>                                                                                             | <b>82</b> |
|           | 10.1 Aprovação do Comitê de Ética em Seres Humanos.....                                                       | 82        |



## 1 INTRODUÇÃO

O zinco (Zn) é um importante mineral que está presente em todos os órgãos, tecidos e fluidos corporais, atuando em muitas funções do organismo humano, como parte de mais de 300 enzimas. A deficiência de Zn é um problema nutricional que está presente tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. Dentre as manifestações clínicas da deficiência do zinco estão, além do retardo no crescimento, alterações na resposta imune (PRASAD, 1996).

O sistema imunológico compreende a via principal de resposta do organismo humano frente à exposição a antígenos exógenos e endógenos. Esta via é imprescindível para defesa frente a infecções e é constituída por uma série de células e moléculas distribuídas por todo organismo.

Em estudo com adultos portadores de deficiência moderada de zinco foi demonstrado alterações do sistema imunológico, como diminuição da atividade da timulina, da relação entre células TCD4/TCD8, redução na produção de interleucina 2 (IL2) e da atividade das células *natural killers*, responsáveis pela defesa celular. Essas alterações foram prontamente corrigidas com a suplementação desse elemento (PRASAD, 1988).

Está bem estabelecido que a suplementação de Zn é positiva tanto na prevenção de infecções respiratórias agudas, como também é bastante eficaz na evolução dos quadros de pneumonia aguda e diarreia infecciosa (BHUTTA *et al.*, 1999; LAZZERINI, 2008).

Devido ao seu papel no funcionamento do sistema imune, indivíduos com deficiência deste mineral apresentam maior susceptibilidade a uma variedade de

patógenos, dentre eles os parasitas intracelulares (SPRIETSMA, 1997).

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é uma antroponose causada por um parasita do gênero *Leishmania*. Esta doença apresenta uma distribuição mundial, sendo endêmica em 65 países (DESJEUX, 2004). A forma visceral da doença ocorre quando o hospedeiro falha em desenvolver uma resposta imunológica protetora e eficaz contra o parasita, podendo ser fatal se não tratada adequadamente (BACELLAR *et al.*, 2000).

A importância da LV está correlacionada não apenas à sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mais à possibilidade de evolução para as formas graves e letais quando associada a infecções e deficiências nutricionais concomitantes (GONTIJO & MELO, 2004).

O estado nutricional de indivíduos infectados por *Leishmania* spp. tem papel decisivo no modo da evolução clínica da doença, especialmente em crianças. O risco de desenvolver a forma grave da doença pode ser em torno de oito vezes maior em crianças com comprometimento do estado nutricional (CERF *et al.*, 1987).

O estado nutricional é um dos principais moduladores da resposta imune e tanto a deficiência dos macronutrientes como de micronutrientes podem contribuir para uma resposta ineficaz. Os mecanismos envolvidos na relação entre desnutrição protéica calórica e resposta imunológica são múltiplos. O déficit nutricional desencadeia danos estruturais e funcionais do timo, diminuição dos linfócitos T funcionais e redução das células T de memória à antígenos. As deficiências nutricionais afetam também a função fagocítica dos neutrófilos, citocinas, função do sistema complemento, bem como afinidade do anticorpo contra o antígeno (FOCK *et al.*, 2007; SAVINO, 2002; KEUSCH, 2003).

Na leishmaniose visceral, o processo de eliminação da leishmania, que é um parasita intracelular, envolve uma resposta imunológica tipo Th1. Em modelos experimentais de leishmaniose a resposta tipo Th1 preferencial conduz a cura da infecção ao passo que a resposta tipo Th2 resulta no desenvolvimento da doença. Em voluntários humanos não portadores de LV, a baixa concentração plasmática do zinco está relacionada com deficiência seletiva na resposta tipo Th1, mas poucos estudos estão disponíveis demonstrando o comportamento deste mineral nos quadros de LV (PRASAD, 2008).

O interesse por este micronutriente tem sido evidenciado ultimamente pelo crescente número de publicações explorando suas ações em varias doenças infecciosas, tanto na prevenção como no tratamento desses processos patológicos.

A suplementação de Zn tem se mostrado benéfica na evolução das crianças com pneumonia e diarreia, reduzindo a morbidade e mortalidade, porém a avaliação deste elemento nas doenças infecto-parasitárias é escassa nos adultos e inexistente na faixa etária pediátrica.

A LV é uma doença que acomete predominantemente indivíduos de baixa renda, onde as deficiências nutricionais, dentre elas o zinco, geralmente estão presentes. Na faixa etária pediátrica, estudos envolvendo o comportamento do zinco durante a evolução da LV não estão disponíveis na literatura.

Assim, o presente estudo tem a finalidade de explorar a dinâmica deste importante elemento traço em crianças com leishmaniose visceral.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Zinco

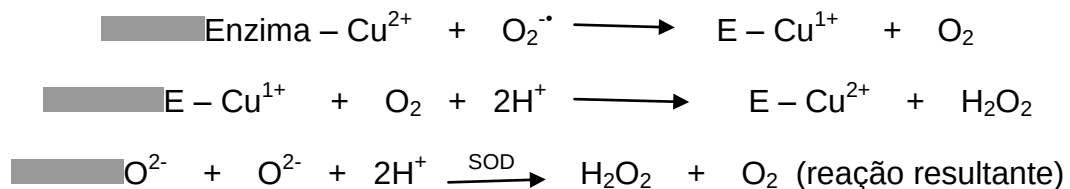
O zinco é um micronutriente essencial, presente em todos os órgãos, tecidos e fluidos corporais. Depois do ferro ele é o segundo elemento traço mais abundante no organismo humano, estando envolvido em várias funções catalíticas, estruturais e reguladoras (COZZOLINO, 2007).

Os elementos traços são aqueles que ocorrem nos tecidos humanos e animais em pequenas concentrações. Estes elementos atuam em várias reações químicas no organismo humano, participando diretamente no transporte de elétrons e como cofatores para uma ampla variedade de enzimas e como componente nas metaloproteínas. Por isso, sua homeostasia encontra-se sob rígido controle metabólico, a fim de manter adequadamente as funções fisiológicas. O conteúdo total de zinco no organismo varia de 1,5 a 2,5 g. Este elemento está presente em praticamente todos os órgãos, sendo sua maior parte concentrada nos ossos, músculos, fígado e pele (MILLS, 1988).

No sangue cerca de 80% do zinco é encontrado dentro dos eritrócitos e 16% no plasma (MAFRA & COZZOLINO, 2004). No leite humano a concentração deste elemento varia de  $0,24 \pm 0,11$  a  $0,45 \pm 0,3$  mg/L (MELNIKOV *et al.*, 2007).

Dentre as aproximadamente 300 enzimas das quais o zinco faz parte estão a anidrase carbônica, fosfatase alcalina, carboxipeptidases, álcool desidrogenase, superóxido dismutase, proteína C quinase, ácido ribonucleico polimerase e transcriptase reversa (SANDSTEAD, 1994; McCALL *et al.*, 2000).

Como exemplo, pode ser citado a enzima cobre-zinco superóxido dismutase (Cu-ZnSOD), que participa das reações de dismutação, passando alternadamente por oxidação e redução, conforme abaixo:



Esta enzima protege os componentes celulares da lesão oxidativa, convertendo os íons superóxido em peróxido de hidrogênio. Para sua ação catalítica, além dos íons de cobre, exige também a presença do zinco.

O zinco exerce ação fundamental na proliferação celular, cujos constituintes indispensáveis durante a síntese protéica são os ácidos nucléicos. Ele está presente no núcleo, nucléolo e cromossomos das células. As enzimas que participam da síntese de DNA e RNA são metaloenzimas que contêm zinco, entre elas a DNA-polimerase e RNA-transcriptase (MILLS, 1988).

O zinco forma um complexo funcional característico chamado “dedos de zinco,” que desempenha as mais variadas funções em muitos processos celulares como replicação, reparo, proliferação e apoptose. Os “dedos de zinco” agem como compassos moleculares e moldam um grande número de moléculas principalmente os ácidos nucléicos e proteínas (Krishna *et al.*, 2003).

O zinco tem ação direta como regulador da apoptose celular. Na apoptose normalmente as células envelhecidas e anormais enviam um sinal que ativa uma série de eventos intracelulares eliminando as mesmas. O zinco inibe a atividade de uma endonuclease, enzima que destrói o DNA e conseqüentemente a morte celular.

Na deficiência deste metal há uma maior atividade das endonucleases com ativação das caspases e mesmo as células relativamente sãs também entram no processo de apoptose (KEEN & GERSHWIN, 1990).

A fonte de zinco para os humanos é a sua dieta. Os alimentos diferem amplamente no seu conteúdo de Zn, sendo os crustáceos, carne bovina e outras carnes vermelha, nozes e legumes boas fontes desse elemento (SHILS *et al.*, 2003).

Os produtos de origem animal são responsáveis por prover de 40% a 70% do zinco consumido pela maioria das pessoas. Os alimentos integrais são fontes pobres desse nutriente. Durante o processo digestivo, os compostos contendo zinco necessitam ser hidrolisados antes da sua absorção. O ácido clorídrico desempenha um papel importante nesta função, pois, forma o íon tetraedro  $[ZnCl_4]^{-2}$  (tetraclorozinco) que segue para o duodeno onde é absorvido (STURNIOLO *et al.*, 1991).

Numerosos componentes alimentares podem se complexar com o íon zinco inibindo sua absorção, entre eles o fitato e oxalato, encontrado particularmente em vegetais e cereais integrais. Numerosos componentes alimentares podem se complexar com o zinco inibindo sua absorção, entre eles o fitato e oxalato, encontrado particularmente em vegetais e cereais integrais (FOOD *et al.*, 2002).

As recomendações diárias de ingestão de zinco para indivíduos saudáveis indicam as quantidades de 11mg para homens e de 8mg para mulheres. Os valores são de 5mg/dia para crianças até 1 ano e de 10mg/dia acima desta idade até 10 anos (RDI, 2001).

É absorvido em toda extensão do intestino delgado, principalmente no jejuno através de transporte mediado por carreadores localizados na borda "em escova"

dos enterócitos e pequenas quantidades são absorvidas no estômago (DUTRA-DE-OLIVEIRA, 1998; MILLER, 2001, OMS, 1998).

No enterócito a absorção é mediada por uma família de proteínas carreadoras, chamadas ZIP4. Outra família de transportadores de zinco, denominada ZnT, carreiam o elemento para fora do enterócito onde se liga à albumina que o transporta para o fígado através da circulação portal. A maior parte do zinco é retida pelo fígado onde este mineral está altamente concentrado e é utilizado na síntese de proteínas (WALKER *et al.*, 2005).

As intoxicações agudas pelo zinco são ocorrências extremamente raras, devido ao seu efeito emetizante, podendo ocorrer quando a quantidade ingerida ultrapassa 225 a 450mg/dia.

O zinco é excretado principalmente pelo trato gastrointestinal, rins e pele (suor). A maior parte é excretada através do trato gastrointestinal, nas fezes.

Os estados crônicos de deficiência de zinco levam ao aparecimento de diarreia, déficit do crescimento, lesões de pele, infecções e comprometimento do desempenho neuropsicológico (HAMBIDGE, 2003). O papel do zinco no desenvolvimento cognitivo também tem sido descrito, ressaltando a importância da adequação dietética na infância (SINGH, 2004).

O zinco participa da estrutura de várias enzimas gustativas, a sua deficiência também pode causar distúrbios do paladar e xerostomia, podendo comprometer a aceitação alimentar (FERNANDES & MAFRA, 2005).

Na população, as deficiências de elementos traços são mais comumente adquiridas e ocorrem como resultado de carências nutricionais, absorção intestinal insuficiente, perda ou utilização aumentada. As deficiências decorrentes de defeitos enzimáticos determinados geneticamente são raras (HENRY, 2008).

Quanto à dosagem laboratorial, o zinco pode ser determinado nos eritrócitos, leucócitos, plasma, cabelo, urina, bem como constituinte de algumas enzimas. Apesar das várias possibilidades de medir a concentração de zinco, o método preferencial é a dosagem plasmática, como indicador do estado corporal de zinco. Neste caso, a concentração plasmática do zinco considerada como normal varia entre 0,7 a 1,2 mg/L (WHO, UNICEF, IAEA e IZiNCG, 2007).

O organismo humano apresenta uma considerável capacidade de conservar os níveis plasmáticos de zinco estáveis como um dos aspectos do rigor homeostático, considerando as funções desempenhadas por este mineral. O *pool* de zinco no organismo se caracteriza por ser rapidamente intercambiável, ocorrendo uma compensação através da redução da sua excreção e/ou da sua redistribuição entre os compartimentos corporais. Uma das repercussões desta cinética, por exemplo, é a desaceleração do crescimento da criança frente ao déficit deste elemento. Por isso, é esperado que as alterações na concentração plasmática do zinco não ocorram até que o organismo esgote seus mecanismos de compensação.

O efeito da deficiência deste mineral em funções específica frequentemente se manifesta antes mesmo que seu declínio no plasma possa ser detectado. Isso se comprova pelos efeitos da sua suplementação (IBS & RINK, 2003). Por outro lado, a suplementação do mineral não altera necessariamente as concentrações no plasma, porém seus efeitos benéficos foram observados (CÔNSOLO, 2012).

No entanto, a concentração do zinco no limite inferior da normalidade nem sempre é considerada um indicador plenamente confiável de deficiências leve a moderada. A concentração de zinco sérico é mantida dentro do normal durante períodos curtos de depleção devido à alta eficiência dos mecanismos homeostáticos e, portanto, o zinco plasmático estará baixo nas depleções mais severas e



prolongadas. Por isso, alguns estudos consideram o valor de 0,80mg/L o ponto de corte inferior para avaliar a prevalência de deficiência de zinco (SENA & PEDROSA, 2005; YOKOI *et al*, 2007; COLE *et al*, 2010).

O diagnóstico da carência de zinco é feito, principalmente, com bases nas manifestações clínicas, tais como alterações do gosto, retardo de crescimento, hiporexia, anorexia, dermatite e hipogonadismo. Há evidências suficientes de que crianças desnutridas ganham peso mais rapidamente com a normalização dos níveis de zinco (PENNY *et al.*, 2004). Estas considerações fazem com que a suplementação deste mineral seja uma das prioridades clínicas no tratamento da desnutrição energético-protéica.

