

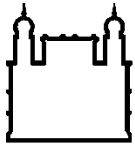
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

INFLUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS E FUNCIONAIS DE
LINFÓCITOS T E B NA PREDISPOSIÇÃO ÀS RECIDIVAS DA
LEISHMANIOSE VISCERAL EM PACIENTES COINFECTADOS PELO
HIV-1

MARIA LUCIANA SILVA DE FREITAS

Rio de Janeiro
Dezembro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MARIA LUCIANA SILVA DE FREITAS

Influência das alterações fenotípicas e funcionais de linfócitos T e B na predisposição às recidivas da leishmaniose visceral em pacientes coinfetados pelo HIV-1

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientador (es): Prof^a. Dra. Alda Maria Da-Cruz
Prof^a. Dra. Joanna Reis Santos-Oliveira

RIO DE JANEIRO
Dezembro de 2019

de Freitas, Maria Luciana Silva.

Influência das alterações fenotípicas e funcionais de linfócitos T e B na predisposição às recidivas da leishmaniose visceral em pacientes coinfetados pelo HIV-1 / Maria Luciana Silva de Freitas. - Rio de Janeiro, 2019.

xiv, 248f. f.; il.

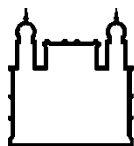
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2019.

Orientadora: Alda Maria Da Cruz.

Co-orientadora: Joanna Reis Santos de Oliveira.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Coinfecção leishmaniose visceral/HIV. 2. Resposta imune. 3. Recidivas.
I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: MARIA LUCIANA SILVA DE FREITAS

**INFLUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS E FUNCIONAIS DE LINFÓCITOS T
E B NA PREDISPOSIÇÃO ÀS RECIDIVAS DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM
PACIENTES COINFECTADOS PELO HIV-1**

**ORIENTADOR (ES): Prof^a. Dra. Alda Maria Da-Cruz
Prof^a. Dra. Joanna Reis Santos-Oliveira**

Aprovada em: 11 de Dezembro de 2019

EXAMINADORES:

**Prof^a. Dra. Mariza Gonçalves Morgado
Prof. Dr. José Ângelo Lauletta Lindoso
Prof^a. Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto
Prof^a. Dra. Danuza Almeida Esquenazi
Prof^a. Dra. Lucimar Gonçalves Milagres**

Rio de Janeiro, 11 de Dezembro de 2019.

A Deus. Ao meu esposo, Rafael. Aos meus pais, Verônica e Ageu. À minha irmã, Elizabety. Aos meus avós, Pedro e Josefa (*in memoriam*). Aos meus familiares, especialmente Fernanda, Jaqueline e J. Henrique. Às minhas orientadoras, Dra. Alda e Dra. Joanna.

AGRADECIMENTOS

Eu acho que nós (alunos) deveríamos fazer os agradecimentos no primeiro dia de doutorado, com todo aquele gás, entusiasmo e sem sentir um quarto do cansaço que se sente justamente nesse último dia. Mas não iria fazer sentido, não teríamos nem a quem agradecer direito, só o tempo nos permite isso. Portanto, mesmo que quase totalmente esgotada, me sinto na obrigação de escrever esses agradecimentos. Início agradecendo a Deus, sem Ele nada seria possível, eu nem existiria. Agradeço a minha família, cada um deles, incluindo a família que ganhei quando casei, pois se cheguei até aqui é por eles e para eles, que mesmo não tendo vivido as mesmas oportunidades que eu, me mostraram a importância de estudar e correr atrás dos meus sonhos. E como mãe é o que temos de mais valioso na vida, agradeço imensamente a minha mãe Verônica, por todos os ensinamentos e por todas as vezes que ela me falou “calma, você já passou por isso tantas vezes”. Agradeço ao meu amado esposo Rafael, por seu meu companheiro de dia-a-dia, que muitas vezes levantou minha cabeça e falou que eu não tinha que desistir, me apoiando e me fazendo acreditar o quanto eu sou capaz. Agradeço a minha irmã Elizabety e os meus amigos mais próximos, que souberam entender as minhas ausências e que se esforçaram muito pra entender o que eu faço (me fazendo explicar várias vezes, rs).

Agradeço as minhas queridas orientadoras, e por minha sorte amigas, Dra. Joanna Reis e Dra. Alda Maria, por terem confiado em me orientar, e por serem meus principais espelhos na ciência, sempre me mostrando que eu posso ir além do que imagino ser capaz. Ressalto o quanto a Joanna foi e é importante na minha vida, por todos esses anos de orientação e amizade, sempre disposta a me ensinar e me fazer crescer pessoal/profissionalmente.

Agradeço a todos os meus queridos amigos e companheiros de trabalho do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, não quero citar um a um para não esquecer ninguém e ser injusta, mas vocês fazem o nosso LIPMED o melhor e mais entrosado laboratório da FIOCRUZ. Agradeço em especial minhas amigas Samyra e Gabriela, que foram meus braços direito e esquerdo nesses últimos anos, tudo se tornou mais fácil pra mim com vocês. Também agradeço em especial ao Dr. Adriano Gomes, por todas as vezes que se fez um terceiro orientador pra mim, sempre disposto a me ajudar e tirar minhas dúvidas, e a Rosa, por organizar “nossa vida” na sala 9B, e literalmente, manter a qualidade do nosso trabalho.

Agradeço a todos os nossos colaboradores: Dra. Glauca Cota, Dra. Ana Rabello, Dra. Carmem Giacoia, Dr. Otacílio Moreira, Dr. Wilson Savino, Dr. Zilton Vasconcelos e a MSc Juliana Dutra, Dr. Leonardo Soares e Dra Maria Rita e toda a equipe do Hospital Eduardo de Menezes/MG, especialmente a Ludmilla e Miriam. Cada um dentro da sua expertise ajudou para no andamento e aprimoramento deste trabalho.

Agradeço a toda equipe da Plataforma do laboratório multiusuário do INI/FIOCRUZ, especialmente a Simone, que sempre estiveram prontos a nos fornecer o serviço de referência.

Agradeço a equipe da plataforma de citometria de fluxo (PDTIS), em especial as Dra. Mariana Gandini e Dra. Thabata Duque, que estiveram sempre disponíveis a nos ajudar, seja arrumando um horário na agenda disputada, seja discutindo nossos dados e nos ensinando um pouco sobre citometria.

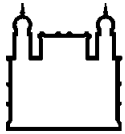
Aos membros da banca examinadora que prontamente aceitaram o convite; foram todos escolhidos carinhosamente e serão indispensáveis para o crescimento deste trabalho. Em especial, gostaria agradecer a minha revisora, Dra. Luzia Pinto, que aceitou o desafio de revisar esta tese em tão pouco tempo e em meio a tantos percalços;

Agradeço a todos os pacientes que sofrem destas enfermidades e aceitaram colaborar e participar deste estudo, mesmo sabendo que o estudo poderia não beneficiá-los diretamente. Muito obrigada por confiarem na pesquisa e na medicina e por continuarem lutando por suas vidas.

Agradeço o auxílio do Universal/CNPq, CNE/FAPERJ e Prociencia/IFRJ pelo financiamento do projeto, sem o qual este trabalho não poderia estar sendo realizado. Da mesma maneira, ao IOC pelo suporte financeiro.

Agradeço ao IOC pela concessão da bolsa de doutorado no período de 2016-2017 e a CAPES pela concessão da bolsa de doutorado no período de 2017-2019.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.” (Madre Tereza de Calcutá)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

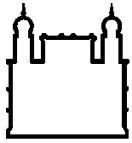
INFLUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS E FUNCIONAIS DE LINFÓCITOS T E B NA PREDISPOSIÇÃO ÀS RECIDIVAS DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM PACIENTES COINFECTADOS PELO HIV-1

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Maria Luciana Silva de Freitas

A leishmaniose visceral associada à infecção pelo HIV-1 (LV/HIV) é considerada uma coinfeção emergente, grave e de difícil manejo clínico, uma vez que os pacientes, comumente, falham na resposta ao tratamento anti-*Leishmania*, apresentam alta taxa de mortalidade e evoluem com frequentes recidivas da LV. Sabe-se que a infecção por *Leishmania* é um cofator para a potencialização do grau de imunossupressão, de ativação celular e *status* inflamatório exacerbado em pacientes LV/HIV, mesmo sob terapia antirretroviral combinada (cART) e pós-tratamento da LV. Aliado a isso, a imunosenescência, principal consequência da manutenção da ativação imune, poderia contribuir para um prejuízo qualitativo da resposta efetora ao parasito, que culminaria nas frequentes recidivas da LV. Então, nosso objetivo foi avaliar a influência do grau de ativação e dos fatores decorrentes da senescência de linfócitos T, assim como das subpopulações de linfócitos B sobre as frequentes recidivas da LV em pacientes LV/HIV. Para isso, 18 pacientes LV/HIV foram separados em não-recidivantes (n=6; NR-LV/HIV, um único episódio de LV ao longo da vida) e recidivantes (n=12; R-LV/HIV, com mais de um episódio de LV ativa), sendo acompanhados desde a fase ativa até 12 meses após o tratamento anti-*Leishmania* (12 mpt). Grupos controles (LV apenas, HIV-1 apenas e sadios) foram incluídos neste estudo. Atualmente, 19 pacientes LV/HIV encontram-se em recrutamento, seguindo esse mesmo desenho experimental descrito. Os pacientes R-LV/HIV mantiveram altos percentuais de linfócitos T ativados, níveis elevados de translocação microbiana e de IgG3 anti-*Leishmania*, bem como baixas contagens de células TCD4⁺ até 12 mpt, diferente de pacientes NR-LV/HIV. Por outro lado, o percentual de células senescentes foi similar entre os grupos NR-LV/HIV e R-. Diante do ganho nas contagens de TCD4⁺ nos pacientes NR-LV/HIV, porém aliado a um estado fenotípico senescente, novas perguntas foram levantadas: 1) a distribuição do repertório de células T e o *status* inflamatório poderia refletir as diferenças na reconstituição imune desses grupos? 2) um melhor *output* tímico poderia ser determinante no processo de reconstituição imune dos pacientes NR-LV/HIV? Diante disso, verificou-se que os pacientes LV/HIV, independente de serem NR- ou R-, apresentaram o repertório TCRV β alterado em comparação aos indivíduos sadios. No entanto, a mobilização do repertório V β em TCD4⁺ foi mais homogênea, sobretudo nos NR-LV/HIV, enquanto em TCD8⁺ seguiu um padrão heterogêneo (expansões e/ou retrações de diferentes famílias V β), em especial nos R-LV/HIV, o que pode corroborar com os elevados níveis de ativação dessas células. Adicionalmente, os pacientes NR-LV/HIV diminuíram as frequências de várias famílias TCRV β aos 12 mpt em relação à LV ativa, o que foi de acordo com a diminuição no *status* inflamatório deste grupo aos 12 mpt. Confirmando a contribuição do timo para essa condição imune diferenciada, os NR-LV/HIV apresentaram um aumento nos níveis de TREC/10⁶PBMC aos 10 mpt em relação ao R- (p<0,05), cujos níveis foram sempre mais baixos do que os apresentados pelos mono infectados pelo HIV-1. Semelhante aos linfócitos T, uma intensa ativação de células B se correlacionou com altas frequências de células B exaustas, sobretudo na LV ativa. Além disso, baixos percentuais de células B *resting* de memória foram observados, bem como altos níveis de plasmócitos de vida longa no sangue periférico, que sugerem uma contínua circulação antigênica. Com exceção do perfil fenotípico dos linfócitos B, todos os nossos achados apontam que pacientes R-LV/HIV apresentam uma resposta imune sistêmica prejudicada, em termos de ativação celular, reconstituição imunológica e *output* tímico, que dificilmente pode ser revertido, ainda que sob carga viral e parasitária controladas pelos tratamentos específicos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INFLUENCE OF THE PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL CHANGES OF T AND B LYMPHOCYTES IN THE PREDISPOSITION TO RELAPSES OF THE VISCERAL LEISHMANIASIS IN HIV-1 CO-INFECTED PATIENTS

ABSTRACT

DOCTORAL THESIS IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Maria Luciana Silva de Freitas

Visceral leishmaniasis associated with HIV-1 infection (VL/HIV) is considered an emerging, severe and difficult clinical management co-infection, since patients normally fail to respond to anti-*Leishmania* treatment, have a high mortality rate and evolve with frequent VL relapses. It is known that the *Leishmania* infection is a cofactor for enhancing the degree of immunosuppression, cellular activation and exacerbated inflammatory status in VL/HIV patients, even under combined antiretroviral therapy (cART) and after treatment of VL. In addition, immunosenescence, the main consequence of maintaining immune activation, could contribute to a qualitative impairment of the effector response to the parasite, which would culminate in frequent relapses of VL. Then, our goal was to evaluate the influence of the activation degree and the factors resulting from T lymphocyte senescence, as well of the B-cell subpopulations on the frequent VL relapses in VL/HIV patients. For this, 18 VL/HIV patients were grouped in non-relapsing (n=6; NR-VL/HIV, a single episode of VL throughout life) and relapsing (n=12; R-VL/HIV, with more than one episode of active VL), being followed from the VL active phase up to 12 months after anti-*Leishmania* treatment (12 mpt). Control groups (VL only, HIV only and healthy) were included in this study. Currently, 19 VL/HIV patients are being recruited following the same experimental design described. The R-VL/HIV patients maintained high percentages of activated T-cell, elevated levels of microbial translocation and anti-*Leishmania* IgG3, as well low counts of CD4⁺ T cells up to 12 mpt, different from NR-VL/HIV patients. On the other hand, the percentages of senescent T-cells were similar between NR-VL/HIV and R- groups. Given the gain in CD4⁺ T counts in NR-VL/HIV patients, along with a senescent phenotypic status, new questions were raised: 1) Could T-cell repertoire distribution and inflammatory status reflect the differences in the immune reconstitution of these groups? 2) Could a better thymic output be determinant in the process of immune reconstitution of NR-VL/HIV patients? Therefore, it was verified that VL/HIV patients, regardless of whether NR- or R-, presented an altered TCRV β repertoire compared to healthy individuals. However, the mobilization of the V β repertoire on CD4⁺ T cells was more homogeneous, especially in the NR-VL/HIV, whereas on CD8⁺ T cells followed a heterogeneous pattern (expansions and/or retractions of different V β families), mainly in the R-VL / HIV, which may corroborate with the high activation levels of these cells. Additionally, NR-VL/HIV patients decreased the frequencies of several TCRV β families at 12 mpt in relation to the active VL, which was in accordance with the decrease in the inflammatory status of this group at 12 mpt. Confirming the contribution of thymus to this differentiated immune condition, NR-VL/HIV showed an increase in TREC/10⁶PBMC levels at 10 mpt compared to R- ($p < 0.05$), whose levels were always lower than those presented by mono-infected HIV-1 patients. Similar to T-lymphocytes, the intense activation of B cells correlated with high frequencies of exhausted B cells, especially VL active. In addition, low percentages of memory resting B cells were observed, as well high levels of long-lived plasma cells in the peripheral blood, that suggested a continuous antigen circulation. Except for the phenotypic profile of B lymphocytes, all our findings indicate that R-VL/HIV patients present an impaired systemic immune response, in terms of cellular activation, immune reconstitution and thymic output that hardly can be reverted, even under controlled viral and parasitic load by specific therapies.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral (LV), da infecção pelo HIV-1 e da associação LV/HIV	1
1.2 Imunopatogênese da leishmaniose visceral (LV)	7
1.3 Imunopatogênese da infecção pelo HIV-1	14
1.4 Aspectos imunopatogênicos da associação leishmaniose visceral/HIV-1 (LV/HIV)	24
1.5 Consequências imunológicas do grau de ativação imune crônica e sua influência sobre a imunopatogênese da coinfeção leishmaniose visceral/HIV-1 (LV/HIV)	31
1.5.1 Imunosenescência e exaustão dos recursos imunes primários	31
1.5.2 Alterações no perfil de mobilização do repertório V β de células T (TCR V β) periféricas	39
2. JUSTIFICATIVA	44
3. OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo geral	47
3.2 Objetivos específicos	47
CAPÍTULO 1	48
4. METODOLOGIA E RESULTADOS	49
4.1 Artigo 1	49
4.2 Manuscrito 1 (submetido)	68
CAPÍTULO 2	118

5. APÊNDICE DE RESULTADOS	119
5.1 Justificativa	119
5.2 Casuística	121
5.3 Obtenção de amostras biológicas e estratégia metodológica	124
5.4 Estratégia de análise citofluorimétrica	125
5.5 Análise estatística	126
5.6 Resultados	126
6. DISCUSSÃO	140
7. CONCLUSÕES	166
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	169
9. ANEXOS	189
ANEXO A – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido	189
ANEXO B – Aprovações do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos	207
ANEXO C – Artigo publicado: Thalidomide is associated with increased T cell activation and inflammation in antiretroviral-naïve HIV-infected individuals in a randomised clinical trial of efficacy and safety.	214
ANEXO D – Artigo publicado: Lower levels of leptin are associated with severity parameters in visceral leishmaniasis patients.	223
ANEXO E – Artigo aceito para publicação: Giardiasis alters Intestinal Fatty Acid Binding Protein (I-FABP) and plasma cytokines levels in children in Brazil.	238

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número de casos de leishmaniose visceral no mundo, em 2017.	2
Figura 2: Distribuição dos casos de leishmaniose visceral por estados brasileiros e Número de casos de LV por região brasileira no período de 2008 a 2017.	3
Figura 3: Distribuição do número de pessoas infectadas pelo HIV-1 por continente, em 2018.	5
Figura 4: Manifestações clínicas da leishmaniose visceral.	8
Figura 5: Curso clínico natural da infecção pelo HIV-1 na ausência de terapia antirretroviral combinada (cART).	17
Figura 6: Estratégia de análise citofluorimétrica para obtenção das subpopulações de células B.	119
Figura 7: Percentuais de linfócitos B totais, naive e <i>resting</i> de memória no sangue periférico de pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV) e pacientes com LV sem HIV-1, acompanhados prospectivamente.	133
Figura 8: Percentuais de linfócitos B ativados e exaustos no sangue periférico de pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV) e pacientes com LV sem HIV-1, acompanhados prospectivamente.	135
Figura 9: Percentuais de plasmócitos de vida curta e de vida longa no sangue periférico de pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV) e pacientes com LV sem HIV-1, acompanhados prospectivamente.	137
Figura 10: Correlação entre os níveis de linfócitos B ativados e os percentuais de células B exaustas, plasmócitos de vida curta e de vida longa em pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV).	138
Figura 11: Níveis plasmáticos de IgG total e subclasses IgG1 e IgG3 anti- <i>Leishmania</i> de pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV) na fase ativa e logo após o tratamento para a LV.	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Marcadores de superfície e fluorocromos utilizados para imunofenotipagem ex vivo de linfócitos B. **124**

Tabela 2: Características clínico-demográficas dos pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV). **128**

Tabela 3: Níveis de carga viral na fase ativa e de Contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ ao longo do acompanhamento clínico dos pacientes com leishmaniose visceral coinfectados com HIV-1 (LV/HIV) **130**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Aids	Do inglês, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC	Alofococianina
cART	Do inglês, Terapia antirretroviral combinada
CCR5	Do inglês, Receptor de células humanas para quimiocina da família CC
CD	Do inglês, <i>Cluster of differentiation</i>
PBMC	Do inglês, Células mononucleares de sangue periférico
CXCR4	Do inglês, Receptor de células humanas para quimiocina da família CXC
DNA	Do inglês, Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Do inglês, <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FITC	Do inglês, Isotiocianato de fluoresceína
GALT	Do inglês, Tecido linfóide associado à mucosa
gp	Do inglês, Glicoproteína do envelope do HIV-1
HIV-1	Do inglês, Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HLA-DR	Do inglês, Antígeno leucocitário humano do tipo II
IFABP	Do inglês, Intestinal fatty acid binding protein
IFN-γ	Do inglês, Interferon-gama
Igs	Imunoglobulinas
IL	Interleucina
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LM	Leishmaniose mucosa
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
NF-kB	Do inglês, Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	Do inglês, Natural killer
MIF	Do inglês, fator de inibição da migração de macrófagos
MIP-1	Do inglês, Proteína inflamatória de macrófago
PCR	Do inglês, Reação em cadeia da polimerase

PD-1	Do inglês, Programmed cell death 1
PE	Do inglês, Ficoeritrina
PercP	Do inglês, Peridina-clorofila
IPs	Inibidores de protease
RANTES	Do inglês, Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted
RNA	Do inglês, Ácido ribonucleico
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIV	Do inglês, Vírus da imunodeficiência símia
TCR	Do inglês, Receptor de células T
TGF-β	Do inglês, Fator de crescimento tumoral beta
TNF	Do inglês, Fator de Necrose Tumoral

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral (LV), da infecção pelo HIV-1 e da associação LV/HIV

A leishmaniose visceral (LV, também conhecida pelo nome indiano *kala-azar*, calazar), é a forma mais grave das leishmanioses, que se apresenta com envolvimento sistêmico e evolução crônica, podendo ser fatal se não tratada. No Brasil, assim como em outros países da América do Sul, América Central, Ásia Central, Bacia do Mediterrâneo e Oriente Médio, a LV tem como agente etiológico o protozoário da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*, transmitido através do repasto sanguíneo de fêmeas infectadas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia sp.* A LV no Brasil é caracterizada por um ciclo zoonótico, tendo o cão como principal reservatório da infecção. No Velho Mundo (Ásia e África), a espécie causadora da LV é a *Leishmania (L.) donovani*, transmitida pelo flebotomíneo do gênero *Phlebotomus sp.*, sendo caracterizada por um ciclo antroponótico, onde o humano é o principal reservatório.

A LV consiste em um grave problema de saúde pública, que afeta, sobretudo, regiões tropicais e subtropicais, permanecendo endêmica em 75 países ao redor do mundo (WHO, 2019). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, aproximadamente 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorram anualmente ao redor do mundo, sendo que dentre o real número de novos casos da doença, apenas cerca 25-45% são relatados à OMS (WHO, 2019). Em 2017, mais de 95% dos novos casos de LV no mundo estavam concentrados em dez países, sendo esses: Bangladesh, Brasil, China, Etiópia, Índia, Quênia, Nepal, Somália, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2019). Entretanto, tem se observado uma diminuição da incidência global de LV, uma vez que em 2012, a estimativa da OMS era de cerca de 200.000 a 400.000 novos casos da doença, estando esse fato associado a programas de diminuição de novos casos da doença, como em Bangladesh, cuja proposta é erradicar a doença até 2020 (Burza et al. 2018; Lindoso et al. 2018).

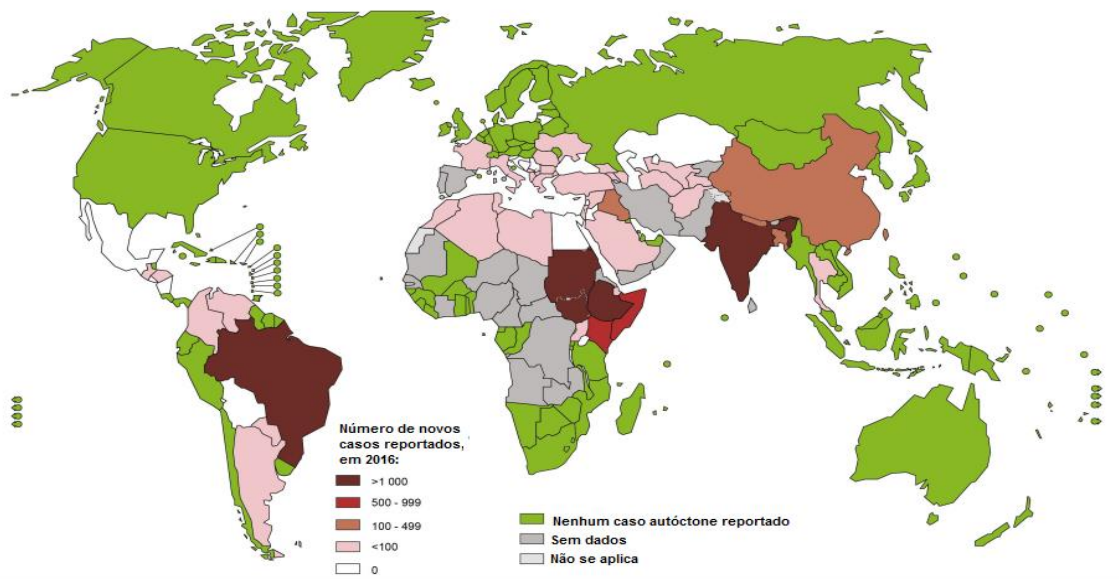


Figura 1: Número de casos de leishmaniose visceral no mundo, em 2016. Adaptado de WHO, 2018.

Nas Américas, a LV permanece endêmica em 11 países, sobretudo na América do Sul, tendo sido relatados à OMS 4.422 novos casos da doença, em 2017 (WHO, 2018). O Brasil contribui com mais de 90% dos casos de LV do continente, onde cerca de 4.300 novos casos da doença ocorreram no país em 2017 (WHO, 2018). Segundo o Ministério da Saúde, em 2017, aproximadamente 4.103 novos casos de LV foram relatados no Brasil, afetando primariamente homens adultos (64,8%) e crianças de 0 a 9 anos (40,9%) (Ministério da Saúde, 2017). Considerando a ocorrência de subnotificações dos casos de LV, estima-se que o número de casos da doença seja maior do que os descritos pela OMS e pelo Ministério da Saúde, variando em uma faixa realista de 4.500 a 6.800 novos casos por ano (Lindoso et al. 2014).

Os casos de LV no Brasil estão distribuídos em 23 unidades federativas das cinco regiões brasileiras, sendo que a região Nordeste contribui com cerca de 50% dos casos relatados no país (Ministério da Saúde, 2017) (Figura 2). A região Sudeste é a segunda região brasileira com o maior número de casos de LV reportados, seguida pelas regiões Norte e Centro-Oeste (Figura 2), aonde novos focos da doença vêm sendo detectados a cada ano, caracterizando um fenômeno de urbanização da LV, originariamente vista como uma doença com distribuição rural (Maia-Elkhoury et al. 2008). Desta forma, a doença se

encontra em constante expansão para as zonas peri-urbanas e urbanas, muito provavelmente como resultado de alterações antropogênicas, tais como o desmatamento, o crescimento desordenado das cidades, a presença concomitante do *Lu. longipalpis* e do reservatório doméstico, as precárias condições de habitação e saneamento básico da população, além da intensa migração das populações rurais para periferias urbanas (Maia-Elkhoury et al. 2008; Drumond & Costa, 2011; Reis et al. 2017). Essa urbanização da doença tem contribuído cada vez mais para a emergência de novos casos de LV associados à infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*).

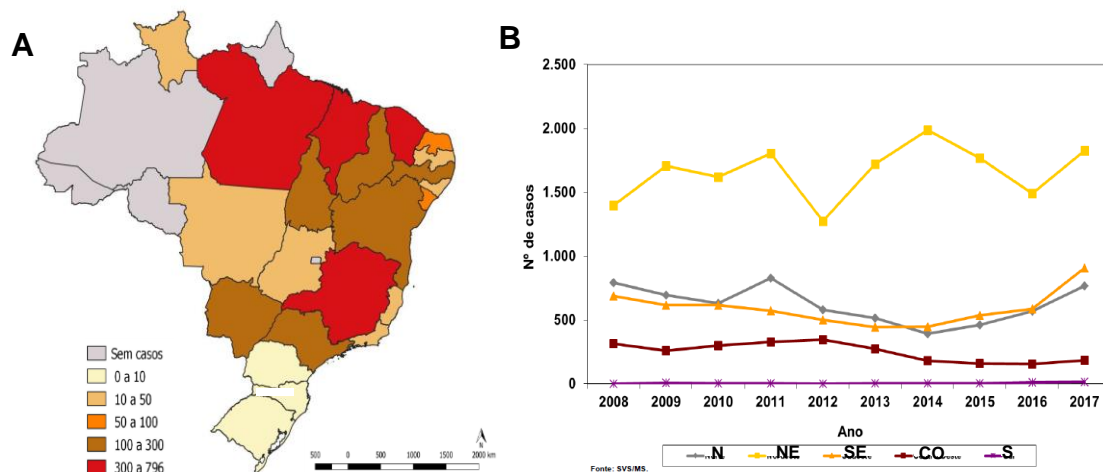


Figura 2: Distribuição dos casos de leishmaniose visceral (LV) por estados brasileiros (A). Número de casos de LV por região Brasileira no período de 2008 a 2017 (B). N (Norte); NE (Nordeste); SE (Sudeste); CO (Centro-Oeste); S (Sul). Fonte: Ministério da Saúde/SVS, 2017.

Paralelamente, estima-se que, globalmente, cerca de 37,9 milhões de pessoas estavam infectadas pelo HIV-1, em 2018. Dessas, aproximadamente 23,3 milhões faziam uso de terapia antirretroviral combinada (cART) neste mesmo ano (WHO, 2019). Ainda em 2018, cerca de 1,7 milhões de novos casos da infecção pelo HIV-1 foram reportados à OMS (WHO, 2019). O número de óbitos pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) foi de aproximadamente 770.000 casos, com uma taxa de letalidade de 1,71%, em 2018 (UNAIDS, 2019). Apesar desses dados ainda serem alarmantes, tem sido observado um importante declínio no número de casos novos da infecção pelo

HIV-1, bem como no número de óbitos por aids em comparação, por exemplo, aos dados de 2001, quando foram estimados cerca de 2,7 milhões de novos infectados pelo vírus e 1,7 milhões de óbitos por aids (UNAIDS, 2019). Adicionalmente, desde 2010 até 2018, esse declínio foi de 16% no número de novos casos de infecção e de 33% no número de óbitos por aids, tendo um impacto positivo no cenário global da infecção (UNAIDS, 2019). Tal fato parece estar fortemente associado ao aumento simultâneo do acesso/adesão à cART (terapia antirretroviral), cujo percentual foi de 24% em 2010 para 62% em 2018, aumentando consideravelmente a expectativa de vida de indivíduos HIV-1 positivos (UNAIDS, 2019).

O continente Africano contribui expressivamente com o maior número de pessoas vivendo com HIV-1 em comparação aos demais continentes. No entanto, a América consiste no terceiro continente com maior número de indivíduos infectados pelo vírus (UNAIDS, 2019) (Figura 3). Na América Latina, estimativas recentes apontam que cerca de 1,9 milhões de indivíduos em todas as faixas etárias estejam infectados pelo HIV-1 (UNAIDS, 2019). Em 2018, foram notificados aproximadamente 100.000 novos casos de infecção pelo HIV-1 (UNAIDS, 2019). O Brasil, por sua vez, está andando na contramão do que tem acontecido com a média global, consistindo no país latino-americano com o maior número de casos de infecção pelo HIV-1, sendo responsável por quase metade desses números apresentados pela América Latina. Estima-se que em 2018, no Brasil, aproximadamente 900.000 pessoas estavam infectadas pelo HIV-1 (UNAIDS, 2019).

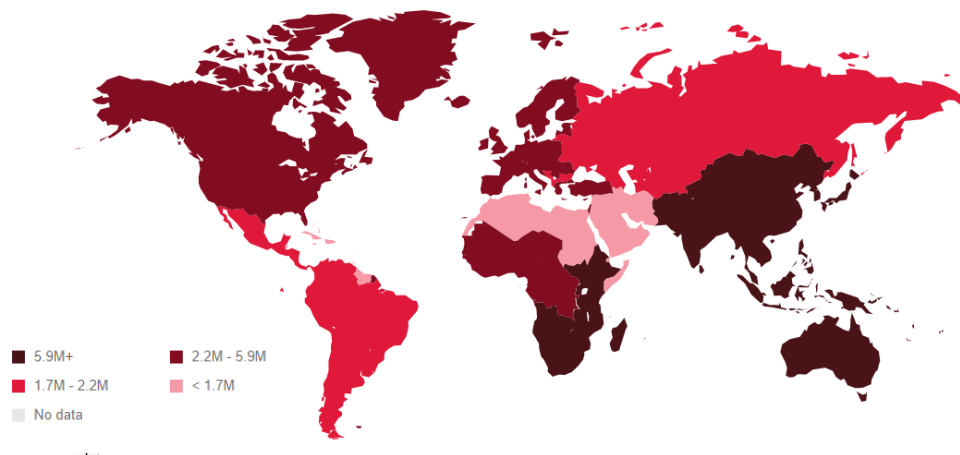


Figura 3: Distribuição do número de pessoas infectadas pelo HIV-1 por continente, em 2018. Fonte: UNAIDS, 2019.

De acordo com o último boletim do Ministério da Saúde, em 2018, 17.248 casos de infecção pelo HIV-1 foram notificados no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), com um aumento expressivo em comparação a 2007, onde 7.290 casos de infecção foram notificados (Ministério da Saúde, 2018). No que se refere aos dados sócio-demográficos, as regiões Sudeste e Nordeste, respectivamente, correspondem às regiões do país com o maior número de casos de infecção pelo HIV-1 notificados ao longo dos anos. Além disso, a epidemia de HIV/Aids no Brasil tem se concentrado, principalmente, em populações com comportamento de risco à infecção, como homens que fazem sexo com homens (HSH), transexuais, usuários de drogas injetáveis que compartilham seringas e agulhas, profissionais do sexo e pessoas privadas de liberdade. Em adição, tem sido observado uma constante heterossexualização, feminização, pauperização e ruralização da epidemia no decorrer dos anos.

Dessa forma, o aumento da difusão da infecção pelo HIV-1 para as áreas rurais e a constante urbanização da LV podem influenciar de forma importante a epidemiologia e a história natural de ambas as infecções. Em áreas endêmicas, onde muitos indivíduos apresentam LV assintomática, já está bem estabelecido que a presença da infecção pelo HIV-1 pode aumentar de 100 para 2320 vezes o risco de desenvolvimento da LV ativa, além de reduzir a probabilidade de uma resposta terapêutica de sucesso e aumentar a probabilidade de ocorrência de recidivas da doença (Alvar et al. 2008; Cota et al. 2011).

Diante disso, a associação LV/HIV emergiu, nos últimos anos, como um importante desafio no controle da LV. Ao mesmo tempo, a LV tem emergido como uma importante doença oportunista associada à infecção pelo HIV-1 (WHO, 2019). Tem sido claramente observada uma sobreposição entre as áreas de transmissão de LV e da infecção pelo HIV-1 (Lindoso et al. 2018), de modo que um terço dos casos de infecção pelo HIV-1 no mundo ocorra em áreas de risco para a transmissão de leishmanioses (Leite de Sousa-Gomes et al. 2017).

Atualmente, a associação LV/HIV tem sido reportada em 35 países ao redor do mundo. O cenário mais crítico em termos de alta incidência dessa associação ocorre em alguns países africanos, como o Sudão e a Etiópia, onde 35% dos indivíduos com LV são coinfetados pelo HIV-1 (Leite de Sousa-Gomes et al. 2017). Já em alguns países da Europa, como Espanha, França e Itália, bem como na Bacia do Mediterrâneo, a incidência de casos de coinfeção LV/HIV tem diminuído nos últimos anos, sobretudo após a introdução da cART (Leite de Sousa-Gomes et al. 2017; Lindoso et al. 2018). No que se refere à América Latina, dados recentes apontam que 8% dos indivíduos com LV são coinfetados pelo HIV-1 (OPAS, comunicação pessoal, 2019). Considerando a epidemiologia de cada uma das infecções, é de se esperar que o Brasil apresente a maior incidência de coinfeção LV/HIV do continente. Em 2017, aproximadamente 330 novos casos de coinfeção LV/HIV foram relatados no Brasil, de modo que 7,8% dos casos de LV eram coinfetados com HIV no país (Ministério da Saúde, 2017). Apesar de ainda expressivo, o Brasil vem apresentando uma discreta diminuição no número de casos de coinfeção LV/HIV, bem como da letalidade dessa associação (Ministério da Saúde, comunicação pessoal, 2019). No entanto, é preciso levar em consideração a possível ocorrência de subnotificações, uma vez que esses percentuais se referem apenas aos casos com manifestações clínicas da LV e que os casos assintomáticos da doença podem ser diagnosticados tardiamente, além de uma boa parcela dos pacientes com LV não ter investigação sorológica para o HIV (Lindoso et al. 2018).

Em concordância com a expansão simultânea e sobreposição geográfica de ambas infecções, a maioria dos casos de associação LV/HIV no país ocorrem nas regiões Nordeste e Sudeste, especialmente nos estados do

Maranhão e Minas Gerais (Ministério da Saúde, 2017). Os grupos afetados são primariamente adultos jovens (20-49 anos) do sexo masculino, usuários de drogas injetáveis, que compõem uma categoria de exposição em constante expansão como fonte de transmissão, os quais acompanham os grupos de risco para a transmissão do HIV-1 (Ministério da Saúde, 2015). Adicionalmente, é cada vez mais comum que o diagnóstico das duas infecções ocorra de forma simultânea, com a LV sendo responsável pela abertura de caso (Ministério da Saúde, 2015). Por outro lado, a LV latente tem sido relatada em indivíduos infectados pelo HIV-1, conduzindo esses pacientes a um maior risco de recidivas da LV, sobretudo quando as contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ alcançam níveis <200 células/mm³, ou mesmo fazendo desses indivíduos possíveis reservatórios para *Leishmania* (Lindoso et al. 2018).

Desta forma, do ponto de vista clínico, a coinfeção pelo HIV-1 acelera o desenvolvimento da LV ativa, resultando em um aumento na taxa de letalidade da LV, além de aumentar de 3 a 5 vezes a predisposição a recidivas da doença, em comparação aos indivíduos HIV negativos (Lindoso et al. 2014). Por outro lado, o desenvolvimento da LV pode intensificar o *status* de imunossupressão apresentado pelos pacientes infectados pelo HIV-1, fazendo com que esses progridam mais rapidamente para a aids. Em adição, em detrimento do grave prejuízo na resposta imunológica, bem elucidado no cenário de associação LV/HIV, pacientes coinfectados podem desenvolver, com certa frequência, manifestações clínicas incomuns e/ou disseminação da LV para sítios atípicos (pele, trato gastrointestinal, respiratório, cardíaco, renal, etc.), bem como diferir em termos de perfil de diagnóstico laboratorial, de resposta ao tratamento específico e especialmente na imunopatogênese.

1.2 Aspectos imunopatogênicos da leishmaniose visceral

Dependendo de fatores ligados a espécie de *Leishmania*, cepas do parasito, resposta imune do hospedeiro, hábitos do vetor e da própria interação parasito-hospedeiro, as leishmanioses podem ocorrer com diferentes formas clínicas. Desta forma, clinicamente, elas são classificadas em: leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral (LV).

A LV é a forma da doença que apresenta um acometimento sistêmico, uma vez que, no decorrer do ciclo de transmissão, as formas amastigotas de *L.*

(*L.*) *infantum* e *L.* (*L.*) *donovani* (no Velho Mundo) apresentam acentuado tropismo pelas células do sistema fagocítico mononuclear do baço, fígado, medula óssea e linfonodos. Desta forma, por envolver o comprometimento de múltiplos órgãos, a LV é definida como a forma mais grave e, possivelmente, fatal das leishmanioses, apresentando mecanismos imunopatogênicos bastante complexos. O fato deste parasito residir, primariamente, no interior de monócitos/macrófagos presentes nestes órgãos faz com que a doença progrida com um comprometimento subjacente dos mecanismos imunológicos de defesa do hospedeiro. Em associação, laboratorialmente, se observa uma hipergamaglobulinemia e a clássica pancitopenia, uma vez que o intenso parasitismo dos macrófagos pelo parasito leva à destruição e, primariamente, a uma tentativa de reposição dessas células. Em consequência, ocorre um desvio da produção de outras linhagens celulares pela medula óssea, como eritrócitos, neutrófilos e plaquetas, o que leva ao aparecimento de anemia, neutropenia e hemorragias. Adicionalmente, ocorre também desvio da produção de progenitores de linfócitos T, que em conjunto com outros mecanismos de morte celular induzida por ativação, contribui para uma importante linfopenia e comprometimento da resposta imune funcional específica para o parasito, caracterizando a LV como uma doença imunossupressora (Brodskyn & Kamhawi, 2018). Consequentemente a essa patogenia, as principais manifestações clínicas da LV que compõem a tríade clássica da doença são: febre persistente/crônica, hepatoesplenomegalia e perda de peso (caquexia) (Figura 4).



Figura 4: Manifestações clínicas da leishmaniose visceral. Pacientes com leishmaniose visceral apresentando hepatoesplenomegalia característica da doença (Ministério da Saúde, 2006).

A imunossupressão na LV é observada na doença ativa e é específica para antígenos de parasito, uma vez que testes de hipersensibilidade do tipo tardia (teste de Montenegro) para esses antígenos se apresentam negativos nesta fase, diferente daqueles indivíduos com doença assintomática ou subclínica (Goto & Prianti et al. 2009; Brodskyn & Kamhawi, 2018). Além disso, na LV ativa também se observa uma diminuição da capacidade proliferativa de células T auxiliares mediante estímulo com antígenos do parasito *in vitro*, bem como da capacidade dessas células de produzir citocinas, como IL-2 e IFN- γ (Carvalho et al. 1985, 1989; Soong et al. 2012).

No entanto, o prejuízo na resposta imune celular é revertido após o término do tratamento leishmanicida, evidenciado pela restauração da produção de IFN- γ , que se relaciona com controle da carga parasitária, e da capacidade linfoproliferativa (Carvalho et al. 1989; Brodskyn & Kamhawi, 2018). Além disso, a LV está associada à produção de IL-4 e, principalmente, de IL-10 que pode atuar em sinergismo como cofatores para inibição da expansão de células do perfil Th1 e, conseqüentemente, da ativação de macrófagos pelo IFN- γ (Carvalho et al. 1994; Gautam et al. 2011; Costa et al. 2012).

Nesse contexto, a função microbicida dos macrófagos pode ser comprometida pela imunossupressão, visto que essas células demonstram uma diminuição da expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I e II, bem como da produção de IL-1 β e TNF em resposta a estímulos. Diante disso, IFN- γ e IL-10 executam papéis centrais na infecção por *L. infantum*, uma vez que o balanço entre essas citocinas são essenciais para o controle da infecção (Brodskyn & Kamhawi, 2018). Apesar do papel da IL-10 ser bem estabelecido na imunopatogênese da LV, a função protetora de IFN- γ ainda é um pouco controversa. Isso porque altos níveis séricos de IFN- γ , bem como de expressão do seu mRNA nos órgãos linfoides já foram demonstrados durante a LV ativa (Soong et al. 2012). Desta forma, apesar da clara evidência de que os antígenos de *L. infantum* são cruciais para o desenvolvimento da imunossupressão característica da LV ativa, muito sobre os mecanismos que conduzem a esse processo ainda permanece desconhecido.

Paradoxalmente, a imunopatogênese da LV também cursa com um intenso grau de ativação do sistema imune, o qual tem se tornado cada vez

mais consistente. Santos-Oliveira e colaboradores (2011b) demonstraram que pacientes com LV ativa apresentaram percentuais elevados de linfócitos T ativados, e que tais percentuais permaneceram elevados mesmo após a remissão clínica da doença. Em outro estudo mais recente, também foram observados percentuais elevados de linfócitos CD4 e CD8 ativados *ex vivo* durante a LV ativa (Rodrigues-Neto et al. 2018). No entanto, quando essas células foram estimuladas com antígeno de *Leishmania*, esses percentuais de ativação celular foram mais baixos em comparação com aqueles de linfócitos provenientes de indivíduos em remissão clínica, corroborando com o perfil imunossupressor específico na fase ativa da LV (Rodrigues-Neto et al. 2018). Adicionalmente, outros estudos têm sugerido fortemente que a LV é caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada, sobretudo na doença ativa, mediada por citocinas inflamatórias, tais como IL-8, TNF e IL-6 (Araújo-Santos et al. 2017). Esse *status* inflamatório e ativado estaria associado à falência múltipla dos órgãos, fazendo da LV algo muito similar ao que ocorre na sepse, na malária e em outras doenças inflamatórias (Costa et al. 2010; Costa et al. 2013).