#### 2.1.1 Zinco e sistema imunológico

O sistema imune é constituído por células progenitoras mieloide e linfoide. As células progenitoras mieloides originam os granulócitos e as progenitoras linfóides originam os linfócitos T e B. Os linfócitos T estão envolvidos na resposta celular tipo Th1, com produção de citocinas como a IL2, interferon-  $\gamma$  e fator de necrose tumoral- $\beta$ . Esta resposta é eficaz contra patógenos intracelulares. Os linfócitos B quando estimulados produzem anticorpos que caracterizam a resposta humoral, com produção de imunoglobulinas (MACHADO *et al.*, 2004)

No sistema imunológico o zinco desempenha papel fundamental, pelo fato das células desse sistema apresentarem altas taxas de proliferação e este mineral está envolvido na tradução, transporte e replicação do DNA. A influência direta do

zinco no sistema imune acontece devido ao fato deste elemento estimular atividade de enzimas envolvidas no processo de mitose, como a DNA e a RNA polimerase, timidina quinase e outras (PRASAD, *et al.*, 2008; SALGUEIRO *et al.*, 2000).

O primeiro passo da resposta imune é o recrutamento de leucócitos presentes na corrente sanguínea para o local da infecção, via quimiotaxia, adesão e diapedese. Frente à deficiência de zinco a quimiotaxia e a fagocitose dos neutrófilos e macrófagos estão diminuídas, assim como as reações oxidativas bactericidas que ocorrem dentro destas células com o objetivo de eliminar o agente infectante (CHAVAKIS *et al.*, 1999).

A deficiência deste mineral também está relacionada à atrofia do timo, com menor produção de timulina, assim como comprometimento de outros órgãos linfóides envolvidos no sistema de defesa. Também está relatada alteração na maturação e diferenciação de linfócitos T e produção de células CD4+, cuja atividade biológica depende do zinco (PRASAD, *et al.*, 2008). Evidências experimentais demonstram diminuição na razão entre as células TCD4:CD8 durante a deficiência de zinco, além da diminuição de precursores de linfócitos-T citotóxicos. Esta modificação nas proporções de linfócitos pode contribuir para o desequilíbrio do sistema imune, afetando diretamente a defesa celular (SALGUEIRO *et al.*, 2000).

Quanto à função do linfócito B, a deficiência de zinco está relacionada à menor produção de imunoglobulina G e comprometimento da imunidade humoral (SHAKAR & PRASAD, 1998). De fato, essas alterações foram novamente relatadas por Prasad (2008) em indivíduos com deficiência de zinco onde a função das células Th1 diminuiu, evidenciada pela redução na produção de INF- $\gamma$ , IL-2 e fator de necrose tumoral, enquanto a função das células Th2, medida pela produção da IL-4, IL-6 e IL-10 não foi alterada. Assim, demonstraram que a deficiência desse mineral

provocou um desequilíbrio na relação entre as células Th1/Th2, além de comprometer o recrutamento das células *natural killer* alterando a resposta imune celular.

O papel do íon Zn no sistema imunológico, diz respeito principalmente à sua ação na redução de infecções, como pneumonia e diarreia. Em relação à diarreia aguda tem sido bem documentado que a suplementação desse mineral diminui os episódios diarreicos, assim como reduz a gravidade do quadro clínico (SINGH, 2004; SALGUEIRO, 2002; WALTER, 2004).

Segundo a OMS/UNICEF (2004), 12 estudos avaliaram o impacto da suplementação de 20mg de zinco no manejo da diarreia aguda. Desse número, 11 estudos mostraram diminuição na duração dos episódios diarreicos e em 5 estudos foi observado que ocorreu redução significativa do volume e da frequência das evacuações. Os dados desses 12 trabalhos demonstraram que a suplementação de zinco, durante todo processo diarreico tem impactos benéficos no curso clínico da doença aguda, reduzindo tanto a duração quanto a gravidade dos episódios.

Em relação ao resfriado comum, Prasad *et al.*, publicaram em 2008, estudo com cinquenta voluntários que fizeram uso de pastilhas com zinco, tendo ocorrido redução dos sintomas, como tosse corrimento nasal, dores musculares em comparação ao grupo placebo.

Valavi *et al.* (2011) em estudo duplo cego, randomizado com 128 crianças portadoras de pneumonia grave, suplementadas com 2mg/kg/dia zinco por cinco dias, notaram que a duração do período do quadro febril, da insuficiência respiratória e do tempo de internação foram significativamente menores no grupo suplementado do que no grupo controle.

Quanto às doenças infecciosas e parasitárias, que suscitam uma resposta imunológica tipo Th-1, o papel do zinco tem sido estudado em diversas situações como na hanseníase, malária, tuberculose e LV, sendo demonstrado de forma definitiva o papel do íon Zn como elemento chave neste tipo de resposta (SPRIETSMA, 1997).

Mishra *et al.* (2010) em estudo realizado na Índia observaram que em 88 casos de pacientes portadores de LV, 16 (75%) tinham concentração plasmática de zinco em relação a 35 casos sem a doença. Quando compararam pacientes de área endêmica e não endêmica para a mesma doença, 65% dos pacientes apresentavam concentração sérica baixa de Zn em comparação com 35% dos pacientes de área não endêmica. Concluíram que pessoas com concentração plasmática baixa de Zn têm maiores possibilidade de desenvolver a doença.

Assim, fica demonstrada, segundo a literatura, a importância do zinco para o organismo humano.

## **2.2 Leishmaniose visceral**

A LV é uma doença causada por um protozoário pertencente à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*, sendo a *L. donovani* de ocorrência na Índia e África, *L. infantum* no Mediterrâneo e *L. chagasi* no Brasil e América do Sul (CUNHA *et al.*, 2001).

A LV foi descrita pela primeira vez na Grécia em 1835. Foi na Índia, em 1869, que recebeu o nome “Kala-jwar” que quer dizer febre negra ou “Kala-azar” que

significa pele negra em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele que ocorre durante a doença (MARZOCHI, *et al.*, 1981).

Anos mais tarde, em 1900, Leishman e Donovan isolaram o protozoário do baço de um soldado indiano e de uma criança, respectivamente (LEISHMAN, 1903). Ronald Ross criou o gênero *Leishmania* e denominou o agente causador do calazar de *Leishmania donivani*, em homenagem a Leishman e Donovan (REY, 2001).

O aumento na incidência da LV vem se tornando um problema importante de saúde pública em vários estados brasileiros em especial no Mato Grosso do Sul.

No sul do Mato Grosso, o primeiro relato de caso autóctone de LV foi no município de Coxim em 1937 (CHAGAS, 1938). Na década de 70, a doença disseminou-se e os municípios de Corumbá, Ladário e Miranda, bem como outras cidades registraram novos casos da doença (BARUFFA & CURY, 1973).

Segundo estudo realizado no ano de 2006 em Três Lagoas MS a prevalência de crianças na faixa etária de 0 a 4 anos foi de 5,93 casos/1.000 habitantes (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Existe uma maior vulnerabilidade à instalação da doença nas crianças menores de dois anos com fatores de risco individuais como desnutrição prévia e infecção co-existente (CALDAS *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2002). A doença acomete tanto adultos com crianças, sendo que no Brasil, é mais comum em menores de 10 anos, com predominância nos menores que 5 anos de idade (BRUSTOLONI, 2006).

A transmissão ao homem ocorre pela picada do mosquito fêmea da família *Phlebotominae*, pertencente ao gênero *Lutzomyia*. Ao picar hospedeiro vertebrado infectado, no momento do repasto sanguíneo, a fêmea do vetor ingere células parasitadas com formas amastigotas contidas no tecido do hospedeiro vertebrado.

No intestino do vetor, as células se rompem e as formas amastigotas liberadas se diferenciam em formas promastigotas, as quais serão transmitidas para um hospedeiro mamífero não infectado. Durante um novo repasto sanguíneo, a fêmea infectada irá regurgitar as formas promastigotas, juntamente com a saliva, na pele do hospedeiro vertebrado. Já no hospedeiro vertebrado, essas formas infectarão rapidamente as células do sistema fagocítico, diferenciando-se em formas desprovidas de flagelo chamadas de amastigotas (REY, 2001).

O protozoário é intracelular obrigatório, infecta o sistema fagocítico mononuclear de mamíferos e apresenta tropismo para o baço, fígado, linfonodos e medula óssea (ALVARENGA *et al.*, 2010 DUARTE, 2009; HENRY, 2008). A infecção por esse parasita acarreta, mesmo no indivíduo eutrófico, alterações imunológicas.

Já é conhecida a relação da doença com o comprometimento do estado nutricional. Autores relatam que a desnutrição é um importante fator para o desenvolvimento de doenças parasitárias, entre elas a LV (HARRISSON *et al.*, 1986; PEARSON *et al.*, 1992).

Cerf *et al.*, 1987, buscando associação entre a desnutrição e a LV, através de um estudo prospectivo realizado no estado da Bahia, demonstraram que o risco relativo de desenvolver a forma grave da doença era 8,7 vezes maior entre as crianças com desnutrição grave a severa do que entre aquelas com um estado nutricional considerado normal.

Carvalho *et al.* (1992), observaram na cidade de Jacobina-Ba que crianças com produção de interferon- $\gamma$  (resposta tipo Th1) significantes foram capazes de controlar a infecção, evoluindo para forma assintomática ou subclínica da doença. Dentre as que evoluíram para forma clássica observou-se deficiente produção de interferon- $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) e diminuição do número células T (CD4), não sendo capazes de

ativação macrofágica necessária para destruição da *Leishmania chagasi*. É demonstrado que durante o estado de doença ocorre ausência de produção de citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-2, caracterizando, deste modo uma resposta imunológica do tipo Th2 (BACELLAR *et al.*, 2000).

Segundo o Ministério da Saúde (2006), a suspeita clínica da doença é fundamentada na presença de febre, esplenomegalia associada ou não hepatomegalia. O início dos sintomas pode variar, mas na maioria dos casos há febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia. A LV pode ser dividida em 3 períodos: inicial, de estado e final. No período inicial também chamado de agudo, ocorre, na maioria dos casos febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia. O período de estado caracteriza-se por febre irregular, associada a emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia, geralmente com mais de 2 meses de duração. No período final a febre é contínua e comprometimento mais intenso do estado geral e nutricional. Nesses pacientes, o óbito geralmente é determinado por infecções bacterianas e/ou sangramentos.

Segundo Ministério da Saúde, 2011, para diagnosticar a LV é necessário além do exame clínico, a confirmação laboratorial, que compreende o encontro da forma amastigota no exame parasitológico, realizado por coleta de material através da punção da medula óssea, baço ou fígado, reação de imunofluorescência reativa com título superior de 1:80 e teste rápido. Ainda pode servir de apoio diagnóstico para a doença a análise do hemograma, leucograma, contagem de plaquetas e dosagem de proteínas. As alterações laboratoriais incluem diminuição do número total de hemácias, leucopenia com linfocitose relativa e plaquetopenia, além da

inversão da relação albumina/globulina. A análise da bioquímica apresenta alterações com elevação dos níveis das aminotransferases, das bilirrubinas e aumento discreto dos níveis de uréia e creatinina. (AL-JURAYYAN *et al.*, 1995; BRASIL, 2006; MICHALICK, 2005).

Entre as alterações hematológicas, na série vermelha, destaca-se a anemia, de causa multifatorial, pois ocorrem pela combinação de fatores, incluindo sequestro esplênico e destruição de eritrócitos, bloqueio de produção na medula, hemorragia, hemólise, mecanismos imunes (autoanticorpos e complexos imunes), infecções concomitantes (parasitoses intestinais comumente associadas ao quadro, entre as quais a ascaridíase e a ancilostomíase) e carência nutricional (ferro, ácido fólico e vitamina B12) (ÇELIK, 2007; DUARTE & BADARÓ, 2009).

A neutropenia é decorrente da redução da reserva medular (hipoplasia ou depressão medular), de seqüestro esplênico por conta do hiperesplenismo, de hemofagocitose ou de reações de autoimunidade, contribuindo para a leucopenia (DIETZE, 2004; OLIVEIRA, 2010; NASCIMENTO & MEDEIROS, 2010). Leucopenia e neutropenia menor que  $1.500/\text{mm}^3$  são encontradas com grande freqüência em pacientes infectados pela *L. chagasi* (BRASIL, 2011).

As plaquetas também estão diminuídas nos quadros graves e letais, principalmente nas fases mais adiantadas da doença, o que facilita a gênese de hemorragias sendo a epistaxe e a gengivorragia as mais comumente encontradas (BRASIL, 2011).

O tratamento da leishmaniose visceral no Brasil é realizado, segundo recomendação do Ministério da Saúde, com o uso de compostos antimoniais, sob a forma de sais pentavalentes, sendo comercializado o antimoniato N-metil glucamina (Glucantime®). Esse composto foi utilizado primeiramente no tratamento da



leishmaniose tegumentar por Gaspar Vianna em 1913. O mecanismo de ação ainda não está bem esclarecido, mas sabe-se que a droga tem ação nas formas amastigotas do parasita, inibindo a atividade glicolítica da via oxidativa de ácidos graxos do parasita.

Dentre os efeitos adversos provocados pelo uso desta droga estão àqueles referentes ao aparelho cardiovascular. A análise eletrocardiográfica de 87 crianças com idade entre 6 a 12 anos, em uso de antimoniato N-metilglucamina para tratamento da LV, mostrou alterações em 34,4% dos pacientes (extrassístole ventriculares e alterações do segmento ST) durante o ciclo do tratamento, sugerindo a necessidade da monitorização cardíaca durante o tratamento. (ZANONI *et al.*, 2009).

Outro fármaco que também está indicado para o tratamento da LV é a desoxicolato sódico de anfotericina B e suas formulações lipossomais (anfotericina-B-lipossomal e anfotericina-B-dispersão coloidal), que agem nas formas promastigotas e amastigotas do parasita. O mecanismo de ação desta droga é por ligação preferencial com ésteres presentes na membrana plasmática da *Leishmania*. A droga altera a permeabilidade da membrana celular, causando poros pelo quais ocorre extravasamento dos componentes celulares e consequente morte do parasita. Dentre os efeitos colaterais da anfotericina B são citados dispneia, cianose, comprometimento da função renal e alteração do número de leucócitos. O uso da anfotericina-B-lipossomal é restrito por seu alto custo inviabilizando seu uso rotineiro no tratamento de todos os pacientes, sendo indicado para aqueles com formas graves, com comprometimento renal ou cardíaco durante o uso do Glucantime<sup>®</sup> (BRASIL, 2006).

A anfotericina B está indicada como primeira escolha em pacientes com sinais de gravidade como letargia, má perfusão, cianose, instabilidade hemodinâmica, idade inferior a 6 meses, apresentando desnutrição grave, co-morbidades, infecções bacterianas e como segunda opção para os pacientes que tenham contra-indicações ou apresente toxicidade relacionadas ao uso dos antimoniais pentavalentes. (BRASIL, 2003; OSTROSKY-ZEICHMER *et al.*, 2003).

Sundar *et al.* (2004) realizaram estudo mostrando que tanto a anfotericina B convencional (1mg/kg em dias alternados por 30 dias) como as formulações lipídicas (2mg/kg/dia por 5dias) têm efeitos similares em relação à cura da leishmaniose visceral, sendo formulações lipídicas e reduzem o tempo de permanência hospitalar e diferem das reações adversas convencionais.

Quanto à evolução clínica, a maioria dos pacientes apresenta melhora após 7 a 10 dias do tratamento. A febre desaparece em torno do 5 dia e os parâmetros hematológicos melhoraram a partir da segunda semana. Ao final do tratamento o tamanho do baço apresenta redução em torno de 40% em relação às medidas iniciais. Noventa por cento ou mais apresentam cura aparente, 5% a 10% não responde ou morrem durante a terapia. A recidiva pode ocorrer em 5% a 10% dos casos (QUEIROZ; *et al.*, 2004). As complicações mais frequentes da LV são de natureza infecciosa bacteriana, principalmente as que acometem os tratos respiratório, digestório e urinário.

Nos últimos 10 anos, mesmo ante os recursos de terapia intensiva e padronização do tratamento da LV, a mortalidade aumentou em várias regiões do país. Este fato pode está relacionado ao retardo do diagnóstico da doença, com referência tardia para unidades de saúde de maior complexidade (BRASIL, 2005).

Rey *et al.* (2005) em estudo retrospectivo realizado em Fortaleza-Ce, entre os anos de 1995-2002, relataram que a maior letalidade estava associada a faixa etária do paciente acometido pela doença, predominantemente nos menores de um ano de idade.

Estudo realizado no Mato Grosso do Sul por Brustoloni (2006), onde foram incluídas 116 crianças com LV, mostrou que a letalidade foi de 2,6%.

A leishmaniose é uma doença que sabidamente suscita do hospedeiro uma resposta imunológica tipo Th1, para que não evolua para a forma grave. A polarização da resposta imunológica para o tipo Th2 leva ao desenvolvimento da forma visceral da doença.

Nos pacientes com LV são caracteristicamente neutropênicos e estão em maior risco de apresentar infecção aparente ou inaparente. As infecções bacterianas nestes pacientes podem ser graves e a apresentação clínica inespecífica. Os locais mais acometidos são o trato respiratório, digestório e urinário (KANDIVAR, 2000). Na faixa etária pediátrica, a concomitância de LV com infecção bacteriana provada ou suspeita, no momento da admissão, ocorre em torno de 70% dos casos, sendo a pneumonia a mais frequente, atingindo 67% dos casos. Em torno de 12% desses pacientes ainda apresentam outras complicações de origem infecciosa durante o tratamento (BRUSTOLONI, 2006).

Nos últimos anos, muitos estudos têm abordado a questão da suplementação do Zn nas doenças infecciosas pediátricas. Nas infecções do trato respiratório inferior, em pacientes não portadores de LV, a suplementação de Zn pode reduzir a incidência dos processos inflamatórios em até 45% dos casos (SHANKAR & PRASAD, 1999; PRASAD *et al.*, 2008). Recentemente foi mostrado que em crianças com pneumonia grave a suplementação de Zn se correlacionou com amenização

dos sintomas, redução da febre e da dificuldade respiratória, diminuindo o tempo de internação dos pacientes (VALAVI *et al.*, 2010). Em crianças com diarreia a reposição de Zn também contribui para reduzir a duração e intensidade dos episódios diarreicos e também prevenir recidivas por um período que pode se prolongar até três meses (ALAM *et al.*, 2010).

Do exposto acima, o zinco é um elemento químico diretamente implicado na adequação da resposta imunológica e, como tal, tem sido estudado em várias doenças bacterianas e virais (MACHADO *et al.*, 2004; PRASAD, 2008)

Porém, o comportamento do elemento traço zinco na leishmaniose visceral, em especial, ainda necessita de vários esclarecimentos. Na criança, onde a prevalência de deficiências nutricionais é significativa principalmente na população de baixa renda os estudos do comportamento do zinco nas doenças parasitárias são inexistentes.

Assim, objetivando preencher esta lacuna nos estudos pediátricos, decidimos investigar, em local endêmico, a dinâmica dos níveis séricos de zinco em crianças portadoras de LV durante o tratamento da doença.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Geral**

Avaliar a dinâmica das concentrações plasmáticas de zinco em crianças com leishmaniose visceral durante o tratamento clínico.

#### **Específicos**

1. Avaliar o estado nutricional das crianças.
2. Medir as concentrações plasmáticas do zinco durante o tratamento.
3. Analisar as variações das concentrações plasmáticas do zinco nos diversos momentos.
4. Correlacionar as concentrações plasmáticas do zinco com estado nutricional dos pacientes.
5. Analisar e comparar as concentrações plasmáticas do zinco com os resultados da hemoglobina, leucócitos, plaqueta, AST, ALT.
6. Correlacionar as concentrações plasmáticas do zinco com a evolução da hepatoesplenomegalia.
7. Correlacionar o uso do antimoniato de N-metilglucamina e anfotericina B com as concentrações plasmática do zinco.

## **4 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo de estudo**

Trata-se de um estudo prospectivo, longitudinal e descritivo analítico.

### **4.2 Período e local da pesquisa**

Este estudo foi realizado com pacientes internados na enfermaria de pediatria do Hospital Universitário “Maria Aparecida Pedrossian”, Faculdade de Medicina “Dr. Hélio Mandetta” da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

O Hospital Universitário é um hospital escola com 256 leitos, conveniado com o Sistema Único de Saúde para atendimento ao público. O serviço de pediatria conta com 23 leitos e é referencia estadual para tratamento da leishmaniose visceral na infância.

O estudo foi realizado em setembro de 2011 a novembro de 2012.

### **4.3 Aspectos éticos**

O protocolo para investigação foi devidamente aprovado pelo Conselho Diretivo do Hospital Universitário e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (Anexo 1). Para o cumprimento das

normas resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde foi assegurada a confiabilidade, privacidade, a proteção da imagem e a não estigmatização dos sujeitos da pesquisa. O termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido previamente de um dos pais ou responsável de cada participante, antes do início do estudo (Apêndice 1).

#### **4.4 Sujeitos da pesquisa**

Crianças de ambos os sexos, com idade entre 12 e 144 meses com diagnóstico clínico e laboratorial de leishmaniose visceral foram incluídas no estudo.

Não participaram ou foram excluídas do estudo as crianças que fizeram uso de nutrição parenteral ou que estavam sendo suplementadas com zinco, aquelas que já estavam em tratamento para LV em outra instituição e aquelas onde o tratamento medicamentoso foi modificado durante o período do estudo. Também não foram incluídos pacientes indígenas.

Os participantes foram divididos em dois grupos de acordo com a terapêutica inicial. Os pacientes que fizeram uso de Anfotericina B foram denominados de Grupo A e os que fizeram uso de Antimoniato de N-metilglucamina ( N-metil meglumina) denominados como Grupo G.

## 4.5 Coleta de dados

### 4.5.1 Avaliação do estado nutricional

O estado nutricional dos pacientes foi avaliado pelos seguintes índices: peso em relação à idade (P/I), altura em relação à idade (A/I), peso em relação à altura (P/A) tomando-se como referência as curvas atualizadas de crescimento da OMS, 2006, 2007 que também são preconizadas pela Sociedade Brasileira de Pediatria.

O valor do peso foi obtido usando uma balança mecânica da marca Filizola<sup>®</sup> comumente utilizada em pediatria para realização da medida de todas as crianças do estudo. As crianças até os 2 anos de idade foram pesadas na mesma balança tipo pediátrica. O paciente foi despido e posicionado de maneira que o peso fosse igualmente distribuído na superfície da balança, proporcionando maior conforto e menor risco de acidentes.

A partir da idade de 2 anos, o peso foi medido com balança do tipo adulto de graduação de 100g. Em qualquer caso a criança ou o adolescente manteve-se em pé sem apoio, com os braços estendidos ao longo do corpo, descalço posicionado no centro da plataforma e evitando movimentar-se.

A estatura nos menores de 2 anos de idade foi medida com a mesma régua e com a criança em decúbito dorsal com régua antropométrica. A criança manteve-se deitada sobre superfície plana horizontal, com o limite superior fixo (zero) ajustado ao pólo cefálico, os olhos voltados para cima, evitando-se a flexão ou extensão do pescoço e o limite inferior, móvel, ajustado ao plano dos pés (MULLER, 2007).



A estatura das crianças maiores foi medida com o estadiômetro vertical da balança. O calcanhar, a região glútea, as costas e o pólo occipital cefálico foram posicionados junto ao anteparo vertical do estadiômetro, com os braços ao lado, acompanhando o corpo (LOPES *et al.*, 2007; MULLER, 2007).

Estes parâmetros foram registrados apenas no momento da internação.

#### 4.5.2 Dados demográfico e clínicos

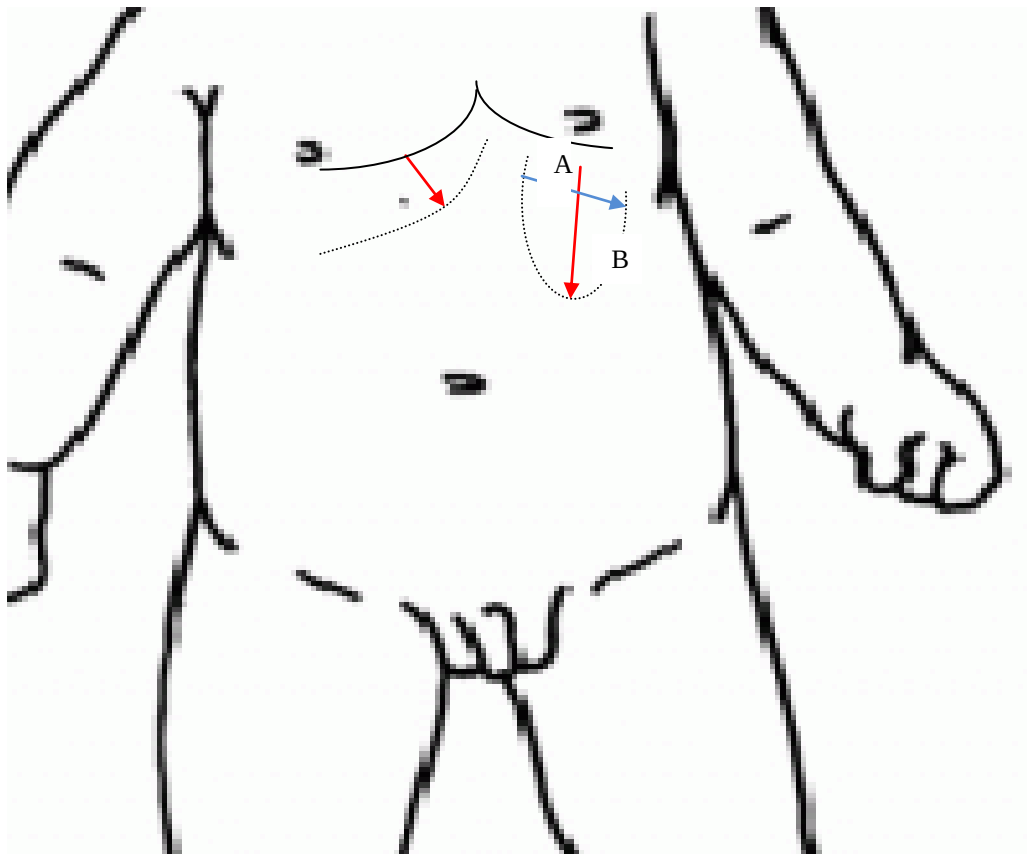
Os dados demográficos e clínicos foram coletados e registrados pelo pesquisador no momento da internação do paciente. Os dados demográficos avaliados foram gênero e idade. Os dados clínicos avaliados foram peso, estatura e presença de hepatoesplenomegalia.

O tamanho do fígado foi medido com fita métrica, do rebordo costal direito, tomando como ponto de referência uma linha imaginária entre o mamilo direito e umbigo.

A avaliação do tamanho do baço pelo exame clínico através da percussão e palpação apresenta imprecisões devido às variações anatômicas individuais desta víscera quando aumentada. O método mais adequado para o cálculo do volume esplênico seria a medida pela ultrassonografia, porém torna-se impraticável na prática clínica diária. Como na infância a parede abdominal e a musculatura facilitam a palpação do baço, foi proposta para este estudo, a medida do volume, visando considerar o diâmetro longitudinal e transversal da víscera. Deste modo, a esplenomegalia foi avaliada pela medida da área do baço. Tais medidas foram

obtidas com fita métrica, considerando o maior valor de uma linha perpendicular ao rebordo costal esquerdo até o bordo do baço. Esta medida foi denominada de “A”. Os maiores limites do baço na linha do rebordo costal esquerdo também foram considerados e denominados de “B”. Com estas medida foi calculada a área da elipse, que é a figura geométrica que mais se aproxima da forma do baço. Foi considerado, para efeito de análise, a área da elipse dividida por 2. A figura abaixo ilustra a forma de avaliação destas medidas. Estes dados foram registrados no momento da internação, denominado T0, no sétimo dia, T7 e no vigésimo dia, T20, do tratamento de cada paciente.

Figura 1. Esquema da medida do baço e fígado



## 4.6 Análises laboratoriais

### 4.6.1 Amostras de sangue

Para a avaliação laboratorial amostras de sangue foram coletadas pelos técnicos especializados do Laboratório de Análises Clínicas-UFMS, em tubos de polipropileno a vácuo, siliconizado, com tampa de borracha, sem anticoagulante e próprio para coleta de metais (BD Vacutainer Systems-Becton, Dickinson & Co®). O plasma foi separado por centrifugação (3.000g) durante 15 minutos, e transferido para tubos Eppendorf devidamente desmineralizados e armazenados a -18°C para posterior determinação de zinco.

As amostras foram coletadas através da punção venosa ou arterial, no primeiro dia de internação (T0), no sétimo dia (T7) e no vigésimo dia de tratamento (T20).

Os exames para confirmação da leishmaniose visceral foram coletados de acordo com a rotina adotada pelo serviço de pediatria, segundo as normas do Ministério da Saúde. Amostras de sangue para realização dos exames laboratoriais foram coletadas e dosadas de acordo com a rotina já estabelecida no Laboratório de Análises Clínicas-UFMS.