Em relação ao perfil inflamatório, a fase ativa da LV tem sido caracterizada por um padrão misto de resposta dos perfis Th1 e Th2 (Goto & Lindoso, 2004; Goto & Prianti, 2009), uma vez que já foi descrito que pacientes com LV nesta fase apresentam níveis significativamente elevados tanto de IFN- γ e TNF como de IL-4 e IL-10 no soro, comparados com pacientes assintomáticos ou indivíduos saudáveis (Ansari et al. 2006; Khoshdel et al. 2009, Costa et al. 2012). As principais fontes de produção de IFN- γ na LV ativa se encontram, possivelmente, nos órgãos linfoides, onde os parasitos proliferam (Goto & Prianti, 2009), e os elevados níveis dessa citocina podem estar relacionados com importantes alterações fisiopatológicas encontradas durante a doença ativa. Ao mesmo tempo, o aumento simultâneo dos níveis de IL-10 também na fase ativa da doença parece mascarar a resposta pró-inflamatória do IFN- γ , contribuindo para o estabelecimento e progressão da LV (Costa et al. 2012). Desta forma, a imunopatogênese da LV está fortemente relacionada ao desbalanço inflamatório decorrente deste perfil misto de citocinas séricas presente em pacientes com a forma sintomática da doença.

Ainda no que se refere ao grau de ativação imune na LV, a intensa resposta inflamatória sistêmica já foi associada ao desenvolvimento de formas graves da doença, estando correlacionada a parâmetros de gravidade, como a coagulopatia e resposta de fase aguda (Costa et al. 2010). Costa e colaboradores (2013) demonstraram que altas concentrações de citocinas como IL-6, IL-8 e IFN- γ precederam o óbito de pacientes com LV ativa e, aliados aos níveis também elevados de TNF e IL-1 β , estavam correlacionadas com parâmetros clínicos e laboratoriais associados com a progressão para a LV grave. Esses resultados reforçaram a hipótese de que a letalidade da LV é, muito provavelmente, o reflexo de uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada. Além disso, em modelos animais, o estudo de estratégias terapêuticas com antagonistas de citocinas, por exemplo, pode apontar terapias adjuvantes para as formas mais graves da doença (Carvalho et al. 1994; Costa et al. 2013). Adicionalmente, outros trabalhos também já demonstraram que além das citocinas, outras moléculas solúveis, tais como d-dímeros, CD163 solúvel, neopterin e leptina podem estar associados a alterações clínico-laboratoriais e, portanto, poderiam ser bons preditores de gravidade e morte na LV (Costa et al. 2013; Silva et al. 2017; Kip et al. 2018; Cunha Fievez et al. 2019).

Mais recentemente, nosso grupo avaliou o envolvimento da leptina na patogênese da LV humana (Cunha Fievez et al. 2019 – Anexo D). A leptina é uma proteína que, inicialmente, foi descrita em estudos sobre obesidade e diabetes, mas que atualmente tem apresentado um papel multi-fatorial importante na resposta imune (Naylor et al. 2016), e sua deficiência pode estar associada a maior suscetibilidade às doenças infecciosas (Maurya et al. 2018). Ela é produzida e secretada, principalmente, por adipócitos, e tem sido descrita como um hormônio regulador da função fagocítica, da secreção de citocinas inflamatórias, bem como da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), quimiotaxia de granulócitos, indução de uma resposta do perfil Th1 (Maurya et al. 2018). Além disso, a deficiência nos níveis de leptina tem sido associada com atrofia tímica e uma resposta imune deficiente (Maurya et al. 2018). Losada-Barragán e colaboradores (2017) demonstraram que camundongos desnutridos infectados com *L. infantum* apresentam baixos níveis de leptina, ao lado de uma deficiência em fatores quimiotáticos que afetam a migração de

timócitos no microambiente tímico, bem como de um aumento da carga parasitária no baço. Desta forma, no contexto da LV, a leptina tem demonstrado um papel importante e promissor no controle parasitário e, conseqüentemente, no bom prognóstico da doença (Shivahare et al. 2015; Maurya et al. 2016; Dayakar et al. 2016; Losada-Barragán et al. 2017).

De fato, em nosso estudo, pacientes com LV na fase ativa apresentaram baixos níveis de leptina no soro, que se correlacionaram positivamente com as contagens absolutas de leucócitos e os níveis de albumina (Cunha Fievez et al. 2019). Entretanto, um mês após o tratamento anti-*Leishmania*, os níveis de leptina aumentaram significativamente, alcançando valores similares ao indivíduos sadios (Cunha Fievez et al. 2019). Tal fato pode estar associado com a recuperação do estado imunológico que conduz ao controle parasitário nesses pacientes, resultando na manutenção da remissão clínica da LV. Alguns trabalhos têm demonstrado, *in vitro* e *in vivo*, que estratégias terapêuticas com leptina exógena podem desempenhar um papel imunomodulador na infecção por *L. infantum* ou *L. donovani*, conduzindo a uma imunidade protetora contra o parasito por induzir a atividade fagocítica de macrófagos, controlar a carga parasitária e mediar a indução de um perfil Th1 de resposta (Maurya et al. 2016; Dayakar et al. 2016). Além disso, já foi descrito que a leptina pode regular a expressão de receptores inibitórios, como PD-1 e CTLA-4 (Dayakar et al. 2017), e até mesmo aumentar o potencial terapêutico de drogas leishmanicidas, como a mitelfosina (Shivahare et al. 2015).

O intenso grau de ativação na LV também pode estar relacionado a outros fatores, indiretamente relacionados à presença do parasito. Considerando que já foi evidenciada a presença de formas amastigotas em células do tecido linfóide associado à mucosa (Muigai et al. 1983; Luz et al. 2010), acarretando possivelmente em dano intestinal, cogitou-se que a translocação de produtos microbianos do lúmen intestinal para a corrente sanguínea poderia consistir em um dos fatores envolvidos no intenso grau de ativação celular e comprometimento imunológico observados na LV. De fato, assim como já foi observado em outras infecções que também cursam com um processo de ativação imune crônica, entre elas a infecção pelo HIV-1 (Brenchley et al. 2006), um estudo prévio do nosso grupo evidenciou a

presença de produtos de origem microbiana na circulação de pacientes de LV durante a doença ativa (Santos-Oliveira et al. 2011b).

Desta forma, aliados aos percentuais elevados de linfócitos T ativados, já mencionados anteriormente, esses pacientes apresentaram níveis séricos elevados de lipopolissacarídeo (LPS) e do seu receptor, a molécula de CD14 solúvel (sCD14), os quais se correlacionaram positivamente com o grau de ativação celular, citocinas inflamatórias e com a deficiência nas contagens absolutas de linfócitos T (Santos-Oliveira et al. 2011b). Esses achados sugerem fortemente que, associados aos antígenos de *Leishmania*, os produtos da translocação podem estar contribuindo para o grau de ativação celular e para “tempestade” de citocinas característica da LV. Visto isso, a associação de terapias antimicrobianas ao tratamento anti-*Leishmania* convencional, pode se mostrar promissora em reduzir o *status* imune ativado, influenciando positivamente no prognóstico da LV.

Finalmente, essa intensa ativação imune crônica também tem sido descrita, de forma policlonal, para o compartimento de linfócitos B. Deste modo, altos títulos de anticorpos, sejam anti-*Leishmania* ou mesmo anticorpos com especificidade desconhecida, são encontrados no soro de pacientes com LV durante a doença ativa (Galvão-Castro et al. 1984; Atta et al. 2004; Saha et al. 2006; Goto & Lindoso, 2009). Alguns estudos têm evidenciado o papel dos linfócitos B e de moléculas associadas com sua ativação na imunopatogênese da LV. Por exemplo, os altos níveis de IgG sérica em camundongos infectados com *L. donovani* estavam associados aos níveis elevados de BAFF (do inglês, *B-cell Activating Fator*) (Omachi et al. 2017), uma molécula que regula o desenvolvimento e diferenciação das células B, e que pode estar envolvida não só com a intensa ativação dessas células na LV, como também ter um papel patológico na esplenomegalia característica da doença (Goto et al. 2014; Omachi et al. 2017).

Além disso, algumas subclasses de IgG, tais como IgG1 e IgG3, além de se apresentarem em níveis elevados na LV e em manifestações atípicas da doença, como a PKDL (Leishmaniose Dérmica Pós-Kalazar), vêm sendo apontadas como importantes biomarcadores de prognóstico da doença (Ansari et al. 2008; Kip et al. 2015; Bhattacharyya et al. 2014). Mais recentemente, um estudo avaliou a aplicabilidade de um teste rápido para detecção de IgG1 no

monitoramento do *status* clínico de pacientes com LV após o tratamento leishmanicida, em termos de cura clínica, recidiva e desenvolvimento de PKDL (Marlais et al. 2018). Neste estudo, pacientes com PKDL ou que apresentaram recidiva da LV, ou mesmo pacientes assintomáticos que progrediram para a LV sintomática, foram positivos para IgG1 anti-*Leishmania*, tanto no teste rápido quanto por ELISA (Marlais et al. 2018). Por outro lado, pacientes após 6 meses de cura clínica da LV diminuíram significativamente os níveis de IgG1 em comparação a fase ativa da doença (Marlais et al. 2018). Todos esses estudos demonstram a importância da avaliação dos níveis de imunoglobulinas, apontando-as como possíveis preditores de prognóstico clínico no acompanhamento de pacientes com LV.

Apesar de ainda pouco elucidado, o envolvimento das células B na patogênese da LV tem sido investigado em alguns trabalhos, principalmente pela identificação de subtipos de células B com características imunorregulatórias, ou àqueles que expressam altos níveis de moléculas relacionadas à ativação e exaustão. O papel regulador dessas células na LV vem sendo relacionado às altas frequências de células B produtoras de IL-10, que podem influenciar de forma importante na susceptibilidade ao parasito, sobretudo por regular a resposta imune dos linfócitos T (Moore et al. 2012; Bankoti et al. 2012; Andreani et al. 2015; Schaut et al. 2016). Além disso, poucos estudos têm evidenciado a ativação policlonal de células B através de uma análise fenotípica e funcional (Deak et al. 2010; Singh et al. 2019); esta tem sido inferida, principalmente, através da presença dos altos níveis de imunoglobulinas séricas. No entanto, todos esses estudos indicam que, de fato, existem alterações fenotípicas e um prejuízo funcional nessa subpopulação linfocitária durante a LV crônica, que podem acarretar consequências imunopatológicas na progressão da doença.

1.3 Aspectos imunopatogênicos da infecção pelo HIV-1

O Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 (HIV-1 - gênero *Lentivirus*, família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*) tem como alvo as células que expressam em sua superfície a molécula CD4, bem como os receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 identificados como importantes

correceptores virais. São elas, linfócitos T CD4⁺, mas também monócitos, macrófagos, células dendríticas e células microgliais do sistema nervoso central. No entanto, pelo fato dos linfócitos T CD4⁺ serem as principais células-alvo e exercerem papéis fundamentais no estabelecimento de uma resposta imune adaptativa funcional, o processo de imunopatogênese associada à imunossupressão da infecção pelo HIV-1 é resultado, principalmente, das alterações quantitativas e qualitativas dessas células.

Nesse contexto, considerando o papel central que os linfócitos T CD4⁺ desempenham no desenvolvimento da resposta imune específica contra o vírus, pode-se afirmar que a perda progressiva no número destas células favorece o estabelecimento do quadro de imunodeficiência grave observada nesses pacientes (Pantaleo & Fauci 1996, Fanales-Belasio et al. 2010). Na ausência da cART, a maioria dos indivíduos positivos para o HIV-1 leva, em média, de 7 a 10 anos para apresentar os sintomas definidores de aids e são chamados de progressores típicos (Pantaleo & Fauci, 1996; Vergis & Mellors, 2000). No entanto, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na progressão para a aids já se iniciam nas primeiras semanas pós-infecção.

Dessa forma, refletindo o padrão clássico apresentado pelos progressores típicos na ausência de cART, o curso clínico natural da infecção pelo HIV-1 é marcado por diferentes fases (Lewis, 2014; Becerra et al. 2016), como pode ser observado na Figura 5. Uma fase inicial de aquisição, também conhecida como fase eclipse, que engloba eventos que vão desde a exposição ao vírus até o aparecimento da primeira viremia (níveis detectáveis de RNA plasmático no sangue), detectável por ensaio virológico ultrasensível. Nesta etapa da infecção surgem os sintomas inespecíficos agudos, semelhantes àqueles presentes na mononucleose ou em outras infecções virais. Essa fase perdura por aproximadamente 10 dias, e é neste período que, provavelmente, o vírus estabelece os reservatórios virais em células T CD4⁺ *resting* de memória. Além disso, as células dendríticas (DCs), que são sentinelas nos sítios estratégicos de transmissão como as mucosas, são as primeiras células a entrarem em contato com vírus e serem infectadas, podendo se constituir em reservatórios da infecção por diversos dias. Estas DCs infectadas podem transferir, de forma eficiente, partículas virais intactas para células T CD4⁺, amplificando o grau de infecção e o aumento da replicação viral. Os efeitos

dessa “trans-infecção” podem ser ainda mais críticos diante da intensa capacidade migratória das DCs que, conseqüentemente, podem entrar em contato com células T CD4⁺ em diversos sítios de mucosa e órgãos linfoides secundários (Manches et al. 2014).

Logo após a fase eclipse, a viremia aumenta exponencialmente, caracterizando uma expansão e disseminação sistêmica do HIV-1, acompanhados por uma queda drástica nas contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ circulantes. Aproximadamente 28 dias depois, verifica-se uma diminuição da carga viral, devido ao controle imunológico inicial e o estabelecimento de um *plateau* (*set point* viral), o qual pode perdurar por muitos anos. Desta forma, com o controle da viremia pós-infecção, se tem o estabelecimento da fase crônica da infecção pelo HIV-1, clinicamente assintomática, que permanece até que esse controle viral seja perdido e que se tenha o aparecimento das doenças definidoras de aids. Nessa fase se tem uma perda lenta e progressiva dos linfócitos T CD4⁺, cujos valores não serão mais recuperados na ausência da cART, associada à expansão simultânea de células T CD8⁺ ativadas, que a princípio mantêm a homeostase no número de linfócitos T totais e contínuos danos ao sistema imune. Eventualmente, o controle da replicação viral é perdido, levando novamente ao aumento da viremia, à intensificação no declínio de células T totais e pelo comprometimento do estado geral do indivíduo infectado que, em conseqüência, progride para a fase de aids. Esta fase normalmente se estabelece quando as contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ atingem valores inferiores a 200 células/mm³. Assim, o aparecimento e/ou reaparecimento de infecções oportunistas, tal como a LV, ou mesmo de neoplasias, é favorecido por esse quadro de imunodeficiência grave. Dessa forma, a ausência da cART nessa fase da infecção pode culminar no óbito do indivíduo infectado.

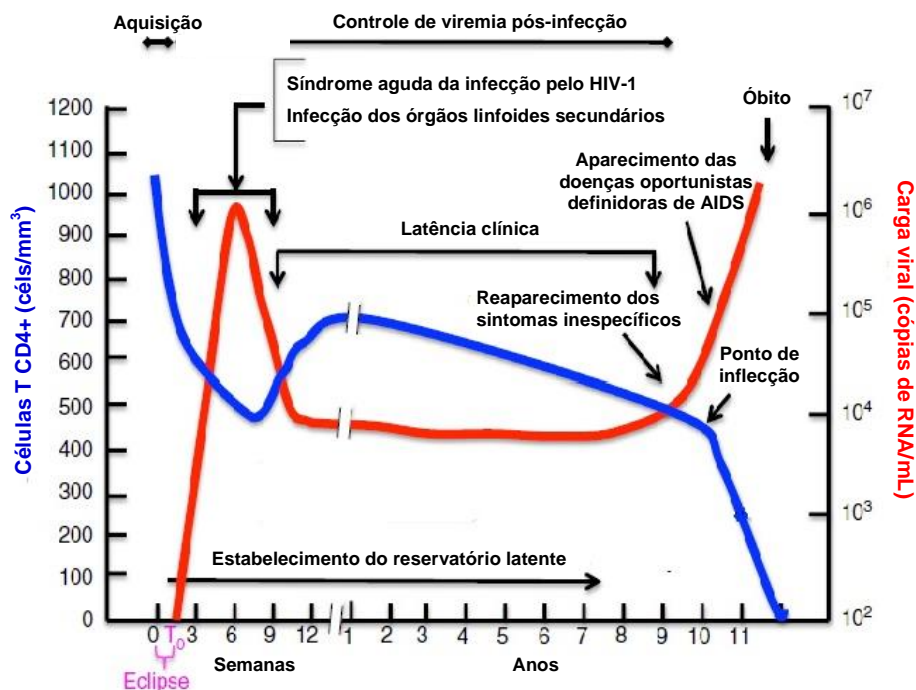


Figura 5: Curso clínico natural da infecção pelo HIV-1 na ausência de terapia antirretroviral combinada (cART). Na abscissa, o tempo 0 indica o dia de exposição ao vírus. A fase eclipse corresponde ao período que vai da infecção pelo HIV-1 (0) até a primeira viremia detectável (T_0). Modificado de Lewis, 2014.

Os indivíduos infectados que não progridem para aids e mantêm contagens de células T CD4⁺ dentro da normalidade, com carga viral baixa em ausência de cART são chamados não-progressores de longo-termo ou controladores de elite (Lopez-Galindez et al. 2019).

Assim, o monitoramento das contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺, associado à quantificação dos níveis de carga viral permanecem como os principais parâmetros utilizados no acompanhamento da progressão da infecção pelo HIV-1 para aids (Summers & Armstrong, 2019). Embora, atualmente, as contagens de células T CD4⁺ não seja o único critério de indicação para introdução da cART, dado os benefícios de se iniciar a terapia logo após o diagnóstico da infecção pelo HIV (INSIGHT START Study Group et al. 2015), esses parâmetros ainda são decisivos para a administração de profilaxias específicas para as doenças oportunistas, além de permitir a avaliação da reconstituição imune pós-cART em pacientes infectados (Ford et al. 2017).

Outros mecanismos, que não apenas a infecção e morte direta das células T CD4⁺ pelo vírus, contribuem para a destruição progressiva dessas células (Doitsh & Greene, 2016). Isso pode ser indicado pelos seguintes fatos: além do HIV-1 não ser um vírus de natureza lítica, os pacientes infectados submetidos à cART e com níveis de carga viral indetectáveis podem ainda assim apresentar uma reconstituição imunológica deficiente e incompleta. Esse conhecimento apontou para a importância de se investigar os efeitos sobre o sistema imunológico, que estavam indiretamente relacionados à infecção viral (Doitsh & Greene, 2016).

Dentre esses, já foi apontado o sequestro de células T para os órgãos linfoides secundários, que resulta em uma aparente depleção linfocitária na periferia (Bucy et al. 1999; Lederman & Margolis, 2008) e, conseqüentemente, altera o número e proporção dessas subpopulações na circulação. Além disso, as células T CD4⁺ infectadas podem ser destruídas pela resposta imune específica ao vírus proveniente de outros subtipos celulares, dentre eles, os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos e as células *natural killer*, pelo processo de ativação *bystander* nos órgãos linfoides ou mesmo através do processo de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (McCune, 2001; Doitsh & Greene, 2016). Finalmente, tem sido amplamente considerado que a ativação crônica do sistema imune, por mecanismos diretamente relacionados à replicação viral ou não, pode ser responsável pela contínua depleção de células T CD4⁺ (Vijayan et al. 2017). Apesar desse processo de ativação imune estar diretamente relacionado com a intensa imunossupressão característica da infecção pelo HIV-1 (Douek et al. 2013; Krebs & Ananworanich, 2016), ele por si só tem se constituído em importante preditor de progressão para aids, mesmo em pacientes em uso de cART (Utay & Hunt, 2016; Zicari et al. 2019).

A princípio, o grau ativação imune na infecção pelo HIV-1 parece não diferir daquele observado em outras infecções sistêmicas, refletindo o que é normalmente visto em uma resposta imune antiviral. Embora nas demais infecções a resposta imune tende a declinar ou ser adequadamente controlada após a eliminação do estímulo antigênico, na infecção pelo HIV-1 esse *status* de ativação persiste indefinidamente, dada a natureza crônica e persistente da infecção (Sauce et al. 2013; Paiardini & Muller-Trutwin, 2013). No entanto, o próprio estímulo antigênico que persiste em função da replicação viral residual

que ocorre, por exemplo, nos reservatórios virais (Mzingwane & Tiemessen, 2017), não é o único fator que mantém esse grau de ativação imune crônica. É bem descrito que mecanismos indiretamente relacionados à infecção pelo HIV-1 podem contribuir para a exacerbação desse grau de ativação imune (Sauce et al. 2013; Paiardini & Muller-Trutwin, 2013). Dentre esses, os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IL-6, IL-1 β e de quimiocinas, como RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β e CXCL13 já foram diretamente implicados nesse processo (Taiwo et al. 2013; Grund et al. 2016; Younas et al. 2016; Richert et al. 2017; Mehraj et al. 2019).

Nesse cenário, estudos *in vivo* e *in vitro* têm apontado as citocinas como importantes cofatores na regulação dos mecanismos imuno-viológicos associados com a persistência viral e com o grau de ativação na infecção pelo HIV-1 (Vandergeeten et al. 2012). Desse modo, as citocinas anti-inflamatórias podem contribuir para o estabelecimento da latência viral, ao inibir a resposta imune efetora e a replicação do vírus, criando, assim, um ambiente propício para a persistência do *pool* de células T CD4⁺ infectadas latentes, sobretudo no estabelecimento da fase crônica da infecção (Vandergeeten et al. 2012). Por outro lado, o estímulo de citocinas pro-inflamatórias pode favorecer a manutenção da replicação viral em baixos níveis (residual) nos tecidos linfoides, por induzir uma constante reativação viral em células T CD4⁺ residentes desses tecidos (Vandergeeten et al. 2012). Assim, enquanto a inibição da replicação consiste em um pré-requisito para o estabelecimento de latência, os efeitos opostos podem contribuir para persistência do vírus ao promover a sua replicação contínua em baixos níveis nos reservatórios anatômicos do HIV-1. A consequência desses mecanismos é a persistência do estímulo antigênico mesmo após longo período de cART que, como um círculo vicioso, culmina no intenso *status* inflamatório e ativado sistêmico.

Adicionalmente, durante o curso da infecção pelo HIV-1, a redução do número de linfócitos T reguladores também pode contribuir para o grau de ativação imune em pacientes sem terapia (Eggena et al. 2005; Paiardini & Muller-Trutwin, 2013). Além disso, já foi demonstrado um alto percentual de células T reguladoras em pacientes infectados pelo HIV-1 sob cART que exibiram contagens de linfócitos T CD4⁺ inferiores a 500 células/ μ L, sugerindo uma tentativa de contenção do grau de ativação por parte do sistema imune

(Piconi et al. 2011). No entanto, os estudos que avaliam a influência dessas células sobre a ativação imune na infecção pelo HIV-1 ainda são controversos (Paiardini & Muller-Trutwin, 2013), uma vez que também já foi demonstrada uma expansão simultânea e uma possível correlação entre células T reguladoras e células T ativadas no sangue periférico de pacientes infectados (Freguja et al. 2011; Saison et al. 2014).

Outro mecanismo inerente ao *status* de ativação imune crônica e que está indiretamente relacionado à patogênese da infecção pelo HIV-1 consiste na passagem de produtos microbianos de origem luminal para a circulação (Brenchley et al. 2006; Zevin et al. 2016; Zicari et al. 2019). De fato, tem-se demonstrado que o trato gastrointestinal é particularmente afetado pela própria replicação viral e pela intensa ativação do sistema imune (Brenchley et al. 2006; Zevin et al. 2016; Bandera et al. 2018; Younas et al. 2019), durante a infecção pelo HIV-1, ou pelo SIV (vírus da imunodeficiência símia) em macacos *Rhesus* (Hensley-McBain et al. 2018; Crakes & Jiang, 2019; O'Connor et al. 2019). A princípio, o dano à barreira intestinal que conduz a um aumento da permeabilidade intestinal, caracterizado pela morte de enterócitos, pode ser mediado pelo próprio HIV, e/ou por mecanismos indiretos à replicação viral, dentre esses a perda de células Th17, cruciais na resposta a antígenos bacterianos e manutenção da homeostase intestinal, bem como infiltração de neutrófilos (Zevin et al. 2016).

Além disso, no período inicial da infecção, ocorre uma destruição massiva de células T CD4⁺CCR5⁺ de memória presentes na mucosa intestinal. Essa perda é resultado direto da infecção pelo HIV-1, mas se mantém de forma constante ao longo de todo o curso da infecção (Brenchley & Douek, 2008). Adicionalmente, tais alterações imunológicas e também histológicas na mucosa intestinal fazem com que pacientes HIV positivos apresentem sintomas característicos de uma enteropatia, tais como diarreia, má absorção e presença de infiltrado inflamatório, além de atrofia das vilosidades e hiperplasia de criptas no tecido mucoso (Brenchley & Douek, 2008). Dessa forma, a depleção das células T CD4⁺ na mucosa intestinal, aliada aos outros danos observados no tecido linfóide associado à mucosa – MALT favorece a translocação de produtos derivados de bactérias gram-negativas presentes no lúmen intestinal para a circulação sistêmica (Brenchley & Douek, 2008), fazendo desse

fenômeno um dos principais mecanismos imunopatogênicos associados ao HIV-1, sobretudo no contexto de ativação imune crônica (Marchetti et al. 2013; Zevin et al. 2016; Tincati et al. 2016).

Algumas moléculas têm sido avaliadas no contexto de translocação microbiana. Dentre essas, encontra-se a proteína IFABP (*intestinal fatty acid binding protein*), uma molécula localizada no citoplasma do enterócito e que aponta de forma indireta o dano intestinal, uma vez que sua liberação é dependente do comprometimento da célula (Lieberman et al. 1997). Já foi demonstrado que os níveis de IFABP além de estarem aumentados em pacientes infectados pelo HIV-1 (Steele et al. 2014; Siedner et al. 2018), se correlacionavam de forma negativa às contagens de linfócitos T CD4⁺ iniciais (*nadir*), sugerindo que quanto maior o dano intestinal, menor as contagens de T CD4⁺ antes do início da cART (Sandler et al. 2011). Os níveis de IFABP também estão aumentados em outras doenças infecciosas com acometimento do trato gastrointestinal, como demonstrado por nosso grupo nos pacientes com giardíase (Cascais-Figueiredo/Austríaco-Teixeira et al. 2019; Anexo E).

Além disso, a translocação microbiana pode ser identificada por um aumento dos níveis plasmáticos de LPS (lipopolissacarídeo) nos indivíduos cronicamente infectados pelo HIV-1 (Brenchley et al. 2006). Tais níveis já foram associados ao aumento nos níveis de CD14 solúvel (sCD14), secretado por monócitos em resposta ao estímulo bacteriano (Brenchley et al. 2006; Steele et al. 2014; Siedner et al. 2018), bem como ao percentual elevado de linfócitos T fenotipicamente ativados (Brenchley et al. 2006). Os componentes bacterianos podem estimular as células da imunidade inata por meio dos seus ligantes de receptores tipo-Toll (TLRs) (Gioannini et al. 2007). O LPS, por exemplo, liga-se ao seu receptor CD14, solúvel ou de membrana e, por sua vez, ao complexo TLR4-MD2, culminando na ativação do fator transcricional NF-κB e na produção de citocinas inflamatórias, como IL-6, IL-1β, TNF e IFN do tipo I. Essas citocinas, como já citado anteriormente, contribuirão para a persistente ativação imune observada durante a fase crônica da infecção pelo HIV-1.

Além disso, os níveis de sCD14, por si só, já foram apontados como preditores de mortalidade em pacientes infectados pelo HIV-1 em uso de cART, independente das contagens de células T CD4⁺ e da carga viral (Sandler et al. 2011). Em adição, a avaliação do microbioma intestinal (Dillon et al. 2014;

Bandera et al. 2018) e a quantificação plasmática do RNA ribossomal 16S bacteriano por PCR em tempo real (Kramski et al. 2011), respectivamente, também vêm sendo apontadas como importantes indicadores de alteração intestinal e de translocação microbiana na infecção pelo HIV-1.

Em termos fenotípicos, esse ambiente de desorganização e ativação crônica do sistema imune pode ser reconhecido e identificado pelo aumento da expressão de moléculas nas superfícies celulares, sobretudo nos linfócitos T (Giorgi et al. 2002; Benito et al. 2004; Younas et al. 2016; Zicari et al., 2019). Essa expressão, em especial das moléculas CD38 e HLA-DR, vem sendo associada à progressão da infecção pelo HIV-1 para a aids, e a avaliação periódica desse fenótipo pode consistir em um bom biomarcador de monitoramento da infecção. A molécula CD38 é uma ectoenzima que, dentre outras funções, está envolvida na regulação do cálcio intracelular, de modo que sua diminuição estaria relacionada com respostas imunológicas prejudicadas e distúrbios metabólicos. Por outro lado, seu aumento na superfície celular é descrito como um indicador de ativação celular, que não está apenas em condições infecciosas, como o HIV-1, mas também em neoplasias de células B, tumores sólidos e diabetes tipo 2 (Quarona et al. 2013; Rodriguez-Alba et al. 2019).

Estudos têm demonstrado que a expressão de CD38, bem como a coexpressão do fenótipo CD38⁺HLA-DR⁺ em células T CD8⁺, aumenta progressivamente na infecção pelo HIV-1, e que esse aumento está associado com o declínio de células T CD4⁺ totais e aumento da carga viral plasmática (Benito et al. 2004; Sauce et al. 2013; Rodriguez-Alba et al. 2019), além de aumentar em duas vezes mais o risco relativo de progressão para a doença (Karim et al. 2012). Um status de ativação crônica inespecífica, observada através da hiperexpressão desses marcadores, particularmente entre os linfócitos T CD8⁺, parece também estar relacionada com o aumento nos níveis de citocinas pro-inflamatórias e com a indução de danos histológicos e prejuízo funcional dos órgãos linfoides (Zicari et al. 2019). Assim, além de prejudicar de forma progressiva a organização funcional do sistema imune, esse grau de ativação imune crônica pode reduzir a capacidade regenerativa desse sistema e, conseqüentemente, favorecer a evolução viral e a progressão mais rápida para aids (Bartovská et al. 2011).

Finalmente, em associação à progressiva depleção e disfunção de células T, o braço humoral do sistema imune, definido pelo compartimento de células B, também cursa com um extenso comprometimento e disfunção no curso da infecção pelo HIV-1 (Amu et al. 2013). Esse comprometimento tem sido caracterizado não apenas pela hipergamaglobulinemia e pela intensa ativação policlonal de células B (Siewe & Landay, 2012), mas também pelo aumento da frequência do fenotipo de células B ativadas (Moir & Fauci, 2009; Amu et al. 2014; Yan et al. 2017). Além disso, semelhante ao que tem sido descrito para a hiperativação de linfócitos T, altos níveis de citocinas inflamatórias (IFN- α , TNF, IL-6, IL-10) e fatores de crescimento (fator de ativação de células B – BAFF) podem estar indiretamente relacionados com a intensa ativação de células B observada em indivíduos infectados pelo HIV-1 (Siewe & Landay, 2012; Borhis et al. 2017). De forma interessante, o LPS resultante da translocação microbiana também já foi apontado como um fator adicional para a hiperativação de células B, possivelmente por mecanismos indiretos (Moir & Fauci, 2009).

Adicionalmente, diversos estudos têm demonstrado a presença de outras subpopulações adicionais de células B no sangue periférico de pacientes infectados pelo HIV-1, as quais não estão normalmente presentes em indivíduos não infectados, e que devem contribuir de forma importante para a progressão da doença (Moir & Fauci, 2009; Moir & Fauci, 2014; Portugal et al. 2017). Uma alta frequência de subpopulações de células B imaturas (CD10⁺⁺CD21^{low/hi}CD27⁻) no sangue periférico de pacientes HIV positivos tem sido associada à intensa linfopenia de células T CD4⁺ induzida pelo vírus e ao aumento dos níveis séricos de IL-7 que, por sua vez, pode induzir a proliferação de precursores de células B (Malaspina et al., 2006).

Por fim, o *turnover* aumentado de células B induzido pelo HIV-1, ou seja, o aumento da proliferação, da diferenciação e da morte celular, conduz a uma alta frequência de plasmócitos de vida-curta, que são provavelmente responsáveis pela hipergamaglobulinemia observada nos indivíduos infectados (Moir & Fauci, 2009). Em suma, todos esses achados são subjacentes às outras manifestações resultantes da replicação viral persistente, como a elevada frequência de células B hiperativadas e, conseqüentemente, de células B fenotípica-funcionalmente exaustas (Moir et al. 2008; Moir & Fauci, 2009).

Tais fatos refletem, mais uma vez, o prejuízo imunológico que, por si só, esse *status* cronicamente ativado causa no curso da infecção pelo HIV.

1.4 Aspectos imunopatogênicos da associação leishmaniose visceral/HIV-1 (LV/HIV)

Considerando a imunopatogênese de cada uma das infecções, se torna cada vez mais evidente o conceito de que as alterações imunológicas causadas por essas enfermidades podem afetar de forma sinérgica os pacientes coinfectados (LV/HIV). Nesse sentido, um dos marcos mais críticos da coinfeção LV/HIV consiste na grave imunossupressão e, paradoxalmente, na intensa ativação crônica do sistema imune que aliada à resposta pró-inflamatória pode apresentar-se de forma potencializada, agravando a condição clínica dos pacientes coinfectados.

Individualmente, sabe-se que a imunopatogênese da infecção pelo HIV-1 ou pela *L. infantum* é profundamente dependente da resposta imune específica. Dessa forma, no contexto de associação *Leishmania*/HIV-1, o fato desses patógenos infectarem as mesmas células-alvo, e assim, comprometerem os mesmos compartimentos imunes, pode acarretar em prejuízos recíprocos sobre a resposta imune efetora e, conseqüentemente, sobre o controle de cada um dos patógenos (Alvar et al. 2008). De fato, estudos anteriores realizados *in vitro* já demonstraram que a infecção pelo HIV-1 induz o aumento da replicação da *L. infantum* no interior de macrófagos (Zhao et al. 2004; Barreto-de-Souza et al. 2006). Além disso, a infecção pelo vírus também foi associada à redução da resposta específica de linfócitos T e a produção de IFN- γ frente aos antígenos de *L. braziliensis* (Da-Cruz et al. 1992, 2006).

Nesse cenário de desorganização do sistema imunológico e de depleção do *pool* de linfócitos T específicos, sobretudo devido à infecção viral, os mecanismos de controle ao parasito são gravemente comprometidos, contribuindo para a progressão da LV. De fato, pacientes infectados pelo HIV-1, sobretudo aqueles com contagens de linfócitos T CD4⁺ <200 células/mm³, apresentam um alto risco de progressão para a LV sintomática (Lindoso et al. 2018).

Além disso, ainda que a remissão clínica da LV seja alcançada após o tratamento anti-*Leishmania*, a parasitemia parece persistir, mesmo que de forma intermitente (Adriaensen et al. 2018). Esse controle ineficiente da replicação parasitária, particularmente em função da imunossupressão provocada pelo HIV-1, pode provocar uma carga parasitária mais elevada em comparação aos pacientes com LV sem HIV-1. Tais fatos conduzem a uma característica que se chama de “LV cronicamente ativa”, que associada ao grave comprometimento imunológico pode explicar a maior suscetibilidade à ocorrência de múltiplas recidivas da LV em pacientes coinfetados pelo HIV-1 (Cota et al. 2011; Lindoso et al. 2018). Por fim, a replicação parasitária contínua na presença de terapia específica para *Leishmania* pode acarretar um aumento na resistência ao tratamento e maior ocorrência de falha terapêutica (Adriaensen et al. 2018) nesses pacientes.

Em paralelo, a natureza crônica da estimulação imune induzida pela *L. infantum* pode induzir o aumento da replicação viral e expressão de provírus latente, sobretudo por comprometer expressivamente a resposta imune efetora, resultando em uma mais rápida progressão para aids (Adriaensen et al. 2018; Lindoso et al. 2018).

Nesse contexto, têm sido propostos alguns mecanismos pelos quais a *Leishmania* pode influenciar o aumento da replicação viral e progressão para a aids. Um deles é o fato do parasito contribuir para o aumento da ativação celular e para um microambiente inflamatório que, por sua vez, aumenta a susceptibilidade das células-alvo à infecção (Zhao et al. 2004; Garg et al. 2009; Andreani et al. 2012). Nesse contexto, a molécula lipofosfoglicano (LPG) presente na superfície do parasito já foi apontada, em estudos *in vitro* anteriores, como uma das que contribui para o aumento da replicação viral, sobretudo via ativação do fator de transcrição NF- κ B e consequente aumento da produção de TNF (Bernier et al. 1998; Wolday et al. 1999). Apesar desses achados, o papel do LPG na interação *Leishmania*-HIV-1 ainda é um pouco controverso, uma vez que já foi descrito que durante a fase inicial da infecção, o LPG inibe a entrada do vírus em macrófagos derivados de monócitos (MDMs) o que, conseqüentemente, resulta na redução da replicação viral (Garg et al. 2008). Por outro lado, em coculturas de células dendríticas humanas e linfócitos T CD4⁺ autólogos, já foi descrito que a presença de formas

amastigotas de *L. infantum* é capaz de promover o aumento da replicação viral, provavelmente por induzir a secreção de citocinas, como IL-6 e TNF, pelas células dendríticas (Garg et al. 2009). De fato, já foi demonstrado que pacientes coinfectados LV/HIV apresentaram níveis aumentados de TNF, que não foram reduzidos mesmo com uso da cART e após o tratamento anti-*Leishmania* e, podem estar associados com a alta viremia e progressiva perda de linfócitos T CD4⁺ (Medrano et al. 1998; Lindoso et al. 2018). Todos esses dados apontam o envolvimento de fatores solúveis, sobretudo o TNF, nas importantes alterações virológicas e imunológicas ocorridas em pacientes coinfectados LV/HIV.

Além dessas evidências de que a LV pode influenciar na carga viral dos pacientes coinfectados pelo HIV-1, já foi demonstrado que ela também contribui para a depleção das contagens de linfócitos T CD4⁺ (Vallejo et al. 2015; Lindoso et al. 2018). Estudos anteriores do grupo demonstraram baixas contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ em pacientes coinfectados LV/HIV na fase ativa da LV e durante a remissão clínica, apesar do tratamento anti-*Leishmania* e do uso da cART (Alexandrino-de-Oliveira et al. 2010; Santos-Oliveira et al. 2010). Comprovando a potencialização desse agravo, tais contagens foram inferiores às aquelas apresentadas por indivíduos monoinfectados pelo HIV-1 (Santos-Oliveira et al. 2010), sugerindo que a LV pode agravar a imunodeficiência causada pelo HIV-1 e isso estaria atrelado ao grau potencializado de ativação do sistema imune nos pacientes coinfectados (Santos-Oliveira et al. 2010).

Apesar da introdução da cART ter contribuído de forma incontestável para a redução da incidência de infecções oportunistas em pacientes HIV positivos, dentre essas as leishmanioses, ela por si só não tem sido capaz de restaurar a resposta imunológica em pacientes coinfectados LV/HIV de forma a torná-los aptos a controlar o parasito (Demarchi et al. 2012). Dessa forma, ao contrário do que é visto em outras doenças oportunistas associadas ao HIV-1, na coinfeção LV/HIV, a reconstituição imune pós-cART, vista pelas contagens de células T CD4⁺, se encontra gravemente prejudicada, mesmo na presença de carga viral indetectável (Adriaensen et al. 2018). Essa imunossupressão persistente pode ser indicada, por exemplo, pelo fato da síndrome inflamatória

da reconstituição imune (IRIS) pós-cART não ser tão comum nessa associação (Adriaensen et al. 2018).

Ainda assim, alguns estudos *in vitro* têm demonstrado que os antirretrovirais da classe de inibidores de protease (IPs) apresentam efeitos inibitórios diretos sobre formas evolutivas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* (Adriaensen et al. 2018). Tais IPs parecem inibir a replicação das formas promastigotas e a proliferação das amastigotas no interior dos macrófagos, bem como impedir o desenvolvimento de lesão em camundongos infectados (Demarchi et al. 2012). De forma interessante, esses efeitos inibitórios dos IPs sobre as formas evolutivas de *L. infantum* parecem ocorrer apenas quando essas eram isoladas de pacientes que não faziam uso da cART. Em outras palavras, quando a cepa de *L. infantum* era isolada de pacientes coinfectados submetidos à cART, nenhum efeito inibitório dos IPs pôde ser observado *in vitro* sobre as formas evolutivas do parasito (Santos et al. 2013).

Embora ações benéficas dos IPs sobre um possível controle da *Leishmania* já tenham sido evidenciadas, a cART parece não ser capaz de prevenir as frequentes reativações, principalmente da forma visceral da doença (Cota et al. 2011). Nesse cenário de reativações da LV, mesmo com carga viral indetectável, a manutenção do tratamento anti-*Leishmania*, com o uso de profilaxia secundária, hipoteticamente poderia ser eficaz em diminuir as recidivas da doença nesses pacientes LV/HIV (Cota et al. 2011). Dessa forma, após o tratamento anti-*Leishmania* específico da fase ativa da LV, mantêm-se esses pacientes em vigência do tratamento em um regime profilático, a fim de se evitar novos episódios ativos da doença. Segundo as recomendações do Ministério da Saúde, a profilaxia secundária deve ser administrada quando o paciente LV/HIV atinge contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ inferiores a 350 células/mm³, sendo comumente adotado um esquema com anfotericina B lipossomal, na dose de 200 mg/Kg, a cada duas semanas.

Apesar desses regimes terapêuticos específicos, que visam tanto o controle do HIV-1 quanto da *Leishmania*, uma boa parcela dos pacientes LV/HIV ainda exhibe frequentes episódios de recidivas da LV. Isso corrobora com a hipótese de que outros fatores, além do próprio vírus e do próprio

parasito, poderiam estar contribuindo para um prognóstico clínico ruim desses pacientes coinfectados LV/HIV.

A ativação imune crônica, como mencionado anteriormente, é uma das principais características da infecção pelo HIV-1 e pela *L. infantum*, mesmo na presença de uma grave imunossupressão. Dessa forma, na coinfeção LV/HIV, o grau de ativação imune aliado à intensa resposta pró-inflamatória pode não só se apresentar de forma potencializada (Santos-Oliveira et al. 2010, 2013), como também pode se constituir em um importante cofator para o prejuízo imunológico que conduz a um histórico de frequentes recidivas da LV em pacientes coinfectados (Casado et al. 2015; Lindoso et al. 2018). Além da possibilidade desse fenômeno favorecer as reativações da doença, a ativação imune e o *status* inflamatório pode estar associada com a ocorrência de manifestações atípicas da LV, como a disseminação cutânea ou PKDL (Santos-Oliveira et al. 2011; Singh et al. 2018) ou mesmo evolução para LV grave (Costa et al. 2013).

Estudos anteriores do nosso grupo avaliaram, de forma transversal, o grau de ativação celular em pacientes LV/HIV na remissão clínica da LV. De fato, esses pacientes apresentaram percentuais elevados de células T CD8⁺ expressando a molécula CD38, quando comparados, por exemplo, a pacientes coinfectados com a forma tegumentar da doença (Santos-Oliveira et al. 2010). Além disso, tais percentuais de células T ativadas estavam associados com as baixas contagens de linfócitos T CD4⁺, independentemente do uso da cART, de uma carga viral indetectável e da remissão clínica da LV pelo tratamento anti-*Leishmania* (Santos-Oliveira et al. 2010).

Esse *status* de ativação celular foi novamente confirmado pelo nosso grupo em 2013, ainda de forma transversal, em pacientes LV/HIV na fase ativa e na remissão clínica da doença, onde os pacientes já apresentavam carga parasitária baixa ou indetectável, aliada ao efetivo controle viral (Santos-Oliveira et al. 2013). Posteriormente, Casado e colaboradores (2015), em um estudo retrospectivo, demonstrou que pacientes LV/HIV com história prévia de recidivas da LV, mas sem nenhuma evidência clínica/diagnóstica de LV ativa na admissão no estudo, apresentaram percentuais elevados de linfócitos T CD8⁺ ativados (CD38⁺HLA-DR⁺), em comparação aos demais grupos avaliados. Mais uma vez, estes percentuais de células T ativadas foram

independentes da supressão viral pela cART, além de serem mantidos mesmo na ausência de LV ativa no momento da admissão no estudo (Casado et al. 2015).