Os resultados dos exames laboratoriais de cada paciente foram avaliados pela equipe médica e registrados semanalmente conforme os intervalos escolhidos T0, T7 e T20. A anemia foi definida como hemoglobina abaixo de 11g/dL para crianças menores de 6 anos e abaixo de 12g/dL para crianças entre 6 a 12 anos de idade (WHO/UNICEF,1997). Foi considerado leucopenia como número de leucócitos

abaixo de 5.000 células/mm<sup>3</sup>; plaquetopenia como número de plaquetas abaixo de 150.000 células/mm<sup>3</sup>. Os valores considerados normais para as aminotransferases foram: AST até 40U/L e ALT até 41U/L.

Os prontuários dos pacientes foram consultados toda vez que necessário para coleta de dados clínicos relatados pelo médico e que fossem relevantes para o estudo.

Todos os materiais de plástico ou de vidro utilizados no estudo ficaram previamente imersos por um período mínimo de 24 horas em solução de Extran (Merck) a 5%, enxaguados abundantemente em água corrente e novamente imersos por, pelo menos, 24 horas em solução de ácido nítrico (Merck) a 10%, para descontaminação de qualquer resíduo de metal.

O zinco foi dosado por um espectrômetro de absorção atômica equipado com lâmpada de deutério como corretor de fundo.

O espectrômetro PerkinElmer AA100<sup>®</sup> foi utilizado nesse estudo nas seguintes condições: lâmpada de cátodo oco (PerkinElmer<sup>®</sup>) e comprimento de onda de 213,9 nm para leitura do Zn. A chama oxidante de acetileno/ar foi utilizada para a determinação do metal. A corrente de lâmpada e a largura de fenda foram utilizadas conforme recomendações do catálogo do fabricante. O fluxo de entrada das amostras e padrões no nebulizador do espectrômetro foi de 1,3 ml/ min e a leitura de absorbância foram de 10 segundos cada, sendo expresso o valor médio de três leituras. Cada amostra foi lida em duplicata. O resultado de cada amostra foi a média das leituras das amostras.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico (Merck<sup>®</sup>). As soluções utilizadas foram preparadas com água purificada por um sistema *Milli-Q* (resistência

18,2 mW cm) e armazenadas em recipientes plásticos previamente descontaminados.

Soluções padrão contendo 1000mg/L de metal foram adquiridas da Aldrich (Milwaukee, WI, USA). As soluções de referência para a curva analítica foram preparadas por diluição da solução padrão estoque. As curvas analíticas foram construídas com 3 concentrações com valores de 0,25, 1 e 2mg/L. A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados e apresentou coeficiente de correlação superior a 0,997.

Para a realização das leituras as amostras de soro foram descongeladas e homogeneizadas. O procedimento consistiu na diluição de 500 $\mu$ L de soro em 2000 $\mu$ L de água ultra pura. Para a análise a solução foi aspirada através de um capilar de plástico diretamente para dentro da chama do espectrômetro de absorção atômica (SUBRAMANIAN, 1996).

#### **4.7 Análises estatísticas**

Ao aplicar o teste Kolmogorov – Smirnov foi mostrado que em certos casos a distribuição da variável não foi sempre paramétrica. Portanto, na comparação entre os grupos em relação à idade, peso e estatura foram realizada tanto o teste t-Student (paramétrico) quanto Mann-Whitney (não paramétrico). A comparação dos resultados dos exames laboratoriais entre os grupos foi feita através do teste de Mann-Whitney. A correlação das variações da concentração plasmática de zinco com as variáveis hemoglobina, leucócito, plaquetas e enzimas hepáticas nos

diversos tempos de estudo foram feitas pelo teste de análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey. Os demais resultados foram avaliados e apresentados na forma de estatística descritiva, tabelas e gráficos.

Para as correlações das variáveis estudadas foi utilizado o teste de correlação de Spearman.

A análise estatística foi realizada utilizando um software BioStat 5.0. Correlação significativa foi considerada para valor de  $p \leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

No período de estudo, 65 crianças portadoras de LV foram internadas no setor de pediatria, sendo que 32 delas, de ambos os gêneros foram inicialmente incluídas. Destes pacientes avaliados, 3 foram excluídos do estudo devido à não contemplação dos critérios de inclusão previamente estabelecidos, isto é, os três pacientes iniciaram o tratamento com antimonialato de N-metilglucamina e posteriormente utilizaram anfotericina B. Um dos pacientes evoluiu para óbito durante o acompanhamento, sendo considerados para fins estatísticos seus dados apenas para o momento T0. Assim, diante de uma perda amostral de 12,5%, participaram efetivamente deste estudo 29 pacientes, com idades variando entre 12 e 144 meses, sendo 37,9% (n=11) do gênero masculino e 62,1% (n=18) do gênero feminino.

Conforme Tabela 1, não foi constatada diferença significativa entre os grupos quanto ao tamanho amostral, peso e estatura. Diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos apenas em relação à idade (Mann-Whitney,  $p=0,02$ ). Os valores de média e desvio padrão das referidas variáveis estão dispostos na tabela 1.

Tabela 1. Dados demográficos dos pacientes segundo os grupos de estudos valores disposto em média e desvio padrão

|                  | Grupo A   | Grupo G  | Valor de p |
|------------------|-----------|----------|------------|
| Tamanho amostral | 11        | 18       | 0,26       |
| Idade (meses)    | 63±43     | 32±21    | 0,02       |
| Peso (kg)        | 19,7±10,7 | 13,3±4,1 | 0,08       |
| Estatura (cm)    | 107±21,2  | 91±22,2  | 0,06       |

Com objetivo de analisar o estado nutricional inicial exames laboratoriais e dados clínicos os 29 pacientes foram divididos em dois grupos, a constar: grupo A, formado por 11 pacientes que fizeram uso de Anfotericina B, e grupo G, composto por 18 pacientes que utilizaram antimoníato de N-metilglucamina (Glucantime®). Dos pacientes do grupo A, 54,5% (n=6) eram do gênero masculino e 45,5% (n=5) do gênero feminino. Dos pacientes do grupo G, 27,7% (n=5) eram do gênero masculino e 72,3% (n=13) do gênero feminino. A proporção entre os gêneros masculino e feminino no grupo A foi de na ordem de 1:1,1 e, no grupo G, de 1:2,5.

### 5.1 Caracterização das variáveis nutricionais

Na avaliação estatística dos 29 pacientes participantes do estudo no T0, quanto à avaliação do estado nutricional, foi observado que 7% (n=2) dos pacientes apresentavam obesidade, 13,8% (n=4) risco para sobrepeso, 48,2% (n=14) de



pacientes eutróficos, magreza 13,8% (n=4) e magreza acentuada 17,2% (n=5) considerando a soma dos pacientes com magreza e magreza acentuada de 31% (n=9) no T0, momento da admissão dos pacientes apresentava déficit nutricional. Os dados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Diagnósticos nutricionais dos pacientes participantes do estudo

| Estado nutricional | Grupo A       | Grupo G       | Total         |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|
| Obeso              | 18,1% (n=2)   | 0,0% (n=0)    | 7,0% (n=2)    |
| Risco de sobrepeso | 9,0% (n=1)    | 16,8% (n=3)   | 13,8% (n=4)   |
| Eutrofia           | 54,5% (n=6)   | 44,4% (n=8)   | 48,2% (n=14)  |
| Magreza            | 0,0% (n=0)    | 22,2% (n=4)   | 13,8% (n=4)   |
| Magreza acentuada  | 18,1% (n=2)   | 16,8% (n=3)   | 17,2% (n=5)   |
| Total              | 100,0% (n=11) | 100,0% (n=18) | 100,0% (n=29) |

## 5.2 Caracterização das variáveis laboratoriais

### 5.2.1 Análise da concentração plasmática do zinco

No grupo A, a concentração plasmática de zinco no momento T0 variou de 0,6 a 3,3 mg/L ( $1,4 \pm 0,2$  mg/L), no momento T7 variou de 0,7 a 2,1 mg/L ( $1,27 \pm 0,1$  mg/L) e no momento T20 variou de 0,7 a 1,65 mg/L ( $1,2 \pm 0,1$  mg/L). Já no grupo G, a concentração plasmática de zinco no momento T0 variou 0,4 a 3,0 mg/L ( $1,3 \pm 0,2$  mg/L), no T7 variou de 0,25 a 2,6 mg/L ( $1,2 \pm 0,2$  mg/L) e no T20 variou de 0,3 a 2,1mg/L ( $1,2 \pm 0,1$ mg/L).

Considerando os 29 participantes do estudo no momento T0, 24,1% (n=7) apresentavam concentração plasmática de zinco menor que 0,8 mg/L, valor este considerado como limite inferior de referência da normalidade. Dos 11 pacientes que fizeram uso de Anfotericina, 18,2% (n=2) apresentavam zinco abaixo de 0,8 mg/L no T0. Dos 18 pacientes que fizeram uso de antimoniato de N-metilglucamina, 27,8% (n=5) apresentavam zinco abaixo de 0,8 mg/L no T0.

Considerando os pacientes no momento T7, 27,5% (n=8) apresentavam concentração plasmática de zinco menor que 0,8 mg/L. Dos pacientes incluídos no Grupo A, 9,1% (n=1) apresentavam zinco abaixo do limite inferior no momento T7, sendo este número, para o grupo G, na ordem de 38,8% (n=7). Analisando os sujeitos no momento T20, 20,6% (n=6) do total da amostra apresentou concentração plasmática de zinco menor que 0,8mg/L. Quando dividido em grupos, 9,1% (n=1) do grupo A e 28% (n=5) do grupo G apresentaram zinco abaixo da concentração limite.

A Figura 2 reflete a variação da concentração média do zinco nas crianças submetidas a tratamento de Anfotericina B (Grupo A) e Glucantime (Grupo G), nos momentos 0, 7 e 20 dias.

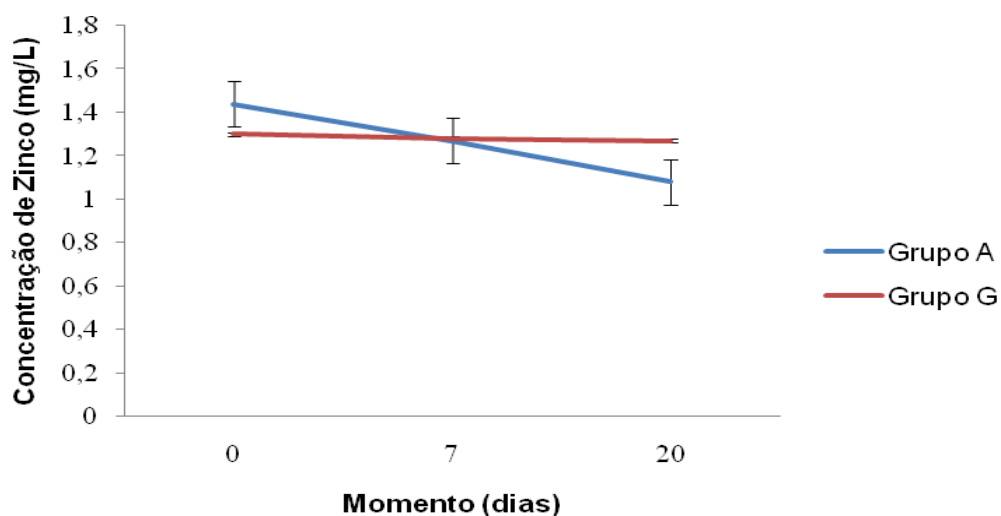


Figura 2. Variação da concentração média do zinco (mg/L) no grupo A e no grupo G

A análise estatística realizada nesta pesquisa evidenciou que não há diferença entre o grupo A e o grupo G, em relação à concentração plasmática de zinco nos momentos T0 (Mann-Whitney,  $p=0,60$ ), T7 (t-Student,  $p=0,96$ ) e T20 (t-Student,  $p=0,66$ ). Quando analisado possíveis diferenças dos grupos entre momentos diferentes, o teste de ANOVA comprovou que não houve diferença significativa entre os dois grupos, em qualquer comparação de momentos ( $p>0,05$  nos momentos T0, T7 e T20).

### 5.2.3 Análise da concentração plasmática de hemoglobina

Sobre a concentração plasmática da hemoglobina, os resultados do grupo A indicam que no momento T0 os valores variaram de 6,7 a 10,6 g/dL ( $7,9\pm0,4$  g/dL), no momento T7 de 6,7 a 11,0 g/dL ( $8,9\pm0,4$  g/dL) e no momento T20 de 9,6 a 11,4 g/dL ( $10,4\pm0,2$  g/dL). No grupo G, a concentração de hemoglobina no momento T0 variou de 6,1 a 11,0 g/dL ( $7,7\pm0,3$  g/dL), no momento T7 de 7,2 a 12,0 g/dL ( $9,2\pm0,3$  g/dL) e no momento T20 de 7,7 a 12,1 g/dL ( $10,5\pm0,3$  g/dL). A Figura 3 reflete a variação da concentração plasmática média da hemoglobina nos pacientes do grupo A e do grupo G, nos três momentos analisados.

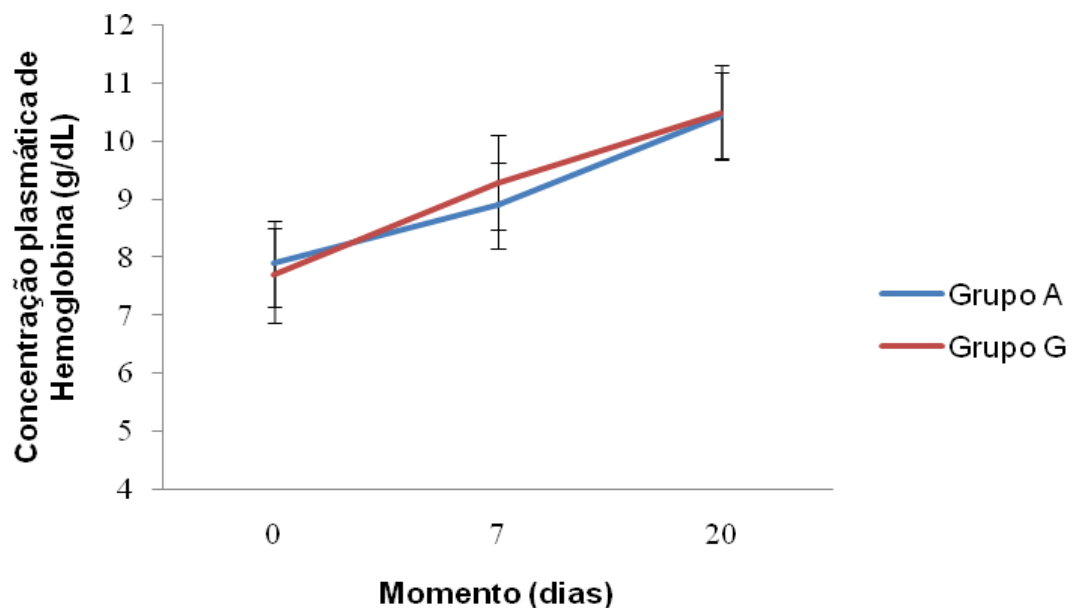


Figura 3. Variação da concentração média de hemoglobina (g/dL) no grupo A e no grupo G

A análise estatística realizada sobre esta variável evidenciou que não há diferença entre o grupo A e o grupo G, em relação à concentração plasmática de hemoglobina nos momentos T0 (Mann-Whitney,  $p=0,32$ ), T7 (t-Student,  $p=0,51$ ) e T20 (t-Student,  $p=0,85$ ). Quando analisado possíveis diferenças dos grupos entre momentos diferentes, o teste ANOVA comprovou que não há diferença significativa entre os dois grupos, em qualquer comparação de momentos ( $p>0,05$  nos momentos T0, T7 e T20).

#### 5.2.4 Análise do número de leucócitos

A análise longitudinal dos dois grupos evidenciou o seguinte quanto ao número de leucócitos: no grupo A, o número de leucócitos no momento T0 variou de 1.150 a 9.190 células/mm<sup>3</sup> ( $3.351,5 \pm 693,8$  células/mm<sup>3</sup>), no momento T7 variou de

1.200 a 7.690 células/mm<sup>3</sup> ( $4.218,9 \pm 545,6$  células/mm<sup>3</sup>) e no momento T20 variou de 3.800 a 8.805 células/mm<sup>3</sup> ( $13.456,5 \pm 7.625,7$  células/mm<sup>3</sup>). No grupo G, o número de leucócitos no momento T0 variou de 2.270 a 8.790 células/mm<sup>3</sup> ( $4.397,1 \pm 417,9$  células/mm<sup>3</sup>), no momento T7 variou de 3.060 a 9.290 células/mm<sup>3</sup> ( $6.008,3 \pm 452,1$  células/mm<sup>3</sup>) e no momento T20 variou de 1.019 a 9.970 células/mm<sup>3</sup> ( $6.861,6 \pm 464,7$  células/mm<sup>3</sup>).

A Figura 4 reflete a variação da média do número de tal variável nos pacientes do grupo A e do grupo G, nos três momentos.

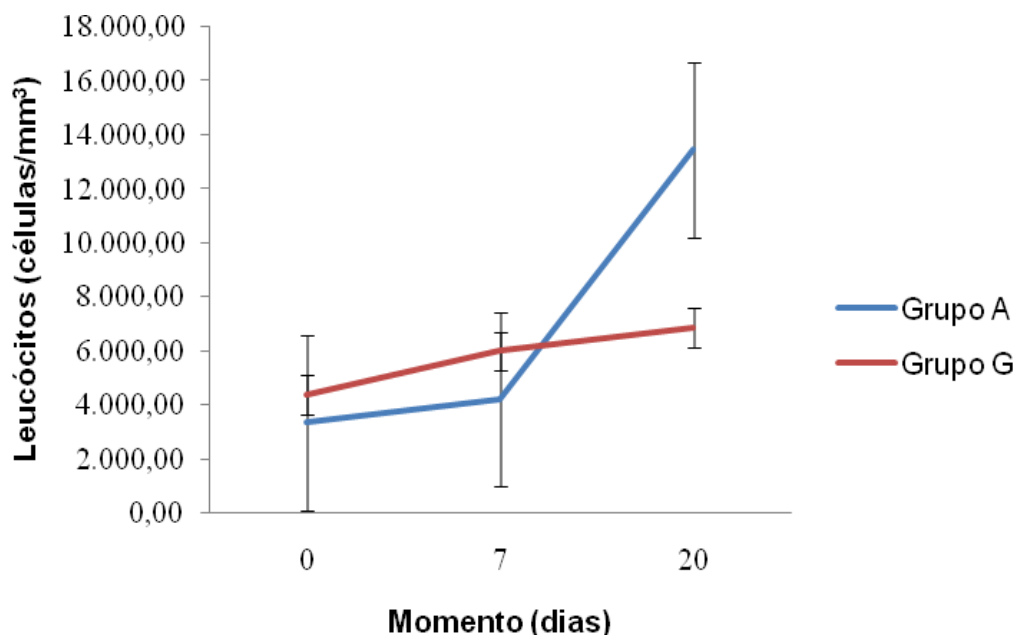


Figura 4. Variação da média do número de leucócitos no grupo A e no grupo G

A análise estatística realizada sobre o número de leucócitos dos pacientes evidenciou que não há diferença entre o grupo A e o grupo G nos momentos T0 (t-Student,  $p=0,18$ ) e T7 (Mann-Whitney,  $p=0,19$ ). Diferentemente, foi observada

diferença significativa entre os grupos no momento T20 (t-Student,  $p=0,02$ ). Quando analisado possíveis diferenças dos grupos entre momentos diferentes, o teste ANOVA apontou que não há diferença significativa entre os dois grupos, em qualquer comparação de momentos ( $p>0,05$  nos momentos T0, T7 e T20). Ou seja, mesmo tendo sido obtido uma diferença significativa entre o grupo A e o grupo G no momento T20, a evolução dos valores dos dois grupos entre os momentos T7 e T20 não indicou diferença, mesmo constatando uma maior inclinação da reta do grupo A em relação à reta do grupo G, entre os momentos de 7 e 20 dias.

#### 5.2.5 Análise do número de plaquetas

Sobre a análise do número de plaquetas, no grupo A variou, no momento T0, de 28.000 a 300.000 células/mm<sup>3</sup> ( $113.636,4 \pm 22.266,7$  células/mm<sup>3</sup>), no momento T7 de 14.000 a 308.000 células/mm<sup>3</sup> ( $170.909,1 \pm 33.594,5$  células/mm<sup>3</sup>) e no momento T20 de 129.000 a 568.000 células/mm<sup>3</sup> ( $273.100,0 \pm 47.320,1$  células/mm<sup>3</sup>). No grupo G, o número de plaquetas no momento T0 variou de 29.000 a 189.000 células/mm<sup>3</sup> ( $90.277,8 \pm 11.508,1$  células/mm<sup>3</sup>), no momento T7 de 74.000 a 474.000 células/mm<sup>3</sup> ( $196.500,0 \pm 23.508,5$  células/mm<sup>3</sup>) e no momento T20 de 110.000 a 384.000 células/mm<sup>3</sup> ( $263.055,6 \pm 17.583,2$  células/mm<sup>3</sup>). A Figura 5 reflete a variação da concentração média de plaquetas nos pacientes do grupo A e do grupo G, nos três momentos.

A análise estatística realizada sobre o número de plaquetas dos pacientes evidenciou que não há diferença entre o grupo A e o grupo G nos momentos T0

(Mann-Whitney,  $p=0,39$ ), T7 (t-Student,  $p=0,52$ ) e T20 (t-Student,  $p=0,84$ ). Quando analisado possíveis diferenças dos grupos entre momentos diferentes, o teste ANOVA comprovou que não há diferença significativa entre os dois grupos, em qualquer comparação de momentos ( $p>0,05$  nos momentos T0, T7 e T20).

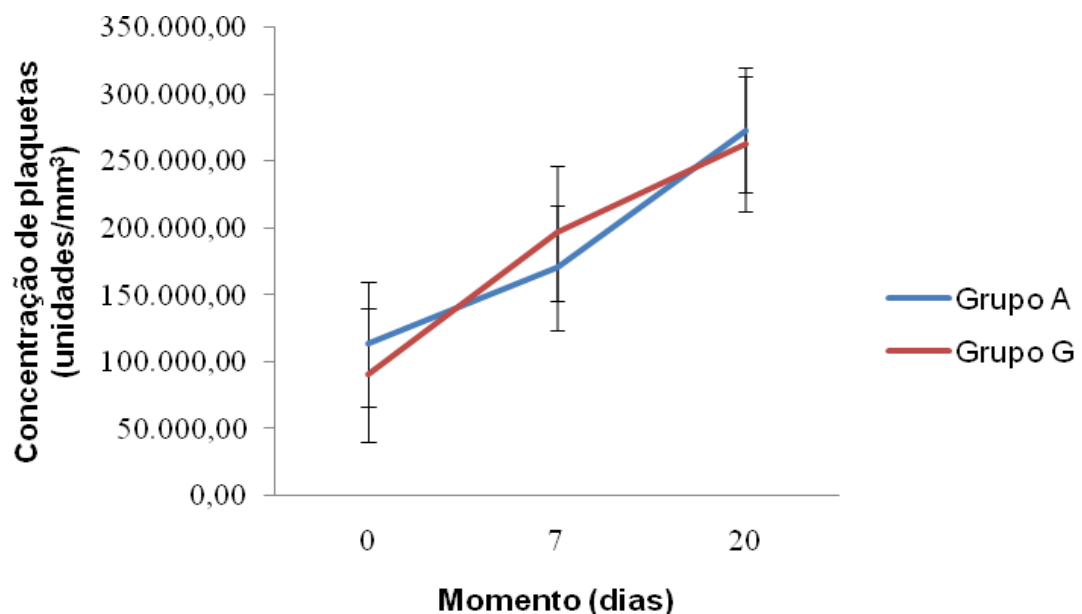


Figura 5. Variação da concentração de plaquetas no grupo A e no grupo G

#### 5.2.6 Análise da concentração plasmática de AST

Sobre a concentração plasmática de AST nos dois grupos, obteve-se o seguinte resultado: no grupo A, a concentração plasmática de AST no momento T0 variou de 17 a 305 U/L ( $102,6 \pm 31,1$  U/L), no momento T7 variou de 24 a 125 U/L ( $61,1 \pm 9,1$  U/L) e no momento T20 variou de 18 a 59 U/L ( $37,9 \pm 4,3$  U/L); no grupo G, a concentração plasmática de AST no momento T0 variou 19 a 330 U/L ( $82,2 \pm 19,6$

U/L), no momento T7 variou de 15 a 197 U/L ( $63,8 \pm 12,7$  U/L) e no momento T20 variou de 20 a 70 U/L ( $41,0 \pm 3,9$  U/L). A Figura 5 reflete a variação da concentração média desta variável nos pacientes do grupo A e do grupo G.

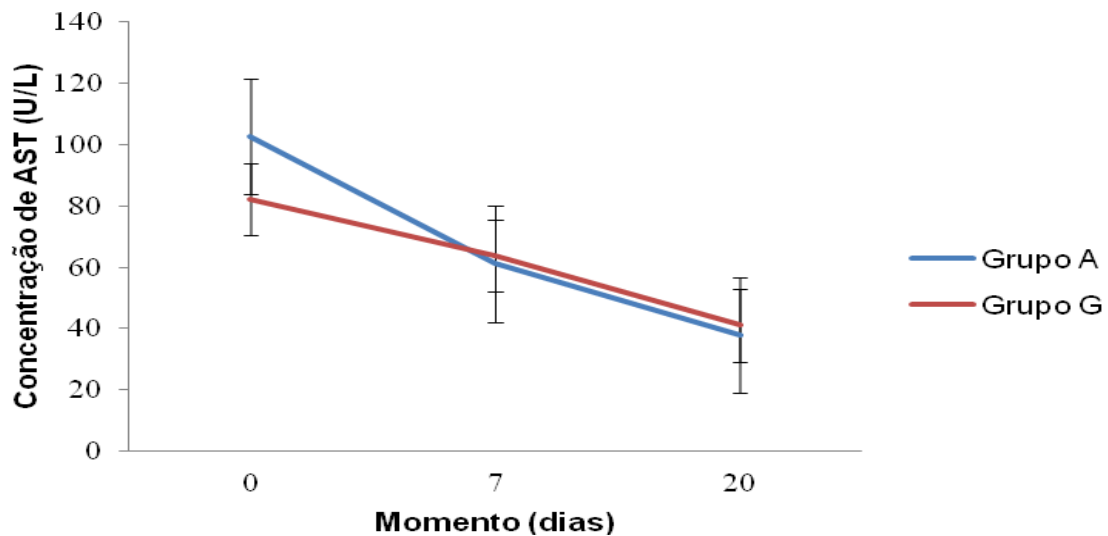


Figura 6. Variação da concentração média de AST no grupo A e no grupo G

A análise estatística realizada sobre a concentração de AST dos pacientes evidenciou que não há diferença entre o grupo A e o grupo G nos momentos T0 (Mann-Whitney  $p=0,77$ ), T7 (Mann-Whitney,  $p=0,47$ ) e T20 (t-Student,  $p=0,61$ ). Quando analisado possíveis diferenças dos grupos entre momentos diferentes, o teste ANOVA comprovou que não há diferença significativa entre os dois grupos, em qualquer comparação de momentos ( $p>0,05$  nos momentos T0, T7 e T20).



### 5.2.7 Análise da concentração plasmática de ALT

No que se referem à concentração plasmática de ALT nos dois grupos, obteve-se os seguintes resultados: no grupo A, a concentração plasmática de ALT no momento T0 variou de 5 a 163 U/L ( $40,6 \pm 14,8$  U/L), no T7 variou de 7 a 138 U/L ( $48,7 \pm 11,4$  U/L) e no momento T20 variou de 8 a 42 U/L ( $26,0 \pm 3,2$  U/L); no grupo G, a concentração plasmática de ALT no momento T0 variou de 5 a 285 U/L ( $46,7 \pm 15,1$  U/L), no momento T7 variou de 6 a 209 U/L ( $47,2 \pm 11,6$  U/L) e no momento T20 variou de 7 a 138 U/L ( $31,9 \pm 7,5$  U/L).