Todos esses resultados levantaram a hipótese de que a infecção por *L. infantum* não pode ser atribuída como o único cofator responsável pelo estado geral de ativação imune em indivíduos infectados pelo HIV-1. Nesse sentido, a translocação microbiana do lúmen intestinal para a corrente sanguínea, muito bem descrita na infecção pelo HIV-1, e também presente na LV, poderia se constituir como outro importante cofator para a manutenção de um alto grau de ativação em pacientes LV/HIV. De fato, altos níveis de LPS e sCD14 também puderam ser observados nesses pacientes LV/HIV previamente avaliados (Santos-Oliveira et al. 2013; Casado et al. 2015) e se correlacionaram positivamente com o percentual de linfócitos T CD8⁺ ativados e com os níveis de IL-6 e IL-8.

Além disso, outros fatores solúveis associados à translocação microbiana e com dano intestinal, como o MIF (fator inibitório da migração de macrófagos liberado após estímulo com LPS) e o IFABP, também estavam elevados nos pacientes LV/HIV tanto na fase ativa quanto na remissão clínica (Santos-Oliveira et al. 2013), corroborando com essa hipótese. Tais achados reforçaram que a translocação microbiana pode contribuir para a manutenção do intenso grau de ativação celular e resposta pró-inflamatória podendo, assim, influenciar diretamente no comprometimento da resposta imune necessária ao controle parasitário (Santos-Oliveira & Da-Cruz, 2012). Esse conceito pode fazer da translocação microbiana um mecanismo adicional para explicar as frequentes recidivas da LV em pacientes coinfectedados pelo HIV-1.

Todos os resultados descritos acima foram obtidos de pacientes LV/HIV-1 acompanhados de forma transversal. Portanto, o acompanhamento prospectivo de pacientes LV/HIV desde a fase ativa da doença até longos períodos após o tratamento anti-*Leishmania* tornara-se indispensável. Isso porque, de forma prospectiva, é possível investigar se tais parâmetros imunológicos podem se constituir em bons preditores de prognóstico clínico, em termos de recidivas ou não da LV, e de grau de comprometimento imune em pacientes LV/HIV.

Nesse contexto, a relação do grau de ativação imune com a evolução clínica na coinfeção LV/HIV foi previamente avaliada pelo nosso grupo. Neste estudo, um paciente LV/HIV, avaliado clínico-laboratorialmente por longo tempo, apresentou um episódio atípico de reativação cutânea da LV. Este paciente apresentou altos níveis de ativação linfocitária, durante a fase ativa e no momento das recidivas da doença (Santos-Oliveira et al. 2011), sugerindo o envolvimento desse fenômeno no comprometimento do controle parasitário a longo prazo.

Diferentemente, no que se refere ao compartimento imune dos linfócitos B, pouco se sabe sobre o papel da ativação dessas células na associação LV/HIV. Assim como é visto na LV sozinha, uma ativação policlonal inferida pelos títulos séricos de Igs é o que predomina na elucidação dessa resposta (Pagliano & Esposito, 2017). Estudos que avaliaram outras formas clínicas de leishmaniose identificaram uma relação positiva entre a cura clínica da infecção causada por *L. braziliensis* e *L. infantum*, e o declínio dos títulos de subclasses de IgG (Fagundes-Silva et al. 2012; Bhattacharyya et al. 2014). Desse modo, tem sido sugerido que a manutenção de níveis elevados de anticorpos poderia ser uma maneira de prever a reativação ou a evolução da doença para forma mais grave da LV. Aliado a esse fato, como já descrito anteriormente, estudos têm demonstrado a importância do papel da hiperativação e disfunção de células B na imunopatogênese da infecção pelo HIV-1. Diante disso, é importante elucidar o perfil de subpopulações de linfócitos B e o papel dessas células na imunopatogênese da associação LV/HIV, sobretudo no que se refere à interação T-B, com vistas a entender a sua influência na evolução e no prognóstico da LV.

Finalmente, tem sido sugerido que esse *status* imune ativado pode afetar diretamente a função efetora dos linfócitos T, seja de forma quantitativa ou qualitativa. Sendo assim, da mesma forma que o grau de ativação pode estar potencializado em um cenário de associação LV/HIV, as consequências imunológicas desse processo também podem estar gravemente intensificadas. Essa hipótese tem como base o fato de cada uma das infecções cursarem, comumente, com um processo de exaustão crônica do sistema imune, como consequência da ativação imune de natureza crônica, bem caracterizada na infecção pelo HIV-1 e, mais recentemente na LV.

1.5 Consequências imunológicas do grau de ativação imune crônica e sua influência sobre a imunopatogênese da coinfeção leishmaniose visceral/HIV-1 (LV/HIV)

1.5.1 Imunosenescência e exaustão dos recursos imunes primários

Verifica-se com o envelhecimento, um processo natural do organismo de deterioração da competência imune, como consequência dos sucessivos momentos de ativação celular ao longo da vida. Isso explica, parcialmente, a morbi-mortalidade aumentada entre indivíduos idosos que não são acometidos por imunodeficiências de qualquer natureza (Pawelec & Gupta, 2019). De forma análoga, devido ao intenso grau de ativação imune observado na infecção pelo HIV-1, observa-se uma progressão mais rápida para o envelhecimento do sistema imunológico em indivíduos HIV positivos (Appay & Sauce, 2017). Tal fato faz com que esses indivíduos exibam de forma mais grave e antecipada, características imunológicas apresentadas apenas por adultos em idades mais avançadas (Appay & Sauce, 2017). Este processo denomina-se imunosenescência e pode se manifestar de maneira clonal, com a perda funcional de clones específicos para o vírus, e/ou global, com a exaustão de compartimentos imunes centrais, como timo e medula óssea (Appay et al. 2007).

A intensa ativação imune crônica e a resposta inflamatória, além de favorecerem a replicação viral e apoptose de células T CD4⁺, vêm sendo cada vez mais associadas com esse envelhecimento sistêmico, que resulta na deterioração de diversas funções fisiológicas em indivíduos infectados pelo HIV-1 (Sokoya, 2017). Sabe-se que em resposta a diversas infecções e danos teciduais, citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IL-1 β e IL-6, são produzidas e secretadas, constituindo-se em uma complexa cascata inicial associada a destruição de patógenos e reparo tecidual, que atua como uma resposta natural do organismo a essas situações de estresse. No entanto, na infecção pelo HIV-1, e também na LV, ocorre a produção e/ou o acúmulo excessivo desses mediadores, acarretando em um grave comprometimento imunológico. Tais fatores também podem ser encontrados em altas concentrações séricas em indivíduos com idade mais avançada, muitas vezes como resultado da infecção por CMV, por exemplo, e desempenham um papel

crucial no processo de envelhecimento imunológico (Pawelec & Grupta, 2019). Esse processo é conhecido como um envelhecimento inflamatório (“*inflammaging*”), sendo caracterizado pela hiperregulação de respostas anti-estresse e produção de citocinas pró-inflamatórias (Pawelec & Grupta, 2019). O envelhecimento inflamatório, aliado ao processo de imunosenescência, tem sido descrito por agravar o grau de imunodeficiência na infecção pelo HIV-1 (Appay & Sauce, 2008; Deeks et al. 2013).

Assim, esses indivíduos permanecem com um alto risco de desenvolver degeneração, prejuízo funcional, bem como doenças não-definidoras de aids, apesar da submissão à cART (Sokoya, 2017). Estas complicações não-aids incluem as doenças cardiovasculares, malignidades não-aids, falência renal e hepática, osteopenia ou osteoporose e desordens neurocognitivas. Os exatos mecanismos responsáveis por esse risco aumentado de eventos não-aids estão longe de serem completamente esclarecidos, mas têm sido constantemente associados com a ativação crônica sistêmica e *status* inflamatório (Desai e Landay, 2010). Esses últimos, por sua vez, são as principais causas de proliferação celular acelerada, expansão e morte de células T, inclusive de células T específicas ao vírus (Grossman et al. 2006). Além disso, essas células T ativadas sofrem sucessivas expansões clonais em resposta ao estímulo viral persistente, resultando na diferenciação e acúmulo de células T senescentes não-funcionais (Gianesin et al. 2016). Assim, esse processo está diretamente relacionado ao intenso *turnover* de células T, mediante o grau de ativação celular, e o número de divisões celulares, devido à persistente estimulação antigênica.

A imunosenescência tem sido caracterizada pela presença de inúmeros clones de células T CD4⁺ e T CD8⁺ terminalmente diferenciados que podem ser reconhecidos através de diversos marcadores fenotípicos e funcionais (Xu & Larbi, 2017). Inicialmente, as células T senescentes foram reconhecidas pelo fenótipo CD27⁻CD28⁻ (Papagno et al. 2004), cujas subpopulações tendem a perder a capacidade de secretar citocinas, como IL-2 e IFN- γ , apresentam menor diversidade do repertório de células T (TCR) e maior suscetibilidade à morte induzida por ativação (Appay et al. 2007). Mais recentemente, o processo de senescência replicativa também tem sido identificado através da expressão da molécula CD57 na superfície das células T (Brenchley et al.

2003, Xu & Larbi, 2017; Henriquez et al. 2019). Essas células T CD57⁺ também apresentam perda da capacidade replicativa e maior suscetibilidade à morte celular induzida por ativação (Brenchley et al. 2003; Palmer et al. 2005). A presença ou ausência, respectivamente, das moléculas CD45RA/CD45RO, em associação a esses marcadores descritos anteriormente, definem as chamadas células T efetoras terminais, que também demonstram déficit na capacidade proliferativa e de produção de citocinas (Xu & Larbi, 2017; Henriquez et al. 2019).

De uma maneira geral, a presença deste fenótipo senescente desempenha um papel importante na imunopatogênese da infecção pelo HIV-1 e são usados como marcadores de imunosenescência em indivíduos infectados (Appay & Sauce, 2017). Diante desse cenário, indivíduos infectados tendem a perder o controle da resposta imune ao vírus, que não é eliminado apesar da presença de células T CD8⁺ específicas diferenciadas (Appay & Rowland-Jones, 2002). Além disso, esses indivíduos HIV positivos também passam a apresentar maior suscetibilidade a outras doenças infecciosas oportunistas, dentre elas a LV que pode, por sua vez, acelerar/potencializar o processo de ativação celular e envelhecimento da população de células T.

Ainda são poucos os trabalhos que descrevem uma relação entre o *status* de ativação observado na LV e a exaustão crônica do sistema imune, capaz de exercer um papel importante na patogênese da doença. Entretanto, assim como já descrito para a infecção pelo HIV-1 (Yasuma-Mitobe & Matsuoka, 2018), essa exaustão foi identificada na LV humana (Gautam et al. 2014), bem como na LV canina (Chiku et al. 2016; Oliveira Silva et al. 2019) e na LV experimental (Habib et al. 2018) através do aumento da expressão fenotípica de moléculas com atividade inibitória, como PD-1 e CTLA-4, sobretudo em linfócitos T CD8⁺. O PD-1 é um receptor inibitório da família do CD28, que se encontra na superfície de linfócitos T, B, monócitos e células NKT após ativação (Saresella et al. 2012). Ambos PD-1 e CTLA-4 regulam negativamente a ativação de células T, além de consistirem em marcadores característicos de anergia/exaustão de células T durante infecções crônicas (Gautam et al. 2014). Essa exaustão celular na LV já foi demonstrada em ambas as subpopulações de linfócitos T, e se caracteriza por um prejuízo funcional devido a uma diminuição na capacidade proliferativa e de produção

de IFN- γ em resposta aos antígenos de *L. infantum* (Esch et al. 2013). No entanto, o bloqueio da via PD-1/PD-L1 (ligante de PD-1) tem mostrado uma reversão desse cenário, resultando no aumento da capacidade proliferativa frente ao antígeno específico, restauração da resposta Th1, com produção de IFN- γ , e aumento na atividade citotóxica (Grabmeier-Pfistershammer et al. 2017; Habib et al. 2018). Dessa forma, por melhorar a função efetora das células T específicas, o bloqueio dessas moléculas inibitórias pode consistir em estratégia terapêutica promissora para restaurar, pelo menos parcialmente, o estado imunológico de indivíduos cronicamente infectados.

Além das alterações fenotípicas, células T senescentes apresentam um encurtamento do comprimento do telômero, tornando-o um marcador clássico de senescência celular sendo, comumente, usado como um indicador da idade biológica dos indivíduos (Appay & Sauce, 2017; Xu & Larbi, 2017). O encurtamento do comprimento do telômero ocorre a cada divisão celular, como consequência da contínua replicação das células T e/ou redução da atividade da telomerase (Xu & Larbi, 2017), enzima envolvida na manutenção do comprimento do telômero. Tal encurtamento pode causar uma instabilidade no cromossomo, conduzindo a uma parada na proliferação e/ou apoptose celular (Hodes et al. 2002). Além disso, a atividade da telomerase é diminuída com a estimulação do sistema imune, comprometendo a capacidade replicativa das células T específicas senescentes (Plunkett et al. 2007). Na infecção pelo HIV-1, o comprimento do telômero tem sido amplamente avaliado como medida de senescência replicativa (Appay & Rowland-Jones, 2002; Gianesin et al. 2016), de modo que a sua redução mais rápida em PBMC ou células T de indivíduos HIV positivos é sugestiva de envelhecimento imunológico acelerado (Appay & Sauce, 2017) e capacidade proliferativa reduzida de células T específicas ao vírus.

Esse quadro pode se apresentar de forma ainda mais grave quando ocorre a perda irreversível de uma subpopulação de clones específicos ao vírus, por exemplo, através de morte por apoptose induzida pela ativação (Brenchley et al. 2003; Appay et al. 2007). Desta forma, a depleção ou não-responsividade desses clones capazes de reconhecer importantes epítomos virais, pode ajudar a explicar a perda do controle da replicação viral e progressão mais rápida para aids (Appay et al. 2008).

Além disso, dependendo da especificidade que é perdida, pode ocorrer um comprometimento da resposta imune frente a outros patógenos, como a própria *Leishmania*, o que seria crítico no cenário de associação LV/HIV. No entanto, esse processo de exaustão clonal não se resume apenas na perda de clones de células T específicas. De uma forma geral, tem sido observado um direcionamento para um estado oligoclonal e senescente, com o acúmulo de células com características de “terminalmente diferenciadas”, que diante do comprometimento global do *status* imunológico do indivíduo infectado, dificilmente serão substituídas por um *pool* de novas células T *naive* capazes de responder à infecção (Papagno et al. 2004).

Nesse cenário, a exaustão dos recursos imunes primários tem-se destacado como um importante cofator que contribui para a manutenção desse estado geral de imunosenescência em infecções crônicas, como pelo HIV-1. Normalmente, seria esperado que o sistema imune fosse capaz de substituir esse *pool* de células T senescentes, bem como compensar a intensa depleção periférica das células T CD4⁺, reconstituindo a periferia com novas células T que irão compor um repertório celular com novas e diferentes especificidades. No entanto, pacientes HIV positivos, semelhante a indivíduos idosos, apresentam um prejuízo na função do timo e da medula óssea, caracterizado por uma limitação dos recursos imunes primários, levando a alteração da homeostase imunológica, e perda da capacidade de renovação das células T pelo timo (Douek et al. 1998; Molina-Pinelo et al. 2009), bem como de linfócitos B (Quiros-Roldan et al. 2012). Todo esse processo pode culminar na perda do equilíbrio entre resposta imune específica e a viremia residual, com súbito aumento da carga viral e da depleção das poucas células T CD4⁺ ainda existentes. Esse colapso imunológico, comumente, irá resultar na perda da capacidade de controlar o aparecimento e/ou reaparecimento de qualquer outra patologia, caracterizando o estado de aids.

O papel central do timo na imunopatogênese da infecção pelo HIV-1 tem sido muito bem reconhecido, de modo que, qualquer alteração na funcionalidade tímica conduz a um desequilíbrio na geração de novas células T e, conseqüente, um prejuízo na reconstituição imunológica (Savino et al. 1986; Douek et al. 1998; Kolte, 2013). Diversos fatores podem implicar nesse comprometimento tímico, portanto na reconstituição periférica com um *pool* de

novas células T. Dentre eles, a infecção e morte de timócitos e de células estromais tímicas pelo HIV-1, assim como a infecção de células-tronco hematopoiéticas, a atrofia tímica acelerada (em um nível similar aos indivíduos idosos), os efeitos de citocinas proinflamatórias (TNF) e do intenso grau de ativação, que conduzem à destruição da arquitetura do tecido linfóide tímico pelo processo fibrótico (Savino et al. 1986; Ye et al. 2004; Young & Angel, 2011; Fiume et al. 2015; Furler et al. 2019).

Diante disso, a análise do *output* tímico em indivíduos infectados pelo HIV-1 tem sido a principal maneira de se avaliar a função tímica, que pode ser acessada de forma acurada pela identificação dos chamados emigrantes tímicos recentes (ETRs), que são as células T recém-geradas e exportadas do timo. A detecção e quantificação desses ETRs em pacientes HIV positivos ajudam a determinar se a repopulação de células T *naive* e, conseqüentemente, a diversidade do repertório de células T na periferia, sobretudo após a admissão da cART, são frutos de uma contribuição direta do timo (Douek et al. 1998).

A caracterização fenotípica desses ETRs é controversa, uma vez que, identificá-los apenas pela expressão de marcadores de células T *naive* não é uma medida fidedigna de avaliação da função tímica. Isso porque tem sido descrito que células T *naive* podem se replicar na periferia, na ausência de estímulo, sem perder a expressão dos seus marcadores, além de se manterem quiescentes durante uma vida-útil longa; e por esses motivos não podem ser consideradas ETRs (Kolte, 2013).

Mais recentemente, a expressão da molécula CD31, também conhecida como PECAM-1, tem sido sugerida para identificação de ETRs dentro do *pool* de células T CD4⁺ *naive*, uma vez que apresentam conteúdo de TREC (do inglês *TCR rearrangement excision circles*,) mais elevado do que as células T CD4⁺ *naive* CD31⁻ (Kolte, 2013). A avaliação dos ETRs pela expressão de CD31 tem demonstrado que indivíduos infectados pelo HIV-1 apresentam baixos percentuais dessas células, os quais foram associados com o grau de ativação celular, as baixas contagens de células T CD4⁺ e com a progressão para doença (Zakhour et al. 2016; Manjati et al. 2016).

No entanto, a medida mais acurada e comumente utilizada para avaliar a capacidade tímica de repopular a periferia com novas células T consiste num

ensaio desenvolvido por Douek e colaboradores (1998). Através desse ensaio pode-se estimar o chamado *output* tímico em amostras clínicas quantificando-se os círculos de DNA epissomais, gerados durante o processo de rearranjo dos genes do receptor de células T (TCR), denominados círculos de excisão do rearranjo do TCR (TREC), já mencionados acima. Estes fragmentos de DNA são estáveis, não se duplicam durante a mitose e, portanto, são diluídos a cada ciclo celular. Os TRECs são produzidos a partir do rearranjo dos genes *TCRA* e *TCRB* e, então, estão presentes apenas nas células que expressam o TCR- $\alpha\beta$ (células T $\alpha\beta$) (Douek et al. 1998).

Diante disso, a avaliação dos níveis de TREC vem sendo utilizada de forma bem-sucedida em diversas situações em que a função tímica pode estar afetada, tais como: a identificação e caracterização das imunodeficiências primárias, por exemplo, em programas de *screening* de recém-nascidos, e também nas imunodeficiências adquiridas, emergindo como um importante biomarcador de *output* tímico e prognóstico em indivíduos infectados pelo HIV (Douek et al. 2000; Serana et al. 2013; Rb-Silva et al. 2019).

A homeostase da população de células T do sangue periférico é, relativamente, mantida por toda a vida de um indivíduo saudável, devido à contínua reposição tímica e proliferação de células T já existentes na periferia. O conteúdo de TREC em células TCD4⁺ e TCD8⁺ de doadores saudáveis declina de forma exponencial com o avanço da idade, mas ainda assim é possível identificar a presença de células TREC⁺ na periferia, em níveis significativamente superiores a indivíduos timectomizados ou infectados pelo HIV, o que reflete uma reposição tímica sustentada (Douek et al 1998; Somech, 2011; Verstegen et al. 2019). Estes estudos apontam que a involução tímica em consequência da idade afeta a timopoiese, principalmente, de forma quantitativa e não qualitativa, possivelmente, devido à história de replicação das células T ao longo da vida (Pinti et al. 2010; Somech, 2011; Verstegen et al. 2019), demonstrando que os timócitos adultos ainda passam por rearranjo gênico e que o timo retém a capacidade funcional de gerar novas células T para a periferia.

De forma precoce e agravada, diversos estudos vêm demonstrando que indivíduos infectados pelo HIV-1 apresentam diminuição do conteúdo de TREC em células T *naive* do sangue periférico, assim como tem sido observado em

macacos infectados com o SIV (Douek et al. 1998, 2000; Hatzakis et al. 2000; Sodora et al. 2002; Gaardbo et al. 2013; Ferrando-Martinez et al. 2017; Rb-Silva et al. 2019). Em todos esses estudos, tal diminuição no *output* tímico geralmente está correlacionada a uma baixa reconstituição imunológica e, conseqüentemente, com as baixas contagens de células TCD4⁺, perda do controle da viremia e uma progressão mais rápida para a aids.

A introdução da cART tem contribuído para um aumento dos níveis de TREC em PBMCs ou em células T CD4⁺ e CD8⁺ *naive* do sangue periférico, sobretudo entre os pacientes HIV positivos com boa resposta à terapia (Douek et al. 2000; Ribeiro & Boir, 2008; Kingkeow et al. 2015; Ferrando-Martinez et al. 2017; Rb-Silva et al. 2019), sugerindo que o timo pode contribuir para a reconstituição imune pós-cART. De fato, a maioria dos indivíduos infectados pelo HIV-1 mostra um aumento importante na reconstituição imune nos primeiros meses após a admissão da cART, normalmente, com um rápido aumento das contagens de células T CD4⁺, seguido por um aumento mais lento em direção a um platô. Dessa forma, a manutenção e/ou retorno da atividade timopoiética nesses indivíduos com boa resposta à cART pode estar contribuindo para a recuperação da resposta proliferativa de células T frente aos antígenos, bem como para a constituição do repertório dessas células na periferia (Kolte, 2013).

Similar ao que é visto na infecção pelo HIV-1, a imunopatogênese da LV também é bastante complexa e compromete diferentes órgãos linfoides, principalmente a medula óssea (Saha et al. 2006). Dessa forma, o fato da LV cursar com um prejuízo da resposta imune efetora específica aos antígenos *L. infantum* ao lado de uma ativação crônica, pode contribuir para um efeito sinérgico sobre o comprometimento do sistema hematopoiético, diante de um cenário de associação LV/HIV. Tal comprometimento, por sua vez, pode afetar a liberação de precursores de linfócitos T que completarão sua maturação no timo e constituirão novos clones na periferia.

Além disso, o prejuízo na reconstituição de células T durante a infecção pelo HIV-1 (Douek et al. 2000), quimioterapia, transplante de medula óssea (Castermans et al. 2011) e, possivelmente, em outras infecções que possam afetar a medula óssea, como a LV (Saha et al. 2006), pode ser agravado pela involução tímica decorrente do envelhecimento natural. Dessa forma, é

importante destacar que na coinfeção *Leishmania*/HIV-1, o efeito da involução tímica natural cursa ao lado das possíveis consequências do intenso processo de ativação do sistema imune sobre o timo. Sendo assim, espera-se um grave comprometimento na reconstituição imune, no fornecimento de um repertório diverso de células T capazes de responder a potenciais neoantígenos, bem como na recuperação de especificidades clonais, perdidas pela depleção de células T e/ou pelo processo de exaustão imune (Appay et al. 2008; Sokoya et al. 2017).

Em suma, principalmente, devido ao comprometimento da medula óssea, bem estabelecido na LV, e ao elevado grau de ativação linfocitária causada por ambas infecções (Goto & Prianti, 2009; Douek et al. 2009; Santos-Oliveira, 2010), os pacientes coinfectados LV/HIV podem apresentar uma potencialização no prejuízo da função tímica, com deficiência de liberação de novos progenitores de linfócitos T para maturação no timo. Estudos anteriores do grupo já demonstraram que indivíduos LV/HIV não recuperavam suas contagens de linfócitos TCD4⁺, mesmo após o tratamento leishmanicida, e uso da cART (Alexandrino-Oliveira et al. 2010; Santos-Oliveira et al. 2010), sugerindo um possível comprometimento timopoiético como um mecanismo contribuinte para esta deficiência.

1.5.2 Alterações no perfil de mobilização do repertório V β de células T (TCRV β) periféricas

Outra consequência resultante da exaustão dos recursos imunes primários, a qual pode ser considerada primariamente de natureza qualitativa, são as perturbações no repertório V β do receptor de linfócitos T (TCRV β). O repertório de células T é determinado pela diversidade genética e antigênica do seu receptor de antígenos, o TCR. O TCR é um heterodímero composto por uma cadeia alfa (α) e uma cadeia beta (β), covalentemente ligadas por uma ponte dissulfeto, sendo expresso pela maioria dos linfócitos T (90-99%), que incluem ambas subpopulações de células T CD4⁺ e T CD8⁺. Cada uma dessas cadeias α e β apresentam um domínio variável (V) e um domínio constante (C). A justaposição das regiões variáveis (V) das cadeias α e β compõe o sítio de ligação e reconhecimento antigênico, através da sua ligação ao complexo peptídeo-MHC.

Os TCRs são gerados pelo processo de recombinação somática dos diferentes segmentos gênicos durante a ontogenia dos linfócitos T, também conhecido como rearranjo V(D)J, a partir do qual também são gerados os TRECs. A porção variável da cadeia α é formada pelo rearranjo dos segmentos V (variável) e J (juncional), enquanto a cadeia β é formada pelo rearranjo dos segmentos V, D (diversidade) e J. Existem cerca de 70-80 segmentos $V\alpha$ e 65 segmentos $V\beta$, que são agrupados em famílias de acordo com o grau de identidade da sequência de nucleotídeos (Kimura et al. 1987, Rowen et al. 1996). Após os processos de rearranjo, maturação e seleção tímica, os linfócitos T maduros irão migrar para os órgãos linfoides periféricos, onde constituirão o chamado repertório de células T. Dessa forma, vale ressaltar que uma possível disfunção tímica, como explorado anteriormente, pode afetar a diversidade desse repertório de células T, a qual está diretamente relacionada à capacidade de iniciar uma resposta imune frente a uma variedade de diferentes antígenos (Brazin et al. 2015).

A avaliação do repertório de células T tem se baseado no estudo das famílias que constituem a porção variável da cadeia β , que iremos nos referir como famílias $V\beta$. A análise do repertório $V\beta$ de células T (TCRV β) no sangue periférico, seja por biologia molecular ou por citometria de fluxo, pode fornecer fortes evidências de clonalidade, especialmente quando se observa um perfil de expansão monoclonal, ou seja, com a expressão dominante de uma determinada família $V\beta$ (Salameire et al. 2012). Nesse contexto, perturbações no repertório TCRV β têm sido relacionadas à imunopatogênese de diversas doenças, tais como câncer (Salameire et al. 2012; Yan et al. 2019); artrite reumatóide (Chang et al. 2019); comorbidades hematológicas (Plasilova et al. 2003); doença de Chagas (Costa et al. 2000; Fernandez-Mestre et al. 2002; Menezes et al. 2004); leishmanioses (Uyemura et al. 1993; Clarêncio J et al. 2006; Ferraz et al. 2015); e HIV/Aids (Soudeyans et al. 1993; Pantaleo et al. 1994; Giacoia-Gripp et al. 2005; Kolte, 2013; Heather et al. 2016).

Durante a fase aguda da infecção pelo HIV-1, sabe-se que a expansão de células T CD8⁺ citotóxicas específicas para o vírus está associada com uma diminuição da viremia e, a princípio, com um controle da replicação viral. No entanto, ainda é possível que a doença progrida, sugerindo que essa resposta imune primária capaz de controlar a replicação viral pode não ser suficiente

para promover um curso clínico favorável (Pantaleo et al. 1994). Já está bem estabelecido que a infecção pelo HIV-1 induz importantes perturbações no repertório TCRV β durante as fases aguda e crônica da infecção, com uma redução considerável da diversidade, sobretudo pela exaustão de clones específicos para o vírus (González-Serna et al. 2013; Heather et al. 2016). Dessa forma, deleções de determinadas famílias V β já foram correlacionadas com percentuais elevados de ativação e exaustão de células T CD8⁺, podendo ser, então, resultado de um nível acelerado de apoptose (González-Serna et al. 2013) o que, conseqüentemente, pode comprometer a resposta imune efetiva e diversa aos antígenos virais. Por outro lado, as expansões de determinadas famílias V β podem estar relacionadas com um repertório mais diverso e funcional quanto à capacidade de controlar o antígeno (González-Serna et al. 2013).

De fato, um dos estudos pioneiros que avaliou o repertório TCRV β de indivíduos HIV-positivos na fase aguda da infecção sugeriu que diferenças qualitativas nesse repertório poderiam estar envolvidas nessa resposta, indicando a existência de pelo menos três perfis diferentes de expressão das cadeias V β do TCR. Foram, então, identificados um perfil monoclonal, com a expressão dominante de apenas uma família V β ; um perfil oligoclonal, com a expansão de duas ou mais famílias V β ; e um perfil policlonal, com a expansão de várias famílias V β ou ainda a ausência de qualquer expansão (Pantaleo et al. 1994), estando a mobilização de um perfil mono-oligoclonal associada com um mau prognóstico e progressão mais rápida para a aids (Pantaleo et al. 1994, 1997a). Estes achados corroboram com a hipótese de que o perfil de distribuição do repertório de células T pode influenciar o prognóstico da infecção pelo HIV (Soudeyns et al. 1993; Kolte, 2013; Heather et al. 2016) e da sua associação com outras infecções, como EBV (Hernandez et al. 2018). Neste sentido, indivíduos não-progressores devem apresentar um perfil policlonal do repertório TCRV β , que pode permanecer sem muitas alterações, ou se apresentar mais diverso mediante a expansão de diversas famílias capazes de sustentar uma resposta imune efetora ao longo da infecção (Pantaleo et al. 1997a). No entanto, vale ressaltar que o perfil de distribuição e o número de famílias V β mobilizadas podem diferir entre os linfonodos e o sangue periférico de indivíduos infectados pelo HIV-1, uma vez que, o tecido

linfoide é o principal sítio de replicação viral e, portanto, este compartimento deve possuir linfócitos T de diferentes especificidades antigênicas.

Considerando que o perfil de mobilização do repertório TCRV β pode influenciar o prognóstico da doença é possível que a introdução da cART resulte em um repertório TCR V β menos restrito do que aquele encontrado antes do tratamento (Heather et al. 2016), melhorando a resposta imune específica e ajudando, inclusive, a controlar o aparecimento de infecções oportunistas. Giacoia-Gripp e colaboradores (2005) demonstraram que pacientes HIV-positivos brasileiros apresentavam um perfil de mobilização oligoclonal do repertório TCRV β após a cART, mas com a mobilização de famílias V β diferentes daqueles utilizados pelos indivíduos infectados ainda sem cART. Por outro lado, outros estudos mostraram que a cART promove a estabilização do repertório V β durante a fase aguda do HIV-1, reduzindo o perfil oligoclonal verificado antes do tratamento (Romiti et al. 2001; Yin et al. 2009).

Já a análise da variação do comprimento da região de complementaridade 3 (CDR3) nos linfócitos T, uma das formas de se acessar a diversidade do repertório TCRV β , revelou alterações importantes dentro da população de células T CD4⁺ *naive* em indivíduos infectados pelo HIV-1. Tais alterações foram revertidas e normalizadas após a redução da viremia e o aumento do *output* tímico obtidos pela cART (Yin et al. 2009; Heather et al. 2016). Resultados similares foram observados em crianças infectadas pelo HIV-1, cuja carga viral elevada e as baixas contagens de células T CD4⁺ se correlacionaram positivamente com as perturbações no repertório de células T CD8⁺ *naive*, as quais foram rapidamente revertidas após a introdução da cART e supressão viral (Kou et al. 2003). Apesar de todos esses achados, ainda existe conflito entre os estudos que avaliam o efeito da cART sobre a dinâmica de normalização do repertório TCRV β . Dessa forma, alguns trabalhos apontam que esse repertório TCRV β alterado pode não ser completamente restaurado com o uso da terapia, mesmo diante da supressão da viremia plasmática e do aumento das contagens de células T CD4⁺ (Gorochov et al. 1998; Giovannetti et al. 2003).

De um modo geral, as perturbações no repertório TCRV β observadas entre pacientes infectados pelo HIV-1 são, em sua maioria, consequências da patogênese do vírus, podendo refletir alterações quantitativas e também

qualitativas, uma vez que um prejuízo na resposta imune específica pode ser observado nesses casos. Além disso, esses efeitos da própria infecção sobre a mobilização do repertório TCRV β podem, muitas vezes, ser somados aos efeitos causados pelas infecções oportunistas que aparecem nos estágios mais avançados da doença. Nesse contexto, a presença de LV e de uma resposta imune específica ao parasito poderia contribuir para perturbar ainda mais o perfil de mobilização do repertório TCRV β em pacientes coinfetados com HIV-1.

Entretanto, no que se refere às leishmanioses, existe uma escassez de estudos que avaliem a dinâmica de mobilização do repertório TCRV β em indivíduos acometidos pela doença. A maior parte do conhecimento acerca da influência das perturbações do repertório TCRV β têm sido obtidos de estudos no modelo da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), especialmente leishmaniose cutânea (LC) (Uyemura et al. 1993; Clarêncio et al. 2006; Ferraz et al. 2015). Nesse contexto, em indivíduos infectados por *L. guyanensis* já foi observado um aumento da expressão da família V β 14 nos sítios das lesões (Kariminia et al. 2007).

Corroborando com este estudo, Clarêncio e colaboradores (2006) já tinham verificado uma diminuição da expressão de V β 14 nas células T CD8⁺ presentes nos linfonodos de pacientes infectados por *L. braziliensis*, o que poderia refletir a migração dessas células para o sítio da infecção (Kariminia et al. 2007). De uma maneira geral, os estudos em LC têm mostrado a dominância de um perfil oligoclonal, similar ao que é visto na infecção pelo HIV-1, com um número limitado de famílias V β sendo expresso nas lesões (Ueymura et al. 1993). Além disso, perfis de repertório TCRV β têm diferido entre os sítios das lesões e o sangue periférico dos indivíduos acometidos. Em avaliações feitas *in vitro*, observou-se que repertório TCRV β específico implicou na expansão de algumas famílias V β com a diminuição simultânea de outras, sugerindo a presença de mecanismos de proliferação e expansão clonal frente ao antígeno, bem como a possibilidade de apoptose após a estimulação específica (Clarêncio et al. 2006).

Mais recentemente, um estudo demonstrou que diferentes subpopulações de células T CD8⁺ expressando famílias V β específicas, estavam envolvidas na resposta imune de pacientes com LC por *L. braziliensis*,

destacando um possível papel das expansões das famílias V β 12 e V β 22 e contração da V β 2 na resposta imune anti-*Leishmania* (Ferraz et al. 2015). A família V β 12 já havia se destacado anteriormente entre os clones de linfócitos T presentes no linfonodo, seguido da imunização de indivíduos com antígenos de *L. amazonensis*, bem como nas respostas *in vitro* frente ao antígeno específico, apontando a importância dessa família na resposta imune contra a *Leishmania*.

No que se refere a LV, pouco se conhece sobre o perfil de mobilização do repertório TCRV β , que já foi avaliado apenas em um estudo *in vitro* (Sassi et al. 2005), não existindo nenhuma informação na literatura sobre o perfil de distribuição do repertório de células T em indivíduos acometidos. Até onde é de nosso conhecimento, o repertório V β de células T ainda não foi investigado na associação LV/HIV, sendo ainda desconhecido se existem alterações das diferentes famílias V β em pacientes coinfectados LV/HIV, pois implicaria na capacidade de reconhecimento antigênico destes pacientes. Diante disso, em virtude do que já se tem descrito na imunopatogênese da infecção pelo HIV-1, e pelo fato do sistema imune estar gravemente comprometido em ambas infecções, a investigação do perfil de mobilização do repertório TCRV β torna-se importante em pacientes LV/HIV. Desta forma, o presente estudo poderá fornecer evidências do quão esse perfil pode estar alterado em pacientes LV/HIV e se, pode ser restaurado após longo tempo de tratamento leishmanicida, uso da cART e de profilaxia secundária anti-*Leishmania*, e se tais alterações podem influenciar no prognóstico clínico e manutenção do controle parasitário nesses indivíduos.

2. JUSTIFICATIVA

A maioria dos casos de LV/HIV-1 na América ocorre no Brasil. Um crescente número de casos de LV/HIV tem sido relatado no país nos últimos anos, alcançando cerca de 8% em 2017 em comparação a 2001, cuja prevalência era de 2% (Ministério da Saúde, 2017). Embora consista em uma associação emergente e grave, ainda existem muitas lacunas de conhecimento, sobretudo no que se refere à condição imunológica preditiva do prognóstico clínico (remissão clínica ou recidivas) de pacientes coinfectados.

Sabe-se que eles comumente, falham em responder ao tratamento anti-*Leishmania*, apresentam uma alta taxa de mortalidade e um risco maior de recidivas da LV quando comparados aos pacientes LV sem HIV-1 (Cota et al. 2011, 2013; Lindoso et al. 2018).

Quanto aos aspectos imunopatogênicos, já foi demonstrado que a infecção por *Leishmania* é um importante cofator para a potencialização do grau de imunossupressão, ativação celular e *status* inflamatório exacerbado em pacientes coinfectados pelo HIV-1 (Santos-Oliveira et al. 2010, 2013). Aliado a isso, a passagem de produtos microbianos de origem luminal para a circulação, observada pelos altos níveis plasmáticos de LPS, sCD14 e IFABP em pacientes LV/HIV, também confirmaram a contribuição desse fenômeno para o grau de ativação (Santos-Oliveira et al. 2013; Casado et al. 2015). Desta forma, hipotetiza-se que esse elevado grau de ativação imune crônica pode acarretar em prejuízos imunológicos importantes, agravando a imunossupressão e comprometendo a resposta imune efetora ao parasito que, por sua vez, pode contribuir para as frequentes recidivas da LV em pacientes LV/HIV.

Nesse contexto, sabe-se que a intensa ativação imune na infecção pelo HIV-1 pode acelerar o fenômeno de imunosenescência, que se manifesta clonalmente pela perda da capacidade proliferativa e, conseqüentemente, com uma alta frequência de células T de memória terminalmente diferenciadas, denominadas senescentes (Appay & Sauce, 2017; Sokoya, 2017). Além disso, o grau de ativação também acarreta em um ônus adicional que é caracterizado por um comprometimento da função de órgãos linfoides centrais, como timo e medula óssea, culminando na exaustão dos recursos imunes primários, o que por sua vez gera uma diminuição no *output* tímico e na diversidade do repertório de células T periféricas.

Desta forma, espera-se que pacientes LV/HIV cronicamente ativados apresentem um grau elevado de senescência que pode levar a uma reconstituição imunológica deficiente com prejuízos na resposta efetora e, por sua vez a um prognóstico clínico ruim para esses indivíduos. Nesse cenário, o estudo do perfil de mobilização das famílias TCRV β em pacientes LV/HIV será de extrema importância para compreender se as alterações do repertório estão relacionadas ao grau de reconstituição imunológica, e se influenciam na manutenção da remissão clínica ou recidivas da LV. Aliado a isso, a detecção e

a quantificação dos níveis de TRECS nas células do sangue periférico desses pacientes que evoluem com diferentes desfechos clínicos, ajudarão a entender se a reconstituição imunológica pode ser afetada por uma funcionalidade tímica diferenciada em repopular a periferia com novas células T diversas.

Esse mesmo raciocínio tem sido aplicado nos estudos que avaliam o envolvimento das subpopulações de linfócitos B na imunopatogênese da infecção pelo HIV-1, onde altas frequências de células B hiperativadas e exaustas têm sido descritas (Moir & Fauci, 2009). Frente ao escasso conhecimento do papel das células B na imunopatogênese da coinfeção LV/HIV, torna-se também importante investiga-lo não só via níveis de imunoglobulinas anti-*Leishmania*, mas também pela identificação das diferentes subpopulações de células B. A avaliação do grau de ativação e exaustão nessas células pode ajudar a compreender se um fenótipo de células B diferenciado pode estar relacionado aos diferentes desfechos clínicos desses pacientes.

Embora nossos estudos anteriores tenham demonstrado uma intensa ativação e resposta imune inflamatória na coinfeção LV/HIV, todos esses achados foram obtidos a partir de estudos transversais (Santos-Oliveira et al. 2010, 2013), não sendo possível relacioná-los com os diferentes desfechos clínicos desses pacientes a longo prazo. Dessa forma, o estudo clínico-laboratorial de caráter prospectivo permitirá avaliar a dinâmica desses parâmetros imunológicos ao longo de 12 meses de acompanhamento longitudinal desses pacientes LV/HIV, relacionando-os com o prognóstico da LV, em termos de monitoramento para remissão clínica ou frequentes recidivas da doença.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência do grau de ativação imune e dos fatores decorrentes da imunosenescência de linfócitos T, assim como dos perfis fenotípicos de linfócitos B sobre as frequentes recidivas da leishmaniose visceral em pacientes coinfectedados pelo HIV-1.

3.2 Específicos

3.2.1 Capítulo 1 - Artigo 1 (publicado)

- ✓ Avaliar prospectivamente o grau de reconstituição imunológica em pacientes coinfectedados LV/HIV, com vistas a definir se este pode diferir entre casos recidivantes ou não da LV e sua possível relação com um comprometimento da resposta imune necessária ao controle parasitário;
- ✓ Analisar as características fenotípicas de linfócitos T quanto à expressão de moléculas associadas à ativação celular (CD38 e HLA-DR) e imunosenescência (CD57), no intuito de entender se frequências diferenciadas desses fenótipos podem ajudar a prever as recidivas da LV em pacientes coinfectedados com HIV-1;
- ✓ Avaliar a influência da translocação microbiana luminal sobre a potencialização do grau de ativação imune crônica sistêmica, e se os fatores solúveis associados a esse fenômeno podem estar relacionados com uma maior suscetibilidade às recidivas da LV nos pacientes acompanhados;

3.2.2. Capítulo 1 – Artigo 2 (submetido)

- ✓ Avaliar a capacidade tímica quanto à geração de novas células T circulantes em pacientes coinfectedados LV/HIV, no intuito de entender se existe prejuízo no *output* tímico e se este pode estar associado a uma baixa reconstituição imune e, conseqüentemente, a um déficit no controle parasitário que predispõe às recidivas da LV;
- ✓ Avaliar o repertório de linfócitos T através da caracterização das regiões variáveis da cadeia beta ($V\beta$) do receptor, e verificar se durante a reconstituição de células T pós-cART e tratamento anti-*Leishmania* ocorre uma mobilização diferenciada de famílias $V\beta$, e se esta pode diferir entre pacientes LV/HIV recidivantes ou não;

3.2.3. Capítulo 2 – Apêndice de resultados

- ✓ Avaliar perfis fenotípicos de linfócitos B, com vistas a identificar as diferentes subpopulações dessas células presentes no sangue periférico de pacientes LV/HIV, e assim relacioná-las não apenas com os diferentes desfechos clínicos da LV mostrados por esses pacientes, mas também com o padrão de secreção de Ig apresentado pelos mesmos.

Capítulo 1

4. METODOLOGIA E RESULTADOS

4.1 Artigo 1 (Publicado)

Título: *“Immune Activation and Bacterial Translocation: A Link between Impaired Immune Recovery and Frequent Visceral Leishmaniasis Relapses in HIV-Infected Patients”.*

Autores: Maria Luciana Silva-Freitas, Glaucia Fernandes Cota, Talia S. Machado-de-Assis, Carmem Giacoia-Gripp, Ana Rabello, Alda M. Da-Cruz, Joanna R. Santos-Oliveira.

Plos One, 2016; 11(12):1–18.

RESUMO

A manutenção da ativação imune crônica devido à leishmaniose ou mesmo a translocação microbiana está associada com a imunosenescência e pode contribuir para as frequentes recidivas. Nosso objetivo foi investigar se pacientes com leishmaniose visceral associada ao HIV-1 (LV/HIV) que vivenciaram um único episódio da LV têm um comportamento imunológico diferente em comparação àqueles que vivenciam frequentes recidivas. Os pacientes LV/HIV foram separados em grupos não-recidivantes (NR, n = 6) e recidivantes (R, n = 11) e foram acompanhados a partir da fase ativa da LV até 12 meses após o tratamento (mpt). Os pacientes estavam recebendo terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) e profilaxia secundária depois do tratamento da LV. Durante a LV ativa, os dois grupos foram similares em todos os parâmetros imunológicos, incluindo a carga parasitária. Aos 6 e 12 mpt, o grupo NR mostrou um ganho significativo de células T CD4+, uma redução da ativação linfocitária e menores níveis de CD14 solúvel e IgG3 anti-*Leishmania* comparado ao grupo R. A carga viral permaneceu baixa, sem correlação com a ativação. Os dois grupos mostraram elevados, porém similares percentuais de células T senescentes. Esses achados sugerem uma diminuição da capacidade do grupo R em reduzir a ativação imune comparado ao grupo NR. Tal comprometimento funcional da resposta efetora pode ser um indicador útil para prever o prognóstico clínico e recomendar o início ou interrupção da profilaxia secundária.

RESEARCH ARTICLE

Immune Activation and Bacterial Translocation: A Link between Impaired Immune Recovery and Frequent Visceral Leishmaniasis Relapses in HIV-Infected Patients

Maria Luciana Silva-Freitas¹*, Glaucia Fernandes Cota^{2,3}*, Talia S. Machado-de-Assis^{2,3}, Carmem Giacoia-Gripp⁴, Ana Rabello², Alda M. Da-Cruz¹, Joanna R. Santos-Oliveira^{1,5*}



CrossMark
click for updates

1 Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas – Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Laboratório de Pesquisas Clínicas e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias – Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Hospital Eduardo de Menezes – Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais-FHEMIG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **4** Laboratório de AIDS e Imunologia – Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **5** Núcleo de Ciências Biomédicas Aplicadas, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – IFRJ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

* These authors contributed equally to this work.

* joannareisoliveira@gmail.com

OPEN ACCESS

Citation: Silva-Freitas ML, Cota GF, Machado-de-Assis TS, Giacoia-Gripp C, Rabello A, Da-Cruz AM, et al. (2016) Immune Activation and Bacterial Translocation: A Link between Impaired Immune Recovery and Frequent Visceral Leishmaniasis Relapses in HIV-Infected Patients. PLoS ONE 11 (12): e0167512. doi:10.1371/journal.pone.0167512

Editor: Farhat Afrin, Taibah University, SAUDI ARABIA

Received: May 23, 2016

Accepted: November 15, 2016

Published: December 1, 2016

Copyright: © 2016 Silva-Freitas et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Support was provided by: 1- Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, <http://www.faperj.br/> (E-26/111.443/2013) - JRSO; 2- Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ - <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tp=home> (Fellowship - MLSF); 3- Conselho Nacional de

Abstract

The maintenance of chronic immune activation due to leishmaniasis or even due to microbial translocation is associated with immunosenescence and may contribute to frequent relapses. Our aim was to investigate whether patients with HIV-associated visceral leishmaniasis (VL/HIV) who experience a single episode of VL have different immunological behaviors in comparison to those who experience frequent relapses. VL/HIV patients were allocated to non-relapsing (NR, n = 6) and relapsing (R, n = 11) groups and were followed from the active phase of VL up to 12 months post-treatment (mpt). The patients were receiving highly active antiretroviral therapy (HAART) and secondary prophylaxis after VL therapy. During active VL, the two groups were similar in all immunological parameters, including the parasite load. At 6 and 12 mpt, the NR group showed a significant gain of CD4⁺ T cells, a reduction of lymphocyte activation, and lower soluble CD14 and anti-*Leishmania* IgG3 levels compared to the R group. The viral load remained low, without correlation with the activation. The two groups showed elevated but similar percentages of senescent T cells. These findings suggest a decreased ability of the R group to downmodulate immune activation compared to the NR group. Such functional impairment of the effector response may be a useful indicator for predicting clinical prognosis and recommending starting or stopping secondary prophylaxis.

Desenvolvimento Científico e tecnológico - CNPq, <http://cnpq.br/> (Fellowship - AMD). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: HAART, highly active antiretroviral therapy; VL, visceral leishmaniasis.

Introduction

The increasing frequency of HIV-associated visceral leishmaniasis (VL/HIV) has become a significant problem in East Africa, Brazil and India. Brazil presents the highest number of co-infection cases in South America, with 8.5% of the HIV-infected individuals in the country being co-infected with VL in 2012 [1]. Both diseases profoundly impair the immune mechanisms involved in the control of infections, which makes the outcomes of VL/HIV very poor. Compared to VL patients without HIV/AIDS, VL/HIV-co-infected patients show a less robust, slower clinical response to treatment and higher frequencies of drug toxicity, relapses and mortality [1-4].

The overall immunological reconstitution observed after highly active antiretroviral therapy (HAART) introduction, at least in countries where it is available, has reduced the incidence of opportunistic infections, including the incidence of *Leishmania*/HIV co-infection [5-8]. In addition to decreased virus-mediated immune activation, a marked increase in the CD4⁺ T cell counts probably also strengthens the effector mechanisms associated with parasite control [8,9]. Moreover, there is *in vitro* evidence that antiretrovirals, and particularly protease inhibitors (PIs), have an inhibitory effect on the evolutionary forms of *Leishmania (L.) infantum* [10,11]. This finding indicates another factor that could contribute to the decline of new VL cases among HIV-infected people receiving HAART [10-12].

Despite reducing new VL cases among HIV/AIDS patients, HAART does not prevent relapses [2,13,14], which still pose a challenge to clinical management. Parasite reactivation occurs even in patients with a good response to HAART, i.e., with an undetectable viral load and an increased CD4⁺ T cell count [15,16]. Early studies soon after the HAART era [17] did not show significant differences when these virological and immunological parameters were compared between relapsing and non-relapsing patients receiving HAART. This fact suggests that HAART does not prevent recurrences, especially in those individuals with previous VL episodes.

Co-infected patients receiving HAART, even after anti-*Leishmania* treatment, maintain a low CD4⁺ T cell count and higher levels of cellular activation despite viral suppression [16,18]. Considering that such pathogenic features are similar between VL and HIV, these results reinforce the concept that VL may contribute to worsening the immunosuppression induced by HIV infection, accelerating progression to AIDS. In addition, the quality of the *Leishmania*-specific immune response may remain impaired in *Leishmania*/HIV patients receiving HAART due to reduced T cell proliferative capacity and deficient interferon (IFN)- γ production [19,20]. Consequently, this deficient parasite control may favor the spread of *L. infantum* to unexpected sites and the appearance of atypical clinical features. In this scenario, amastigotes have been recovered from skin [20,21] and from gut-associated lymphoid tissue (GALT) [22,23].

There is strong evidence that chronic cellular activation is a crucial immunopathogenic mechanism not only in HIV infection but also in VL [24-27]. As a result, VL/HIV-co-infected patients present increased levels of activated CD38⁺CD8⁺ T lymphocytes [18] as well as elevated levels of pro-inflammatory cytokines [28,29]. Unexpectedly, this heightened cellular activation remains despite successful control of the viral and parasite loads [28] by HAART and anti-*Leishmania* therapy, respectively. Microbial translocation and even parasite persistence in the bone marrow or lymphoid organs have been identified as possible factors related to the maintenance of immune activation [28,30]. In this context, there is strong evidence that secondary anti-*Leishmania* prophylaxis helps to maintain the clinical remission of VL in HIV-infected patients [2,3,10,14]. We hypothesize that controlling the parasite load could contribute to the reduction of cellular activation during *Leishmania*/HIV co-

infection. In turn, this control could strengthen the effector immune response, diminishing the occurrence of relapses.

Another consequence of immune activation is accelerated and premature aging of the immune system [31–33], even in HIV-infected patients with viral load suppression [33]. This premature aging is characterized by an exhaustion of primary immune resources, decreased thymic output and an accumulation of terminally differentiated cells, similar to what occurs in healthy elderly subjects [34,35]. Thus, co-infected patients may experience acceleration of the degree of immunosenescence, providing an additional factor that decreases the effector immune response to *Leishmania* antigens and contributes to frequent relapses.

Previous results from our group have shown that VL/HIV/AIDS patients display high levels of cellular activation during both clinical remission of leishmaniasis and HAART [18]. However, it is crucial to determine whether and how secondary anti-*Leishmania* prophylaxis in patients receiving HAART can favor T cell immune reconstitution and reduce activation levels, which together can help to prevent further relapses.

The aim of this study was thus to determine the T cell activation and senescence profiles presented by VL/HIV-co-infected patients during 12 months of prospective follow-up while under viral and parasitological therapy in order to identify immunological parameters that can be used to predict VL relapse.

Methods

Study design and participants

Eighteen *Leishmania*/HIV-co-infected patients were recruited for a prospective cohort study carried out in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, from February 2011 to March 2013. The VL/HIV-co-infected patients were separated into two groups: those who had experienced only one VL episode throughout life (non-relapsing (NR) group) and those experiencing more than one VL episode, either previously or during the prospective follow-up (relapsing (R) group).

HIV-infected patients without a history of VL ($n = 16$) and healthy subjects without either infection ($n = 12$) were also included as controls.

The diagnosis of VL was confirmed by a parasitological exam of bone marrow aspirates from all patients. Clinical evaluation and an immune response panel test were performed before the VL treatment and every two months during treatment for one year. Approval for this study was obtained from the Ethical Review Board of Eduardo de Menezes Hospital—Hospital Foundation of the State of Minas Gerais and from Centro de Pesquisas René Rachou—Fundação Oswaldo Cruz. Patients with clinical symptoms and parasitological confirmation of active VL were included only after appropriate written informed consent was obtained. The first-line treatment for VL in the HIV-infected patients was intravenous amphotericin B deoxycholate for 4 weeks. After VL treatment, for all patients with $CD4^+$ T cell counts less than 350 cells/mm^3 , secondary prophylaxis with amphotericin B was offered every two weeks.

Immunological and virological assessments

Absolute T lymphocyte counts were determined using the BD Multitest monoclonal antibodies anti-CD45-PerCP, anti-CD3-FITC, anti-CD4-APC, and anti-CD8-PE (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions and as described previously by Santos-Oliveira et al. (2013) [28]. The counts were acquired using a FACSCalibur and were analyzed with Multiset software (BD¹). The results are expressed as the number of cells per cubic millimeter (cells/mm^3). The plasma HIV RNA levels were measured using real-time quantitative PCR (RT-PCR) (Abbott¹, Des Plaines, IL, USA) according to the manufacturer's

recommendations. The detection range was from 40 to 10,000,000 RNA copies/mL plasma. Assay results below 40 copies/mL are expressed as undetectable or below the detection limit.

Leishmania parasite load assessment

Total DNA was extracted from the peripheral blood of patients using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen¹ GmbH, Hilden, Germany). Two independent assays for the detection and quantification of *Leishmania* spp. and human DNA were performed using the StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies¹, Carlsbad, CA, USA) as described in a previous study [4]. For the *Leishmania* assay, TaqMan real-time PCR was performed using the small-subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene as the target DNA, as described by Wortmann et al. (2002) [36], according to the protocol described by Gomes and others (2012) [37]. Standard curves were prepared for each assay using known quantities of pCR-4 TOPO vector (Life Technologies¹) containing the cloned 120-bp human gene *ACTB* and the 67-bp *L. infantum* SSU rRNA fragment. The parasite load is expressed as the *Leishmania* DNA load (the relative copy number of the SSU rRNA fragment) normalized to the reference gene *ACTB*, as reported by Overbergh and others (1999) [38]. The *ACTB* copy numbers for the target samples were divided by the highest *ACTB* value obtained in the experiment to generate the correction factor used for the normalization.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and cytofluorometric assays

PBMCs were obtained as described elsewhere [18] and were used for cytofluorometric assays. The PBMCs were labeled with the following human monoclonal antibodies: anti-CD3-APC, anti-CD4-PerCP or anti-CD4-FITC and anti-CD8-APC or anti-CD8-FITC, anti-CD38-PE and anti-HLA-DR-PerCP, and anti-CD57-FITC and anti-CD27-PE. All antibodies were purchased from BD¹ Biosciences. At least 20,000 events in the lymphocyte gate were acquired on a FACSCalibur and were analyzed with CellQuest™ software (BD¹ Biosciences). The analysis region was first established by gating on the CD3⁺ T lymphocytes based on a forward scatter *versus* fluorescence dot plot. After that, the results were determined as the percentages of both activated T cells within the CD3⁺ T lymphocyte population (CD38⁺HLA-DR⁺CD4⁺ and CD38⁺HLA-DR⁺CD8⁺ T cells) (S1 Fig) and senescent T cells (CD57⁺CD27⁻CD4⁺ and CD57⁺CD27⁻CD8⁺ T cells) (S2 Fig).

Quantification of lipopolysaccharide (LPS) and soluble CD14 (sCD14)

The samples were diluted in endotoxin-free water, and LPS levels were quantified using a commercial assay kit (Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000; Cambrex¹, Milan, Italy). The results are expressed as picograms per milliliter (pg/mL), and the sensitivity level was 10 pg/mL. sCD14 levels were quantified by ELISA using the Human sCD14 Quantikine ELISA Kit (R&D¹ Systems, Minneapolis, MD, USA). The results are expressed as nanograms per milliliter (ng/mL), and the minimum detection limit was 125 pg/mL.

Anti-*Leishmania* immunoglobulin detection

An ELISA was performed as previously described by Fagundes-Silva et al. (2012), with certain modification [39]. Briefly, the only difference was the antigen, since *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) soluble promastigote (40 µg/mL) was used to coat a polystyrene flat-bottom microtiter plate (Nunc-Immuno, Roskilde, Denmark). In this assay, diluted peroxidase-conjugated mouse monoclonal anti-human immunoglobulin G (IgG) (1:1000) (Invitrogen, San

Francisco, CA, USA) and diluted monoclonal anti-human IgG1 (1:200) and IgG3 (1:400) (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) were used. The absorbance was measured with a Benchmark microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) at 492 nm and is expressed as an ELISA index (EI).

Statistical analyses

Continuous variables are expressed as medians and interquartile ranges (IQRs). Comparisons were performed using unpaired Student's t-tests for normally distributed variables and Wilcoxon tests for paired variables with skewed distributions. Spearman's test was used for correlation analysis, and a chi-square test was used to compare categorical variables. The statistical analyses were performed using SPSS¹ version 16 and GraphPad Prism software (version 5.0, San Diego, CA, USA). A paired test (Kruskal-Wallis test) was used because the same patients are observed when evaluating data prospectively. Differences were considered statistically significant when the p value was <0.05.

Results

Clinical characteristics and evolutionary course of VL/HIV patients

The demographic characteristics and clinical evolution of all patients studied are shown in [Table 1](#). The mean patient age was 37.5±0.7 years. Fourteen patients were men (78%), and half of all patients (nine patients) had already experienced a prior VL episode. In 15 patients, HIV infection had been diagnosed before the diagnosis of primary VL, and most of the patients (14 patients) had already been treated with HAART. However, out of ten patients using HAART for more than 3 months, only 7 were taking their medications on a regular basis.

Patients with more than one VL episode (R group, n = 12) had lower normalization rates for clinical and laboratory parameters at 3 months after treatment (p = 0.02), a lower *Leishmania* clearance rate after anti-*Leishmania* treatment (p = 0.01) and a lower CD4⁺ T lymphocyte count at the 12-month follow-up in comparison to those who had experienced only one VL episode (NR group, n = 6). In contrast, no difference was observed between the R and NR groups in terms of the proportion of patients who had used protease inhibitors or who had presented other opportunistic infections in the past.

Additionally, R patients had a different immunological profile in terms of cellular activation compared to NR patients at the 12-month follow-up. Interestingly, possibly related to these differences, we observed a longer time between the HIV and VL diagnoses in the R group than in the NR group (median: 51 versus 5 months, p = 0.05). Similarly, HIV infection had been diagnosed longer before VL infection in the R group than in the NR group (median: 103 (95% CI 29.5–141) versus 5 (95% CI 3.5–21.25) months, p = 0.007) ([Table 1](#)).

The occurrence of several episodes of VL impairs the degree of immune reconstitution in VL/HIV patients, independent of the virological and parasitological loads

All co-infected patients had low CD4⁺ T cell numbers during the active phase (median: 98 cells/mm³; IQR: 63–159 cells/mm³) compared to HIV-mono-infected patients (median: 377 cells/mm³; IQR: 222–450 cells/mm³) ([Fig 1A](#)). In a prospective evaluation, most of the patients continued to have counts less than 350 CD4⁺ T cells/mm³, which was the criterion used for the introduction and maintenance of secondary prophylaxis in this study. However, the VL/HIV-NR group had a significant gain of CD4⁺ T cells at the prospective follow-up six months

Table 1. Clinical evolution and demographic characteristics of visceral leishmaniasis/HIV (VL/HIV)-co-infected patients.

Patients' initials	Age, sex	Time since HIV infection diagnosis (months)	HAART use before first VL episode	Time between HIV and VL diagnoses (months)	Time since the first VL infection diagnosis (months)	Previous VL (number of episodes)	VL treatment	Secondary prophylaxis	Total follow-up time in the study	Clinical follow-up
GBS (HLV01)	53 years, male	4	No	4	NA	No	Amphotericin B deoxycholate for 20 days	Amphotericin B deoxycholate biweekly for two months (until CD4 count recovery)	12 months	No VL relapse
WLA (HLV03)	38 years, male	179	Yes	179	NA	No	Amphotericin B deoxycholate for 3 days, followed by liposomal amphotericin 20 mg/kg total dose	Patient abandoned follow-up and received no prophylaxis	6 months (death)	VL relapse at 6-month follow-up and death
JRO (HLV05)	25 years, female	78	No	49	29	Yes (1)	Liposomal amphotericin 20 mg/kg total dose	Irregular use of prophylaxis	12 months	No VL relapse
MF (HLV06)	51 years, male	4	No	4	NA	No	Amphotericin B deoxycholate for 20 days	Amphotericin B deoxycholate biweekly for 20 months (patient requested suspension of prophylaxis when CD4 count stabilized at approximately 200 cells/mm ³)	12 months	No VL relapse
APS (HLV07)	33 years, female	20	Yes	20	NA	No	Amphotericin B deoxycholate for 20 days	Amphotericin B deoxycholate biweekly for 12 months (patient requested suspension of prophylaxis when CD4 count stabilized at approximately 250 cells/mm ³)	12 months	No VL relapse
RAS (HLV09)	39 years, male	41	Yes	21	19	Yes (1)	Liposomal amphotericin 20 mg/kg total dose	Liposomal amphotericin biweekly on regular basis	12 months	VL relapse at 4- and 12-month follow-up
LPO (HLV010)	35 years, male	27	Yes	17	9	Yes (1)	Liposomal amphotericin 20 mg/kg total dose	Amphotericin B deoxycholate biweekly for 7 months (until CD4 count recovery)	12 months	No VL relapse
CMS (HLV012)	40 years, male	134	No	52	82	Yes (4)	Liposomal amphotericin 20 mg/kg total dose	Liposomal amphotericin biweekly on regular basis	6 months (death)	VL relapse at 6-month follow-up and death
CMRR (HLV013)	37 years, female	5	No	5	NA	No	Amphotericin B deoxycholate for 5 days, followed by liposomal amphotericin 20 mg/kg total dose	Amphotericin B deoxycholate biweekly for 10 months (patient requested suspension of prophylaxis when CD4 count stabilized at approximately 200 cells/mm ³)	12 months	No VL relapse
PJS (HLV016)	41 years, male	31	Yes	31	NA	No	Amphotericin B deoxycholate for 20 days	Amphotericin B deoxycholate biweekly for 4 months (until CD4 count recovery)	12 months	No VL relapse

(Continued)

Table 1. (Continued)

Patients' initials	Age, sex	Time since HIV infection diagnosis (months)	HAART use before first VL episode	Time between HIV and VL diagnoses (months)	Time since the first VL infection diagnosis (months)	Previous VL (number of episodes)	VL treatment	Secondary prophylaxis	Total follow-up time in the study	Clinical follow-up
WMC (HLV017)	38 years, male	14	Yes	14	NA	No	Amphotericin B deoxycholate for 20 days	Irregular use of prophylaxis (amphotericin B deoxycholate biweekly), with use for 18 months (until CD4 count recovery)	12 months	VL relapse at 4-, 6- and 12-month follow-up
PRP (HLV019)	45 years, male	69	Yes	69	NA	No	Amphotericin B deoxycholate for 20 days	Irregular use of prophylaxis (amphotericin B deoxycholate biweekly), with use for 13 months (until CD4 count recovery)	12 months	VL relapse at 8-month follow-up
JTS (HLV021)	45 years, male	139	Yes	113	25	Yes (4)	Liposomal amphotericin 20 mg/kg total dose	Irregular use of prophylaxis (amphotericin B deoxycholate biweekly)	12 months	VL relapse at 2-, 8- and 12-month follow-up
VPGS (HLV022)	21 years, male	25	No	1	24	Yes (1)	Liposomal amphotericin 20 mg/kg total dose	Amphotericin B deoxycholate biweekly for 13 months (until CD4 count recovery)	12 months	VL relapse at 6-month follow-up
AMP (HLV023)	39 years, male	239	Yes	117	121	Yes (7)	Liposomal amphotericin 20 mg/kg total dose	Liposomal amphotericin weekly on regular basis	12 months	VL relapse at 6- and 12-month follow-up
AMGN (HLV024)	37 years, female	155	Yes	107	47	Yes (1)	Amphotericin B deoxycholate for 20 days	Irregular use of amphotericin B deoxycholate biweekly for 4 months	4 months (lost to follow-up)	No VL relapse during short follow-up
DCLS (HLV025)	30 years, male	2	No	2	NA	No	Amphotericin B deoxycholate for 25 days	Amphotericin B deoxycholate biweekly for 13 months (until CD4 count recovery)	12 months	No VL relapse
ACL (HLV026)	52 years, male	128	No	0	128	Yes (2)	Liposomal amphotericin 20 mg/kg total dose	Amphotericin B deoxycholate biweekly for 8 months (until CD4 count recovery)	12 months	No VL relapse

NA: not applicable

doi:10.1371/journal.pone.0167512.t001

post-treatment (mpt) (m p<0.05) compared to the VL/HIV-R group (Fig 1B), who maintained the same values as those observed in the active phase of the disease (Fig 1B).

The HIV viral load did not seem to be related to CD4⁺ T cell depletion because it was low or undetectable in 12 of 18 co-infected patients already in the active phase of VL, regardless of whether they belonged to the NR or R group (S1 Table). Similarly, recurrences occurred independently of the viral load because certain patients maintained undetectable HIV RNA copy numbers at the moment of relapse as well as at the end of the 12-month follow-up period (n = 4, S1 Table). Moreover, VL/HIV-NR patients had undetectable parasite loads soon after

anti-*Leishmania* treatment. In all of these patients except for one, the undetectable levels were maintained up to the 12-month follow-up. In relation to VL/HIV-R patients, 5 of the 9 evaluated patients still had detectable parasite burdens in the periods 12 months subsequent to treatment (S1 Table), suggesting that parasite persistence at the end of treatment may indicate an increased risk of future relapses.

The degree of immune activation in VL/HIV patients seems to be related to the occurrence of VL episodes

In a previous transversal study of VL/HIV patients [18,28], a multivariate analysis indicated that “leishmaniasis disease,” but not parasite load, and microbial translocation were the two main risk factors associated with the activation status.

In the present study, the percentages of activated T lymphocytes were comparable between the VL/HIV-NR and VL/HIV-R groups in the early stages of the follow-up. As expected, CD8⁺ T lymphocytes (Fig 2B) displayed higher activation levels than CD4⁺ T cells (Fig 2A). The CD8⁺ T and CD4⁺ T cells of VL/HIV-NR patients had lower levels of activation by the end of

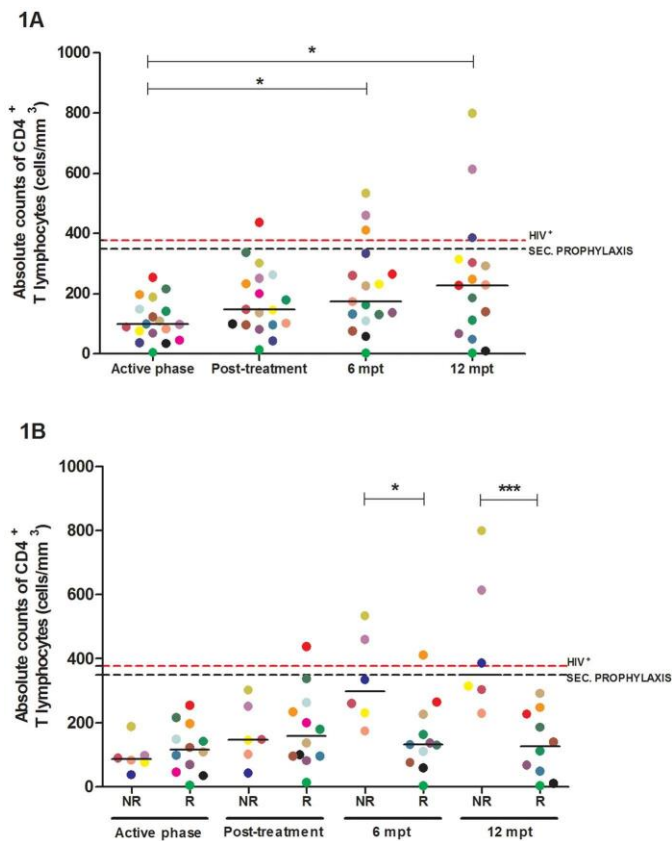


Fig 1. Immune constitution of visceral leishmaniasis/HIV (VL/HIV)-co-infected patients. Absolute counts of CD4⁺ T lymphocytes during the prospective follow-up of co-infected patients (A) and after patient allocation into a non-relapsing (NR) group, encompassing those with a single episode of VL, and a relapsing (R) group, encompassing those with disease relapse during the follow-up or even before being enrolled in the study (B). The black dashed line represents the recommended limit for the establishment of secondary prophylaxis (350 cells/mm³). The red dashed line is the median value of the CD4⁺ T cell counts of the HIV-positive controls (377 cells/mm³). Each symbol represents one patient, and the color refers to the same patient at different stages of follow-up. The horizontal bars represent the median values. 6 mpt: six months post-treatment; 12 mpt: 12 months post-treatment. Asterisks denote a statistically significant difference between the phases of follow-up or between the NR and R groups, *p<0.05; ***p<0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0167512.g001

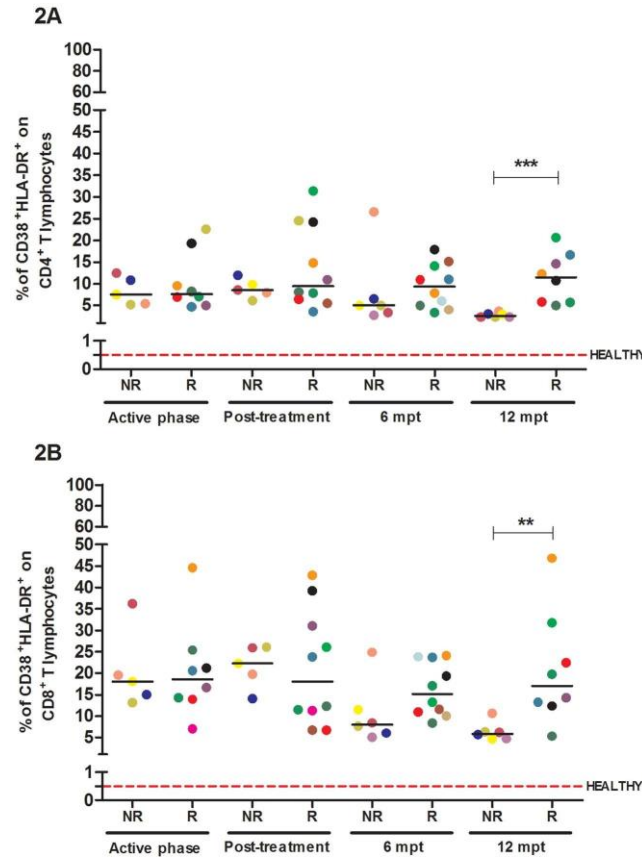


Fig 2. Activation levels of T lymphocyte subpopulations in visceral leishmaniasis/HIV (VL/HIV)-co-infected patients. Percentages of activated CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T lymphocytes in relapsing (R) and non-relapsing (NR) co-infected patients. The red dashed line represents the median levels of activated CD4⁺ T and CD8⁺ T cells in healthy controls (median: 0.5%, interquartile ranges: 0.15–1.77% and 0.23–5.92%, respectively). Each symbol represents one patient, and the color refers to the same patient at different stages of follow-up. The horizontal bars represent the median values. 6 mpt: 6 months post-treatment; 12 mpt: 12 months post-treatment. Asterisks denote a statistically significant difference between the NR and R groups, **p<0.01; ***p<0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0167512.g002

the clinical follow-up period (p<0.05). At the sixth month, the VL/HIV-NR group showed a trend towards decreased activation levels, but a significant reduction was observed at 12 mpt in this group compared to the VL/HIV-R group (^{mm}p<0.01).

Furthermore, the R group had higher sCD14 levels compared to the NR group during all phases of follow-up, and this difference was already significant immediately post-treatment (^mp<0.05) (Fig 3A). As expected, the sCD14 levels were positively correlated with the LPS levels in all phases of evaluation (p<0.001; r = 0.42) (Fig 3C). Additionally, a significant negative correlation was observed for the absolute CD4⁺ T cell counts (Fig 3B). A high degree of innate activation is also related to immune impairment because the release of sCD14 is dependent on LPS-mediated macrophage activation.

Reduction of anti-*Leishmania* IgG3 levels is a predictor of the maintenance of clinical remission in VL/HIV patients

Similarly, to how the T cell activation levels and macrophage activation status were evaluated, the latter based on sCD14 levels, B lymphocyte activation was evaluated by quantitation of the

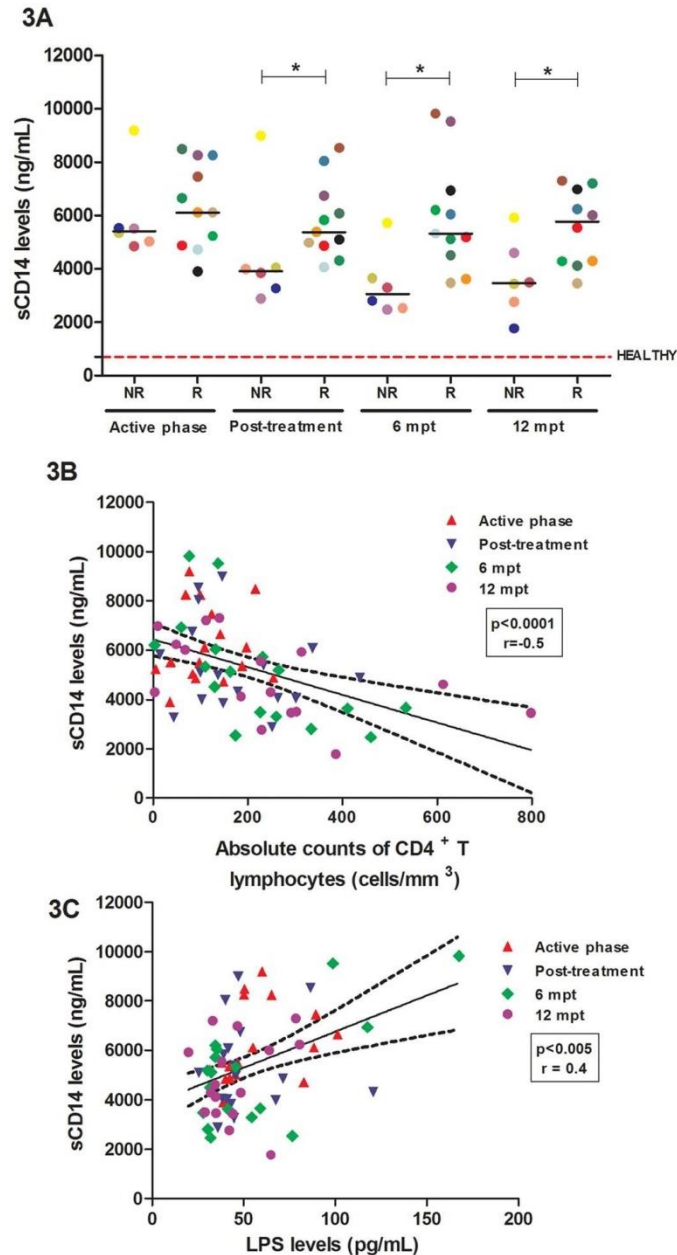


Fig 3. Relationship between plasma factors related to microbial translocation and the immune status of visceral leishmaniasis/HIV (VL/HIV)-co-infected patients. Plasma soluble CD14 (sCD14) level assessment in the relapsing (R) and non-relapsing (NR) groups during all the follow-up visits (A). Negative correlation between sCD14 levels and the absolute counts of CD4⁺ T lymphocytes (B) in co-infected patients (Spearman correlation, $p < 0.0005$; $r = -0.5$). Positive correlation between sCD14 levels and LPS levels (C) in co-infected patients (Spearman correlation, $p < 0.001$; $r = 0.4$). The red dashed line represents the median value of the sCD14 levels (median: 699 ng/mL; interquartile range: 155–1525 ng/mL). Each symbol represents one patient, and the color refers to the same patient at different stages of follow-up. The horizontal bars represent the median values. 6 mpt: 6 months post-treatment; 12 mpt: 12 months post-treatment. Asterisks denote a statistically significant difference between the NR and R groups, $*p < 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0167512.g003

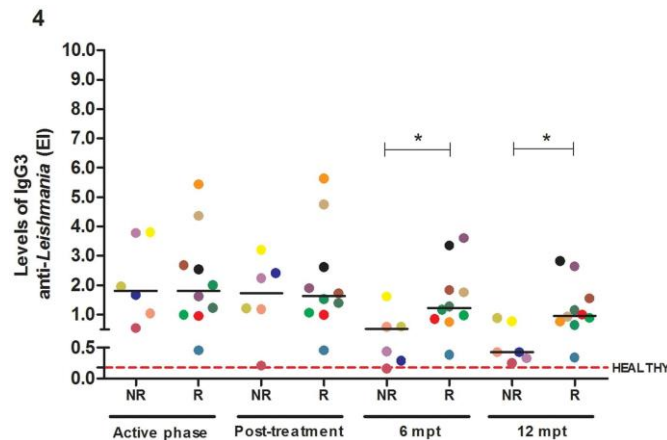


Fig 4. Titers of the anti-*Leishmania infantum* immunoglobulin G3 (IgG3) isotype in visceral leishmaniasis/HIV (VL/HIV)-co-infected patients. IgG3 levels in the relapsing (R) and non-relapsing (NR) groups during the entire follow-up. The red dashed line represents the median value of the IgG3 levels in healthy controls (median: 0.18; interquartile range: 0.1–0.3). Each symbol represents one patient, and the color refers to the same patient at different stages of follow-up. The horizontal bars represent the median values. 6 mpt: 6 months post-treatment; 12 mpt: 12 months post-treatment. Asterisks denote a statistically significant difference between the NR and R groups, * $p < 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0167512.g004

levels of anti-*Leishmania* IgG and its subclasses (IgG1 and IgG3). The VL/HIV-R group presented high levels of anti-*Leishmania* IgG and IgG1 compared to the VL/HIV-NR group throughout the study (S3 Fig). In contrast, the anti-*Leishmania* IgG3 levels were similarly elevated in the two groups in the early stages of follow-up but significantly decreased in the NR group in comparison to the R group at six and 12 mpt ($p < 0.05$) (Fig 4).

Immunosenescence levels in VL/HIV patients are elevated independently of frequent episodes of VL relapses

The CD57⁺CD27⁻ phenotype is found among senescent CD8⁺ and CD4⁺ T cells. In general, the co-infected patients presented higher percentages of senescent CD8⁺ T lymphocytes during all phases of follow-up. These values were higher than those observed in healthy controls of the same age (median: 4.2%; IQR: 2.6–10.1%), with a trend towards an increase by the end of follow-up (Fig 5B). Despite the lower percentages, the same result was observed in the subpopulation of senescent CD4⁺ T lymphocytes (Fig 5A). However, the percentages of senescent T lymphocytes were elevated in both the VL/HIV-NR and the VL/HIV-R groups, without any difference between them [data not shown].

These results suggest that VL/HIV patients who had experienced multiple VL relapses previously or during the clinical follow-up showed different immunological parameters compared to those who had experienced a single episode of active disease, even though both groups had controlled viral loads and received secondary prophylaxis.

Discussion

Earlier cross-sectional studies identified *Leishmania* infection as a cofactor for heightening the activation status in HIV patients, independent of the viral or parasite load [18,28]. The present study confirmed that co-infected patients with active VL (NR or R group) have low CD4⁺ T cell counts, high levels of cellular activation and microbial translocation and elevated parasitemia. In contrast to a previous study, which evaluated a single parameter [30], herein, the

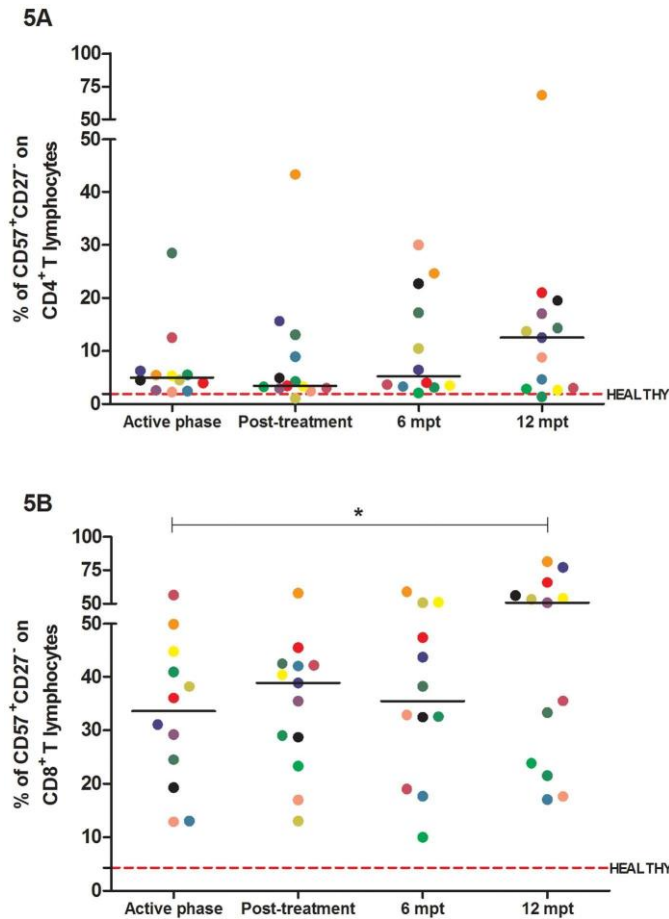


Fig 5. Immunosenescence levels in visceral leishmaniasis/HIV (VL/HIV)-co-infected patients. Percentages of senescent CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T cells in co-infected patients during the prospective follow-up of co-infected patients. The red dashed line represents the median value of the percentage of senescent CD8⁺ T cells in healthy controls (medians: 1.8% and 4.2%; interquartile ranges: 0.3–4.0% and 2.6–10.1%, respectively). Each symbol represents one patient, and the color refers to the same patient at different stages of follow up. The horizontal bars represent the median values. 6 mpt: 6 months post-treatment; 12 mpt: 12 months post-treatment.

doi:10.1371/journal.pone.0167512.g005

patient’s prior history of VL, the current immunological state of the patient at each visit and the final outcome of therapy during secondary prophylaxis were all taken into account.

Recognition of the rationale underlying the frequent episodes of VL in the R patients is fundamental to designing preventive strategies. Our group has previously reported that diminished levels of cellular activation were stably maintained in a co-infected patient during the remission phase over a 12-month prospective follow-up period [20]. However, reactivation episodes were again marked by increased activation along with progressively lower levels of specific IFN- γ in response to parasite antigens [20]. Herein, a positive correlation between the number of relapses and the degree of cellular activation was observed in co-infected patients ($p < 0.05$ and $r = 0.80$, data not shown). These results suggest that repeated VL relapses may worsen the effector immune response and consequently its ability to control parasites, resulting in a vicious cycle. These data reinforce the importance of epidemiological surveillance as well as the early diagnosis and treatment of VL.

The similarity in the impairment of immunological parameters between the NR and R groups at the beginning of follow-up indicates that the parasite antigens released during active disease were equally present in these groups, despite different clinical outcomes. In addition, longer exposure to HIV infection and a longer period between HIV diagnosis and the first active VL episode, as observed in the R group in comparison to the NR group, seem to be crucial factors that predispose patients to VL recurrence. The longer exposure could be related to the maintenance of high levels of activation, with consequent ongoing immune suppression and recurrence of disease.

Herein, the NR group displayed a significant decrease in the degree of activation at 6 and 12 mpt. This change could not have been due only to the control of *Leishmania* infection because the R group also had a reduced parasite load after anti-*Leishmania* treatment and secondary prophylaxis over 12 months. Despite this reduction, only four of the 11 co-infected patients in the R group still had low but detectable *Leishmania* kDNA copy numbers in the peripheral blood at the end of follow-up. This observation reinforces the concept that a continuous low level of *Leishmania* parasitemia can occur in treated patients despite an adequate clinical response to specific therapy. This phenomenon can lead to a clinical condition characterized by alternating asymptomatic and symptomatic states [6,7]. Moreover, considering that parasite control did not prevent VL relapse in the R group, it is reasonable to propose that other factors could contribute to the maintenance of high levels of activation in this group.

Persistent activation in HIV infection as well as in VL/HIV co-infection has been associated with microbial translocation from the intestinal lumen into the bloodstream [24,27,28,40,41]. In the current study, VL/HIV-R patients showed higher levels of sCD14, which were positively correlated with the elevated levels of plasma LPS, suggesting that sCD14 is biologically active. The activation of monocytes/macrophages via sCD14 levels contributed not only to the heightened degree of systemic activation through cytokine release but also to the impairment of immune reconstitution because sCD14 levels were negatively correlated with CD4⁺ T cell counts. These data indicate that microbial translocation is an additional factor contributing to frequent VL relapses in patients with HIV infection because only VL/HIV-R patients maintained persistent high levels of sCD14 and LPS after viral and parasite control was achieved.

Considering that the sCD14 levels were positively correlated with the parasite load [data not shown], further studies will be necessary to elucidate whether *L. infantum* infection can also affect the gut-associated lymphoid tissue (GALT) [42,43]. It is currently believed that the role of *L. infantum* is likely indirect because, similar to what has been described for HIV [24,44], this parasite can also be involved in some damage to the gut-associated lymphoid tissue (GALT) [42-43]. Thus, both pathogens can contribute to increased intestinal permeability and consequent microbial translocation, which in turn can maintain the activation status in co-infected patients. Early results from our group showed that LPS levels were augmented in VL patients only during the active phase of disease [25].

In this scenario, the clinical condition of VL/HIV patients can be aggravated by the consequences of immune activation, referred to as accelerated aging of the immune system.

Herein, it was hypothesized that the increased levels of chronic activation in VL/HIV co-infection could play a crucial role in promoting the rapid decline of immune system competence, making immunosenescence an additional factor that contributes to the recurrence of VL in HIV-infected patients. In fact, co-infected patients had high percentages of senescent CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, which reflects chronic immune activation that does not change despite the use of HAART and maintenance of anti-*Leishmania* treatment. This result is consistent with what has been observed in VL/HIV patients from the Mediterranean basin [30]. Our data confirm this finding through a prospective study design and in patients

presenting two distinct clinical outcomes: relapse or no relapse. However, the degree of senescence did not differ between the VL/HIV-R and VL/HIV-NR groups, suggesting that the quantitative accumulation of terminally differentiated cells is not the only important factor. Indeed, immunosenescence includes a lower capacity to respond to new antigens and an exhaustion of primary resources, which can lead to loss of viral load control and progression towards HIV disease [34,35]. Considering that the CD4⁺ T cell count was negatively correlated with cellular activation and that activation is the primary cause of immunosenescence [data not shown], there are two possible explanations for the deficient T cell reconstitution: 1) a deficit in T lymphocyte function due to the impairment of proliferative capacity and cytokine production following parasite or viral antigen-related stimulation and 2) decreased thymic output or a failure to mobilize peripheral T cell compartments. Because the absence of absolute recovery of CD4⁺ T cells after primary VL is an important predictor of relapse in patients infected with HIV [2], ongoing studies in this cohort of patients will address these possibilities.