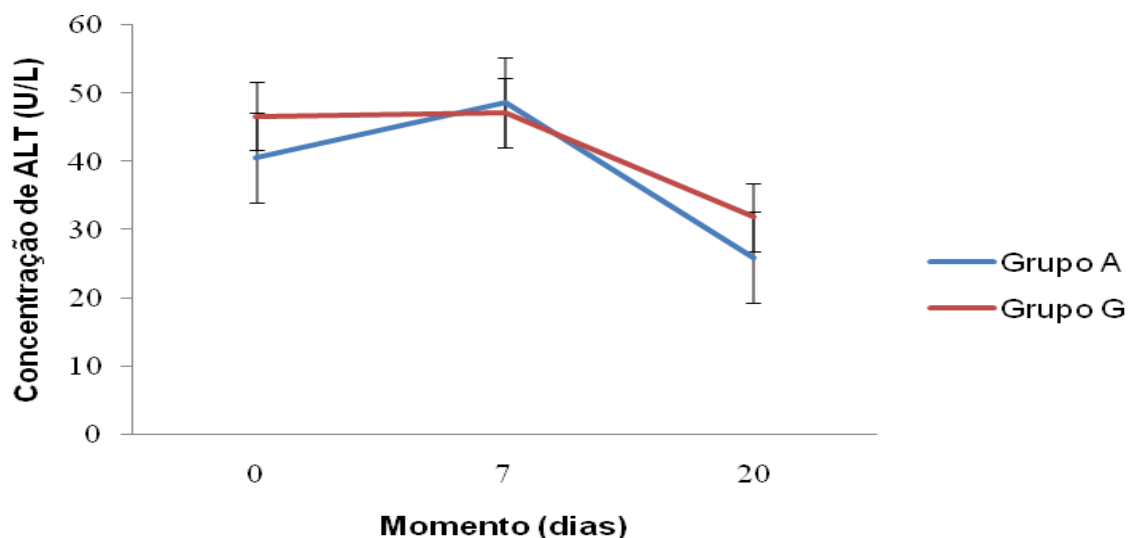


Figura 7. Variação da concentração média de ALT (U/L) no grupo A e no grupo G

A análise estatística realizada sobre a concentração de ALT dos pacientes evidenciou que não há diferença entre o grupo A e o grupo G nos momentos T0 (Mann-Whitney,  $p=0,63$ ), T7 (Mann-Whitney,  $p=0,62$ ) e T20 (Mann-Whitney,  $p=0,49$ ). Quando analisado possíveis diferenças dos grupos entre momentos diferentes, o

teste ANOVA comprovou que não há diferença significativa entre os dois grupos, em qualquer comparação de momentos ( $p>0,05$  nos momentos T0, T7 e T20).

### 5.3 Caracterização das variáveis clínicas

Em relação às variáveis clínicas foram analisadas a evolução da esplenomegalia e a hepatomegalia. Tais análises encontram-se a seguir.

#### 5.3.1 Análise da área do baço entre os grupos

Conforme os dados coletados, no grupo A, a área do baço no momento T0 variou de 14,1 a 188,5 cm<sup>2</sup> ( $68,6\pm17,9$  cm<sup>2</sup>), no momento T7 variou de 2,4 a 518,4 cm<sup>2</sup> ( $105,8\pm145,6$  cm<sup>2</sup>) e no momento T20 variou de 0,0 a 103,7 cm<sup>2</sup> ( $28,2\pm12,9$  cm<sup>2</sup>). No grupo G, a área do baço no momento T0 variou de 1,2 a 345,6 cm<sup>2</sup> ( $75,6\pm19,7$  cm<sup>2</sup>), no momento T7 variou de 1,6 a 173,6 cm<sup>2</sup> ( $40,5\pm9,4$  cm<sup>2</sup>) e no momento T20 variou de 0,0 a 64,8 cm<sup>2</sup> ( $13,1\pm3,9$  cm<sup>2</sup>). Cabe salientar que quando o baço não era palpável, a área do mesmo foi considerada zero. A Figura 8 refere-se à variação do tamanho do baço nas crianças submetidas a tratamento pertencentes aos grupo A e grupo G, nos momentos 0, 7 e 20 dias.

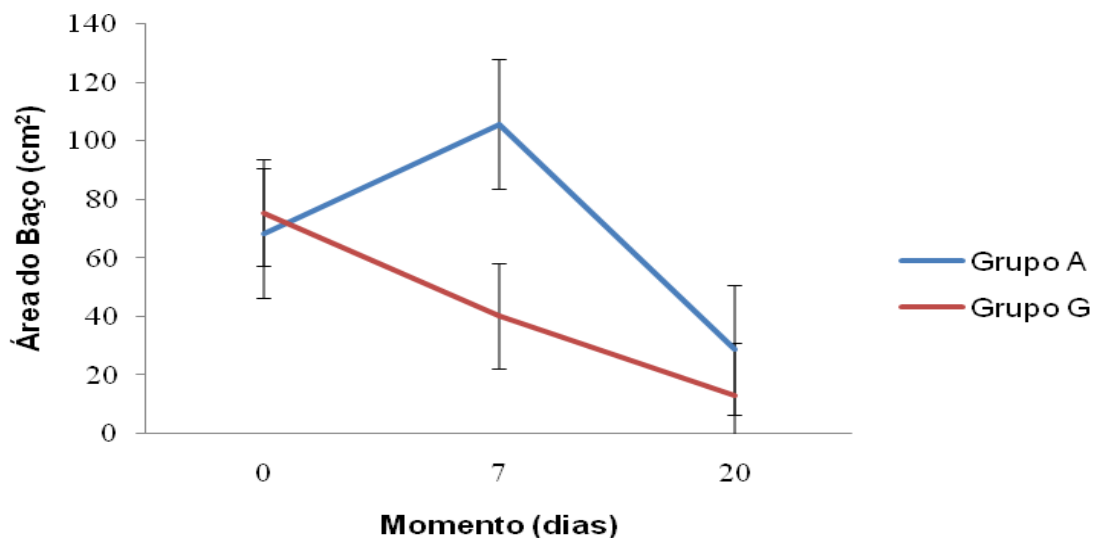


Figura 8. Variação média da área (cm<sup>2</sup>) do baço no grupo A e no grupo G

A análise estatística realizada evidenciou que não há diferença entre o grupo A e o grupo G, em relação ao tamanho do baço, nos momentos T0 (Mann-Whitney,  $p=0,89$ ), T7 (Mann-Whitney,  $p=0,38$ ) e T20 (Mann-Whitney,  $p=0,90$ ). Pelo resultado, observamos uma grande diferença de valores médios entre os dois grupos no momento T7, mas que não apresentou diferença significativa entre si. Contudo, quando aplicado o teste de ANOVA, foi constatado que os grupos apresentaram padrões diferentes entre os momentos T7-T20, sofrendo o grupo A um declínio da área do baço mais considerável do que o grupo G ( $p=0,004$ ).

### 5.3.2 Análise do tamanho do fígado entre os grupos

A Figura 9 demonstra a variação do tamanho do fígado nos dois grupos, nos momentos 0, 7 e 20 dias. Como observado, no Grupo A, o tamanho do fígado

no momento T0 variou de 0,5 a 7,5 cm ( $4,8 \pm 0,7$  cm), no momento T7 variou de 2,0 a 7,5 cm ( $4,9 \pm 0,4$  cm) e no momento T20 variou de 0,0 a 5,0 cm ( $2,5 \pm 0,5$  cm). Já no Grupo G, o tamanho do fígado no momento T0 variou de 3,0 a 8,0 cm ( $4,3 \pm 0,3$  cm), no momento T7 variou de 1,0 a 7,0 cm ( $3,8 \pm 0,3$  cm) e no momento T20 variou de 0,0 a 4,5 cm ( $1,8 \pm 0,4$  cm).

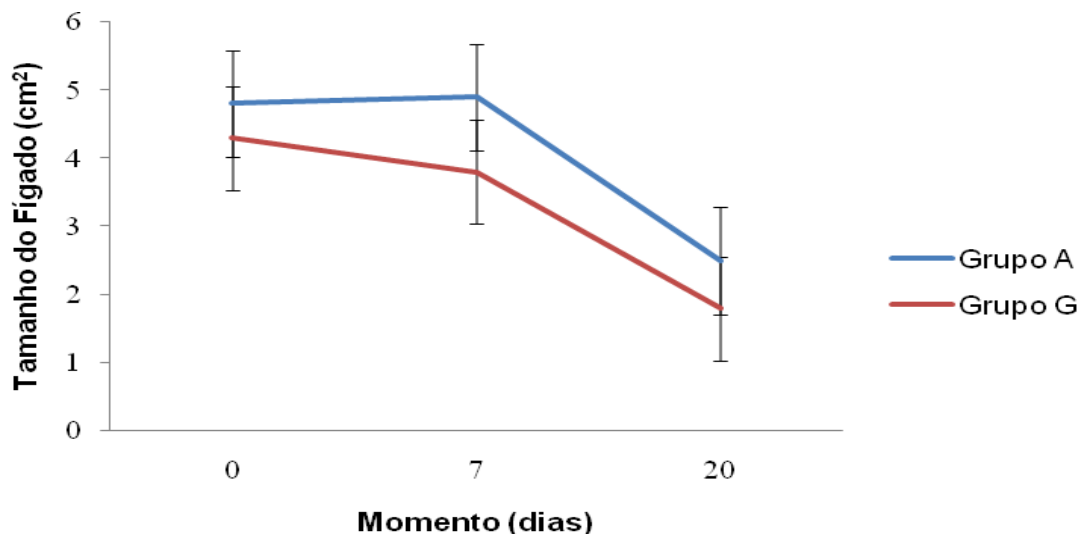


Figura 9. Variação média do tamanho (cm) do fígado no grupo A e no grupo G

A análise estatística realizada evidenciou que não há diferença entre o grupo A e o grupo G, em relação ao tamanho do fígado, nos momentos T0 (t-Student,  $p=0,48$ ), T7 (t-Student,  $p=0,08$ ) e T20 (Mann-Whitney,  $p=0,38$ ). Apesar da diferença em T7 ter apontado um valor de significância perto do estipulado nessa pesquisa ( $p<0,05$ ), há de se considerar que este dado não se enquadrava na delimitação estipulada, não sendo, por conseguinte, considerado uma diferença significativa. Quando analisado possíveis diferenças dos grupos entre momentos diferentes, o teste ANOVA comprovou que não há diferença significativa entre os grupos, em qualquer comparação de momentos ( $p>0,05$  em todas as análises comparativas T0, T7 e T20).

#### 5.4 Análise correlativa da concentração plasmática de zinco com as variáveis clínicas e laboratoriais

No momento T0, considerando os dois grupos do estudo, a correlação entre a concentração plasmática de zinco e estado nutricional foi considerada, do ponto de vista estatístico, como de média intensidade ( $r=0,33$ ;  $p=0,07$ ).

Também foram realizadas análises correlativas para verificar a associação da concentração plasmática de zinco com as demais variáveis clínicas e laboratoriais estudadas, nos momentos T0, T7 e T20, por grupo. Tais resultados encontram-se detalhados na Tabela 3 e 4.

Tabela 3. Índice de correlação da concentração plasmática de zinco com variáveis clínicas e laboratoriais do grupo A

| Grupo A              |       |      |       |      |       |      |
|----------------------|-------|------|-------|------|-------|------|
| Variáveis\momentos   | T0    | p    | T7    | p    | T20   | p    |
| Hemoglobina          | -0,12 | 0,71 | -0,08 | 0,79 | -0,58 | 0,07 |
| Número de leucócitos | 0,19  | 0,56 | 0,55  | 0,07 | 0,30  | 0,39 |
| Número de plaquetas  | -0,04 | 0,90 | 0,28  | 0,39 | -0,34 | 0,33 |
| AST                  | 0,56  | 0,06 | 0,23  | 0,49 | 0,51  | 0,12 |
| ALT                  | 0,34  | 0,30 | 0,02  | 0,95 | 0,19  | 0,58 |
| Área do Baço         | 0,21  | 0,53 | -0,27 | 0,40 | -0,14 | 0,69 |
| Tamanho do fígado    | 0,17  | 0,61 | -0,18 | 0,59 | 0,12  | 0,73 |

Tabela 4. Índice de correlação da concentração plasmática de zinco com variáveis clínicas e laboratoriais do grupo G

| Grupo G              |       |      |       |      |       |      |
|----------------------|-------|------|-------|------|-------|------|
| Variáveis\momentos   | T0    | p    | T7    | p    | T20   | p    |
| Hemoglobina          | 0,11  | 0,30 | -0,05 | 0,84 | 0,03  | 0,90 |
| Número de leucócitos | 0,32  | 0,25 | 0,28  | 0,26 | -0,19 | 0,43 |
| Número de plaquetas  | -0,54 | 0,07 | -0,27 | 0,27 | 0,27  | 0,27 |
| AST                  | 0,18  | 0,46 | 0,07  | 0,76 | -0,27 | 0,27 |
| ALT                  | 0,22  | 0,37 | 0,24  | 0,33 | 0,25  | 0,30 |
| Área do Baço         | -0,11 | 0,65 | -0,32 | 0,19 | -0,15 | 0,54 |
| Tamanho do fígado    | 0,19  | 0,43 | 0,02  | 0,05 | 0,01  | 0,96 |

Conforme constatado anteriormente, os valores de correlação variaram entre  $-0,58 \leq r \leq 0,56$ , indicando que a correlação do zinco com as demais variáveis foi de média e baixa intensidade.

## 6 DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral é uma doença com ampla distribuição mundial, atingindo no Brasil vinte e dois estados, entre eles o Mato Grosso do Sul. É uma doença que tem sido abordada sob diversos aspectos, sendo aqui estudada sob a ótica do elemento traço zinco.

Quanto ao gênero, há relatos de predominância da doença no gênero masculino (PASTORINO *et al.*, 2002) sendo que em outros estudos não há diferenças (BRUSTOLONI, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2004).

No presente estudo não houve diferença significativa em relação ao gênero, corroborando com estudo local e nacional. Quanto à idade, foi observada uma prevalência absoluta para a faixa etária abaixo dos 5 anos. Esse dado já havia sido relatado por outros autores e também foi demonstrado em estudo prévio, realizado no mesmo serviço hospitalar, com maior número de crianças (GONTIJO & MELO 2004; BRUSTOLONI, 2006).

É amplamente conhecido que a gravidade da LV não é dada apenas pela sua ampla distribuição e alta incidência, mas também pela possibilidade de evoluir de forma desfavorável quando associada a deficiências nutricionais. Dados epidemiológicos e clínicos relacionam o estado nutricional com a adequação da imunocompetência dos indivíduos quanto ao risco de adquirir infecção. Condições ambientais, sanitárias e de higiene pessoal inadequadas, água e alimentos contaminados, associados ao baixo grau de instrução obviamente contribuem para uma maior suscetibilidade dos indivíduos às infecções. A inter-relação entre nutrição e sistema imune foi consolidada a partir dos anos setenta, quando testes

imunológicos foram inseridos nos protocolos de avaliação do estado nutricional (SALGUEIRO, 2000).

Neste contexto, a LV que é a forma clínica mais grave, se apresenta como uma doença re-emergente, acometendo as populações de baixa renda em até 80% dos casos. No Brasil, a desnutrição protéico-calórica ainda figura como um importante problema de saúde pública, especialmente em crianças menores de 5 anos de idade. Segundo o relatório da UNICEF para 2005, 11% das crianças brasileiras apresentavam escore  $Z < -2$  para estatura/idade, o que caracteriza o diagnóstico de desnutrição (UNICEF, 2005). No presente estudo, o comprometimento nutricional estava presente em 31% das crianças sendo a maioria pertencente ao grupo G. A predominância deste achado neste grupo provavelmente é multifatorial, envolvendo não só os aspectos da doença como também a menor faixa etária. A doença, pelo seu caráter subagudo e crônico colabora para o agravar o estado nutricional dos pacientes, sendo este um dos fatores associados ao maior risco de óbitos, requerendo intervenção precoce (BRASIL, 2010).

A prevalência mundial da deficiência de zinco é desconhecida, porém Prasad (1996), afirma que, possivelmente, esta deficiência no mundo seja tão prevalente quanto a de ferro, principalmente quando se avalia a faixa etária pediátrica. Em estudo com dois grupos de crianças americanas pertencentes às famílias de baixa renda, sendo um de afrodescendentes e outro de crianças hispânicas, mostrou baixa concentração do mineral em 12,5% das crianças, correspondendo à 19,4% nas afrodescendentes e 4,8% nas hispânicas (COLE *et al.*, 2010).

No Brasil, no interior de São Paulo, Favaro e Vannucchi (1990) obtiveram resultados semelhantes pela avaliação de 126 crianças entre 2 a 7 anos de idade e



também pertencentes à famílias de baixa renda. Realmente, 13% dessas crianças apresentaram a concentração plasmática de zinco abaixo de 0,7 mg/L.

No presente estudo, a correlação entre desnutrição e concentração plasmática de zinco foi estatisticamente de média intensidade. No entanto, do ponto de vista clínico, sendo o zinco um elemento rapidamente intercambiável entre os diversos compartimentos do organismo, este resultado não é surpreendente. As fontes mais abundantes de zinco para o ser humano estão nos alimentos de origem animal, que tem maior concentração de proteínas e que, de modo geral, são de custo mais elevado e consequentemente ingeridos em menor quantidade pela criança pertencente a famílias de baixa renda. Assim, é possível considerar este dado de relevante significado clínico.

Devido ao fato de haver um rigor homeostático do organismo na manutenção dos níveis plasmático deste elemento, sugere-se atualmente, que para avaliar a prevalência da deficiência do mineral, o valor de corte seja considerado de 0,81mg/L (COLE *et al.*, 2010).

Na presente investigação, uma porcentagem significativa das crianças (24,1%) apresentou inicialmente valores plasmáticos baixos de Zn, isto é, menor que 0,80 mg/L, que continuou reduzindo durante o período de tratamento. Do ponto de vista clínico, considerando os efeitos do Zn relacionados ao sistema imune, pode-se considerar maior vulnerabilidade destes pacientes às complicações infecciosas.

Quanto à suplementação desse elemento na leishmaniose, estudo clínico com pacientes portadores da forma cutânea da doença, mostrou que a taxa de cura do grupo suplementado com 10mg/kg foi de 96,9%, enquanto que no grupo controle não ocorreu cicatrização das lesões no mesmo período de observação (SHARQUIE, 2001).

Outro estudo recente em pacientes também portadores de leishmaniose cutânea, onde um grupo recebeu apenas sulfato de zinco (10mg/k/dia) e o outro antimoniato de N-metilglucamina mostrou que não houve diferença quanto à resposta terapêutica, obtendo-se a mesma porcentagem de cura entre os dois grupos (YAZDANPANA, 2011). Isto torna evidente a importância de se considerar a plena atividade do sistema imunológico no combate a esta doença. Obviamente esses dados não podem ser extrapolados para os casos de LV, mas as intervenções para o adequado funcionamento do sistema imune é altamente desejável.

Em relação ao comportamento do zinco no paciente portador de LV, os estudos são referentes apenas à população adulta. Em áreas endêmicas da doença, a concentração plasmática de zinco é significativamente mais baixa nos portadores de LV do que nos controles (MISHRA *et al.*, 2010).

Deste modo, na presente investigação, alta porcentagem de crianças, no T0 apresentavam valores plasmáticos baixos de zinco, podendo ser considerado achado altamente indicativo para suplementação deste elemento desde o início do tratamento. Após uma semana de tratamento (T7), o número de paciente com zinco plasmático baixo aumentou para 27,5%. Deve ser notado que destes pacientes, 38,8% pertenciam ao grupo G. Apesar destes dados não revelarem diferença estatística significativa, há de se considerar a relevância do ponto de vista clínico, pois um maior contingente de pacientes estava agora incluído numa situação de maior risco.

No momento T20 do estudo, ao final do tratamento, o número de pacientes com déficit de zinco não se alterou substancialmente. É provável que a redução inicial do zinco (T0) não foi decorrente apenas do processo de doença, mas sim de deficiência nutricional pré-existente. Também deve ser considerado que, apesar dos

pacientes permaneceram internados durante todo período de estudo, o que, de certa forma, garantiu o aporte nutricional adequado, não foi suficiente para repor os déficits.

Assim comprova-se a necessidade de dosagem laboratorial do zinco, bem como sua suplementação quando necessário. Por outro lado, a ausência de diferença estatística significativa entre os 2 grupos (A e G) durante o tratamento também assegura que as drogas aplicadas nos pacientes não exerceram maiores efeitos sobre as concentrações plasmáticas de zinco, o que é bastante favorável do ponto de vista clínico.

No cenário da criança com LV, as infecções são frequentes e constituem fatores de risco para complicações e óbito. Neste contexto, a suplementação de Zn estaria duplamente justificada, quer do ponto de vista preventivo, isto é, como um imunomodulador e também auxiliando na recuperação de outras doenças infecciosas concomitantes.

Quanto à avaliação hematológica, a LV é uma doença caracterizada por diminuição das séries vermelha, branca e plaquetária. No presente estudo, as alterações hematológicas não foram diferentes das já publicadas, havendo recuperação progressiva de todas as séries até o final do tratamento (BRUSTOLONI, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2004). Observou-se, no entanto, um grande aumento de leucócitos no T7 para o grupo A, com diminuição paulatina até T20. É possível interpretar este fato como um dos efeitos adversos causados pela Anfotericina B (ANVISA, 2007).

Apesar dos efeitos benéficos do Zn na função leucocitária, estudos mostram que este elemento parece não influenciar no número total de leucócitos ou na concentração de hemoglobina (BONHAM *et al.*, 2003; HEGAZY *et al.*, 2010). No

presente estudo esta correlação foi de fraca a média intensidade. Neste caso, provavelmente, o aumento do número de leucócitos foi decorrente principalmente da resposta terapêutica instituída para a doença. É possível considerar esta mesma explicação para o caso da concentração da hemoglobina e do número de plaquetas.

As aminotransferases (AST/ALT) geralmente estão aumentadas durante o estado de doença, atingindo em torno de duas a três vezes do valor normal (BRASIL, 2006), fato este comprovado também no presente estudo. Como resposta terapêutica ao tratamento espera-se que as concentrações dessas enzimas diminuam, refletindo a normalização da função hepática. O uso de antimoniato de N-metilglucamina ou anfotericina B não exerceu efeito diferente entre os dois grupos em relação às aminotransferase em qualquer momento analisado.

No momento da admissão hospitalar, todos os pacientes apresentaram esplenomegalia como um dos sinais clínicos da doença. No momento T7 o grupo A apresentou um aumento da área do baço. Não seria esperado que esse fato ocorresse, uma vez que a Anfotericina B é uma droga bastante específica para o tratamento da LV. É possível considerar que a gravidade inicial da doença, associada a outros processos infecciosos, justifique esta forma de evolução. O fato é que no T20 os dois grupos apresentaram significativa redução da visceromegalia, não havendo diferença estatística entre eles.

Quanto à hepatomegalia, o aumento inicial não foi diferente para os grupos A e G, tendo ocorrido redução paulatina até T20, refletindo também a resposta ao tratamento instituído. Diante dos resultados é possível considerar que o uso de anfotericina B ou antimoniato não exerceu efeito diferente entre os grupos, com relação ao tamanho do fígado.

Quanto à correlação das concentrações plasmática de zinco com as outras variáveis estudadas, obtiveram-se valores de baixa e média intensidade. Cabe ressaltar que nos grupos A e G os sinais dos coeficientes de correlação são, em muitos casos, diferentes para o mesmo parâmetro, justificados pelas correlações de fraca intensidade, onde os valores são distribuídos de modo bastante disperso, resultando em correlações fracamente negativas ou positivas. O tratamento clínico da LV resulta em uma série alterações como aumento da células sanguíneas, que são ricas em zinco, redução de visceromegalias, lesão celular por toxicidade das drogas utilizadas, sendo que o balanço final resulta em diversas combinações. Assim, o Zn afetou as variáveis laboratoriais e clínicas estudadas, mas houve também influência de outros fatores sobre estas variáveis, sendo a mais evidente o próprio tratamento específico da doença.

No grupo A, a AST e a ALT foram os exames que mantiveram uma correlação diretamente proporcional com a concentração de Zn nos três momentos. O fígado desempenha um papel importante na homeostase do Zn, tanto no que se refere à síntese enzimática, como por representar um *pool* que pode ser rapidamente intercambiável com o plasma.

A deficiência de Zn tem sido implicada na patogênese de várias doenças hepáticas. Estudos mostram que ocorre redução na concentração deste elemento tanto na lesão hepática aguda como crônica, porém são poucos os estudos que delineiam o papel exato do Zn na patogênese da doença hepática (STAMOULIS *et al.*, 2007). Na presente investigação não foi possível estabelecer uma explicação clara e plausível para a correlação observada. A AST é uma enzima presente não só no fígado, como também em outros órgãos e tecidos como coração, rins e músculo. A anfotericina B é uma droga sabidamente nefrotóxica e cardiotoxica e pode ser

considerado que a lesão celular induzida, de certo modo interferiu nas concentrações de zinco.

Outro dado obtido foi a correlação de baixa intensidade entre as concentrações plasmática de zinco e a área do baço no T7 principalmente no grupo G. Sendo esta correlação negativa, ocorreu de fato uma diminuição do tamanho da víscera, proporcionalmente mais significativa do que a variação da concentração do zinco plasmático. É possível que não haja uma única explicação para este fato, isto é, se a regressão da área do baço espelha a resposta terapêutica, ou esta é mais adequada quando o paciente apresenta níveis plasmáticos de zinco mais elevados. Se esta última suposição for válida, podemos concluir que a suplementação deste mineral como adjuvante ao tratamento seria benéfica.

A leishmaniose visceral na infância representa uma doença grave, pois mesmo com o tratamento adequado, 1 a 5% evoluem a óbito, quer por resistência do parasita aos medicamentos, pela toxicidade das medicações específicas ou complicações da doença quando o diagnóstico é tardio. Por essa razão, o diagnóstico e a intervenção precoce das deficiências nutricionais, principalmente com relação ao elemento zinco são altamente desejáveis.

Propõe-se que outros estudos complementares a este, sejam realizados para se estabelecer comparações com os dados aqui obtidos.

O zinco afetou as variáveis laboratoriais e clínicas analisadas nesta pesquisa, mais houve a influência de outros fatores sobre tais variáveis, justificando, assim, ausência de correlações de alta intensidade. Além disso, os resultados constatados comprovam que, em determinado momento, a associação de uma variável com a concentração de zinco pode ser diretamente proporcional e inversamente proporcional.

Para confirmar este fato outro estudo com um grupo de pacientes com suplementação de zinco na Leishmaniose visceral seria necessário.

## 7 CONCLUSÕES

1. A dinâmica das concentrações plasmáticas de zinco é regida provavelmente por duas variáveis principais: alterações metabólicas devidas à doença e o estado nutricional.
2. A prevalência de desnutrição na criança portadora de leishmaniose visceral é elevada.
3. Um número expressivo de crianças portadoras de leishmaniose visceral apresenta deficiência de zinco ao final do tratamento.
4. As variações do hemograma são aquelas esperadas para o diagnóstico e para a resposta terapêutica da leishmaniose visceral.
5. A correlação entre concentração plasmática de zinco e valores de AST é maior quando comparada com a ALT.
6. Não é possível correlacionar a redução da visceromegalia unicamente às concentrações plasmáticas de zinco.
7. A utilização de anfotericina B ou antimoniato N-metil glucamina não exerce efeito sobre a concentração plasmática de zinco.



## 8 REFERÊNCIA BIBLIOGRAFIA

Alam DS, Yunus M, El Arifeen S, Chowdury HR, Larson CP, Sack DA, *et al.* Zinc treatment for 5 or 10 days is equally efficacious in preventing diarrhea in the subsequent 3 months among Bangladeshi children. *J Nutr.* 2011;141(2):312-5.

Al-Jurayyan NA, al-Nasser MN, al-Fawaz IM, al Ayed IH, al Herbish AS, al-Mazrou AM, *et al.* The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. *J Trop Pediatr.* 1995;41(3):143-8.

Alvarenga DG, Escalda PMF, Costa ASV, Monreal MTFD. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(2):194-7.

Bacellar O, D'Oliveira A Jr, Jerônimo S, Carvalho EM. M. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine.* 2000;12(8):1228-31.

Badaró R, Duarte MIS. Leishmaniose visceral (calazar). In: Veronesi R, Focaccia R, organizadores. *Tratado de infectologia.* 4ª ed. São Paulo: Atheneu; 2009. v. 2, p. 1.254-79.

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;154(6):1003-11.

Baruffa G, Cury P. Contribuição ao estudo do calazar em Mato Grosso. *Rev Patol Trop.* 1973;2(3):345-61.

Benoist B, Darnton-Hill I, Davidsson L, Fontaine O, editors. Recommendations for indicators of population zinc status. *Food Nutr Bull.* 2007; 28(3 Suppl):S399-400. Report of WHO/UNICEF/IAEA/IZiNCG Interagency meeting on zinc status indicators.

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;135(6):689-97.

Bonham M, O'Connor JM, Alexander HD, Coulter J, Walsh PM, McAnena LB, *et al.* Zinc supplementation has no effect on circulating levels of peripheral blood leucocytes and lymphocyte subsets in healthy adult men. Br J Nutr. 2003;89(5):695-703.

Brasil. Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral grave: normas e condutas. Brasília, DF: Ed. Ministério da Saúde; 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade. Brasília, DF: Ed. Ministério da Saúde; 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, DF: Ed. Ministério da Saúde; 2003. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, DF: Ed. Ministério da Saúde; 2010. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, DF: Ed. Ministério da Saúde; 2005. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Brustoloni YM. Leishmaniose visceral em crianças no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil: contribuição ao diagnóstico e ao tratamento [tese]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2006.