In addition to the involvement of T lymphocytes in co-infection pathogenesis, a high degree of B cell activation may be inferred because elevated levels of anti-*Leishmania* IgG were observed, particularly in VL/HIV-R patients. Interestingly, the IgG3 levels decreased among NR patients after VL treatment and remained decreased until the end of follow-up, very similar to what was observed for the CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte activation levels. This result corroborates what has been described in the tegumentary form of leishmaniasis [39], suggesting IgG3 as a possible clinical remission marker for VL that deserves more attention.

In conclusion, our main finding is the observation that HIV-infected patients with recurrent VL have a different immunological profile compared to VL/HIV patients with only one lifelong VL episode, even when they receive the same medications for viral load control and anti-*Leishmania* prophylactic therapy. Although the activation levels were significantly different between the R and NR groups, it was not possible to demonstrate that the differences in the clinical outcomes arise from the process of immunological aging, which may have been due to an insufficiently long follow-up period or the influence of other markers not included in this analysis. Additionally, the quality of the specific effector immune response may be directly related to the different clinical behaviors observed in this study.

Finally, chronically activated immune systems were observed in the patients, even when under secondary anti-*Leishmania* prophylaxis, suggesting that other factors may be associated with the maintenance of an inefficient, hyperactive immune state, including microbial translocation or T cell compartment exhaustion. These findings help to improve our understanding of the mechanisms underlying relapses and reinforce how important early diagnosis and treatment are in reducing immune suppression. Future studies will be important to demonstrate the applicability of these results in the clinical management of these patients in terms of predicting their clinical prognosis as well as deciding whether to prescribe secondary prophylaxis.

Supporting Information

S1 Fig. Gating strategy for evaluating the degree of cellular activation of T lymphocytes in visceral leishmaniasis/HIV (VL/HIV)-co-infected patients. The population of CD3⁺ T lymphocytes (region 2) in the region bounded as total lymphocytes (region 1) was defined. Then, the respective lymphocyte subpopulations, namely, CD4⁺ T and CD8⁺ T cells (regions 3 and 4, respectively) in the CD3⁺ T cell gate were defined. Finally, the coexpression of the HLA-DR and CD38 molecules on CD4⁺ and CD8⁺ T cells was determined from an analysis of the dot plots. The figure shows a representative profile of a non-relapsing patient with VL/HIV. (TIF)

S2 Fig. Gating strategy for evaluating the degree of cellular senescence of T lymphocytes in visceral leishmaniasis/HIV (VL/HIV)-co-infected patients. The population of CD3⁺ T lymphocytes (region 2) in the region bounded as total lymphocytes (region 1) was defined. Then, the respective lymphocyte subpopulations, namely, CD4⁺ T and CD8⁺ T cells (regions 3 and 4, respectively) in the CD3⁺ T cell gate were defined. Finally, the coexpression of the CD57 and CD27 molecules on CD4⁺ and CD8⁺ T cells was determined from an analysis of the dot plots. The figure shows a representative profile of a non-relapsing patient with VL/HIV.
(TIF)

S3 Fig. Titers of anti-*Leishmania infantum* immunoglobulin G (IgG) and the IgG1 isotype in visceral leishmaniasis/HIV (VL/HIV)-co-infected patients. IgG and IgG1 levels in the relapsing (R) and non-relapsing (NR) groups during the entire follow-up. The red dashed line represents the median values of the IgG and IgG1 levels in healthy controls (medians: 0.85 and 0.19; interquartile ranges: 0.5–1.1 and 0.08–0.55, respectively). Each symbol represents one patient, and the color refers to the same patient at different stages of follow up. The horizontal bars represent the median values. 6 mpt: 6 months post-treatment; 12 mpt: 12 months post-treatment.
(TIF)

S1 Table. Copies per mL numbers for viral RNA and kDNA of *Leishmania (L.) infantum* presented by visceral leishmaniasis/HIV (VL/HIV) co-infected patients.
(DOC)

Acknowledgments

We would like to thank Elaine Marques, MSc, for help with the processing of the patient samples. We also acknowledge the participation of all the patients and healthy individuals enrolled in this study.

Author Contributions

Conceptualization: JRSO AMDC GFC

AR. **Formal analysis:** MLSF GFC

JRSO. **Funding acquisition:** AR

AMDC. **Investigation:** MLSF GFC

JRSO. **Methodology:** MLSF TSMA

JRSO.

Project administration: GFC JRSO AR AMDC.

Resources: GFC CGG AR AMDC.

Supervision: GFC JRSO AR AMDC.

Validation: CGG AR AMDC.

Visualization: MLSF GFC JRSO.

Writing – original draft: MLSF GFC JRSO.

Writing – review & editing: CGG AR AMDC.

References

1. Lindoso JA, Cota GF, da Cruz AM, Goto H, Maia-Elkhoury ANS, Romero GAS, et al. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(9):e3136. doi: [10.1371/journal.pntd.0003136](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003136) PMID: [25233461](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25233461/)
2. Cota GF, de Sousa MR, Rabello A, et al. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in hiv-infected patients: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(6):1–8.
3. Cota GF, de Sousa MR, Fereguetti TO, Rabello A. Efficacy of Anti-Leishmania Therapy in Visceral Leishmaniasis among HIV Infected Patients: A Systematic Review with Indirect Comparison. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(5):e1153.
4. Cota GF, de Sousa MR, de Freitas Nogueira BM, Gomes LI, Oliveira E, Assis TSM, et al. Comparison of Parasitological, Serological, and Molecular Tests for Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected Patients: A Cross-Sectional Delayed-Type Study. *Am J Trop Med Hyg*. 2013; 89(3):570–7. doi: [10.4269/ajtmh.13-0239](https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0239) PMID: [23836568](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23836568/)
5. De la Rosa R, Pineda J a, Delgado J, Macias J, Morillas F, Martin-Sanchez J, et al. Influence of highly active antiretroviral therapy on the outcome of subclinical visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis*. 2001; 32(4):633–5. doi: [10.1086/318708](https://doi.org/10.1086/318708) PMID: [11181128](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11181128/)
6. Del Giudice P, Mary-Krause M, Pradier C, Grabar S, Dellamonica P, Marty P, et al. Impact of highly active antiretroviral therapy on the incidence of visceral leishmaniasis in a French cohort of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis*. 2002; 186(9):1366–70. doi: [10.1086/344325](https://doi.org/10.1086/344325) PMID: [12402211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12402211/)
7. Cruz I, Nieto J, Moreno J, Canavate C, Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res*.; 2006; 123(3):357–88. PMID: [16778317](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16778317/)
8. Alvar J, Aparicio P, Aseffa a., Den Boer M, Canavate C, Dedet J-P, et al. The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. *Clin Microbiol Rev*. 2008; 21(2):334–59. doi: [10.1128/CMR.00061-07](https://doi.org/10.1128/CMR.00061-07) PMID: [18400800](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18400800/)
9. Okwor I, Uzonna JE. The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. *Immunol Res*. 2013; 56(1):163–71. doi: [10.1007/s12026-013-8389-8](https://doi.org/10.1007/s12026-013-8389-8) PMID: [23504228](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23504228/)
10. Monge-Maillo B, Norman FF, Cruz I, Alvar J, López-Vélez R. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in the Mediterranean Region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(8):e3021. doi: [10.1371/journal.pntd.0003021](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003021) PMID: [25144380](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25144380/)
11. Demarchi IG, Silveira TG V, Ferreira ICP, Lonardon MVC. Effect of HIV protease inhibitors on New World *Leishmania*. *Parasitol Int*.; 2012; 61: 538–44. doi: [10.1016/j.parint.2012.04.006](https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.04.006) PMID: [22579524](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22579524/)
12. Santos LO, Vitorio BS, Branquinha MH, Pedroso e Silva CM, Santos a. LS, d'Avila-Levy CM. Nelfinavir is effective in inhibiting the multiplication and aspartic peptidase activity of *Leishmania* species, including strains obtained from HIV-positive patients. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68: 348–353. doi: [10.1093/jac/dks410](https://doi.org/10.1093/jac/dks410) PMID: [23109184](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23109184/)
13. Cota GF, de Sousa MR, de Mendonça ALP, Patrocínio A, Assunção LS, de Faria SR, et al. *Leishmania*-HIV Co-infection: Clinical Presentation and Outcomes in an Urban Area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(4):2–8.
14. Alemayehu M, Wubshet M, Mesfin N. Magnitude of visceral leishmaniasis and poor treatment outcome among HIV patients: metaanalysis and systematic review. *HIV/AIDS—Res Palliat Care*. 2016; 8: 75–81.
15. Casado JL, Lopez-Velez R, Pintado V, Quereda C, Antela A, Moreno S. Relapsing visceral leishmaniasis in HIV-infected patients undergoing successful protease inhibitor therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.; 2001; 20(3):202–5. PMID: [11347673](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11347673/)
16. Alexandrino-de-Oliveira P, Santos-Oliveira JR, Dorval MEC, da Costa FCB, Pereira GROL, da Cunha R V, et al. HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in Central-west Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105(5):692–7. PMID: [20835619](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20835619/)
17. Villanueva JL, Alarcón a, Bernabeu-Wittel M, Cordero E, Prados D, Regordán C, et al. Prospective evaluation and follow-up of European patients with visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000; 19(10):798–801. PMID: [11117648](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11117648/)
18. Santos-Oliveira JR, Giacoia-Gripp CBW, Alexandrino de Oliveira P, Amato VS, Lindoso JÂL, Goto H, et al. High levels of T lymphocyte activation in *Leishmania*-HIV co-infected individuals despite low HIV viral load. *BMC Infect Dis*. 2010; 10(1):358.
19. Da-Cruz AM, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho Z, Machado ES, Coutinho SG. Cellular immune responses to *Leishmania braziliensis* in patients with AIDS-associated American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000; 94(5):569–71. PMID: [11132391](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11132391/)

20. Santos-Oliveira JR, Da-Cruz AM, Pires LHS, Cupolillo E, Kuhls K, Giacoia-Gripp CBW, et al. Case report: Atypical lesions as a sign of cutaneous dissemination of visceral leishmaniasis in a human immunodeficiency virus-positive patient simultaneously infected by two viscerotropic *Leishmania* species. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 85(1):55–9.
21. Zijlstra EE. PKDL and Other Dermal Lesions in HIV Co-infected Patients with Leishmaniasis: Review of Clinical Presentation in Relation to Immune Responses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(11):e3258. doi: [10.1371/journal.pntd.0003258](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003258) PMID: [25412435](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25412435/)
22. Gómez Senent S, Adan Merino L, Mora Sanz P. Kala azar con afectación gástrica. *Gastroenterol Hepatol*. 2009; 32(3):176–7. doi: [10.1016/j.gastrohep.2008.09.021](https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2008.09.021) PMID: [19233514](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19233514/)
23. Luz KG, Tuon FF, Irma M, Duarte S, Maia GM, Matos P, et al. Cytokine expression in the duodenal mucosa of patients with visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010; 43(4):393–5. PMID: [20802937](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20802937/)
24. Brenchley JM, Price D a, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006; 12(12):1365–71. doi: [10.1038/nm1511](https://doi.org/10.1038/nm1511) PMID: [17115046](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17115046/)
25. Santos-Oliveira JR, Regis EG, Leal CRB, Cunha R V., Bozza PT, Da-Cruz AM. Evidence that lipopolysaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(7):e1198. doi: [10.1371/journal.pntd.0001198](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001198) PMID: [21765960](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21765960/)
26. Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA., Prata a., Silva LD A., Rabello A., Teixeira-Carvalho A., et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon- and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor- α ⁺ monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania* chag. *Clin Exp Immunol*. 2006; 146(1):124–32. doi: [10.1111/j.1365-2249.2006.03171.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03171.x) PMID: [16968407](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16968407/)
27. Klatt NR, Funderburg NT, Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends Microbiol*. 2013; 21(1):6–13. doi: [10.1016/j.tim.2012.09.001](https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.09.001) PMID: [23062765](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23062765/)
28. Santos-Oliveira JR, Regis EG, Giacoia-Gripp CBW, Valverde JG, Alexandrino-De-Oliveira P, Lindoso JÁL, et al. Microbial translocation induces an intense proinflammatory response in patients with visceral leishmaniasis and HIV type 1 coinfection. *J Infect Dis*. 2013; 208:57–66. doi: [10.1093/infdis/jit135](https://doi.org/10.1093/infdis/jit135) PMID: [23539743](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23539743/)
29. Medrano FJ, Rey C, Leal M, Cañavate C, Rubio a., Sánchez-Quijano a., et al. Dynamics of serum cytokines in patients with visceral leishmaniasis and HIV co-infection. *Clin Exp Immunol*. 1998; 114(3):403–7. doi: [10.1046/j.1365-2249.1998.00733.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1998.00733.x) PMID: [9844050](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9844050/)
30. Casado JL, Abad-Fernández M, Moreno S, Pérez-Elías MJ, Moreno a, Bernardino JI, et al. Visceral leishmaniasis as an independent cause of high immune activation, T-cell senescence, and lack of immune recovery in virologically suppressed HIV-coinfected patients. *HIV Med*. 2015; 16(4):240–8. doi: [10.1111/hiv.12206](https://doi.org/10.1111/hiv.12206) PMID: [25604328](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25604328/)
31. Chou JP, Ramirez CM, Wu JE, Effros RB. Accelerated Aging in HIV/AIDS: Novel Biomarkers of Senescent Human CD8+ T Cells. *PLoS One*. 2013; 8(5):1–7.
32. Kaushal H, Bras-Gonçalves R, Negi NS, Lemesre J-L, Papierok G, Salotra P. Role of CD8+ T cells in protection against *Leishmania donovani* infection in healed Visceral Leishmaniasis individuals. *BMC Infect Dis*. 2014; 14:653. doi: [10.1186/s12879-014-0653-6](https://doi.org/10.1186/s12879-014-0653-6) PMID: [25471494](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25471494/)
33. Serrano-Villar S, Pérez-Elías MJ, Dronza F, Casado JL, Moreno A, Royuela A, et al. Increased risk of serious non-AIDS-related events in HIV-infected subjects on antiretroviral therapy associated with a low CD4/CD8 ratio. *PLoS One*. 2014; 9(1):e85798. doi: [10.1371/journal.pone.0085798](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085798) PMID: [24497929](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24497929/)
34. Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV infection: causes and consequences. *J Pathol*. 2008; 214(2):231–41. doi: [10.1002/path.2276](https://doi.org/10.1002/path.2276) PMID: [18161758](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18161758/)
35. Deeks SG, Verdin E, McCune JM. Immunosenescence and HIV. *Curr Opin Immunol*. 2012; 24(4):501–6. doi: [10.1016/j.coi.2012.05.004](https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.05.004) PMID: [22658763](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22658763/)
36. Wortmann G, Sweeney C, Houg HS, Aronson N, Stiteler J, Jackson J, et al. Rapid diagnosis of Leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 2001; 65(5):583–7. PMID: [11716118](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11716118/)
37. Gomes LI, Gonzaga FM, Morais-Teixeira De E, de Souza-Lima BS, Freire V V., Rabello A. Validation of quantitative real-time PCR for the in vitro assessment of antileishmanial drug activity. *Exp Parasitol*. 2012; 131(2):175–9. doi: [10.1016/j.exppara.2012.03.021](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.03.021) PMID: [22475774](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22475774/)
38. Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine*. 1999; 11(4):305–12. doi: [10.1006/cyto.1998.0426](https://doi.org/10.1006/cyto.1998.0426) PMID: [10328870](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10328870/)
39. Fagundes-Silva GA, Vieira-Goncalves R, Nepomuceno MP, de Souza MA, Favoreto S, Oliveira-Neto MP, et al. Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is

correlated with the time of clinical cure. *Parasite Immunol.* 2012; 34(10):486–91. doi: [10.1111/j.1365-3024.2012.01379.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2012.01379.x) PMID: [22742527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22742527/)

40. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price D a, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2004; 200(6):749–59. doi: [10.1084/jem.20040874](https://doi.org/10.1084/jem.20040874) PMID: [15365096](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15365096/)
41. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2004; 200(6):761–70. doi: [10.1084/jem.20041196](https://doi.org/10.1084/jem.20041196) PMID: [15365095](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15365095/)
42. Hicks L, Kant P, Tay PH, Vincini V, Schuster H, Rotimi O, et al. Visceral Leishmaniasis presenting with intestinal failure: a case report and literature review. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 21(1):117–22. doi: [10.1097/MEG.0b013e32830e6fdb](https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e32830e6fdb) PMID: [19011572](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19011572/)
43. Baba CS, Makharia GK, Mathur P, Ray R, Gupta SD, Samantaray JC. Chronic diarrhea and malabsorption caused by *Leishmania donovani*. *Indian J Gastroenterol;* 2006; 25(6):309–10. PMID: [17264434](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17264434/)
44. Marchetti G, Tincati C, Silvestri G. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26(1):2–18 doi: [10.1128/CMR.00050-12](https://doi.org/10.1128/CMR.00050-12) PMID: [23297256](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23297256/)

4.2 Manuscrito 1 (Submetido)

Título: *Impaired thymic output can be related to the low immune reconstitution and T cell repertoire disturbances in relapsing visceral leishmaniasis associated HIV/AIDS patients.*

Autores: Maria Luciana Silva-Freitas; Gabriela Corrêa-Castro, Glaucia Cota; Carmem Giacoia-Gripp; Ana Rabello; Juliana Teixeira Dutra; Zilton Farias Meira de Vasconcelos; Wilson Savino; Alda Maria Da-Cruz; Joanna Reis Santos-Oliveira.

The Journal of Infectious Diseases, 2019.

RESUMO

Introdução: Pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV que controlam a infecção por *Leishmania* mostraram uma aumentada contagem de células T CD4⁺ e menores níveis de células T ativadas após o tratamento anti-*Leishmania* (mpt). Isto não foi observado em pacientes recidivantes-LV/HIV, embora ambos os grupos tenham mostrado linfócitos senescentes. Nosso objetivo foi avaliar se esse ganho de células T estava relacionado a mudanças no repertório TCRV β e *status* inflamatório, bem como ao possível envolvimento tímico na reconstituição desses novos linfócitos.

Métodos: Pacientes LV/HIV agrupados em não-recidivantes (-NR=7) e recidivantes (-R=11) foram avaliados desde a fase ativa até 12 mpt. HIV- apenas e indivíduos sadios (HS) foram incluídos.

Resultados: Casos LV/HIV apresentaram um perfil de mobilização alterado (expansões e retrações) das famílias V β quando comparados aos sadios ($p < 0.05$). O repertório TCRV β sobre células T CD4⁺ foi mais homogêneo nos casos LV/HIV-NR, mas homogêneo sobre células T CD8⁺, uma vez que diferentes famílias V β foram mobilizadas. Pacientes LV/HIV-NR reduziram o *status* inflamatório aos 6 mpt. Um aumento dos emigrantes tímicos (TREC) foi observado em pacientes LV/HIV-NR aos 10 mpt comparados aos LV/HIV-R ($p < 0.01$), que mantiveram níveis de TREC menores do que os controles HIV.

Conclusões: Pacientes que ainda mantêm a função tímica deve ser capaz de reconstituir o compartimento de linfócitos T com células efetoras, possibilitando o controle parasitário.

The Journal of Infectious Diseases

Impaired thymic output can be related to the low immune reconstitution and T cell repertoire disturbances in relapsing visceral leishmaniasis associated HIV/AIDS patients.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Impaired thymic output can be related to the low immune reconstitution and T cell repertoire disturbances in relapsing visceral leishmaniasis associated HIV/AIDS patients.
Short Title:	TCRV β repertoire and TREC levels in VL/HIV-1 patients.
Article Type:	Major Article
Section/Category:	Pathogenesis and Host Response
Keywords:	visceral leishmaniasis/HIV-1 coinfection; thymic output; TCRV β repertoire; relapses; immune response
Corresponding Author:	Alda Maria Da-Cruz, MD, PhD Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ Rio de Janeiro, RJ BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Maria Luciana Silva-Freitas, MSc
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Maria Luciana Silva-Freitas, MSc Gabriela Corrêa-Castro, Master Degree Student Glauca Fernandes Cota, MD, PhD Carmem Giacoia-Gripp, PhD Ana Rabello, MD, PhD Juliana Teixeira Dutra, MSc Zilton Farias Meira de Vasconcelos, PhD Wilson Savino, PhD Alda Maria Da-Cruz, MD, PhD Joanna Reis Santos-Oliveira, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	<p>Background: Visceral leishmaniasis/HIV-coinfected patients (VL/HIV) who control Leishmania infection showed increased CD4+ T-cell counts and lower levels of activated T-cells post anti-leishmanial treatment (mpt). This was not observed in relapsing-VL/HIV patients, albeit both groups displayed senescent lymphocytes. Our aim was to evaluate if this gain of T cells was related to changes in the peripheral TCRVβ repertoire and inflammatory status, as well as the possible thymus involvement in the replenishment of these newly lymphocytes.</p> <p>Methods: VL/HIV patients grouped into non-relapsing (-NR=7) and relapsing (-R=11) were evaluated from the active phase up to 12mpt. HIV-only and healthy subjects (HS) were included.</p>

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	<p>Results: VL/HIV cases presented an altered mobilization profile (expansions or retractions) of the Vβ families when compared to HS (p<0.05). TCRVβ repertoire on CD4+ T-cells was more homogenous in the VL/HIV-NR cases, but heterogeneous on CD8+ T-cells, since different Vβ-families were mobilized. VL/HIV-NR reduced the inflammatory status after 6mpt. An increase of the thymic emigrants (TREC) was observed in VL/HIV-NR at 10mpt compared to -R (p<0.01) who maintained lower TREC levels than HIV controls.</p> <p>Conclusions: Patients who still maintain the thymic function may be able to replenish the T lymphocyte compartment with effector cells enabling parasite control.</p>
Suggested Reviewers:	<p>Daniel Douek, Medical Doctor, PhD Researcher ddouek@mail.nih.gov Expertise in the immunology of HIV-1 infection especially in thymic function by TREC quantification.</p> <p>Johan van Griensven, Medical Doctor, PhD Researcher jvangriensven@itg.be Expertise in visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection, treatment and clinical aspects.</p> <p>Jude Uzonna, Medical Doctor, PhD Researcher jude.uzonna@umanitoba.ca Expertise in visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection.</p> <p>Carlos Henrique Nery Costa, Medical Doctor, PhD Researcher chncosta@gmail.com Expertise in the visceral leishmaniasis immunopathogenesis and internal medicine.</p> <p>Kenneth John Gollob, Medical Doctor, PhD Researcher kjggollob@gmail.com Expertise in the immunology of tegumentary leishmaniasis and TCRVβ repertoire.</p> <p>Selma Jerônimo, Medical Doctor, PhD Researcher smbj@cb.ufrn.br Expertise in the immunology of visceral leishmaniasis, pathogenesis and clinical aspects.</p>

**IMPAIRED THYMIC OUTPUT CAN BE RELATED TO THE LOW IMMUNE
RECONSTITUTION AND T CELL REPERTOIRE DISTURBANCES IN
RELAPSING VISCERAL LEISHMANIASIS ASSOCIATED HIV/AIDS
PATIENTS.**

**Maria Luciana Silva-Freitas¹; Gabriela Corrêa-Castro^{1,3}, Glaucia Cota²; Carmem
Giacoia-Gripp⁴; Ana Rabello²; Juliana Teixeira Dutra⁵; Zilton Farias Meira de
Vasconcelos⁵; Wilson Savino^{6,7}; Alda Maria Da-Cruz^{1,7#}; Joanna Reis Santos-
Oliveira^{1,3#}.**

¹*Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas - Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.*

²*Leishmaniasis Referral Center, Instituto René Rachou – FIOCRUZ, Minas Gerais, Brazil.*

³*Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia - IFRJ, Rio de Janeiro, Brazil.*

⁴*Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular - Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.*

⁵*Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira – FIOCRUZ – Rio de Janeiro, Brazil.*

⁶*Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.*

⁷*National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.*

Financial support:

This work was supported by Instituto Oswaldo Cruz (internal funds), CNPq - Universal, FAPERJ – CNE and IFRJ. M. L. S. F. received a fellowship from CAPES. G. C. C. received a fellowship from FAPERJ. A. M. C. is a researcher fellowship from CNPq and FAPERJ.

Potential conflicts of interest:

All authors: No reported conflicts.

Corresponding authors:

Joanna Reis Santos-Oliveira and Alda Maria Da-Cruz.

Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ, Brazil. 21040-360,

Phone: +55.21.2562-1039

Email addresses: joanna.oliveira@ifrj.edu.br and alda@ioc.fiocruz.br

These authors equally shared the author correspondence

Abstract

Background: Visceral leishmaniasis/HIV-coinfected patients (VL/HIV) who control *Leishmania* infection showed increased CD4⁺ T-cell counts and lower levels of activated T-cells post anti-leishmanial treatment (mpt). This was not observed in relapsing-VL/HIV patients, albeit both groups displayed senescent lymphocytes. Our aim was to evaluate if this gain of T cells was related to changes in the peripheral TCRV β repertoire and inflammatory status, as well as the possible thymus involvement in the replenishment of these newly lymphocytes.

Methods: VL/HIV patients grouped into non-relapsing (-NR=7) and relapsing (-R=11) were evaluated from the active phase up to 12mpt. HIV-infected patients (non-VL) and healthy subjects (HS) were included.

Results: VL/HIV cases presented an altered mobilization profile (expansions or retractions) of the V β families when compared to HS ($p<0.05$). TCRV β repertoire on CD4⁺ T-cells was more homogenous in the VL/HIV-NR cases, but heterogeneous on CD8⁺ T-cells, since different V β -families were mobilized. VL/HIV-NR had the inflammatory pattern reduced after 6mpt. An increase of the thymic emigrants (TREC) was observed in VL/HIV-NR at 10mpt compared to -R ($p<0.01$) who maintained lower TREC levels than HIV controls.

Conclusions: Patients who still maintain the thymic function may be able to replenish the T lymphocyte compartment with effector cells enabling parasite control.

Key words: visceral leishmaniasis/HIV-1 coinfection; thymic output; TCRV β repertoire; relapses; immune response.

Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected tropical disease associated with poverty, being a public health issue in endemic countries, mainly in tropical and subtropical regions [1-2]. Most of VL cases in the Americas occurs in Brazil, where around 4,000 new cases are reported annually [1-3]. An increasing number of HIV-associated VL (VL/HIV) cases has been reported since 2001 reaching 7.8% of the whole VL cases reported in 2017 [3]. Noteworthy, VL/HIV patients frequently fail to respond successfully to treatment, exhibiting a high rate of drug toxicity, relapses and mortality [1-2, 4].

VL/HIV patients evolve with an intense immunosuppression and, paradoxically, potentiated cellular activation, despite antiretroviral therapy (ART) and clinical remission of VL [2, 5]. We previously demonstrated that *Leishmania* infection was the main cofactor associated with the immune activation state in HIV-infected individuals [5]. Allied to this, elevated levels of lipopolysaccharide (LPS) pointed out that microbial products from the gut lumen translocation, could also be involved in the exacerbated pro-inflammatory status of VL alone [6] and VL/HIV co-infected patients [2, 7].

Plasma inflammatory cytokines levels, as well as soluble molecules associated with inflammation such as d-dimers, neopterin, soluble CD163 and leptin levels have been described as important predictors of severity and death in VL [8-12]. We showed that relapsing HIV-co-infected VL patients maintained low CD4⁺ T lymphocyte counts, higher levels of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells, sCD14 and anti-*Leishmania* IgG3, even 12 months after anti-leishmanial treatment, whereas this immune profile was reverted in non-relapsing-VL/HIV

patients after anti-*Leishmania* treatment [13]. This indicates intense activation leading to an exhaustion of the immune response to the parasite, which may contribute to the frequent VL relapses or even faster disease progression [2,14].

Continuous cellular activation induces immunosenescence and exhaustion of primary immune resources. As a consequence, decreased generation of new T cells and lower peripheral T-cell repertoire diversity takes place [15-17]. In this respect, it is relevant to point out that the thymus of HIV patients is also affected, compromising both the lymphoid and microenvironmental compartments of the organ [18]. Thymic capacity of exporting mature T lymphocytes can be ascertained by quantifying the T-cell receptor excision circles (TRECs). These circles are generated intrathymically during the somatic gene rearrangement process that generates the T-cell receptor (TCR) and are unique of naive T $\alpha\beta$ cells, and allow the identification in the periphery of the so-called recent thymic emigrants (RTEs) [19-21].

In a second vein, HIV-positive patients evolve with disturbances in the generation of the T lymphocyte receptor V β repertoire (TCRV β) [17], which can potentially compromise the effector responsiveness to a variety of antigens, including *Leishmania*. In this context, disorders of the TCRV β repertoire have been related to the immunopathogenesis of several diseases, such as cancer [22]; rheumatoid arthritis [23]; hematological comorbidities [24]; Chagas disease [25]; cutaneous leishmaniasis [26-27]; and HIV/AIDS [28-29]. HIV-positive patients with a restrict mono-oligoclonal TCRV β repertoire profile present a rapid AIDS-progression, suggesting that the T-cell repertoire disturbances do influence the HIV/AIDS prognosis [28] and of its association with other

infections, such as Epstein Barr virus [30]. Moreover, after ART a change on the profile of the TCRV β repertoire is observed since, not only newly V β families appear in the periphery, but also others are positive or negatively mobilized [29, 31].

We recently showed that VL-HIV co-infected patients with satisfactory clinical evolution and no recurrence of VL (non-relapsing) showed increased levels of the circulating CD4⁺ T cell pool, indicating that they still have the ability to replenish the peripheral T cell compartment. Differently however, this was not observed in relapsing VL-HIV patients suggesting a sort of burnout of T cell sources [32]. The main source of these T cells, peripheral lymphoid organs or thymus, can be affected by both *Leishmania* and HIV infection [18, 33-34]. Accordingly, it is conceivable that the compromising degree of one of these compartments may be related to a deficient immune response. These features may contribute to the lack of parasite control which in turn can explain the frequent relapses in VL/HIV [13-14]. Thus, the aim of this study was to evaluate if the gain of T cells observed in VL/HIV-NR patients after anti-*Leishmania* treatment [13] was related to changes in the mobilization and proliferation of the peripheral TCRV β repertoire. Additionally, we investigated whether the thymus is involved in the replenishment of newly T cells, especially in non-relapsing VL/HIV co-infected patients.

Patients and methods

Casuistic of the study and ethical aspects

Eighteen VL/HIV co-infected patients were recruited from Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte, Brazil, being prospectively followed from February 2011 up to March 2013. These patients were grouped in relapsing VL/HIV (VL/HIV-R; n=12) e non-relapsing VL/HIV (VL/HIV-NR; n=6) respectively, according to the occurrence or not of VL relapse episodes throughout life. Clinical aspects, diagnosis, treatment and ethical aspects were previously reported [13]. Parasitological tests (direct exam and culture) from bone marrow aspirates were used to confirm the VL diagnosis in all patients. At that time, the first line treatment recommended by the Ministry of Health for VL/HIV patients was amphotericin B deoxycholate for 4 weeks [35]. After treatment, secondary prophylaxis with amphotericin B was offered every two weeks to those VL/HIV patients that maintained absolute CD4⁺ T lymphocyte counts below 350 cells/mm³ [36].

The immunological parameters were evaluated in the following monitoring periods: active phase, post-treatment, six and 12 months post-treatment (mpt). Patients infected only with HIV or *Leishmania*, as well as healthy subjects (HS) were included as controls. This study was approved by ethical review board of Hospital Eduardo de Menezes and FIOCRUZ (Instituto René Rachou and Instituto Oswaldo Cruz).

Evaluation of TCRV β repertoire levels by flow cytometry

To evaluate the V β repertoire of T lymphocytes was used the IOTest β Mark kit (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, EUA), which have specific monoclonal antibodies for 24 V β chains belonging to 19 from 26 V β families known. In this kit, three V β different chains were simultaneously analyzed in a single dotplot, being marked with the following fluorochromes: FITC or PE or with the FITC-PE combination. Therefore, this flow cytometry protocol allowed to analyze the expression of V β chains in the subpopulations of CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T lymphocytes using anti-CD4 PercP (Peridinin-chlorophyll proteins) and anti-CD8 APC (allophycocyanin) monoclonal antibodies. The gate of these subpopulations was defined within the CD3 $^{+}$ T lymphocyte compartment, in a tube containing anti-CD4 PercP, anti-CD8 APC and anti-CD3 FITC monoclonal antibodies. From this lymphocyte subpopulations (CD4 $^{+}$ or CD8 $^{+}$ T cell), a dotplot was created to define the percentages of cells expressing such V β Family. PBMCs obtained of the Ficoll-Hypaque gradient centrifugation were used to *ex vivo* immunophenotyping and all samples were acquired by a FACSCalibur β device (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). For each sample 20,000 events were acquired within the lymphocyte gate. The cytometry analyses were performed using the Cell Quest Pro TM software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Quantification of cytokine levels

A multiplex assay was realized to quantify the serum levels of the following cytokines: IFN- γ , TNF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, MCP-1 and MIP-1 β . Cytokine contents were calculated by Luminex technology (Bio-Plex Workstation; Bio-Rad Laboratories, USA). The

analysis of data was performed using software provided by the manufacturer (Bio-Rad Laboratories, USA). Recombinant cytokines were used to establish standard curves and the sensitivity of the assay. Results were expressed as mean fluorescent intensity (MFI). The MFI of the last point of each standard curve was used to determine the detection limit of each cytokine.

Quantification of T cell receptor excision circles (TRECs) by qPCR

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) previously cryopreserved were thawed and the DNA was extracted directly from these cells using the QIAamp DNA Blood Mini kit following the manufacturer's instructions (Qiagen, Manchester, UK). The DNA was extracted of an initial concentration of cells which ranged from 1 to 5 million PBMC/mL. After extraction, the eluted DNA was quantified through of NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). TRECs were quantified by real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR), according to the principles of the test established by Douek et al [19]. Briefly, 2 μ L of extracted DNA was added in MicroAmp® Optical 96-well reaction plate (Applied Biosystems®) with 3 μ L of TREC reaction mix, which consisted in: milliQ water; TREC primers: Forward (5'-CAC ATC CCT TTC AAC CAT GCT-3') and Reverse (5'-GCC AGC TGC AGG GTT TAG G-3'); probe TREC (6-FAM-ACA CCT CTG GTT TTT GTA AAG GTG CCC ACT-39-TAMRA); and the 2x TaqMan Universal Master Mix II enzyme (Applied Biosystems®). Reaction final volume was 5 μ L/well. To control the quality of the assay and the integrity of the extracted DNA as well as to standard the final result of TRECs/ 10^6 PBMC, the RNaseP endogenous constitutive gene was quantified in all samples. To perform TREC quantification

a plasmid containing TREC sequence cloned kindly provided by Dr. Daniel Douek (Vaccine Research Center, NIH, USA) were serially diluted from 10^6 to 10^{-1} TREC copies/ μ L and used as standard curve amplified in parallel in each experiment. A standard curve of RNaseP with known concentrations (from 10^6 up to 10^1 copies/PBMC) of PBMC extracted-DNA from a healthy control sample were also included in each assay. The qPCR run was performed in the 7500 Real-Time PCR System equipment (Life Technologies). Then, a quantitative amplification of the TREC/ μ L and RNaseP/PBMC copies in each sample was generated. Each sample was run in duplicate and the final results of TREC/ 10^6 PBMC were obtained by dividing the amount of TREC by the amount RNaseP of each sample.

Statistical analysis

The statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 6.0, San Diego, CA, USA). For comparisons between VL/HIV co-infected patients and control groups we used non-parametric tests: Mann Whitney when two groups were analyzed; ANOVA (Kruskal-Wallis) and Dunns post-test when three or more groups were simultaneously compared. Parametric test (Wilcoxon) was applied when the same patient was compared in his/her different phases of follow-up. Differences were considered statistically significant when the p value was ≤ 0.05 . Heatmap analyses were performed to evaluate the differential expression patterns of TCRV β repertoire on T cell subpopulations in VL/HIV patients. For this, the online software Heat mapper[®] (Wishart Research Group at the University of Alberta) were used to draw a heatmap from a spreadsheet which contained the expression index of each

TCRV β family for each patient evaluated, using the following formula: % Y-V β family expression of the X-patient in a given follow-up period divided by average of the % Y-V β family expression in the healthy controls. The clustering method used for analysis was the average linkage, and the distance measurement method applied was Euclidean.

Results

Mobilization of the CD4⁺ and CD8⁺ T-cell V β repertoire after anti-*Leishmania* treatment in non-relapsing and relapsing visceral leishmaniasis/HIV co-infected patients

As previously shown, VL/HIV-NR or VL/HIV-R patients presented similar levels of CD4⁺ T cells during active phase of VL [13] (Table 1). However, at 6 months post-treatment (mpt) a significant increase in this population was observed in VL/HIV-NR patients, remaining until 12 mpt (medians (VL/HIV-NR): 297 and 350 cells/mm³; IQR: 216-478 cells/mm³ and 284-659 cells/mm³; medians (VL/HIV-R): 132 and 126 cells/mm³; IQR: 76-203 cells/mm³ and 39-232 cells/mm³; $p < 0.05$). Although CD8⁺ T lymphocyte counts also increased in the VL/HIV-NR group after treatment, no significant differences were found throughout the follow-up when the patients were evaluated individually (Table 1). This indicates that the main mobilization occurs in the CD4⁺ T cell pool.

Table 1. T cell absolute counts of patients with visceral leishmaniasis co-infected by HIV

VL/HIV group	Follow-up phase	Median CD4 ⁺ (IQR)		Median CD8 ⁺ (IQR)		<i>n</i>
Non-relapsing (NR-VL/HIV)	<i>Active VL</i>	86.5	(66.25-120.5)	364	(238.5-1032)	6
	<i>Post-treatment</i>	166.5	(120.3-263.8)	499	(386.8-961.8)	6
	<i>6 mpt</i>	297	(216.8-478.5) ^A	766.5	(428.8-1872)	6
	<i>12 mpt</i>	350	(284.5-659.5) ^B	806	(651.5-1408)	6
Relapsing (R-VL/HIV)	<i>Active VL</i>	116	(51.75-185)	418	(226.8-881)	12
	<i>Post-treatment</i>	189.5	(96-257.8)	556	(390.3-1305)	12
	<i>6 mpt</i>	132	(76-203)	425	(309-705)	11
	<i>12 mpt</i>	126	(39.25-232.3)	327.5	(218-1476)	10

VL/HIV: patients with visceral leishmaniasis co-infected by HIV; mpt: months post-treatment; IQR: interquartile range; ^Asignificant difference between non-relapsing (NR) and relapsing (R) VL/HIV patients at 6 mpt; ^Bsignificant difference between non-relapsing (NR) and relapsing (R) VL/HIV patients at 12 mpt; *n*: number of patients in each follow-up phase.

Considering that VL/HIV-NR patients had an important degree of immune reconstitution, mainly in CD4⁺ T cells, differing from VL/HIV-R cases, we decided to investigate whether this input was associated with newly TCRVβ repertoire diversity or even differentially mobilized.

We found that more than 50% of the TCRVβ repertoire evaluated on CD4⁺ and CD8⁺ T cells were significantly altered in both VL/HIV-NR and VL/HIV-R patients, in comparison to healthy individuals. This mobilization was either for a higher or a lower expression of Vβ families, regardless of the clinical phase of the follow-up (17 Vβ families altered in CD4⁺ T cells and 12 Vβ families altered in CD8⁺ T cells; tables 2 and 3, respectively). The Vβ7.2 was significantly less expressed in VL/HIV-NR patients when compared to the profile

of HS (table 2). The expression levels of this family on CD4⁺ T cells remained below 1% in VL/HIV-NR patients up to 12 mpt, suggesting a reduced mobilization of the corresponding CD4⁺ T cells (see Supplementary Fig. 1A). By contrast, the Vβ13.6 was more expressed in both VL/HIV-NR and VL/HIV-R groups, especially in the VL active phase (table 2). Moreover, during the active phase, the number of Vβ families more expressed in CD4⁺ T cells was higher in VL/HIV-R than in VL/HIV-NR patients (table 2). The VL/HIV-NR patients presented an increase in the expression of three families: Vβ5.1, Vβ13.6 and Vβ1; whereas VL/HIV-R patients showed elevated levels in six families: Vβ18, Vβ13.6, Vβ23, Vβ22, Vβ13.2 e Vβ4 (table 2, see Supplementary Fig. 1A). Of note, the Vβ22 family was mobilized by more than 5% of the CD4⁺ T cell repertoire in VL/HIV-R patients during the active phase (see Supplementary Fig. 1A). Nevertheless, at 6 and 12 mpt, only the Vβ5.1 (>5% at 12 mpt; see Supplementary Fig. 1B) and the Vβ13.6 families, respectively, remained significantly more expressed in the VL/HIV-NR patients, in comparison to HS (table 2). By contrast, with exception for the Vβ22 family, all other Vβ families significantly more expressed in the active phase of VL/HIV-R patients remained significantly higher after anti-*Leishmania* treatment (table 2), in comparison to HS. In these patients, the expression of the Vβ13.6 and Vβ4 families remained higher than HS until 6 mpt (table 2). Yet, it is noteworthy that the percentages of Vβ4 mobilization were always below 1% in the CD4⁺ T repertoire until 12 mpt. This was also observed in VL/HIV-NR patients (Supplementary Figs. 1A-B), although significant differences in comparison to the HS were only observed after 6 mpt (table 2).

The mobilization profile of TCRV β repertoire in CD8⁺ T cells (table 3) revealed that the V β 3 family was more expressed in VL/HIV-NR patients during active phase, post-treatment and at 6 mpt, when compared to HS. The expression levels of this family in CD8⁺ T-cells from these patients were above 5% throughout the follow-up (Supplementary Figs. 1C-D). Such an increase was not observed in relation to VL/HIV-R cases. The V β 18 was also significantly more abundant in VL/HIV-NR patients during active and anti-*Leishmania* post-treatment phases. Differently, the V β 2 family remained less expressed in both VL/HIV-NR and VL/HIV-R groups during the whole follow-up period. This finding indicates a mobilization profile characteristic of the VL/HIV association. Similarly, the V β 7.2 was less expressed, not only in the VL/HIV-NR patients during all follow-up but also in the active and 6 mpt phases of VL/HIV-R patients. The mobilization profile of this family represented less than 1% in both groups, in the active and the 12 mpt phases (Supplementary Fig. 1C-D), suggesting a restriction of this family in VL patients.

In comparison to healthy individuals, only the V β 23 family was more expressed in the VL/HIV-R patients during the VL active phase. No other significant difference in terms of higher expression could be seen in the course of the prospective follow-up of this group (table 3). This same family, as well as the V β 11 and V β 4 families were more expressed in VL/HIV-NR patients in the post-treatment, 6 and 12 mpt, respectively. Noteworthy, practically no significant change in the TCRV β mobilization profile was seen in CD8⁺ T cells from relapsed patients, since many families were differently mobilized in each clinic phase. This indicates that the CD8⁺ TCRV β repertoire in VL/HIV-R patients is

more heterogeneous, which could be related to a reduced ability of parasite control.

Despite of the similarities and differences described above, especially in relation to the healthy group, punctual changes along the clinical follow up of the VL/HIV-NR and VL/HIV-R patients were observed for some V β families (Figs. 1A-B). In this sense, a tendency to higher percentages of the V β 3 and V β 9 families on CD4⁺ T cells was seen in VL/HIV-NR patients when compared to VL/HIV-R, mainly during active phase of disease. The VL/HIV-R, in turn, had similar levels of these families in comparison to HS, particularly during the active phase. For example, during active phase of disease, the V β 8 family seems to be more expressed on CD4⁺ T cells of VL/HIV-R patients than in VL/HIV-NR patients (Fig. 1C). Moreover, the levels of the V β 9 and V β 23 families on CD4⁺ T cells significantly decreased in both groups. The levels of mobilization of these families were below 1% in the period of 12 mpt (Figs. 1B, 1D, see Supplementary Fig. 1B). Interestingly, the percentages of V β 23 and V β 18 families on CD4⁺ T cells showed a tendency to be higher in NR- and VL/HIV-R patients, mainly during the active phase, in comparison to HS, which may be associated with the presence of *Leishmania* (Figure 1D-E). Furthermore, the V β 18 family had your expression levels decreased during the clinical follow-up of the VL/HIV-R patients (Fig. 1E).

In relation to the TCRV β repertoire on CD8⁺ T cells, the expression levels of V β 3 and V β 18 families presented a trend towards to be higher in the VL/HIV-NR patients when compared to the VL/HIV-R group, mainly in the active phase of VL (Figs. 2A-B). It is interesting to note that these two V β families had already been pointed out above because they were significantly higher in

VL/HIV-NR cases compared to healthy ones (table 3, Figs. 2A-B). Although the VL/HIV-R patients have shown V β 3 levels similar to HS and lower than VL/HIV-NR group (Fig. 2A), this family was the only one mobilized above 5% in the CD8⁺ T cell repertoire at 12 mpt (see Supplementary Fig. 1D). Moreover, during active phase of VL, the mobilization percentages of the V β 5.2 and V β 23 families were higher in VL/HIV-R patients when compared to VL/HIV-NR group (Figure 2C e D), although without significant difference.

In the prospective follow-up, the levels of the V β 18 e V β 23 families on CD8⁺ T cells significantly decreased in the VL/HIV-NR patients during the 12 mpt in comparison to the initial phases (Figure 2B e D), with percentages below 1% in this phase of follow-up (see Supplementary Figure 1D). Among the VL/HIV-R patients, there was a significant decrease at 6 mpt of the V β 23 family (Figure 2D). Although not significant, it was also observed a decrease in the expression of V β 5.2 and V β 23 family on CD8⁺ T cells in this group at 12 mpt (Figure 2C and D). Finally, an increase in the expression levels of the V β 11 family in VL/HIV-NR patients was observed after anti-*Leishmania* treatment (Figure 2E).

The other changes in the CD4⁺ and CD8⁺ T cells TCRV β repertoire in VL/HIV-NR and VL/HIV-R patients are shown as supplementary material (see Supplementary Figures 2-3).

In order to provide a qualitative overview of the V β disturbances, we used a heatmap strategy to represent the fold change of the percentages of each TCRV β family presented by each VL/HIV patient in all phases of follow-up. The CD4⁺ TCRV β repertoire analysis (Figures 3A) showed that the V β 9 and V β 5.3 families were highly mobilized during the active phase mainly in the

VL/HIV-NR, reducing after the anti-*Leishmania* treatment in both groups. The V β 18 family also presented increased expression levels during the active phase and after treatment against *Leishmania* among VL/HIV-NR patients, decreasing in the 6 and 12 mpt. This same pattern was observed for the V β 22, V β 1, V β 23 and V β 18 families among the VL/HIV-R patients. At 12 mpt, it was observed a reduction in the expression levels of the V β 13.1 and V β 23 families among VL/HIV-NR patients and of the V β 23 and V β 2 families among VL/HIV-R patients. The V β 7.2 and V β 13.2 families had a tendency to be more expressed among VL/HIV-R in comparison to VL/HIV-NR. The opposite was observed for the V β 3 family, whose mobilization tended to be clearly higher among VL/HIV-NR.

Heatmap analysis of the CD8 TCRV β repertoire reinforced our previous observations (Figure 3B). The V β 18 was highly mobilized in the early periods of the follow-up among VL/HIV-NR patients, but their levels decreased at 6 and 12 mpt. The opposite was observed for the V β 4, whose levels were decreased at the beginning of follow-up for most VL/HIV-NR patients, but increased during 6 and 12 mpt. Also, the V β 23 family mobilization was expressively reduced among VL/HIV-NR patients at 12 mpt. An extremely heterogeneous pattern of CD8 TCRV β repertoire in the VL/HIV-R cases was evidenced. Then, only the V β 5.2 family was noteworthy among VL/HIV-R patients, whose levels of expression were increased from the active phase up to 6 mpt and reduced at 12 mpt. Overall, the V β 23 family tended to be more used among VL/HIV-R when compared to VL/HIV-NR patients. Finally, the levels of V β 3 family were not only elevated during all the clinical follow-up of the VL/HIV-NR, but also tended to be higher in this group in comparison to VL/HIV-R patients (Figure 2A; Figure 3B).

Considering that VL/HIV-NR and VL/HIV-R patients differed in their T cell reconstitution profile (CD4⁺ T cell counts and TCRV β repertoire), especially after 6 mpt we decided to investigate the impact of this on pro- and anti-inflammatory cytokine status of these patients. During the active phase and post-treatment VL/HIV-NR and VL/HIV-R patients displayed similar levels of IL-8 and TNF (Figure 4A-B). Nevertheless, in VL/HIV-NR patients there was a significant decrease in the levels of these cytokines, from 6 mpt compared to the early phases. By contrast, VL/HIV-R patients kept or even augmented IL-8 and TNF levels, which were actually higher than those observed in VL/HIV-NR cases (Fig. 4A-B) ($p < 0.05$).

Interestingly, it was also observed a significant decrease in the serum IL-10 levels in VL/HIV-NR patients at 6 and 12 mpt in comparison to the active phase of VL (Figure 4E). This finding may be associated to the fact of the parasite load in this group have become undetectable after anti-*Leishmania* treatment (Figure 4F).

For the other cytokines, the same pattern was observed; the majority of the VL/HIV-NR patients showed a tendency to reduce IFN- γ and IL-6 (Figure 4C-D), as well as IL-2, IL-17, MIP-1 β , IL-13 and IL-4 levels (see Supplementary Figure 4B-C and 4E-G) at 6 and 12 mpt in relation to the active phase and immediately after the anti-*Leishmania* treatment. On the other hand, among the VL/HIV-R patients, IFN- γ and IL-6 (Figure 4C-D), as well as IL-1 β , CCL2, CCL4 and IL-4 (see Supplementary Figure 4A, D, E, G) levels tended to remain elevated or even higher at 6 and 12 mpt in comparison to those found in the early periods of clinical follow-up.

Thymic output may contribute to the replenishment of T cells in non-relapsing visceral leishmaniasis/HIV patients

Finally, considering that both VL/HIV-NR and VL/HIV-R showed elevated percentages of senescent T cells [13], but different degree of immune reconstitution, inflammatory profile and mobilization of V β families, we questioned whether the thymic compartment could be contributing to this differentiated immune status.

We found that TREC copies per million of PBMCs were lower in the VL/HIV coinfecting patients during active phase (1650 TRECs; IQR: 1035-2024 TRECs) and post-treatment (1218 TRECs; IQR: 406.4-3013 TRECs) when compared to HIV mono-infected or healthy subjects (HIV: 8382 TRECs; IQR: 4959-42011 TRECs; and HS: 61592 TRECs; IQR: 10542-99927 TRECs) (Fig. 5A). Nevertheless, a significant increase was observed among co-infected patients at 10 months post anti-VL treatment (mpt), as compared to the initial phases of the follow-up (Fig. 5A). When these patients were split into relapsing (VL/HIV-R) and non-relapsing (VL/HIV-NR), it was observed that the augment in TRECs at 10 mpt was due to a significant increase in VL/HIV-NR patients in comparison to VL/HIV-R (Fig. 5B). The median of TREC copies in PBMCs seen in VL/HIV-NR patients were higher than those observed in the HIV mono-infected individuals and some of VL/HIV-NR patients showed data rather close to the median of HS (Fig. 5B, dashed line). By contrast, VL/HIV-R patients maintained low TREC copies during all the follow-up period, and below the medians of the control group (Fig. 5B).

The significant increase in the numbers of TREC copies in VL/HIV-NR patients at 10 mpt (Fig. 5B) may reflect their ability to replenish the pool of peripheral CD4⁺ T cells, as we showed previously [13] (Table 1).

The TREC copy numbers per million PBMCs at 10 mpt negatively correlated ($p < 0.05$, $r = -0.567$) with the number of relapses observed in VL/HIV patients in this same period of follow-up, as seen in figure 5C, again suggesting that the impairment of the thymic output may influence the occurrence of VL relapses.

Discussion

Relapses in VL/HIV patients is a challenge for clinicians since it is not only a frequent event, but also difficult to manage because of the scarce therapeutic options. A negative correlation between CD4⁺ T cell counts and cellular activation levels in VL/HIV co-infected patients was previously demonstrated [13]. Corroborating with these results, relapsing-VL/HIV patients whose activation levels were elevated during 12 months clinical follow-up also maintained low CD4⁺ T-lymphocyte counts. On the other hand, non-relapsing-VL/HIV [13] presented a gain of CD4⁺ T [13], but not of CD8⁺ T cells. Therefore, we decided to investigate the quality of the T cells circulating in the periphery, in terms of diversity and mobilization profile of V β families, its immune status, and the probable origin of T cells.

Disturbances in the TCRV β repertoire diversity are observed in HIV solely infected patients at the acute phase of the infection [28-29,31,37], perpetuating through chronic infection [31]. Here, VL/HIV co-infected patients

also suffered significant disturbances in the expansion or retraction of several V β -families, mainly during active and VL post-treatment phases, regardless of these are -R or -NR. Although different families were mobilized in both groups, the analysis of these disturbances by heatmap suggested a more homogeneous TCRV β repertoire on CD4⁺ T-cells, especially in the VL/HIV-NR cases. On the other hand, the TCRV β repertoire on CD8⁺ T-cells is extremely heterogeneous when assessed individually, since different V β -families were mobilized (expansions or retractions). These differential alterations were more intense among VL/HIV-R patients in accordance with the mobilization index obtained by heatmap. Indeed, major disturbances have been described in the CD8⁺ TCRV β repertoire, regardless of the clinical status, CD8⁺ and CD4⁺ T-cell counts, and viral load [38] in HIV-1 infection. On the other hand, the CD4⁺ TCRV β repertoire appears to be severely disturbed when it has low CD4 T-cell counts and high HIV viremia [38]. Considering that CD8⁺ T-cells are an important subpopulation for parasite control, we could infer that this intense disturbance on CD8⁺ T-cells repertoire may be related to the predisposition to VL relapses.

Although a characteristic TCRV β mobilization profile was not evidenced in both R and NR cases, it is noteworthy there were V β families highly mobilized in the early stages of the follow-up of VL/HIV-NR cases, which tended to retract at 12 mpt (V β 9 on CD4 T-cells; V β 18 on CD8 T-cells; V β 23/V β 13.1 in both CD8 and CD4 T-cells). This retraction could be related to the return to basal state of expression of V β families or even to a severe clonal exhaustion process. In this context, V β 3 was less mobilized in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in VL/HIV-R patients throughout the clinical follow-up, although it is a family that is usually increased

in Brazilian HIV-positive patients, either with or without ART [29]. Not only V β 3, but also other families were poorly mobilized among VL/HIV-R patients (as V β 9 and V β 18 on CD4 and CD8 T-cells, respectively), mainly in the VL active phase. Considering the continuous *Leishmania* stimulation in the scenario of VL/HIV co-infection, it is plausible to suppose that the exhaustion of primary immune resources may influence the effector immune response and therefore the occurrence of relapse episodes. The association between the mobilization of these families and parasitic control could not be addressed in this study. New approaches based on other study designs and using specific stimulations may clarify these questions.

Besides the gain in CD4 T lymphocytes, the reduction of the T-cell activation status was markedly observed in VL/HIV patients who achieved clinical remission after anti-leishmanial therapy [13]. Then, a possible relationship between the improvement of the immune status along with the replenishment of T lymphocytes pool (CD4⁺ T cells gain and TCRV β repertoire) on the profile of systemic inflammatory cytokine was addressed. In the present study, VL/HIV-NR group tended to reduce the plasmatic pro- and anti-inflammatory cytokine levels throughout the clinical follow-up. A cytokine storm has been associated with the severity of VL alone [9], with the worsening of the immune status and progression to AIDS in HIV-positive individuals [39] and it has also been associated with the presence of *Leishmania* in VL/HIV patients [7]. As in a vicious circle, this inflammatory status contributes to maintaining the high levels of cellular activation that, in turn, continuously compromises the general immune status of relapsing-VL/HIV patients, generating exhaustion and peripheral senescence and compromising central immune functions.

Despite the reduction of inflammatory status in VL/HIV NR patients, the high proportion of peripheral senescent T cells previously verified [13] indicates that these patients present an impairment of the T cell proliferative capacity. This raised the question about the origin of the newly T cells detected in the circulation of VL/HIV-NR patients, which prompted us to investigate the thymus participation in this process. Herein, for co-infected patients, the TREC copy numbers were low during the VL active phase, suggesting a thymic functional impairment in the renewal of the T-cell pool despite ART use and low or undetectable viral load in the majority of patients [13]. In fact, it is well described that thymic functionality is compromised in HIV-infected patients, especially in those without ART [20-21,32,40-41], since the virus has the ability to infect or at least to affect thymic stromal cells, T-lymphocyte progenitors and thymocytes, which results in lower production of new T-cells and impairs the immune reconstitution [42-43].

However, TREC copies in VL/HIV co-infected patients were lower than those seen in HIV-solely infected patients. This fact points out that not only residual HIV, but also *Leishmania* can be contributing to the enhancement of impaired thymic function in VL/HIV patients. Previous studies have shown that *Leishmania* can affect T-cell progenitors in the bone marrow and the thymic microenvironment [42-44], which may also favor the deficient thymic output. Additionally, as previously described, the parasite potentiates the immune activation degree [5,45], mainly in VL/HIV-R cases [13], which in turn may lead to thymic dysfunction.

More, interestingly this thymic output deficit seems to be more intense in those patients presenting VL relapses since they maintained low TREC levels

during all clinical setpoints of the clinical follow-up, whereas non-relapsing-VL/HIV patients recovered these values at 10 mpt. Considering that TREC copy numbers were accompanied by maintenance of low absolute CD4⁺ T-cell counts in relapsing-VL/HIV and correlated negatively with the number of relapses we may suggest that the thymic impairment may favor the loss of parasitic control and the VL recurrences. Future quantification of TREC copies in sorted CD4⁺ and CD8⁺ T-cells would be useful to define if the CD4⁺ T-cell counts recovery among non-relapsing cases is related to increased TREC copy numbers in this subpopulation [46].

To the best of our knowledge no other study has reported the degree of thymic output in VL/HIV coinfecting patients. Therefore, in the context of impaired thymic output along with TCRV β repertoire disturbances and intense inflammatory status, it is expected that relapsing-VL/HIV patients present a qualitative deficit in the effector cellular immune response, which in turn may predispose to VL relapses. Ongoing studies are evaluating the immune senescence degree in terms of proliferative capacity and cytokine production by these patients. Finally, this set of factors may culminate in a higher susceptibility to VL relapses among VL/HIV co-infected patients who have a deficient immune system by itself, but that with each relapse becomes increasingly unable to control the parasite.

Acknowledgments:

We thank the Dr. Daniel Douek, for kindly give the plasmids containing the TREC copies, the Dr. Elisângela Silva (UERJ and UFRJ), for helpful in the performance of the cytokines assay and Dr. Otacílio Moreira (IOC/FIOCRUZ-RJ), for helpful discussions about TREC results; We thank to all patients and volunteers that participate of this study.

References

1. Pagliano P, Esposito S. Visceral leishmaniosis in immunocompromised host: an update and literature review. *J Chemother* **2017**;29(5):261–6.
2. Lindoso JAL, Moreira CHV, Cunha MA, Queiroz IT. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: Current perspectives. *HIV/AIDS - Res Palliat Care* **2018**;10:193–201.
3. Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica da Leishmaniose visceral. Available at: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/leishvisceral-17-novo-layout.pdf%0Afile:///D:/IC/Pibic/leishvisceral-17-novo-layout.pdf>. Accessed 01 August 2019.
4. Andrade Paes AM, Santos FS, Neto MS, Fontoura VM, et al. Epidemiological, clinical and laboratory aspects of human visceral leishmaniasis (HVL) associated with human immunodeficiency virus (HIV) coinfection: a systematic review. *Parasitology* **2018**;145(14):1819–1819.
5. Santos-Oliveira JR, Giacoia-Gripp CBW, Alexandrino de Oliveira P, Amato VS, Lindoso JÂL, Goto H, et al. High levels of T lymphocyte activation in *Leishmania*-HIV-1 co-infected individuals despite low HIV viral load. *BMC Infect Dis* **2010**;10(1):358.
6. Santos-Oliveira JR, Regis EG, Leal CRB, Cunha R V., Bozza PT, Da-Cruz AM. Evidence That Lipopolisaccharide May Contribute to the Cytokine Storm and Cellular Activation in Patients with Visceral Leishmaniasis. Carvalho EM, editor. *PLoS Negl Trop Dis* **2011**;5(7):e1198.

7. Santos-Oliveira JR, Regis EG, Giacoia-Gripp CBW, Valverde JG, Alexandrino-De-Oliveira P, Lindoso JÂL, et al. Microbial translocation induces an intense proinflammatory response in patients with visceral leishmaniasis and HIV type 1 coinfection. *J Infect Dis* **2013**;208:57–66.
8. Costa CHN, Werneck GL, Costa DL, Holanda TA, Aguiar GB, Carvalho AS, et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. *Rev Soc Bras Med Trop* **2010**;43(4):386–92.
9. Costa DL, Rocha RL, Carvalho RMA, Lima-Neto AS, Harhay MO, Costa CHN, et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathog Glob Health* **2013**;107(2):78–87.
10. Dayakar A, Chandrasekaran S, Kuchipudi S V., Kalangi SK. Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. *Front Immunol* **2019**;10(APR):670.
11. Silva RLL, Santos MB, Almeida PLS, Barros TS, Magalhães L, Cazzaniga RA, et al. sCD163 levels as a biomarker of disease severity in leprosy and visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* **2017**;11(3):1–13.
12. Cunha Fievez AM da, Silva-Freitas ML, Sousa A de Q, Santos-Oliveira JR, Da-Cruz AM. Lower levels of leptin are associated with severity parameters in visceral leishmaniasis patients. *PLoS One* **2019**;14(3):1–15.
13. Silva-Freitas ML, Cota GF, Machado-De-Assis TS, Giacoia-Gripp C, Rabello A, Da-Cruz AM, et al. Immune activation and bacterial

- translocation: A link between impaired immune recovery and frequent visceral leishmaniasis relapses in HIV-infected patients. *PLoS One* **2016**;11(12):1–18.
14. Cota GF, de Sousa MR, de Assis TSM, Pinto BF, Rabello A. Exploring prognosis in chronic relapsing visceral leishmaniasis among HIV-infected patients: Circulating *Leishmania* DNA. *Acta Trop* **2017**;172(December 2016):186–91.
 15. Douek DC, Koup R a, McFarland RD, Sullivan JL, Luzuriaga K. Effect of HIV on thymic function before and after antiretroviral therapy in children. *J Infect Dis* **2000**;181(4):1479–82.
 16. Appay V, Almeida JR, Sauce D, Autran B, Papagno L. Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. *Exp Gerontol* **2007**;42:432–7.
 17. Sokoya T, Steel HC, Nieuwoudt M, Rossouw TM. HIV as a Cause of Immune Activation and Immunosenescence. *Mediators Inflamm* **2017**;2017(II):1–16.
 18. Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog* **2006**;2(6):0472–83.
 19. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage E a, Massey JM, Haynes BF, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* **1998**;396(6712):690–5.
 20. Ferrando-Martinez S, De Pablo-Bernal RS, De Luna-Romero M, De Ory SJ, Genebat M, Pacheco YM, et al. Thymic function failure is associated with human immunodeficiency virus disease progression. *Clin Infect Dis* **2017**;64(9):1191–7.

21. Rb-Silva R, Nobrega C, Azevedo C, Athayde E, Canto-Gomes J, Ferreira I, et al. Thymic Function as a Predictor of Immune Recovery in Chronically HIV-Infected Patients Initiating Antiretroviral Therapy. *Front Immunol* **2019**;10(FEB):1–13.
22. Salameire D, Solly F, Fabre B, Lefebvre C, Chauvet M, Gressin R, et al. Accurate detection of the tumor clone in peripheral T-cell lymphoma biopsies by flow cytometric analysis of TCR-VB repertoire. *Mod Pathol* **2012**;25(9):1246–57.
23. Chang C-M, Hsu Y-W, Wong HS-C, Wei JC-C, Liu X, Liao H-T, et al. Characterization of T-Cell Receptor Repertoire in Patients with Rheumatoid Arthritis Receiving Biologic Therapies. *Dis Markers* **2019**;2019:1–12.
24. Plasilova M, Risitano A, Maciejewski JP. Application of the molecular analysis of the T-cell receptor repertoire in the study of immune-mediated hematologic diseases. *Hematology* **2003**;8(3):173–81.
25. Costa RP, Gollob KJ, Fonseca LL, Rocha MOC, Chaves ACL, Medrano-Mercado N, et al. T-cell repertoire analysis in acute and chronic human Chagas' disease: Differential frequencies of V β 5 expressing T cells. *Scand J Immunol* **2000**;51(5):511–9.
26. Ferraz R, Cunha CF, Pimentel MI, Lyra MR, Schubach AO, de Mendonça SCF, et al. T-cell receptor V β repertoire of CD8+ T-lymphocyte subpopulations in cutaneous leishmaniasis patients from the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2015**;110(5):596–605.

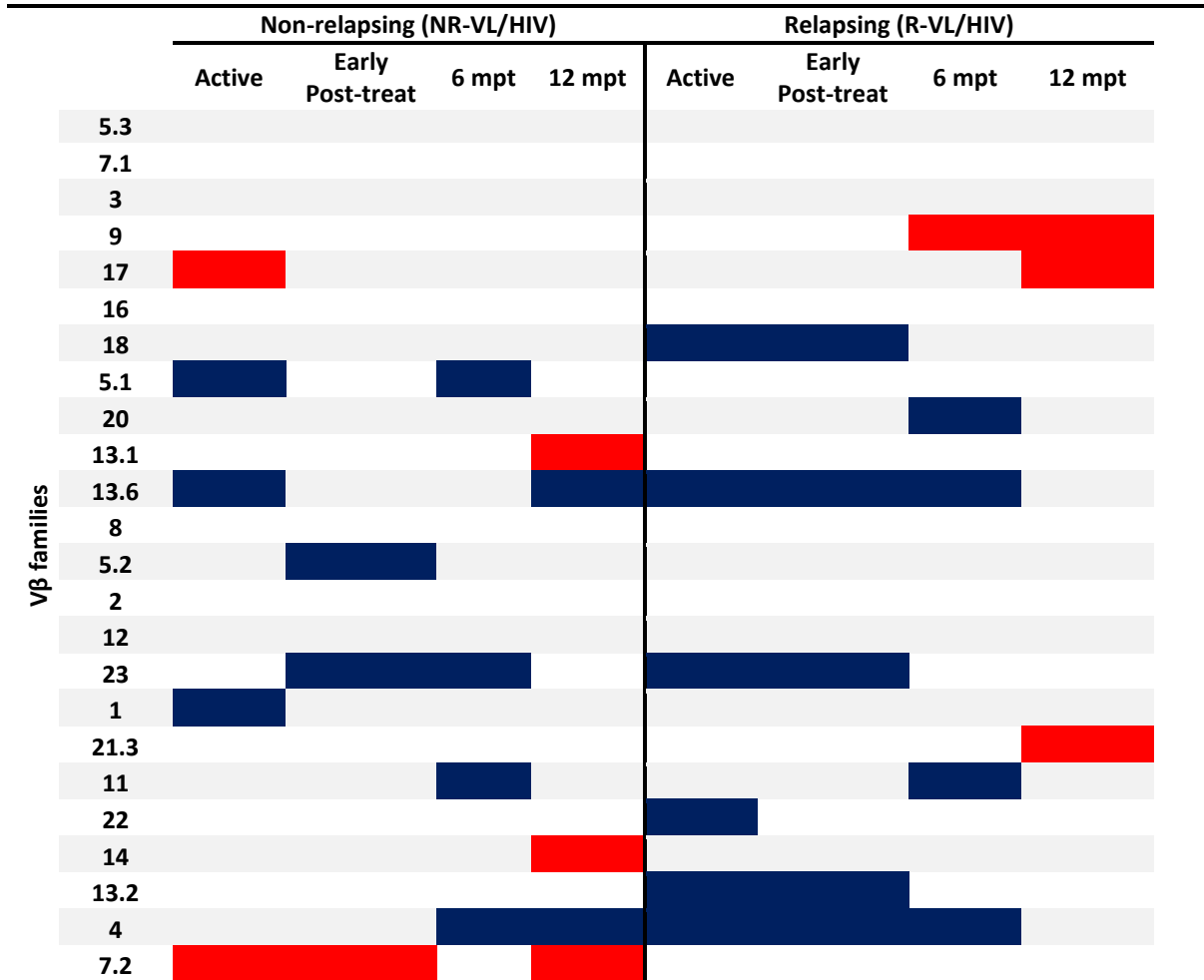
27. Clarencio J, de Oliveira CI, Bomfim G, Pompeu MM, Teixeira MJ, Barbosa TC, et al. Characterization of the T-Cell Receptor V Repertoire in the Human Immune Response against *Leishmania* Parasites. *Infect Immun* **2006**;74(8):4757–65.
28. Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyns H, Graziosi C, Denis F, Adelsberger JW, et al. Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V β usage during the primary immune response to HIV. *Nature* **1994**;370(6489):463–7.
29. Giacoia-Gripp CBW, Neves I, Galhardo MC, Morgado MG. Flow Cytometry Evaluation of the T-Cell ReceptorV? Repertoire Among HIV-1 Infected Individuals Before and After Antiretroviral Therapy. *J Clin Immunol* **2005**;25(2):116–26.
30. Hernández DM, Valderrama S, Gualtero S, Hernández C, López M, Herrera MV, et al. Loss of T-cell multifunctionality and TCR-V β repertoire against Epstein-Barr virus is associated with worse prognosis and clinical parameters in HIV+ patients. *Front Immunol* **2018**;9(OCT):1–15.
31. Heather JM, Best K, Oakes T, Gray ER, Roe JK, Thomas N, et al. Dynamic perturbations of the T-Cell receptor repertoire in chronic HIV infection and following antiretroviral therapy. *Front Immunol* **2016**;6(JAN):1–15.
32. Zicari S, Sessa L, Cotugno N, Ruggiero A, Morrocchi E, Concato C, et al. Immune Activation, Inflammation, and Non-AIDS Co-Morbidities in HIV-Infected Patients under Long-Term ART. *Viruses* **2019**;11(3):200.
33. Furler RL, Newcombe KL, Del Rio Estrada PM, Reyes-Terán G, Uittenbogaart CH, Nixon DF. Histoarchitectural Deterioration of Lymphoid

- Tissues in HIV-1 Infection and in Aging. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2019**;1–37.
34. Losada-Barragán M, Umaña-Pérez A, Cuervo-Escobar S, Berbert LR, Porrozzì R, Morgado FN, et al. Protein malnutrition promotes dysregulation of molecules involved in T cell migration in the thymus of mice infected with *Leishmania infantum*. *Sci Rep* **2017**;7(1):45991.
34. Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento de Pacientes com a Coinfecção *Leishmania*-HIV. **2011**. Available at: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_pacientes_leishmania.pdf
35. Cota GF, de Sousa MR, de Mendonça ALP, Patrocínio A, Assunção LS, de Faria SR, et al. *Leishmania*-HIV Co-infection: Clinical Presentation and Outcomes in an Urban Area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* **2014**;8(4):2–8.
36. Yin L, Zhong CK, Rodriguez C, Hou W, Goodenow MM, Sleasman JW. Antiretroviral therapy restores diversity in the T-cell receptor V β repertoire of CD4 T-cell subpopulations among human immunodeficiency virus type 1-infected children and adolescents. *Clin Vaccine Immunol* **2009**;16(9):1293–301.
37. Gorochov G, Neumann AU, Kereveur A, Parizot C, Li T, Katlama C, et al. Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy. *Nat Med* **1998** Feb;4(2):215–21.

38. Leeansyah E, Malone DFG, Anthony DD, Sandberg JK. Soluble biomarkers of HIV transmission, disease progression and comorbidities. *Curr Opin HIV AIDS* **2013** Mar;8(2):117–24.
39. Rosado-Sánchez I, Herrero-Fernández I, Genebat M, Ruiz-Mateos E, Leal M, Pacheco YM. Thymic Function Impacts the Peripheral CD4/CD8 Ratio of HIV-Infected Subjects. *Clin Infect Dis* **2017**;64(2):152–8
40. De Voeght A, Martens H, Renard C, Vaira D, Debruche M, Simonet J, et al. Exploring the link between innate immune activation and thymic function by measuring sCD14 and TRECs in HIV patients living in Belgium. *PLoS One* **2017**;12(10):1–11.
41. Savino W, Dardenne M, Marche C, Trophilme D, Dupuy JM, Pekovic D, et al. Thymic epithelium in AIDS. An immunohistologic study. *Am J Pathol* **1986**;122(2):302–7.
42. Ye P, Kirschner D, Kourtis A. The Thymus During HIV Disease: Role in Pathogenesis and in Immune Recovery. *Curr HIV Res* **2004**;2(2):177–83.
43. Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Lepletier A, Dardenne M. Hormonal control of T-cell development in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* **2016**;12(2):77–89.
44. Cuervo-Escobar S, Losada-Barragán M, Umaña-Pérez A, Porrozzi R, Saboia-Vahia L, Miranda LHM, et al. T-Cell Populations and Cytokine Expression Are Impaired in Thymus and Spleen of Protein Malnourished BALB/c Mice Infected with *Leishmania infantum*. Stager S, editor. *PLoS One* **2014**;9(12):e114584.

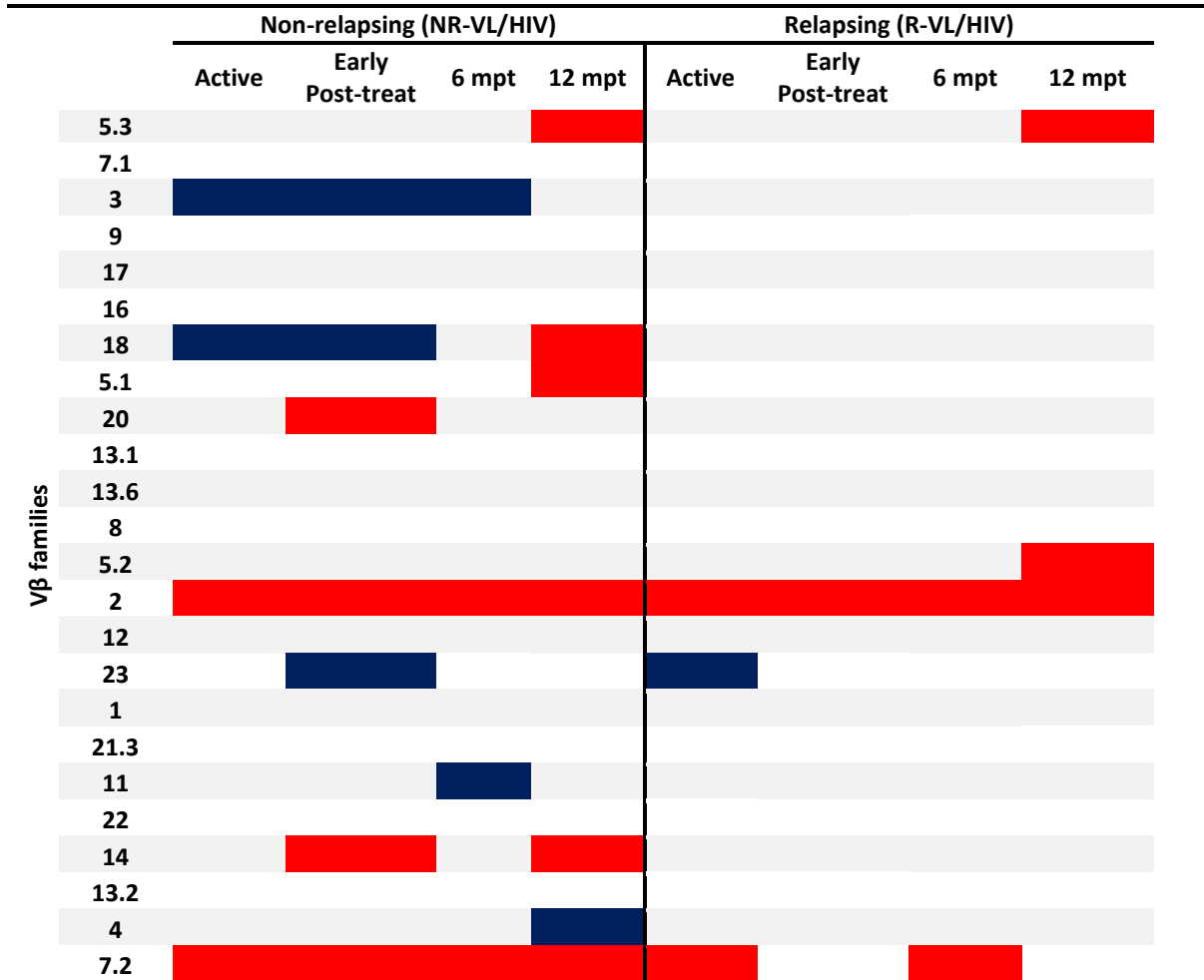
45. Kumar P, Misra P, Thakur CP, Saurabh A, Rishi N, Mitra DK. T cell suppression in the bone marrow of visceral leishmaniasis patients: impact of parasite load. *Clin Exp Immunol* **2018**;191(3):318–27.
46. Losada-Barragán M, Umaña-Pérez A, Durães J, Cuervo-Escobar S, Rodríguez-Vega A, Ribeiro-Gomes FL, et al. Thymic Microenvironment Is Modified by Malnutrition and *Leishmania infantum* Infection. *Front Cell Infect Microbiol* **2019**;9(July):1–19.
47. Casado JL, Abad-Fernández M, Moreno S, Pérez-Elías MJ, Moreno a, Bernardino JI, et al. Visceral leishmaniasis as an independent cause of high immune activation, T-cell senescence, and lack of immune recovery in virologically suppressed HIV-1-coinfected patients. *HIV Med* **2015**;16(4):240–8.
48. Sempowski GD, Haynes BF. Immune Reconstitution in Patients with HIV Infection. *Annu Rev Med* **2002**;53(1):269–84.

Table 2. Differences in the CD4⁺ T-cell V β repertoire mobilization profile of relapsing and non-relapsing visceral leishmaniasis (VL)/HIV-co-infected patients.



* V β families up-expressed (■) or down-expressed (■) in CD4⁺ T cells in comparison to healthy subjects. **VL/HIV** (patients with visceral leishmaniasis co-infected by HIV); **Active** (VL active phase); **Early Post-treat** (immediately after anti-*Leishmania* post-treatment); **6 mpt** (six months post-treatment); **12 mpt** (12 months post-treatment); **mpt** (months post treatment).

Table 3. Differences in the CD8⁺ T-cell V β repertoire mobilization profile of relapsing and non-relapsing visceral leishmaniasis (VL)/HIV-co-infected patients.



* V β families up-expressed (■) or down-expressed (■) in CD8⁺ T cells in comparison to healthy subjects. **VL/HIV** (patients with visceral leishmaniasis co-infected by HIV); **Active** (VL active phase); **Early Post-treat** (immediately after anti-*Leishmania* post-treatment); **6 mpt** (six months post-treatment); **12 mpt** (12 months post-treatment); **mpt** (months post treatment).

Figure legends

Figure 1: Percentages of the V β families on CD4⁺ T lymphocytes among non-relapsing (NR) and relapsing(R) visceral leishmaniasis (VL)/HIV-coinfected patients. The mobilization percentages of V β 3 (A), V β 9 (B), V β 8 (C), V β 23 (D) and V β 18 (E) in VL/HIV-NR coinfected patients in comparison to VL/HIV-R group. VL/HIV-NR (patients with visceral leishmaniasis coinfected by HIV – Non-relapsing); VL/HIV-R (patients with visceral leishmaniasis coinfected by HIV - Relapsing); HS (Healthy subjects). The blue asterisk represents the statistical differences in relation to HS. *p<0.05 **p<0.005.

Figure 2: Percentages of the V β families on CD8⁺ T lymphocytes among non-relapsing (NR) and relapsing (R) visceral leishmaniasis/HIV-coinfected patients. The mobilization percentages of V β 3 (A), V β 18 (B), V β 5.2 (C), V β 23 (D) and V β 11 (E) in VL/HIV-NR coinfected patients in comparison to VL/HIV-R group. VL/HIV-NR (patients with visceral leishmaniasis coinfected by HIV – Non-relapsing); VL/HIV-R (patients with visceral leishmaniasis coinfected by HIV - Relapsing); HS (Healthy subjects). The blue asterisk represents the statistical differences in relation to HS. *p<0.05 **p<0.005.

Figure 3: Individual pattern of V β repertoire mobilization on CD4⁺ and CD8⁺ T cells of the visceral leishmaniasis (VL)/HIV-co-infected patients during all the follow-up by heatmap analysis. To this analysis, the mobilization index was calculated so that the percentage of a given V β family presented by each VL/HIV patient was divided by mobilization mean of this V β family presented by healthy subjects. Each V β family is demonstrated in the line (n=24) and each VL/HIV patient is represented in the column (NR- 1 to 5; R- 1 to 8) during all phases of follow-up (A, P, 6 and 12). The V β families were

clustered in accordance with the similarity, using appropriate distance and clustering methods. The red and green scales represent a lower and higher mobilization index, respectively, of a given V β family on CD4⁺ T (A) and CD8⁺ T (B) cells for each VL/HIV patient seen individually. -NR (patients with visceral leishmaniasis coinfecting by HIV – Non-relapsing); -R (patients with visceral leishmaniasis coinfecting by HIV - Relapsing); Active phase (A); Post-treatment (P); 6 months post-treatment (6; 6 mpt); 12 months post-treatment (12; 12 mpt).

Figure 4: Anti- and pro-inflammatory cytokines levels and parasite load of the non-relapsing and relapsing-visceral leishmaniasis (VL)/HIV-co-infected patients during clinical follow-up. Plasma cytokine levels of IL-8 (A), TNF (B), IFN- γ (C) and IL-8 (D) and the parasite load (F) in VL/HIV-NR and -R coinfecting patients in the active phase, post-treatment, 6mpt and 12mpt. The cytokines results were represented in Median Fluorescence Intensity (MFI). The cytokine levels were assessed by Luminex assay and the parasite load quantification by qPCR. Each point represents a VL/HIV co-infected patient and each color represents the same patient in the different phases of the follow-up. Post-treat (post-treatment); 6 mpt (6 months post-treatment); 12 mpt (12 months post-treatment). *p<0.05 **p<0.005.

Figure 5: Number of T cell receptor excision circles (TREC) copies/10⁶ PBMC in visceral leishmaniasis (VL)/HIV-co-infected patients during the prospective follow-up and its correlation with VL relapses. TREC copy numbers in the VL/HIV-coinfected patients group (A) and TRECS copy numbers in non-relapsing (NR) and relapsing group (B). The number of TREC copies was evaluated from 5x10⁶ cells/mL obtained of the peripheral blood of all VL/HIV co-infected patients in the active, early post-treatment and 10 mpt

phases, as well as HIV mono-infected patients and healthy subjects. Negative correlation (C) between the number of TREC copies at 10 mpt and the total numbers of relapses presented by VL/HIV patients (Spearman correlation, $r = -0.567$; $p < 0.05$). The green and red colors represent the VL/HIV-NR and -R patients, respectively. The dashed lines represent the median of TREC copies/ 10^6 PBMC (A and B) of the HIV mono-infected patients and HS. Each point represents a patient and each color represents the same patient in the different phases of follow-up. NR (Non-relapsing); R (Relapsing); HS (Healthy Subjects); CHIV (HIV mono-infected controls). 10 mpt (10 months post-treatment). * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$ *** $p < 0.0005$.

Supplementary Figure 1: Percentages of T-cell receptor $V\beta$ families among non-relapsing (NR) and relapsing(R) visceral leishmaniasis (VL)/HIV patients during the active VL and 12 months post treatment.

Mobilization levels of the 24 $V\beta$ families in VL/HIV-NR and -R patients in the active phase (A and C) and 12 mpt (B and D). This evaluation was performed in accordance with the literature to indicate the families that were less (<1%) and more (>5%) mobilized by $CD4^+$ (A and B) and $CD8^+$ (C and D) T-cell $V\beta$ repertoire. These mobilization limits (1% and 5%) were represented by dashed lines. The asterisks point to the significant differences for higher (blue) and lower (red) mobilization in the VL/HIV groups in relation to Health subjects. VL/HIV-NR (patients with visceral leishmaniasis coinfecting by HIV – Non-relapsing); VL/HIV-R (patients with visceral leishmaniasis coinfecting by HIV - Relapsing); 12 mpt (12 months post-treatment). * $p < 0.05$

Supplementary Figure 2: Mobilization profile of $CD4^+$ TCR $V\beta$ repertoire presented by non-relapsing (NR) and relapsing(R) visceral leishmaniasis

(VL)/HIV patients during clinical follow-up. The percentages of the other 19 V β families that makes up the CD4⁺ T-cell repertoire were evaluated in the VL/HIV coinfecting patients during clinical follow-up and in HS. VL/HIV-NR (patients with visceral leishmaniasis coinfecting by HIV – Non-relapsing); VL/HIV-R (patients with visceral leishmaniasis coinfecting by HIV - Relapsing); HS (Healthy subjects). The blue asterisk represents the difference statistical in relation to HS. *p<0.05

Supplementary Figure 3: Mobilization profile of CD8⁺ TCRV β repertoire presented by non-relapsing (NR) and relapsing (R) visceral leishmaniasis (VL)/HIV patients during clinical follow-up. The percentages of the other 19 V β families that makes up the CD8⁺ T-cell repertoire were evaluated in the VL/HIV coinfecting patients during clinical follow-up and in HS. VL/HIV-NR (patients with visceral leishmaniasis coinfecting by HIV – Non-relapsing); VL/HIV-R (patients with visceral leishmaniasis coinfecting by HIV - Relapsing); HS (healthy subjects). The blue asterisk represents the difference statistical in relation to HS. *p<0.05 **p<0.005

Supplementary Figure 4: Anti- and pro-inflammatory cytokines and chemokines levels of the visceral leishmaniasis (VL)/HIV co-infected patients during clinical follow-up. Levels of IL-1 β (A), IL-2 (B), IL-17 (C), MCP-1 (D), MIP-1 β (E), IL-13 (F) and IL-4 (G) in VL/HIV-NR and –R coinfecting patients throughout clinical follow-up. The results were represented as Median Fluorescence Intensity (MFI). Each point represents a VL/HIV coinfecting patient and each color represents the same patient in the different phases of the follow-up. Post-treat (post-treatment); 6 mpt (6 months post-treatment); 12 mpt (12

months post-treatment). The measure of these soluble factors was performed by Luminex assay. * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$.