Caldas AJ, Silva DR, Pereira CC, Nunes PM, Silva BP, Silva AA, *et al.* Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luis-MA, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2001;34(5):445-51.

Carvalho EM, Barral A, Pedral-Sampaio D, Barral-Netto M, Badaró R, Rocha H, *et al.* Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. J Infect Dis. 1992;165(3):535-40.

Çelik Ü, Leblebisatan G, Alhan E, Aksaray N. Immune hemolytic anemia in association with visceral leishmaniasis. J Pediatr Inf. 2007;1:36-8.

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;156(6):1030-3.

Chagas E, Chagas AW. Notas sobre epidemiologia da leishmaniose visceral americana no Mato Grosso. O Hospital 1938;13:471-80.

Chavakis T, May AE, Preissner KT, Kanse SM. Molecular mechanisms of zinc-dependent leukocyte adhesion involving the urokinase receptor and beta2-integrins. Blood. 1999;93(9):2976-83.

Cimerman B, Cimeman, S. Condutas em infectologia. São Paulo: Atheneu; 2004.

Cole CR, Grant FK, Swaby-Ellis ED, Smith JL, Jacques A, Northrop-Clewes CA, *et al.* Zinc and iron deficiency and their interrelations in low-income African American and Hispanic children in Atlanta. Am J Clin Nutr. 2010;91(4):1027-34.

Cônsolo FZ. Suplementação de Zinco em crianças e adolescentes portadores de leucemia, Brasil [dissertação]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2012.

Cousins RJ. Systemic transport of zinc. In: Mills CF, editor. Zinc in human biology. London: Springer-Verlag; 1989. p. 79-93.

Cozzolino SMF. Biodisponibilidade de nutrientes. Barueri: Manole; 2007.

Cunha DF, Lara VC, Monteiro JP, Romero HD, Cunha SF. Retardo do crescimento em crianças com reação intradérmica positiva para leishmaniose: resultados preliminares. Rev Soc Bras Med Trop. 2001;34(1):25-7.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004;27(5):305-18.

Dutra-de-Oliveira JE, Marchini JS. *Ciências nutricionais*. 2ª ed. São Paulo: Sarvier; 1998.

Fávaro RMD, Vannucchi H. Níveis plasmáticos de zinco e antropometria de crianças da periferia de centro urbano no Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1990; 24(1):5-10.

Fernandes AG, Mafra D. Zinco e câncer: uma revisão. *Rev Saúde.com*. 2005;1(2):144-56.

Fischer Walker C, Black RE. Zinc and the risk for infectious disease. *Annu Rev Nutr*. 2004;24:255-75.

Fischer Walker C, Kordas K, Stoltzfus RJ, Black RE. Interactive effects of iron and zinc on biochemical and functional outcomes in supplementation trials. *Am J Clin Nutr*. 2005;82(1):5-12.

Fock RA, Vinolo MA, de Moura Sá Rocha V, de Sá Rocha LC, Borelli P. Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF-alpha in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. *Cytokine*. 2007;40(2):105-14.

Genaro O., Michalick MSM. Leishmaniose visceral americana. In: Neves DP, editor. *Parasitologia humana*. 11ª ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 67-83.

Gilead Sciences. Ambisome (amphotericin B) liposome for injection. San Dimas, CA: Gilead Sciences; 2007.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol*. 2004;7(3):338-49.

Hambidge M. Biomarkers of trace mineral intake and status. *J Nutr*. 2003;133 Suppl 3:948S-955S.

Harrison LH, Naidu TG, Drew JS, Alencar JE, Pearson RD. Reciprocal relationships between undernutrition and the parasitic disease visceral leishmaniasis. *Rev Infect Dis.* 1986;8(3):447-53.

Hegazy AA, Zaher MM, Abd El-Hafez MA, Morsy AA, Saleh RA. Relation between anemia and blood levels of lead, copper, zinc and iron among children. *BMC Res Notes.* 2010;3:133.

Henry JB. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 20<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole; 2008.

Ibs KH, Rink L. Zinc-altered immune function. *J Nutr.* 2003;133(5 Suppl 1):1452S-6S.

Jennifer J. Otten, Jennifer Pitz Hellwig, Linda D. Meyers, editors. Dietary reference intakes: The essential guide to nutrient requirements. Washington, DC: National Academy Press; 2001.

Keen CL, Gershwin ME. Zinc deficiency and immune function. *Annu Rev Nutr.* 1990;10:415-31.

Keusch GT. The history of nutrition: Malnutrition, infection and immunity. *J Nutr.* 2003;133(1):336S-340S.

Krishna SS, Majumdar I, Grishin NV. Structural classification of zinc fingers: Survey and summary. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(2):532-50.

Lazzerini M, Ronfani L. Oral zinc for treating diarrhoea in children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;1:CD005436.

Leishman WB. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. 1903. *Indian J Med Res.* 2006;123(3):1252-4; discussion 79.

Lopes LA, Patin RV, Weffort VRS, Dantar S Filho, Palma D. Avaliação do estado nutricional. In: Lopez FA, Campos D Jr, organizadores. *Tratado de pediatria.* Burueri: Manole; 2007. p. 1.458-72.

Machado PRL, Araújo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. *An Bras Dermatol*. 2004;79(6):647-62.

Mafrá D, Cozzolino SMF. Importância do zinco na nutrição humana. *Rev Nutr*. 2004;17(1):79-87.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJ, Amendoeira MR. Leishmaniose visceral (calazar). *JBM, J. Bras. Med*. 1981;41:61-84.

McCall KA, Huang C, Fierke CA. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr*. 2000;130(5S Suppl):1437S-46S.

Melnikov P, da Cruz Montes Moura AJ, Batista Palhares D, Martimbianco de Figueiredo CS. Zinc and copper in colostrum. *Indian Pediatr*. 2007;44(5):355-7.

Miller WJ. Zinc in animal and human health. In: Rose J, editor. *Trace elements in health: A review of current issues*. London: Butterworth; 2001. p. 182-92.

Mishra J, Carpenter S, Singh S. Low serum zinc levels in an endemic area of visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Indian J Med Res*. 2010;131:793-8.

Muller R. O exame morfológico da criança. In: Lopez FA, Campos D Jr, organizadores. *Tratado de pediatria*. Burueri: Manole; 2007. p. 1115-28.

Nascimento ELT, Medeiro IM. Leishmaniose visceral (calazar). In: Tavares W, Marinho LACM, organizadores. *Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2010. p. 706-13.

Oliveira ALL, Paniago AMM, Dorval MEC, Oshiro ET, Leal CR, Sanches M, *et al*. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(5):446-50.

Oliveira JM, Fernandes AC, Dorval MEC, Alves TP, Fernandes TD, Oshiro ET, *et al*. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(2):188-93.

Organização Mundial da Saúde. Elementos traço na nutrição e saúde humanas. São Paulo: Roca; 1998.

Ostrosky-Zeichner L, Marr KA, Rex JH, Cohen SH. Amphotericin B: Time for a new “gold standard”. *Clin Infect Dis*. 2003;37(3):415-25.

Pearson RD, Cox G, Jeronimo SM, Castracane J, Drew JS, Evans T, *et al*. Visceral leishmaniasis: A model for infection-induced cachexia. *Am J Trop Med Hyg*. 1992;47(1 Pt 2):8-15.

Penny ME, Marin RM, Duran A, Peerson JM, Lanata CF, Lönnerdal B, *et al*. Randomized controlled trail of the effect of daily supplementation with zinc or multiple micronutrients on the morbidity, growth, and micronutrient status of young Peruvian children. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(3):457-65.

Prasad AS, Beck FW, Bao B, Snell D, Fitzgerald JT. Duration and severity of symptoms and levels of plasma interleukin-1 receptor antagonist, soluble tumor necrosis factor receptor, and adhesion molecules in patients with common cold treated with zinc acetate. *J Infect Dis*. 2008;197(6):795-802.

Prasad AS. Zinc deficiency in women, infants and children. *J Am Coll Nutr*. 1996;15(2):113-20.

Prasad AS. Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. *Mol Med*. 2008;14(5-6):353-7.

Queiroz MJA, Alves JGB, Correia JB. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. *J Pediatr*. 2004;80(2):141-6.

Rey L. Bases da parasitologia médica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Rey LC, Martins CV, Ribeiro HB, Lima HAM. Leishmaniose visceral americana (calazar) em crianças hospitalizadas de área endêmica. *J Pediatr*. 2005;81(1):73-8.

Salgueiro MJ, Zubillaga MB, Lysionek AE, Caro RA, Weill R, Boccio JR. The role of zinc in the growth and development of children. *Nutrition*. 2002;18(6):510-9.

Salgueiro MJ, Zubillaga MB, Lysionek AE, Sarabia MI, Caro RA, De Paoli T, et al. Bioavailability, biodistribution, and toxicity of BioZn-AAS(1): A new zinc source – comparative studies in rats. *Nutrition*. 2000;16(9):762-6.

Sandstead HH. Understanding zinc: Recent observations and interpretations. *J Lab Clin Med*. 1994;124(3):322-7.

Santos MA, Marques RC, Farias CA, Vasconcelos DM. Indicadores de reposta insatisfatória ao antimônio pentavalente no tratamento da leishmaniose visceral americana. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(6):629-33.

Savino W. The thymus gland is a target in malnutrition. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56 Suppl 3:S46-9.

Sena KCM, Pedrosa LFC. Efeitos da suplementação com zinco sobre o crescimento, sistema imunológico e diabetes. *Rev Nutr*. 2011;18(2):251-9.

Shankar AH, Prasad AS. Zinc and immune function: The biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr*. 1998;68(2 Suppl):447S-63S.

Sharquie KE, Najim RA, Farjou IB, Al-Timimi DJ. Oral zinc sulphate in the treatment of acute cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol*. 2001;26(1):21-6.

Shils MC, Olson JÁ, Shike M, Ross AC. Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença. 9ª ed. São Paulo: Manole; 2003.

Singh M. Role of micronutrients for physical growth and mental development. *Indian J Pediatr*. 2004;71(1):59-62.

Sprietsma JE. Zinc-controlled Th1/Th2 switch significantly determines development of diseases. *Med Hypotheses*. 1997; 49:1-14.



Sturniolo GC, Montino MC, Rossetto L, Martin A, D'Inca R, D'Odorico A, et al. Inhibition of gastric acid secretion reduces zinc absorption in man. *J Am Coll Nutr.* 1991;10(4):372-5.

Subramanian KS. Determination of metals in biofluids and tissues: Sample preparation methods for spectroscopic techniques. *Spectrochim Acta B.* 1996;51(3):291-319.

Sundar S, Agrawal G, Rai M, Makharia MK, Murray HW. Treatment of Indian visceral leishmaniasis with single or daily infusions of low dose liposomal amphotericin B: Randomized trial. *BMJ.* 2001;323(7310):419-22.

Valavi E, Hakimzadeh M, Shamsizadeh A, Aminzadeh M, Alghasi A. The efficacy of zinc supplementation on outcome of children with severe pneumonia. A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Indian J Pediatr.* 2011;78(9):1079-84.

Vianna G. Tratamento da leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tártaro emético. *Arq Bras Med.* 2012;4:426-8.

World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Human vitamin and mineral requirements: Report of a joint FAO/WHO expert consultation – Bangkok, Thailand. Rome: FAO; 2002.

World Health Organization; The United Nations Children's Fund. WHO/UNICEF Joint Statement: Clinical management of Acute Diarrhoea. Geneva: WHO; 2004.

Yazdanpanah MJ, Banihashemi M, Pezeshkpoor F, Khajedaluee M, Famili S, Tavakoli Rodi I, et al. Comparison of oral zinc sulfate with systemic meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Dermatol Res Pract.* 2011;2011(2011):269515.

Yokoi K, Sandstead HH, Egger NG, Alcock NW, Sadagopa Ramanujam VM, Dayal HH, et al. Association between zinc pool sizes and iron stores in premenopausal women without anaemia. *Br J Nutr.* 2007;98(6):1214-23.

Zanoni LZ, Brustoloni YM, Melnikov P, Cônsolo CE. Antimony containing drug and ECG abnormalities in children with visceral leishmaniasis. *Biol Trace Elem Res.* 2009;132(1-3):35-40.

## APÊNDICE

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Nome do Projeto: Pesquisadoras Responsáveis:** Débora Cardozo Bonfim Carbone

**Orientadora:** Lourdes Zélia Zanoni Consolo

**Objetivo da Pesquisa:** Avaliar a dinâmica da concentração plasmática de zinco em crianças com leishmaniose visceral durante o tratamento clínico.

Você está sendo convidado (a) permitir a participação voluntária do seu filho (a) de uma pesquisa. Você precisa decidir se vai deixar teu filho (a) participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver. Este estudo está sendo conduzida pela mestrande Débora Cardozo Bonfim Carbone.

A finalidade da pesquisa determinar a concentração plasmática de Zinco em crianças com leishmaniose visceral através da coleta de sangue.

Será garantida sigilosidade e confidencialidade quanto ao seu nome, ao nome da criança observada e quanto aos dados coletados, sendo que esses dados serão utilizados apenas com o objetivo deste estudo e divulgação em congresso e revistas. Você poderá escolher não fazer parte do estudo, ou pode desistir a qualquer momento, sem prejuízos. Você não pagará nenhuma quantia em dinheiro para participação neste estudo, também não receberá quantia alguma e receberá uma via assinada deste termo de consentimento.

As pesquisadoras se comprometem perante os entrevistados de prestar quaisquer esclarecimentos que eventualmente possam surgir antes, durante e após a coleta de dados, entrando em contato com: Débora Cardozo Bonfim Carbone fone 92530235 Se você tiver alguma consideração ou dúvida ética da pesquisa, entre em contato com a Diretoria de NHU.

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_, responsável legal pelo menor \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_ declaro que li, entendi e/ou que foram lidas para mim, este formulário de consentimento e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e que autorizo meu filho a ser voluntário (a) deste estudo.

Campo Grande, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_

## ANEXO



**Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**  
**Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS**

*Carta de Aprovação*

O protocolo nº 2207 CAAE 0305.0.049.000-11 da Pesquisadora Débora Cardozo Bonfim Carbone, intitulado "Concentração dos elementos traços em crianças com Leishmaniose Visceral", e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 29 de setembro de 2011, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.



Edilson Reis

Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 11 de agosto de 2011.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>  
[bioetica@propp.ufms.br](mailto:bioetica@propp.ufms.br)  
fone 0XX67 345-7187