Figure 1

[Click here to access/download;Figure;Figure1_](#)

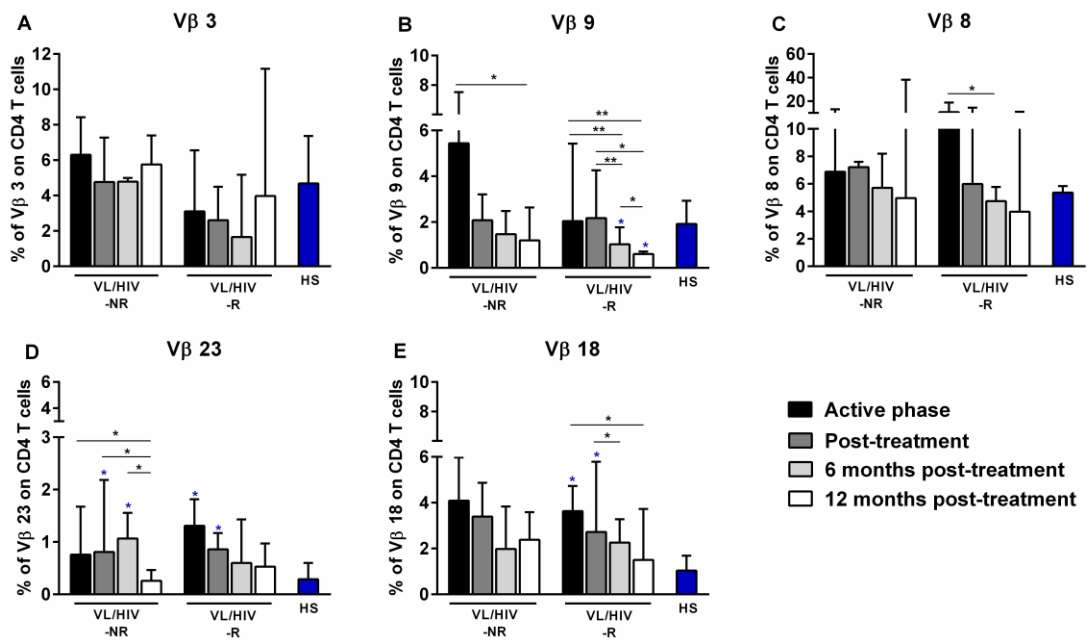


Figure 2

[Click here to access/download;Figure;Figure2_](#)

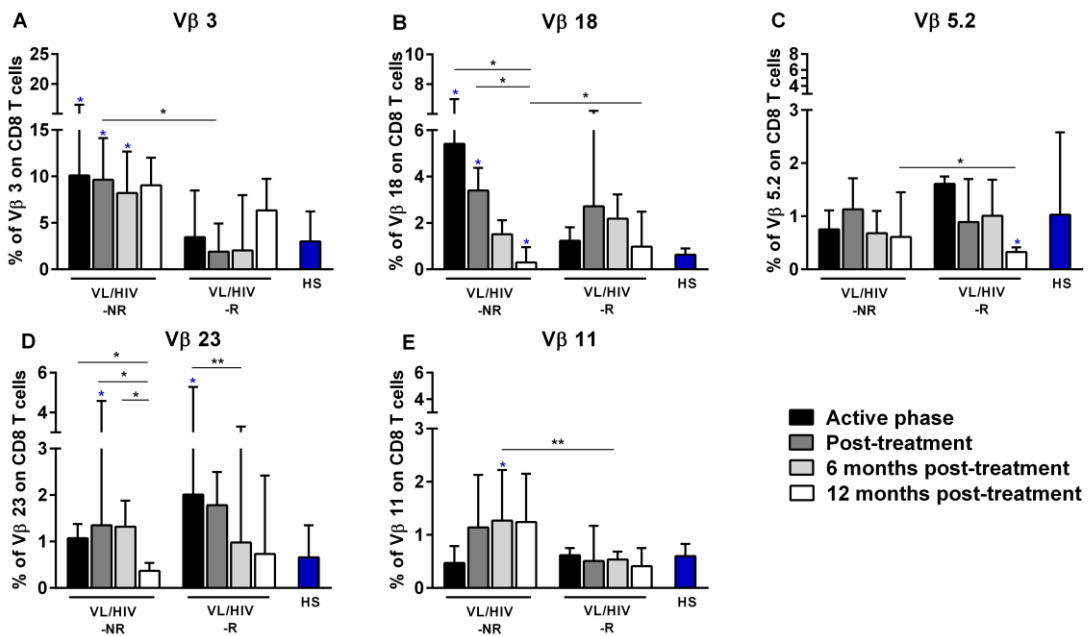


Figure 3

[Click here to access/download;Figure;Figure3](#)

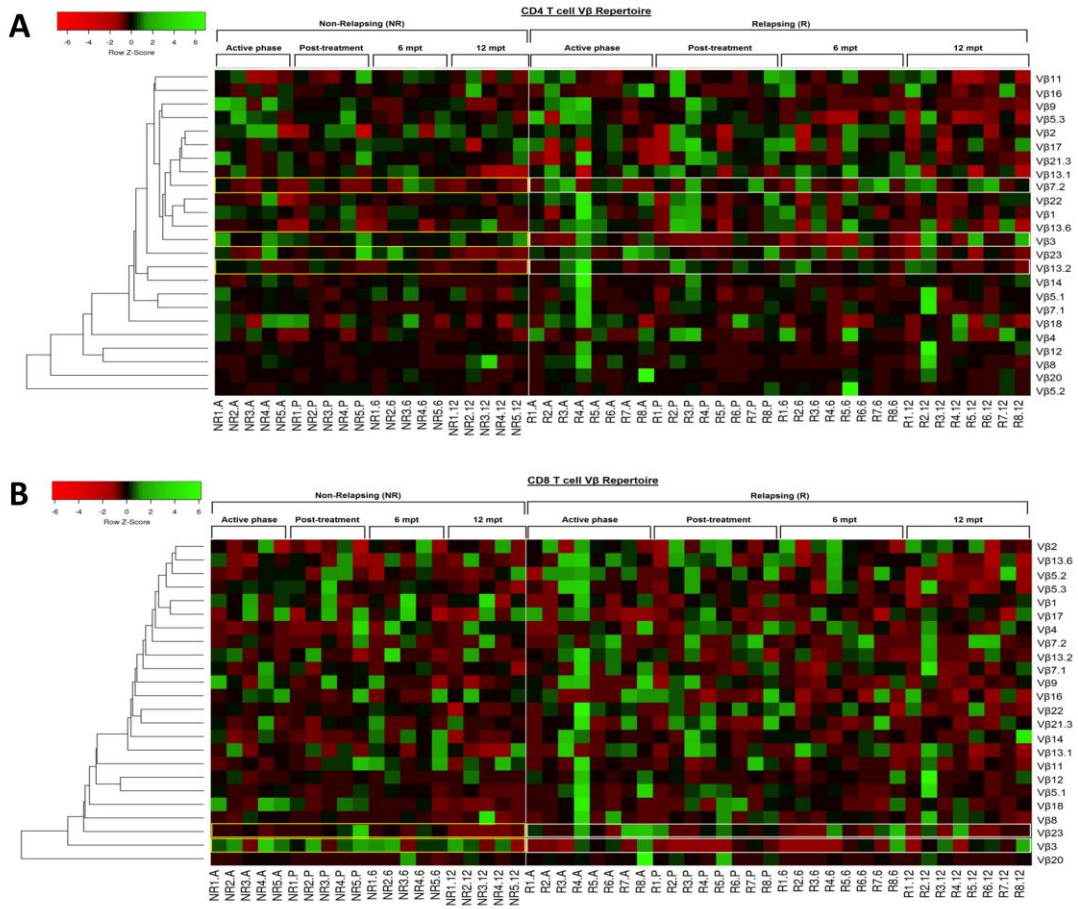
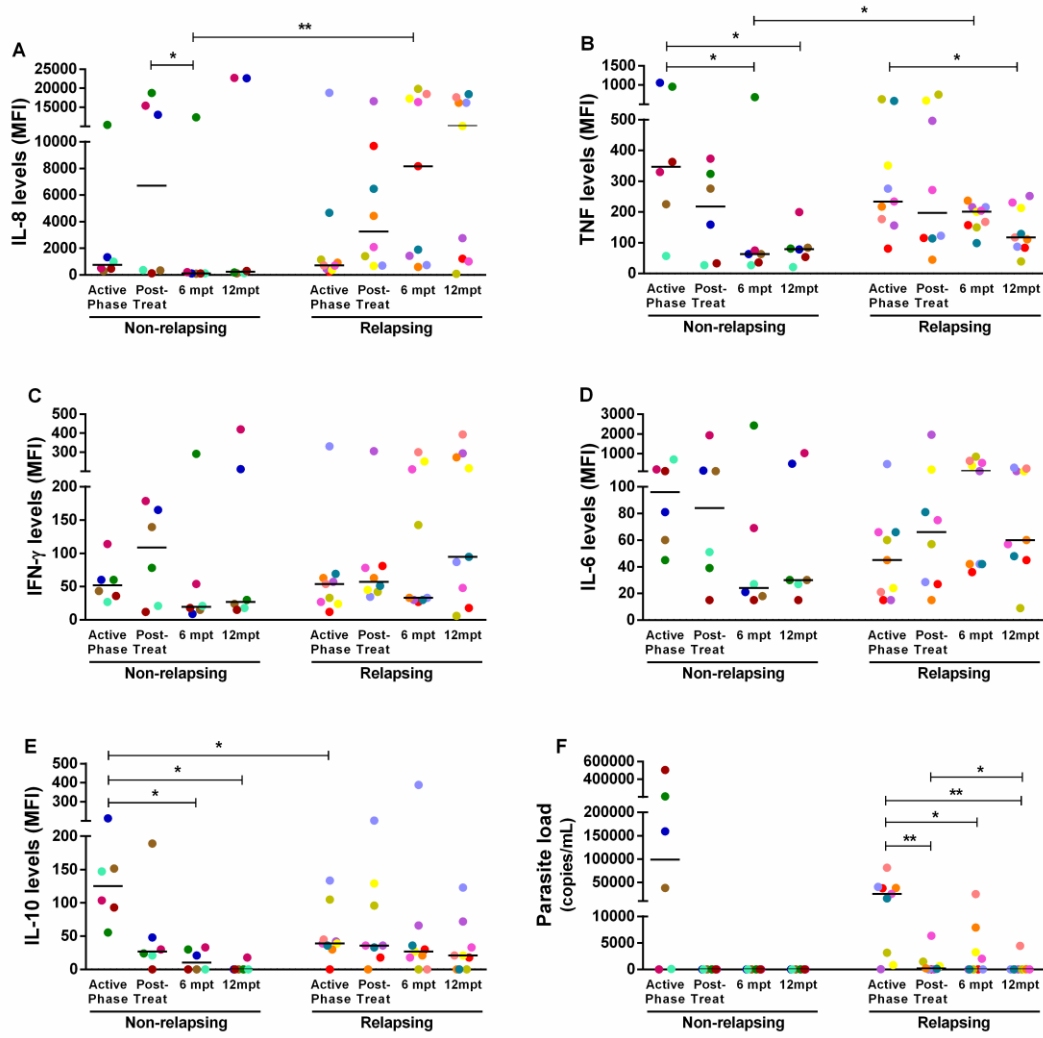
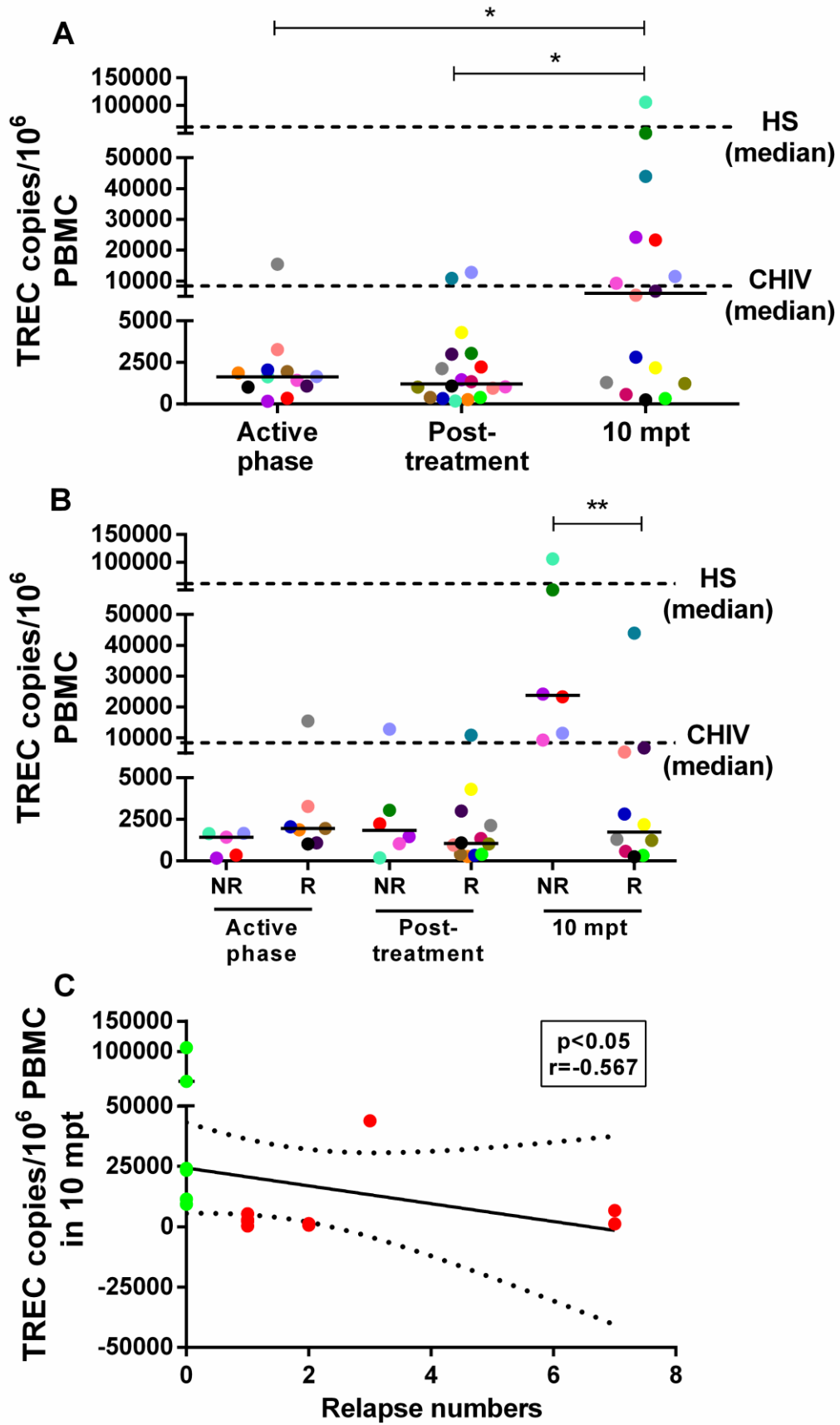


Figure 4

[Click here to access/download;Figure;Figure4_](#)





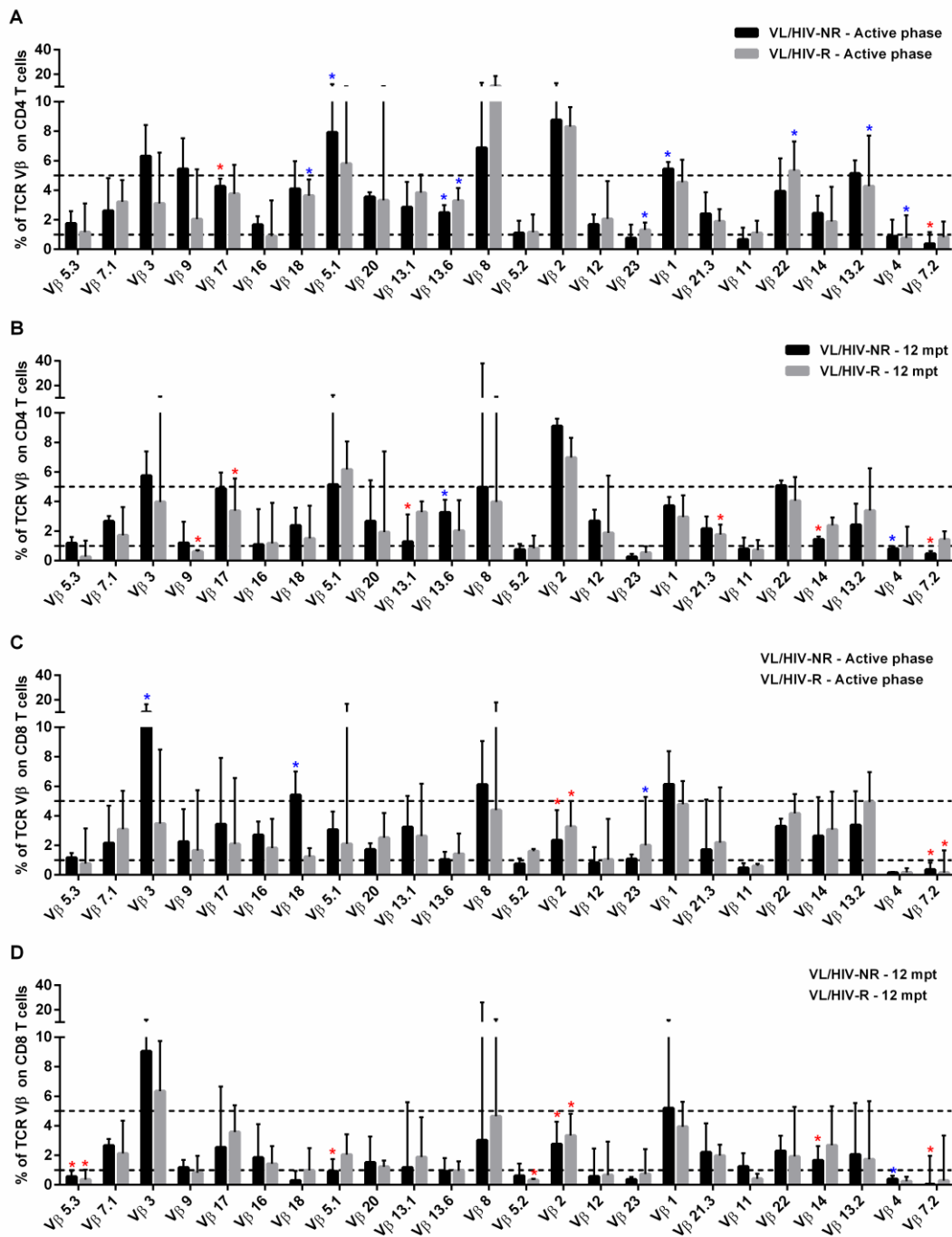


Figure S2

[Click here to access/download;Figure;FigureS2_CD4.tif](#)

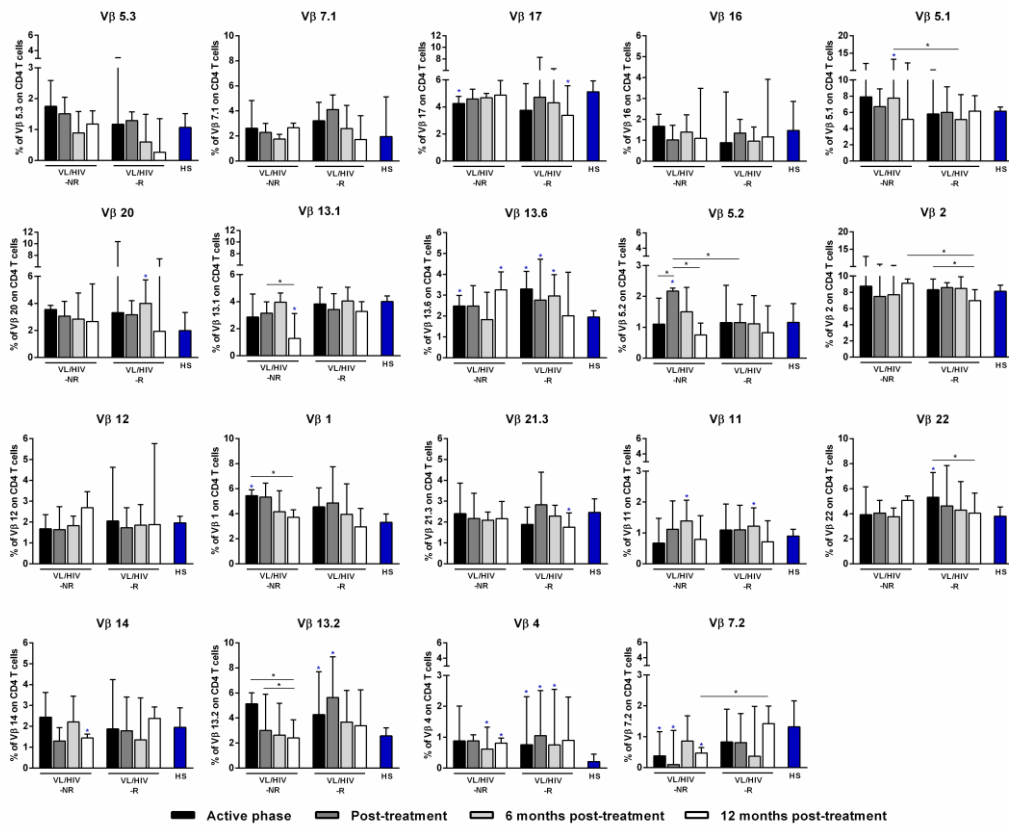


Figure S3

[Click here to access/download;Figure;FigureS3_CD8.tif](#)

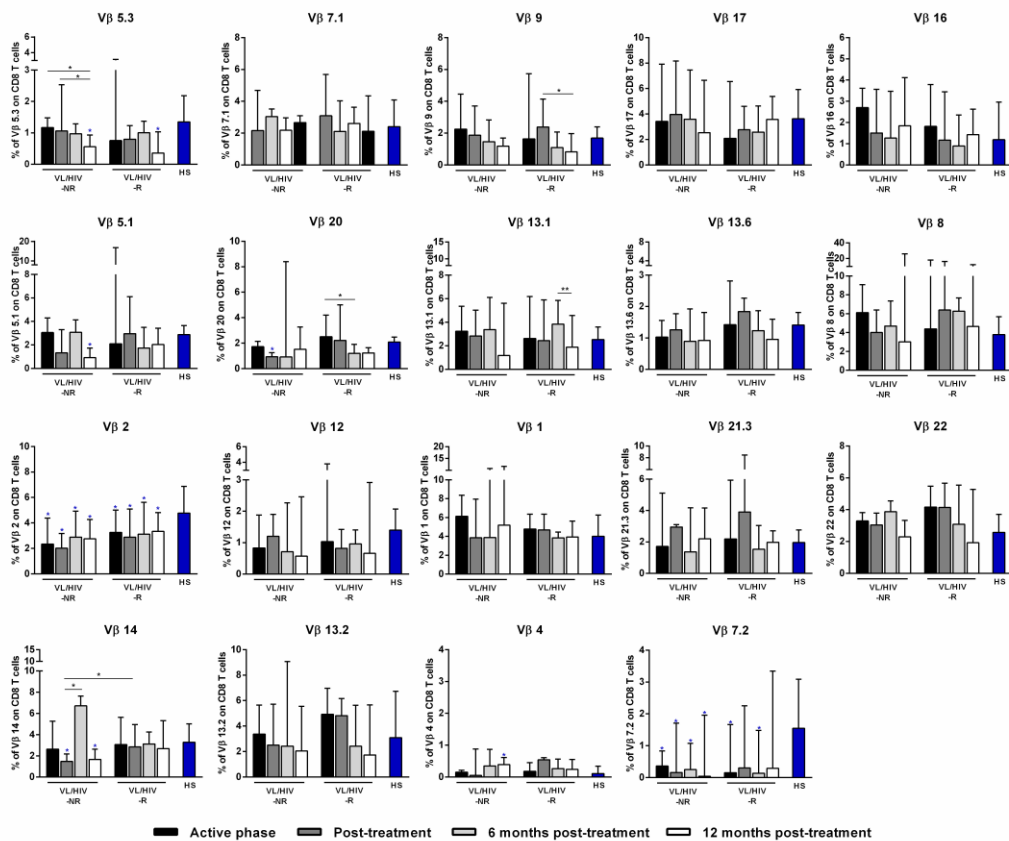
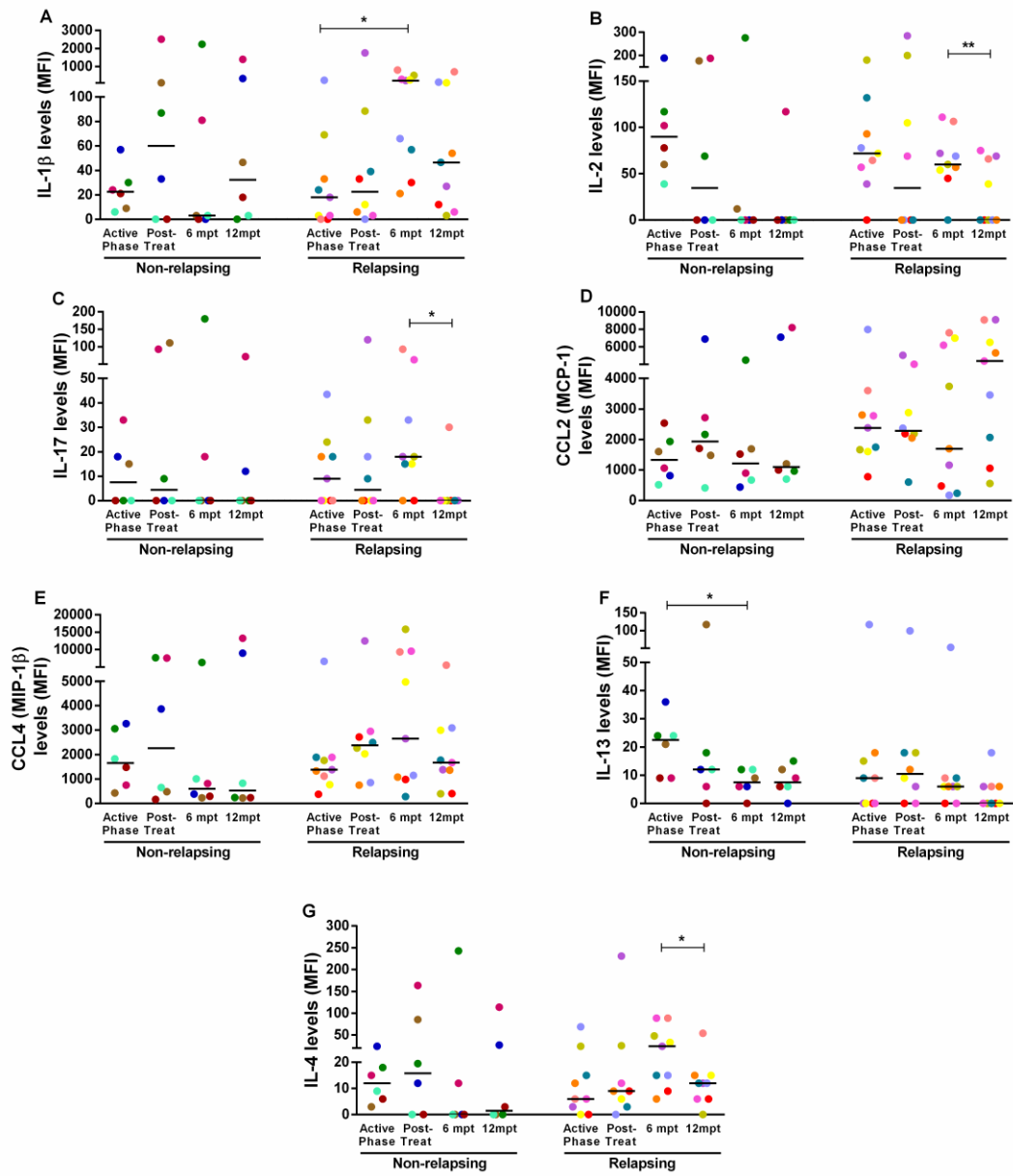


Figure S4

[Click here to access/download;Figure;FigureS4.tif](#)



Capítulo 2

5. APÊNDICE DE RESULTADOS: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL COINFECTADOS PELO HIV-1 (LV/HIV-1).

5.1 Justificativa

Até então, o que se conhece sobre a imunopatogênese da coinfeção LV/HIV se refere, sobretudo, à resposta de linfócitos T. O papel da ativação de células B na associação *Leishmania*/HIV ainda não está totalmente esclarecido. Na LV humana, a presença de uma hipergamaglobulinemia específica ou não aos antígenos do parasito, decorrente de uma ativação policlonal de células B está bem estabelecida e se constitui em uma característica intrínseca da doença (Goto & Lindoso, 2004; Deak et al. 2010; Gardinassi et al. 2014). Entretanto, o real envolvimento dessas células ou das imunoglobulinas (Igs) na imunopatogênese da LV ainda é pobremente elucidado.

Apesar disso, nos últimos anos, estudos em LV humana, canina ou em modelos experimentais vêm apontando que a presença de células B ou a secreção de Igs podem contribuir para a progressão da doença. Dentre os mecanismos sugeridos estão a alta produção de IL-10 por células B com perfil imunorrregulador que modulam negativamente a resposta de células T (Andreani et al. 2016; Schaut et al. 2016), bem como a *downmodulação* da atividade de ROS por Igs circulantes, o que poderia influenciar na resposta efetora ao parasito (Srinontong et al. 2018). Além disso, o aumento da expressão de moléculas associadas à exaustão celular (PD-1, CTLA-4 e TIM-3) no microambiente esplênico também pode contribuir para a imunopatogênese da LV, por estar, possivelmente, relacionado à morte por apoptose e à falha no controle parasitário (Silva et al. 2012; de Souza et al. 2019).

De forma similar ao que acontece com o compartimento de células T, a infecção pelo HIV-1 tem sido caracterizada por uma hiperativação de células B devido à natureza crônica da infecção, definida por outros fatores além da hipergamaglobulinemia e da ativação policlonal de linfócitos B. Dentre eles estão a frequência elevada de células B ativadas, exaustas/senescentes e de plasmócitos, bem como altos níveis de citocinas inflamatórias (IFN- α , TNF, IL-6, IL-10) e fatores de crescimento, como o BAFF (*B-cell activating factor*), que

pertence a família de TNF e consiste em um fator de sobrevivência e maturação dessas células (Moir & Fauci, 2009; Borhis et al. 2017). Além disso, verifica-se frequências aumentadas de células B imaturas transicionais, as quais já foram associadas à intensa linfopenia de células T CD4⁺ induzida pelo vírus e também ao aumento dos níveis séricos de IL-7 que, por sua vez, pode induzir a proliferação de precursores de células B (Malaspina et al. 2006).

Após a introdução da cART, normalmente, ocorre a restauração das frequências dos subtipos de células B comprometidos durante a infecção crônica pelo HIV-1, exceto do *pool* de células B *resting* de memória (Moir et al. 2010; Pensieroso et al. 2013), apontando que outros mecanismos, além do vírus, podem impactar na disfunção dessas células, como a linfopenia de células T e o grau de ativação imune (Amu et al. 2014). Desta forma, tais estudos têm demonstrado a presença de outras subpopulações de células B e de alterações nesse compartimento no sangue periférico de pacientes infectados pelo HIV, os quais não estão normalmente presentes em indivíduos não infectados, e contribuem de forma importante para a progressão da doença.

No contexto da associação LV/HIV, ou mesmo na LV sozinha, o cenário de hiperativação de células B tem sido, basicamente, inferido pelos níveis elevados de Igs observados ao longo de um acompanhamento prospectivo (artigo 1). Nosso grupo demonstrou que pacientes LV/HIV apresentaram altos níveis de IgG, IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* durante a LV ativa. Entretanto, os pacientes LV/HIV-reativantes mantiveram tais níveis elevados mesmo nas fases posteriores ao tratamento anti-*Leishmania*, diferente dos pacientes LV/HIV-não-reativantes. Considerando que os níveis de Igs já sugerem uma relevante influência das células B nos diferentes desfechos clínicos da LV em pacientes LV/HIV (artigo 1), aliado aos estudos de hiperativação e disfunção dessas células na imunopatogênese da infecção pelo HIV-1 e, mais escassamente, da LV, torna-se importante avaliar o perfil de subpopulações de linfócitos B na associação LV/HIV. Nosso intuito é entender a influência dessas subpopulações na evolução clínica e prognóstico da LV em indivíduos coinfectados.

5.2 Casuística

Este estudo investigou uma coorte de 19 pacientes com leishmaniose visceral coinfectados com HIV-1, os quais estão sendo avaliados prospectivamente desde maio de 2018 até o período atual, até completarem o total de 12 meses de acompanhamento após o término do tratamento anti-*Leishmania*. Paralelamente, uma coorte de 15 pacientes com leishmaniose visceral sem HIV-1 está sendo avaliada de forma prospectiva a partir do mesmo período descrito para os coinfectados. Os dois grupos de pacientes são provenientes do Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte, Minas Gerais. Além disso, indivíduos sadios para ambas as infecções e sem outras doenças conhecidas, provenientes da mesma área endêmica (Belo Horizonte, MG) e do Rio de Janeiro, foram incluídos no estudo (n=11). Os pacientes e os voluntários que aceitaram participar deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, regido de acordo com as normas da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, MS (ANEXO A). Este projeto está vinculado ao protocolo “Avaliação prospectiva de parâmetros imunológicos aplicáveis ao monitoramento do curso clínico de pacientes co-infectados com leishmaniose visceral e HIV-1” submetido ao Comitê de Ética do IOC/Fiocruz e aprovado sob o número de CAEE: 68118117.3.1001.5248 (ANEXO B). O mesmo também foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética do Instituto René Rachou/FIOCRUZ Minas Gerais – IRR/CPqRR (CAEE: 68118117.3.3001.5091) e do Hospital Eduardo de Menezes de Belo Horizonte -HEM/FHEMIG (CAEE: 68118117.3.3002.5124) (ANEXO B).

Os pacientes receberam os tratamentos específicos para HIV/aids e LV preconizado pelo Ministério da Saúde e tiveram seu acompanhamento garantido (MS/PN-DST/AIDS, 2011). A primeira linha de tratamento da LV para pacientes infectados pelo HIV-1 foi a anfotericina B lipossomal (20 mg/Kg dose total) ou anfotericina B complexo lipídico (20 mg/Kg dose total), cuja dose total pode ser fracionada por, em média, 5 a 7 dias de tratamento. Para os casos recidivantes, a dose total liberada pelo Ministério da Saúde variou de 40 a 60 mg/kg. Após o tratamento da LV, para todos os pacientes LV/HIV que apresentavam contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ inferiores a 350

células/mm³ foi oferecida a profilaxia secundária com anfotericina B lipossomal (200 mg), quinzenalmente.

No que se refere ao diagnóstico da LV, este foi confirmado em todos os pacientes pelo exame parasitológico de aspirado de medula óssea (pesquisa direta de amastigotas de *L. infantum* e cultura em meio NNN - meio de Novy e McNeal modificado por Nicolle - ágar-sangue). O diagnóstico inicial da infecção pelo HIV-1 foi confirmatório quando os pacientes apresentaram os exames sorológicos ELISA e Western Blot positivos, conforme protocolo do Ministério da Saúde.

Os pacientes infectados pelo HIV-1, com sintomas clínicos e confirmação parasitológica de LV ativa foram incluídos no estudo apenas depois das considerações éticas serem aplicadas. O estudo foi de caráter longitudinal, sendo incluídos pacientes LV/HIV que apresentavam LV ativa, com ou sem (primodiagnóstico) uso prévio de cART. Os pacientes com LV sem HIV-1 também foram incluídos na fase ativa da doença. Todos os pacientes foram avaliados clínico-laboratorialmente e tiveram amostras biológicas obtidas nos seguintes períodos: fase ativa da LV, logo após o tratamento anti-*Leishmania* (pós-tratamento), 6 meses pós-tratamento (6 mpt) e 12 meses pós-tratamento (12 mpt), totalizando 4 visitas ambulatoriais. Visitas adicionais foram incluídas se o paciente apresentasse outro episódio ativo da LV, que configurasse uma recidiva da doença e, portanto, levasse a uma nova internação do mesmo.

Dessa forma, no decorrer do acompanhamento, a suspeita dos episódios de recidivas da LV baseou-se no reaparecimento ou piora de quaisquer sinais e sintomas da LV, de acordo com os seguintes critérios estabelecidos por Cota e colaboradores (2014): a) reemergência de episódios febris, e/ou b) aumento da esplenomegalia, e/ou c) agravamento da citopenia (redução de 50% ou mais das contagens de plaquetas ou leucócitos; diminuição de 2g% ou mais dos níveis de hemoglobina). Os casos de recidivas da LV foram, então, confirmados através de um teste parasitológico positivo (exame direto ou cultura) em espécime obtido pelo aspirado de medula óssea ou através da anamnese clínica. Tais critérios confirmatórios são determinantes

para o oferecimento da profilaxia secundária aos pacientes com LV sem HIV-1 que configurarem recidiva da doença pela terceira vez.

Finalmente, os pacientes LV/HIV foram separados em dois grupos distintos, conforme a evolução clínica no que se refere à recidiva e não recidiva da LV. Os pacientes LV/HIV ou com LV não-recidivantes sem HIV-1 (-NR; n=9 e 10, respectivamente) foram aqueles que não apresentaram nenhum episódio de LV durante todo o período de acompanhamento, e que tiveram um único episódio ativo de LV ao longo da vida. Por outro lado, os pacientes LV/HIV ou com LV recidivantes sem HIV-1 (-R; n=10 e 5, respectivamente) foram aqueles que apresentaram mais de um episódio ativo da doença, seja prévio à admissão do estudo ou durante o acompanhamento prospectivo.

5.3 Obtenção de amostras biológicas e estratégia metodológica

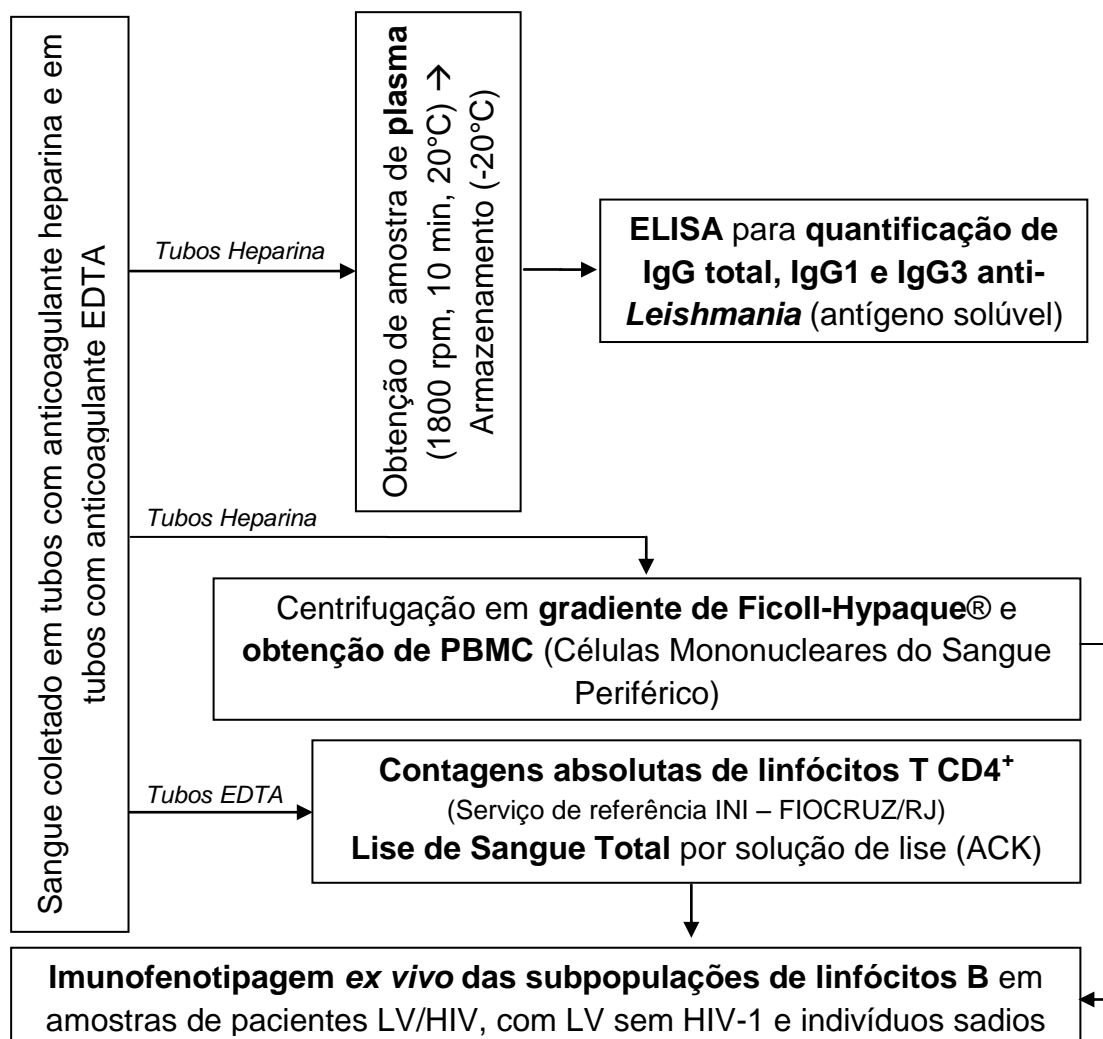


Tabela 1: Marcadores de superfície e fluorocromos utilizados para imunofenotipagem ex vivo de linfócitos B.

Painel fenotípico para caracterização das subpopulações de linfócitos B (adquiridos da BD Biosciences®)		Mouse anti-human
Viabilidade	Fixable Viability Stain 450 (FVS450)	
CD3	AlexaFluor-700	
CD19	APC-H7	
CD20	BB515	
CD21	PE	
CD27	BV510	
CD38	PE-Cy7	

5.4 Estratégia de análise citofluorimétrica

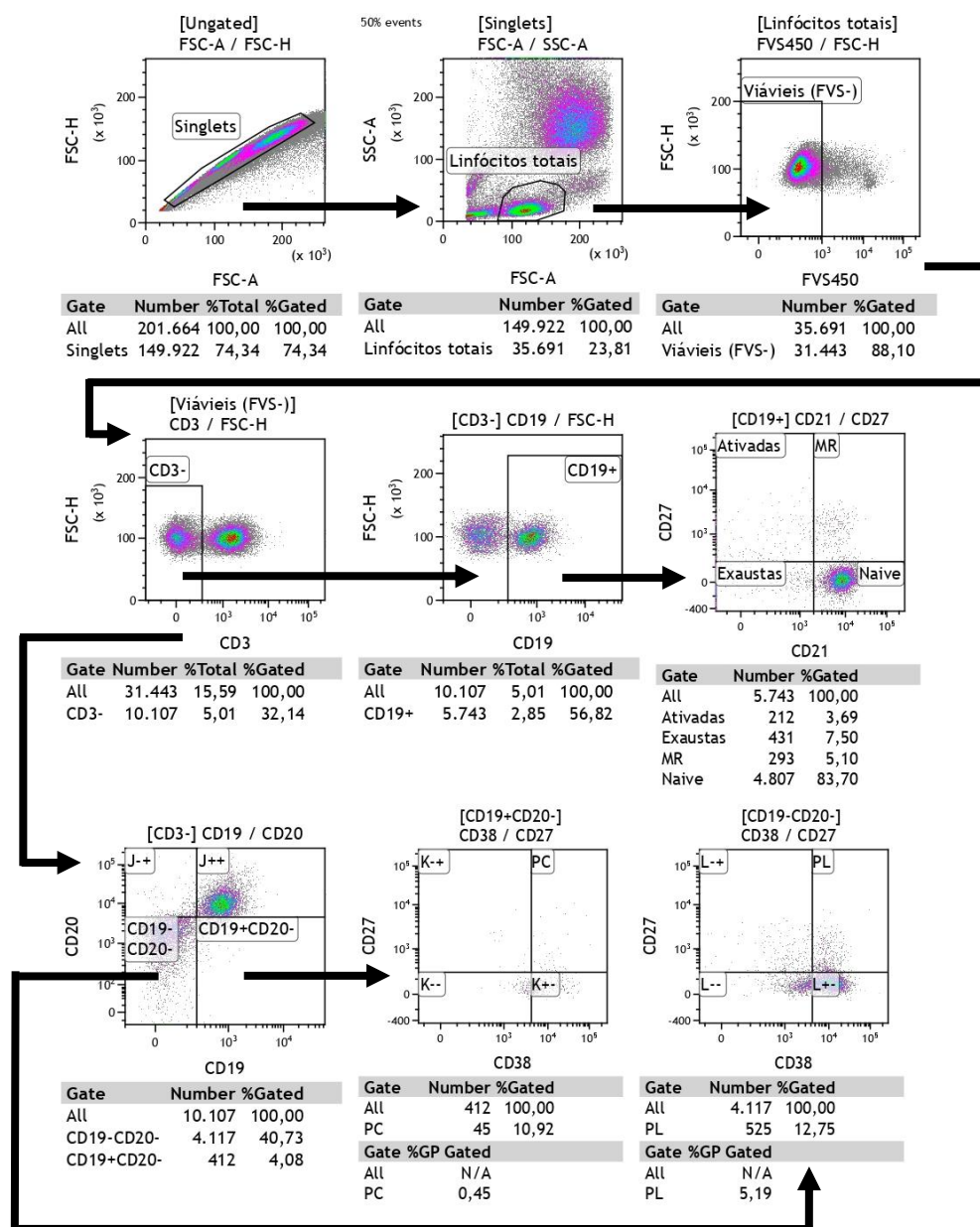


Figura 6: Estratégia de análise citofluorimétrica para obtenção das subpopulações de células B. As setas direcionam a estratégia que foi utilizada para a realização das gates de populações definidas pelas moléculas de anticorpos associadas aos fluorocromos (demonstrados na Tabela 1). As células CD3⁻CD19⁺ foram consideradas como os linfócitos B totais, a partir dos quais foram obtidos os percentuais de células B ativadas (CD27⁺CD21⁻), exaustas (CD27⁺CD21⁺), resting de memória (MR) (CD27⁺CD21⁺) e naive (CD27⁻CD21⁺). Para esses perfis, o percentual foi obtido a partir da gate “mãe” (% Gated). A partir da ausência da expressão de CD20 e presença ou ausência de CD19, foram obtidos os percentuais de plasmócitos de vida curta (PC) (CD38⁺CD27⁺) e vida longa (PL) (CD38⁺CD27⁻), respectivamente. Para essas subpopulações, o percentual foi obtido a partir da gate “avó” (%GP Gated - grandparent), que consistiu na gate CD3⁻, a qual era a gate em comum para as duas subpopulações, tornando possíveis suas comparações.

5.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism (version 6.0, San Diego, CA, USA). As comparações entre os dois grupos de pacientes coinfectados LV/HIV, controles LV sem HIV-1 e indivíduos sadios foram realizadas pelo teste não-pareado e não-paramétrico, *Mann-Whitney t-test*. Os testes pareados e não-paramétricos foram realizados usando o *Wilcoxon t-test*, quando os mesmos indivíduos foram comparados nas diferentes fases do acompanhamento. Quando três ou mais grupos foram comparados simultaneamente, foi utilizado o teste ANOVA (*Kruskal-Wallis test*) e o pós-teste de *Dunns*. Foram consideradas diferenças significativas aquelas com valores de $p < 0,05$.

5.6 Resultados

A tabela 2 abaixo demonstra algumas das principais características clínica-demográficas dos pacientes LV/HIV avaliados nesse capítulo do estudo, que foram possíveis de se obter até o presente momento.

Dos 19 pacientes LV/HIV avaliados até o momento, 10 apresentaram episódios de recidivas da LV, sendo que desses casos recidivantes (-R), seis apresentaram um ou mais episódios prévios da doença, e dentre esses, três evoluíram para óbito durante o seguimento. Os demais pacientes recidivantes (n=4) apresentaram um ou mais episódios de recidivas apenas durante o acompanhamento, até o momento da redação desses resultados. Por outro lado, nove dos 19 pacientes LV/HIV apresentaram um único episódio de LV ativa até esse momento da avaliação (não-recidivantes-NR). Destes, três evoluíram para óbito e os seis restantes obtiveram cura clínica da LV.

Quanto ao gênero, 15 pacientes LV/HIV foram do sexo masculino (-R: 7/10; -NR: 8/9) e quatro do sexo feminino (-R: 3/10; -NR: 1/9). A mediana de idade em anos foi de 38,0 (IQR: 28,8-43,8) para os casos recidivantes e 45,0 (IQR: 36,0-56,5) para os não-recidivantes, sem diferenças estatísticas entre os grupos para este parâmetro ($p=0,12$).

A análise do tempo desde o diagnóstico da infecção pelo HIV-1 até o momento da admissão no estudo (em meses) foi realizada para os pacientes LV/HIV, os quais a obtenção dessa informação foi possível até a redação

dessa tese. Não se observou diferenças estatísticas para esse parâmetro ao se comparar oito pacientes R-LV/HIV (mediana: 138; IQR: 90-180) e seis NR-LV/HIV (mediana: 126; IQR: 55,5-276) ($p=0,87$).

Além disso, após uma análise preliminar dos dados armazenados no Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagens de Linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ e Carga Viral (SISCEL) e nos prontuários médicos, observou-se que 10 pacientes LV/HIV faziam uso regular da cART, dentre esses seis eram pacientes R-LV/HIV e quatro eram casos NR-. Daqueles que faziam uso irregular ou não contínuo da cART (8/19), quatro eram pacientes R-LV/HIV e a outra metade eram casos NR-. Neste estudo, definiu-se o uso irregular da cART a partir das informações referentes às dispensações do esquema terapêutico no SISCEL, verificando se para cada paciente essa dispensação estava sendo realizada de forma regular ou não, de acordo com as datas de retirada da medicação por cada paciente. Além disso, foram consideradas as evoluções médicas, que foram avaliadas em cada prontuário.

Dois pacientes, o HLV04 e o HLV11, foram considerados abertura de caso, ou seja, foram concomitantemente diagnosticados para a infecção pelo HIV-1 e para a LV. No entanto, por ter evoluído para óbito após o tratamento anti-*Leishmania*, o paciente HLV04 não chegou a ser submetido a cART.

Quanto à aderência ao esquema de profilaxia secundária com anfotericina B lipossomal, até esse momento do estudo, não foi possível obter informações suficientes para essa avaliação. Até então, informações sobre seis pacientes R-LV/HIV foram obtidas, e dentre esses, dois aderiram de forma regular e quatro de forma irregular à profilaxia secundária anti-*Leishmania*.

Tabela 2: Características clínico-demográficas dos pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV).

Classificação quanto às recidivas da LV	Identificação do paciente	Gênero	Idade	Tempo de diagnóstico do HIV (meses)	Tempo de diagnóstico da 1ª LV (meses)	Episódios prévios da LV (números)	ART	Profilaxia secundária	Evolução clínica*
Não-Recidivantes (NR-LV/HIV)	HLV04	Masculino	44	0	0	N	NA	SI	Óbito
	HLV07	Masculino	52	84	0	N	Regular	SI	Óbito
	HLV10	Masculino	65	348	0	N	Irregular	SI	Cura clínica
	HLV14	Masculino	45	252	0	N	Irregular	SI	Cura clínica
	HLV15	Masculino	32	72	0	N	Irregular	SI	Óbito
	HLV17	Masculino	61	168	0	N	Regular	SI	Cura clínica
	HLV18	Masculino	47	SI	0	N	Irregular	SI	Cura clínica
	HLV20	Masculino	28	SI	0	N	Regular	SI	Cura clínica
	HLV21	Feminino	40	SI	0	N	Regular	SI	Cura clínica
Recidivantes (R-LV/HIV)	HLV01	Masculino	42	144	144	S (14)	Regular	Regular	Recidiva aos 6 mpt; Óbito
	HLV02	Masculino	37	132	48	S (2)	Irregular	Irregular	Recidiva aos 6 mpt; Óbito
	HLV06	Feminino	43	228	120	S (10)	Regular	Regular	Recidiva aos 3, 11 e 14 mpt
	HLV08	Feminino	37	192	0	N	Irregular	SI	Recidiva aos 2 mpt
	HLV09	Masculino	46	84	0	N	Irregular	Irregular	Recidiva aos 9 mpt
	HLV11	Masculino	20	0	0	N	Regular	Irregular	Recidiva aos 12 mpt
	HLV12	Masculino	61	144	0	N	Regular	SI	Recidiva aos 3 mpt
	HLV13	Masculino	29	108	108	S (8)	Irregular	Irregular	Óbito
	HLV16	Masculino	39	SI	SI	S (2)	Regular	SI	Cura clínica
HLV19	Feminino	28	SI	SI	S (5)	Regular	SI	Cura clínica	
Valor de p			0,12	0,87	NA	NA	-	NA	NA

HLV (pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1); R (Recidivantes); NR (Não-recidivantes); SI (Sem informação até o momento); NA (Não se aplica); mpt (meses pós-tratamento); * até o presente momento; S/N (Sim/Não).

A tabela 3 mostra os níveis de carga viral dos pacientes LV/HIV, no momento em que esses foram admitidos neste estudo, ou seja, durante a fase ativa da LV, ao lado das contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ nestes pacientes ao longo do acompanhamento clínico.

Os valores de carga viral foram obtidos a partir do SISCEL, porém, devido à limitação de se obter a amostra biológica para tal finalidade, ainda não foi possível obter esse parâmetro nas demais fases do acompanhamento. Essa análise inicial apontou que dez pacientes LV/HIV (10/19) apresentaram níveis de carga viral baixos ou indetectáveis (≤ 2000 cópias/mL) na fase ativa da LV. Dentre estes, cinco eram casos NR-LV/HIV e cinco eram pacientes R- (Tabela 3). Além disso, seis pacientes (6/19) apresentaram níveis elevados de carga viral (≥ 10.000 cópias/mL), dos quais quatro eram pacientes R-LV/HIV e dois eram -NR (Tabela 3). Para apenas três casos LV/HIV (3/19) não foi possível obter este parâmetro (Tabela 3). Interessantemente, dos seis pacientes que evoluíram para óbito durante o acompanhamento, seja nas fases mais precoces ou nas mais tardias, quatro deles apresentaram níveis de carga viral baixos ou indetectáveis durante a LV ativa (Tabela 3).

Corroborando com os resultados anteriores do grupo, a avaliação das contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ apontou que os pacientes LV/HIV, independente de serem não-recidivantes ou recidivantes da LV, apresentaram níveis similarmente diminuídos dessas células nas fases iniciais do acompanhamento (Tabela 3). Apesar de alguns pacientes LV/HIV apresentarem um aumento discreto desses valores nas fases posteriores ao tratamento anti-*Leishmania*, o número daqueles que retornaram nos períodos de 6 e 12 mpt ainda é limitado, nos impossibilitando de observar possíveis diferenças entre NR-LV/HIV e R-.

Tabela 3: Níveis de carga viral na fase ativa e de Contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ ao longo do acompanhamento clínico dos pacientes com leishmaniose visceral coinfectedados com HIV-1 (LV/HIV).

Classificação quanto às recidivas da LV	Identificação do paciente	Carga viral (Fase ativa)	Contagens absolutas de linfócitos T CD4 ⁺			
			Fase ativa	Pós-tratamento	6 mpt	12 mpt
Não-Recidivantes (NR-LV/HIV)	HLV04	2121	21	24	†	†
	HLV07	<40	162	243	†	†
	HLV10	1195	101	50	151	158
	HLV14	SI	20	125	9	ANR
	HLV15	SI	13	9	†	†
	HLV17	275454	24	16	ANR	ANR
	HLV18	225769	48	76	ANR	ANR
	HLV20	306	40	20	ANR	ANR
	HLV21	257	56	118	ANR	ANR
Mediana (IQR)		1195 (257-225759)	40 (20,5-78,5)	50 (18-121,5)	80 (9-151)	-
Recidivantes (R-LV/HIV)	HLV01	<40	107	142	126	130
	HLV02	12945	70	-	60	†
	HLV06	172	229	238	-	190
	HLV08	SI	44	64	133	153
	HLV09	109762	47	176	-	ANR
	HLV11	40216	190	257	273	ANR
	HLV12	113963	80	133	127	ANR
	HLV13	85	15	26	†	†
	HLV16	<40	47	52	ANR	ANR
HLV19	119	219	256	ANR	ANR	
Mediana (IQR)		172 (62,5-74989)	75 (46,25-197-3)	142 (58-247)	127 (93-203)	153 (130-190)
Valor de p		0,46	0,10	0,04	0,66	-

HLV (pacientes com leishmaniose visceral coinfectedados pelo HIV-1); mpt (meses pós-tratamento); SI (Sem informação até o momento); † (óbito); ANR (Ainda Não Realizado); - (Não comparecimento)

No que se refere à avaliação das subpopulações de linfócitos B, verificou-se durante a fase ativa da LV, uma diminuição significativa dos percentuais de linfócitos B totais (mediana: 26,2; IQR: 13,5-56,3) e da subpopulação de células B *naive* (mediana: 40,8; IQR: 33,5-62,9) entre os pacientes coinfectados LV/HIV em comparação aos indivíduos sadios (mediana: 66,2; IQR: 64,2-74,9; $p < 0,05$ e $p < 0,005$, respectivamente) (Figura 7 A e B). Entretanto, para os percentuais de células B *naive*, foi observada uma tendência a aumento desses valores entre os pacientes LV/HIV no decorrer do acompanhamento, sobretudo no período logo após o tratamento anti-*Leishmania* (mediana: 65,3; IQR: 32,4-74,2) (Figura 7B). Por outro lado, os percentuais de linfócitos B totais de pacientes LV/HIV foram mantidos em níveis similares a fase ativa ao longo de todo o acompanhamento, sem muitas modificações expressivas (Figura 7A).

Interessantemente, os percentuais de linfócitos B *resting* de memória foram significativamente menores nos pacientes coinfectados LV/HIV durante todas as fases do acompanhamento (medianas: fase ativa - 6,8; IQR: 3,8-9,3; pós-tratamento - 7,1; IQR: 5,5-15,1; 6 mpt - 5,6; IQR: 5,2-13,5; 12 mpt - 7,4; IQR: 5,3-7,7), quando comparados aos indivíduos sadios (mediana: 24,5; IQR: 16,0-30,3; $p < 0,0005$, $p < 0,005$, $p < 0,005$ e $p < 0,005$, respectivamente) (Figura 7C).

No que se refere aos controles com LV sem HIV-1, observou-se uma tendência a medianas de linfócitos B totais e *naive* inferiores àquela apresentada por indivíduos sadios, durante as fases ativa (medianas: 35,0 e 54,1; IQR: 24,4-65,0 e 34,5-79,2, respectivamente) e logo após o tratamento anti-*Leishmania* (medianas: 30,3 e 49,2; IQR: 22,7-57,3 e 35,9-76,0, respectivamente), porém sem diferença significativa (Figura 7 D e E). Apesar do número baixo de pacientes avaliados aos 6 e 12 mpt, observou-se uma tendência a aumento dos percentuais dessas subpopulações nesses períodos do acompanhamento (B totais (6 e 12 mpt) - medianas: 49,2 e 60,7; IQR: 32,9-55,1 e 39,4-72,1, respectivamente; B *naive* (6 e 12 mpt) - medianas: 64,7 e 80,9; IQR: 46,6-87,0 e 63,4-86,5, respectivamente) (Figura 7 D e E).

Os percentuais de células B *resting* de memória foram significativamente mais baixos nos controles com LV sem HIV-1 durante a fase ativa (mediana: 10,0; IQR: 3,4-13,7), no pós-tratamento (mediana: 10,4; IQR: 7,3-13,3) e 12 mpt (mediana: 9,2; IQR: 2,8-14,5), quando comparados aos indivíduos saudáveis ($p < 0,0005$, $p < 0,0005$ e $p < 0,005$, respectivamente) (Figura 7F).

Considerando o comprometimento imune mútuo na associação LV/HIV, as medianas dos percentuais dessas três subpopulações foram superiores entre os controles LV sem HIV-1 em comparação aos pacientes coinfectados LV/HIV, durante todo o acompanhamento (Figura 7 A-F), porém sem diferenças significativas.

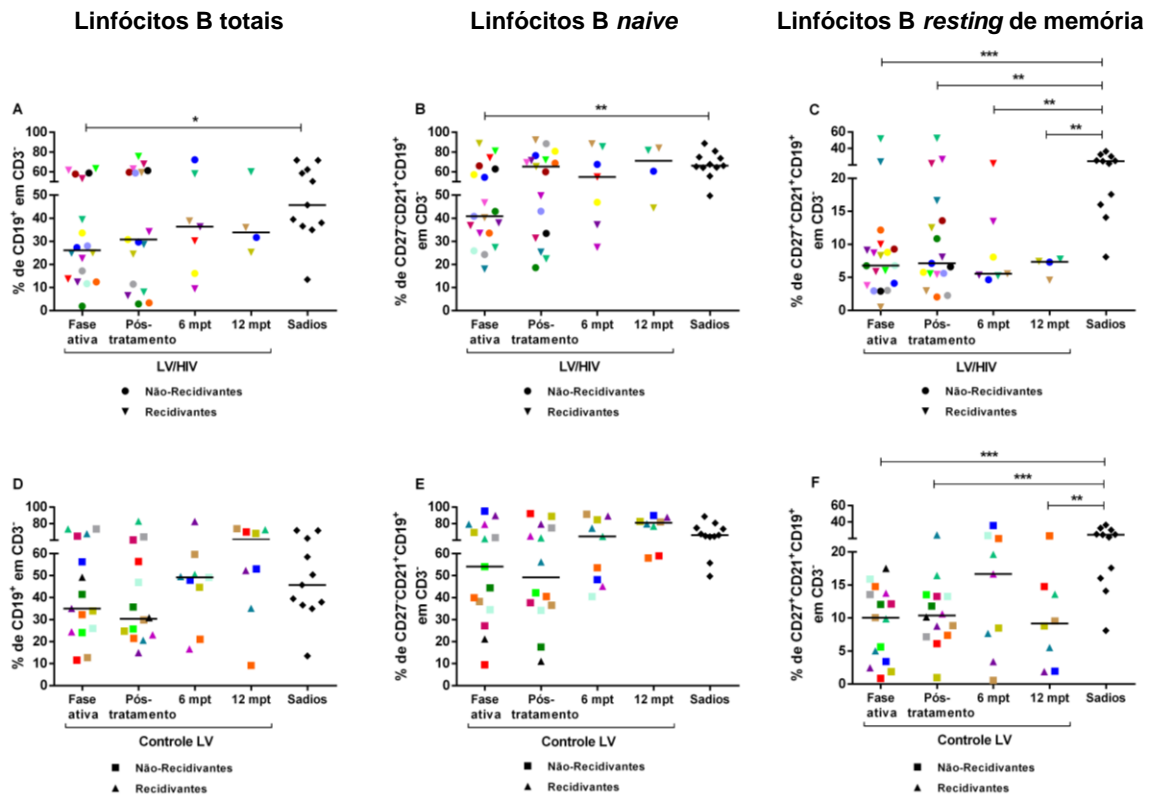


Figura 7: Percentuais de linfócitos B totais, naïve e resting de memória no sangue periférico de pacientes com leishmaniose visceral coinfetados pelo HIV-1 (LV/HIV) e pacientes LV sem HIV-1, acompanhados prospectivamente. Os percentuais de linfócitos B totais ($CD19^+CD3^+$), naïve ($CD27^+CD21^+CD19^+CD3^+$) e resting de memória ($CD27^+CD21^+CD19^+CD3^+$) foram avaliados nos pacientes LV/HIV (A-C) e em controles LV (D-F) durante o acompanhamento prospectivo e comparados a indivíduos sadios para as duas infecções. Cada símbolo representa um indivíduo avaliado e cada cor representa o mesmo paciente nas diferentes fases do acompanhamento. (● e ▼) pacientes LV/HIV não-recidivantes e recidivantes da LV, respectivamente; (■ e ▲) controles LV não-recidivantes e recidivantes da LV, respectivamente. LV/HIV (pacientes com LV coinfetados com o HIV-1); Controle LV (pacientes com LV sem HIV-1); 6 mpt (6 meses pós-tratamento); 12 mpt (12 meses pós-tratamento). Diferenças estatísticas entre as fases e entre os diferentes grupos foram obtidas através dos testes Wilcoxon *t*-test e Mann-Whitney *t*-test, respectivamente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$.

Ao avaliar os percentuais de linfócitos B ativados, observou-se níveis significativamente maiores dessas células durante a fase ativa dos pacientes coinfetados LV/HIV (mediana: 5,3; IQR: 2,7-7,1) quando comparados aos indivíduos sadios (mediana: 2,8; IQR: 1,7-3,9; $p < 0,05$) (Figura 8A). Uma tendência à diminuição dos percentuais dessas células foi observada logo após

o tratamento anti-*Leishmania* entre os pacientes LV/HIV (mediana: 2,8; IQR: 1,6-9,0), alcançado níveis similares aos sadios (Figura 8A).

Os pacientes LV sem HIV-1, por sua vez, apresentaram percentuais de linfócitos B ativados tendencialmente maiores do que os indivíduos sadios, durante a fase ativa da LV (mediana: 4,5; IQR: 1,4-6,6), que se mantiveram similares no pós-tratamento (mediana: 4,0; IQR: 2,2-10,1) (Figura 8C). Entretanto, uma tendência à diminuição desses valores pode ser observada nesses pacientes aos 12 mpt (mediana: 1,5; IQR: 1,0-2,3) (Figura 8C). No que se refere a esse *pool* de células B ativadas, tais resultados apontam que pacientes LV/HIV e pacientes com LV sem HIV-1 parecem se comportar de forma similar (Figura 8 A e C). Apesar disso, os pacientes LV/HIV apresentaram níveis significativamente mais elevados dessas células B ativadas em relação aos controles LV, quando os períodos de 12 mpt desses grupos foram comparados entre si ($p < 0,05$).

Considerando o perfil de exaustão celular como uma consequência do grau de ativação imune, observou-se que pacientes coinfectados LV/HIV apresentaram percentuais significativamente mais elevados de linfócitos B fenotipicamente exaustos, durante a fase ativa da LV (mediana: 40,7; IQR: 19,6-51,8), em comparação aos indivíduos sadios (mediana: 4,3; IQR: 2,6-8,7; $p < 0,0005$) (Figura 8B). Apesar de se observar uma tendência à diminuição desses valores nos períodos após o tratamento anti-*Leishmania* dos pacientes LV/HIV (pós-tratamento - mediana: 20,5; IQR: 12,6-41,7; 6 mpt - mediana: 24,5; IQR: 6,7-45,5; 12 mpt - mediana: 18,7; IQR: 8,2-40,0), esses ainda foram significativamente mais elevados em comparação aos sadios ($p < 0,0005$, $p < 0,05$ e $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 8B).

Os controles LV, por sua vez, mostraram um padrão similar aos coinfectados, porém menos intenso, no que se refere aos níveis de exaustão de células B (Figura 8 B e D). Desta forma, os controles LV apresentaram percentuais significativamente elevados de linfócitos B exaustos durante a fase ativa (mediana: 34,4; IQR: 14,2-43,6) e no pós-tratamento (mediana: 28,6; IQR: 14,5-45,9), quando comparados aos indivíduos sadios ($p < 0,0005$) (Figura 8D).

Uma tendência à diminuição desses valores foi observada aos 6 mpt (mediana: 11,0; IQR: 7,2-23,3) e 12 mpt (mediana: 8,9; IQR: 6,4-11,1), em comparação à fase ativa desse grupo. No entanto, esses valores ainda foram significativamente maiores nos controles LV aos 6 mpt quando comparados aos sadios ($p < 0,01$) (Figura 8D). Nenhuma diferença significativa foi observada ao se comparar os percentuais de linfócitos B exaustos dos controles LV com os dos pacientes LV/HIV avaliados.

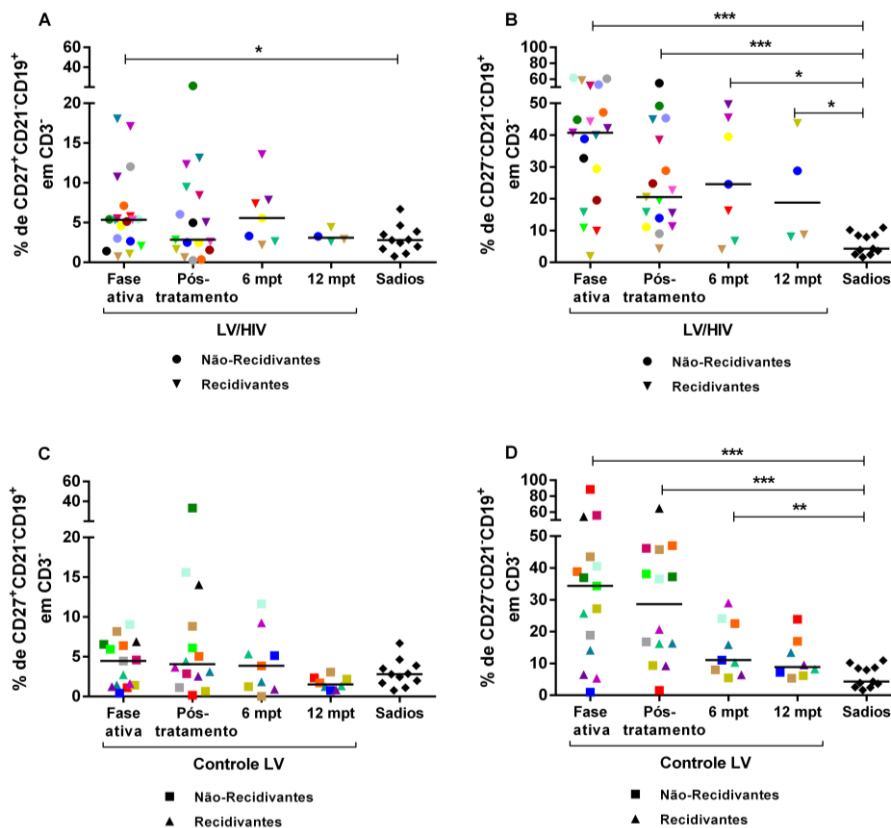


Figura 8: Percentuais de linfócitos B ativados e exaustos no sangue periférico de pacientes com leishmaniose visceral coinfetados pelo HIV-1 (LV/HIV) e pacientes LV sem HIV-1, acompanhados prospectivamente. Os percentuais de linfócitos B ativados ($CD21^+CD27^+CD19^+CD3^+$) e exaustos ($CD21^-CD27^-CD19^+CD3^+$) foram avaliados nos pacientes LV/HIV (A-B) e em controles LV sem HIV-1 (C-D) durante o acompanhamento prospectivo e comparados a indivíduos sadios para as duas infecções. Cada símbolo representa um indivíduo avaliado e cada cor representa o mesmo paciente nas diferentes fases do acompanhamento. (● e ▼) pacientes LV/HIV não-recidivantes e recidivantes da LV, respectivamente; (■ e ▲) controles LV não-recidivantes e recidivantes da LV, respectivamente. LV/HIV (pacientes com LV coinfetados com o HIV-1); Controle LV (pacientes com LV sem HIV-1); 6 mpt (6 meses pós-tratamento); 12 mpt (12 meses pós-tratamento). Diferenças estatísticas entre as fases e entre os diferentes grupos foram obtidas através dos testes Wilcoxon t-test e Mann-Whitney t-test, respectivamente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$.

Adicionalmente, os percentuais de plasmócitos de vida curta (PC) apresentados pelos pacientes LV/HIV foram similares aos indivíduos sadios (mediana: 0,15; IQR: 0,1-0,2), sobretudo durante a fase ativa (mediana: 0,2; IQR: 0,1-0,4) e logo após o tratamento (mediana: 0,2; IQR: 0,1-0,4) desses pacientes (Figura 9A). Apesar disso, níveis significativamente mais elevados dessas células foram observados nos pacientes LV/HIV aos 6 mpt (mediana: 0,3; IQR: 0,2-0,7) quando comparados aos sadios (Figura 9A). Um padrão de resultado similar, mas com níveis expressivamente superiores aos dos PC (Figura 9A), pode ser observado para os percentuais de plasmócitos de vida longa (PL) apresentados por esses pacientes (fase ativa - mediana: 2,4; IQR: 1,5-3,7; pós-tratamento - mediana: 2,9; IQR: 1,5-4,9; 6 mpt - mediana: 4,4; IQR: 1,3-5,4), em comparação aos indivíduos sadios (mediana: 2,1; IQR: 1,9-2,9) (Figura 9B).

No que se refere aos pacientes LV sem HIV-1, esses apresentaram percentuais de PC e PL similares aos indivíduos sadios, desde a fase ativa até os 6 mpt (PC e PL, respectivamente: fase ativa - mediana: 0,2 e 1,8; IQR: 0,1-0,5 e 1,2-2,4; pós-tratamento - mediana: 0,1 e 2,1; IQR: 0,05-0,3 e 1,1-3,5; 6 mpt - mediana: 0,2 e 2,3; IQR: 0,07-0,3 e 1,9-4,3) (Figura 9C-D). Interessantemente, uma diminuição significativa nos percentuais de PC e PL foi observada entre os controles LV aos 12 mpt (PC e PL, respectivamente, mediana: 0,04 e 1,3; IQR: 0,02-0,1 e 0,9-1,5) quando comparados aos sadios ($p < 0,05$ e $p < 0,0005$, respectivamente) (Figura 9C-D). Essa diminuição também foi significativa quando se comparou os percentuais de PL aos 6 e 12 mpt entre os controles LV ($p < 0,05$). Similar aos LV/HIV, os controles LV também apresentaram percentuais de PL superiores aos de PC na periferia (Figura 9C-D).

Adicionalmente, ao se comparar os percentuais de PC dos pacientes LV/HIV com os dos controles LV, observou-se que estes foram significativamente mais elevados entre os pacientes LV/HIV durante os períodos de 6 e 12 mpt ($p < 0,05$).

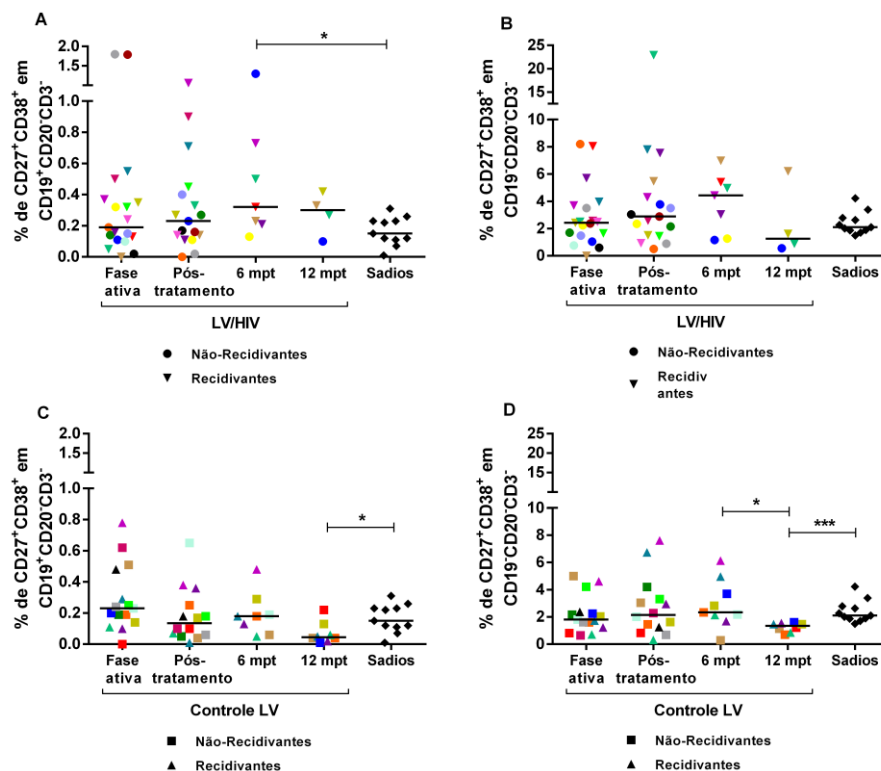


Figura 9: Percentuais de plasmócitos de vida curta e de vida longa no sangue periférico de pacientes com leishmaniose visceral coinfetados pelo HIV-1 (LV/HIV) e pacientes LV sem HIV-1, acompanhados prospectivamente. Os percentuais de plasmócitos de vida curta ($CD27^+CD38^+$ em $CD19^+CD20^-CD3^-$) e plasmócitos de vida longa ($CD27^+CD38^+$ em $CD19^+CD20^-CD3^-$) foram avaliados nos pacientes LV/HIV (A-B) e em controles LV (C-D) durante um acompanhamento prospectivo e comparados a indivíduos saudáveis para as duas infecções. Cada símbolo representa um indivíduo avaliado e cada cor representa o mesmo paciente nas diferentes fases do acompanhamento. (● e ▼) pacientes LV/HIV não-recidivantes e recidivantes da LV, respectivamente; (■ e ▲) controles LV não-recidivantes e recidivantes da LV, respectivamente. LV/HIV (pacientes com LV coinfetados com o HIV-1); Controle LV (pacientes com LV sem HIV-1); 6 mpt (6 meses pós-tratamento); 12 mpt (12 meses pós-tratamento). Diferenças estatísticas entre as fases e entre os diferentes grupos foram obtidas através dos testes Wilcoxon *t*-test e Mann-Whitney *t*-test, respectivamente. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0005$.

Corroborando com a relação entre o intenso grau de ativação imune e níveis de imunossenescência, observou-se uma correlação significativamente positiva entre os percentuais de linfócitos B ativados e os percentuais de linfócitos B exaustos apresentados pelos pacientes coinfetados LV/HIV durante a fase ativa e logo após o tratamento da LV ($p < 0,01$; $r = 0,452$) (Figura 10A). Além disso, uma correlação significativamente positiva entre os

percentuais de linfócitos B ativados e os percentuais de PC ou PL ($p < 0,0005$; $r = 0,571$ e $p < 0,0005$; $r = 0,569$, respectivamente) foi observada para os pacientes LV/HIV, também durante as fases ativa e logo após o tratamento da LV (Figura 10B-C).

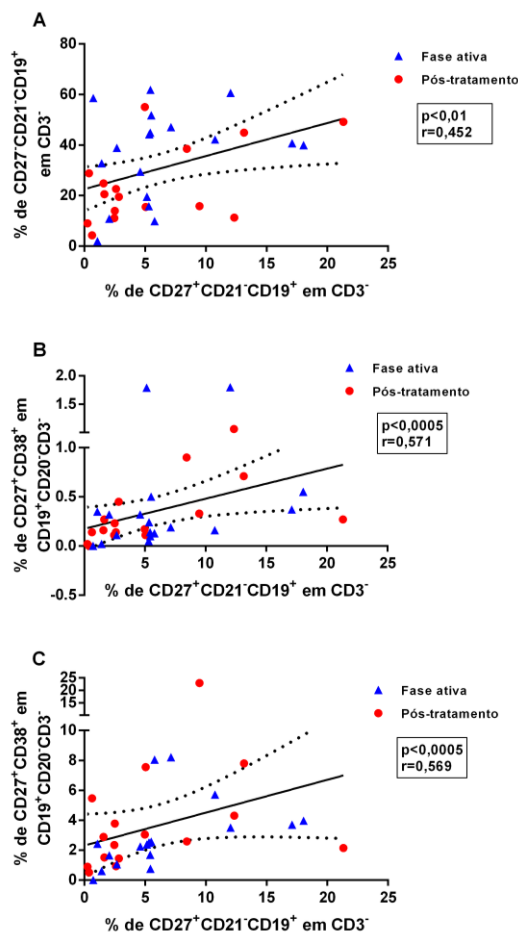


Figura 10: Relação entre os níveis de linfócitos B ativados e os percentuais de células B exaustas, plasmócitos de vida curta e de vida longa em pacientes coinfectados LV/HIV. Correlações significativamente positivas foram encontradas entre os percentuais de linfócitos B ativados (CD27⁺CD21⁻CD19⁺ em CD3⁺) e os percentuais de células B exaustas (CD27⁺CD21⁻CD19⁺ em CD3⁺) (A), com plasmócitos de vida curta (CD27⁺CD38⁺ em CD19⁺CD20⁻CD3⁺) (B) e com plasmócitos de vida longa (CD27⁺CD38⁺ em CD19⁺CD20⁺CD3⁺) (C). Cada símbolo representa um indivíduo avaliado na fase ativa (▲) ou logo após o tratamento para LV (●). Regressão linear foi utilizada para elaboração dos gráficos e o teste estatístico aplicado foi a correlação de Spearman.

Ainda não foi possível observar diferenças entre pacientes não-recidivantes e recidivantes da LV, sejam eles LV/HIV ou LV sem HIV-1, no que

se refere aos percentuais de todas as subpopulações células B avaliadas neste estudo (Figuras 7-9).

Finalmente, avaliou-se os níveis plasmáticos de IgG total, IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* na casuística atual, cuja as fases de 6 e 12 mpt ainda serão avaliadas. Corroborando com resultados anteriores do grupo, observou-se que os pacientes LV/HIV apresentaram níveis similares dessas Igs anti-*Leishmania* durante a fase ativa (IgG total - mediana: 40,1; IQR:8,1-168,4; IgG1 - mediana: 13,2; IQR:5,7-72,5; IgG3 - mediana: 11,8; IQR:6,5-23,7) em comparação ao período imediatamente após o tratamento da LV (IgG total - mediana: 43,3; IQR:5,2-204,3; IgG1 - mediana: 20,3; IQR:4,0-84,6; IgG3 - mediana: 13,6; IQR:7,7-25,0) (Figura 11A-C). No entanto, tais níveis foram significativamente maiores nesses pacientes em comparação aos controles sadios para ambas as infecções (IgG total - mediana: 0,3; IQR:0,3-1,0; IgG1 - mediana: 1,3; IQR:0,5-1,5; IgG3 - mediana: 0,6; IQR:0,5-1,1) (Figura 11A-C).

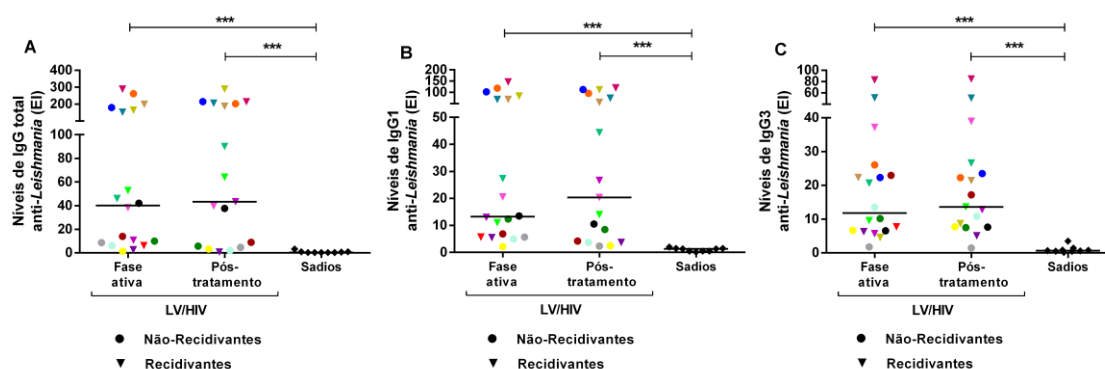


Figura 11: Níveis plasmáticos de IgG total e subclasses IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* de pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV-1 (LV/HIV) na fase ativa e logo após o tratamento para a LV. Os níveis de IgG total (A), IgG1 (B) e IgG3 (C) foram dosados no plasma de pacientes coinfectados LV/HIV e de indivíduos sadios (endêmicos e não-endêmicos) frente aos antígenos solúveis de *L. infantum*, durante a fase ativa e logo após o tratamento da LV. Os resultados foram expressos em índice de ELISA (EI), onde a média da densidade óptica de cada amostra avaliada em duplicata foi dividida pela média total das densidades ópticas obtidas do grupo de controle sadios. Cada símbolo representa um indivíduo avaliado e cada cor representa o mesmo paciente nas diferentes fases do acompanhamento. (● e ▼) pacientes LV/HIV não-recidivantes e recidivantes da LV, respectivamente. LV/HIV (pacientes com LV coinfectados com o HIV-1); Diferenças estatísticas entre as fases e entre os diferentes grupos foram obtidas através dos testes Wilcoxon *t*-test e Mann-Whitney *t*-test, respectivamente. *** $p < 0.0005$.

6. DISCUSSÃO

Nosso estudo identificou um perfil imunológico que diferiu entre pacientes LV/HIV que apresentaram um único episódio de LV ao longo da vida (não-recidivantes/-NR) daqueles com frequentes recidivas da doença (recidivantes/-R). Desta forma, pacientes NR-LV/HIV evoluíram com ganho de células T CD4⁺ após o tratamento da LV, acompanhado de uma diminuição dos níveis de ativação das células T, além de diminuição da translocação microbiana, observada pelos níveis de CD14 solúvel (sCD14) e diminuição dos níveis séricos de IgG3 anti-*Leishmania*. Já os pacientes R-LV/HIV mantiveram esses parâmetros acima comprometidos, de forma similar à fase ativa da LV e independente da coinfeção pelo HIV, por todo o acompanhamento clínico. Como demonstrado em nosso estudo, a reconstituição imune observada nos pacientes NR-LV/HIV estava relacionada com uma aparente restauração do repertório TCRV β , que atingiu valores de frequências de determinadas subpopulações próximas à normalidade, ou seja, próximos às frequências apresentadas por indivíduos saudáveis. Além disso, observamos uma menor resposta inflamatória, com diminuição dos níveis de importantes citocinas pró-inflamatórias (IFN γ , IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF) e IL-10 aos 12 mpt, e uma melhor capacidade de *output* tímico, pelo aumento dos níveis de TREC em PBMC aos 10 mpt. Por outro lado, os pacientes R-LV/HIV confirmaram um comprometimento geral da resposta imune, apresentando um repertório em células T CD8⁺ bastante heterogêneo, manutenção do status inflamatório periférico e uma menor funcionalidade tímica inferida pela manutenção dos baixos níveis de TREC em células T. Estas identificações foram possíveis, principalmente, pelo fato desse estudo ter sido de caráter longitudinal, nos permitindo avaliar não só a fase ativa da LV em pacientes LV/HIV, como também o estado atual do paciente a cada visita ambulatorial, diferente de outros estudos anteriores desenvolvidos com objetivos similares ao nosso (Casado et al. 2015).

Inicialmente, a avaliação das contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ apontou para um prejuízo importante na capacidade de reconstituição

imunológica em pacientes R-LV/HIV, que foi aparentemente recuperada entre pacientes NR-LV/HIV já após 6 meses do tratamento da LV. Cota e colaboradores (2011), já tinham apontado em uma metanálise que a ausência de recuperação imunológica, ou seja, as baixas contagens de células T CD4⁺ mantidas após o tratamento da LV primária poderia se constituir em um fator preditivo de recidivas da doença em pacientes coinfetados pelo HIV. No nosso estudo, tal fato aconteceu ainda que a maioria desses pacientes apresentasse carga viral indetectável (13 de 18 pacientes), pelo uso da cART, já na fase ativa da LV, independente de ser recidivante ou não .

Sabe-se que a reconstituição imune, comumente, é uma característica marcante decorrente da supressão viral obtida após a admissão da cART em pacientes HIV positivos (Powderly et al. 1998; Rudy et al. 2015). Desta forma, a manutenção das baixas contagens de células T CD4⁺ nos pacientes R-LV/HIV reforçou a hipótese de que outros fatores poderiam estar contribuindo para esse processo. Um desses fatores seria o grau de ativação imune crônica, que consiste no “alicerce” para o comprometimento geral da resposta imune, responsável pela perda da remissão clínica da LV.

A intensa ativação do sistema imune consiste em um dos principais mecanismos imunopatogênicos envolvidos com a progressão da infecção pelo HIV-1 (Sauce et al. 2013; Utay & Hunt, 2016). Altos níveis de ativação e inflamação são observados mesmo em pacientes com longo tempo de cART e supressão viral, uma vez que a estimulação antigênica persiste em possíveis reservatórios virais (Douek, 2013). Nesse contexto, pacientes HIV positivos que fazem uso da cART e mantêm a carga viral indetectável, mas apresentam baixas contagens de células T CD4⁺, os chamados não-respondedores imunológicos, apresentam um *status* inflamatório e ativado acima do esperado (Gazzola et al. 2009). Essa ativação imune contribui para o grau de imunossupressão por mecanismos que se retroalimentam. Por exemplo, a perda do controle viral pode ocorrer pela ativação de reservatórios virais que por sua vez, contribui para o aumento da depleção de células T CD4⁺ (Doitsh & Greene, 2016). Além disso, mecanismos de morte celular induzida por ativação

são fatores adicionais para a perda dessas células na periferia (Doitsh & Greene, 2016).

Alguns estudos têm descrito que a persistência de um grau elevado de ativação de células T em indivíduos infectados pelo HIV mesmo com supressão viral pela cART, pode predizer um prognóstico tão ruim quanto o de pacientes sem uso de terapia (Bofill et al. 1996; Taiwo et al. 2012). Desta forma, essa intensa ativação estaria relacionada com a progressão da doença, por exemplo, devido ao desenvolvimento de complicações vasculares e eventos não-aids (Karim et al. 2014; Siedner et al. 2015; Zicari et al. 2019), do aumento da taxa de mortalidade (Hunt et al. 2011) e da maior suscetibilidade às coinfeções (Boulougoura & Sereti, 2016), dentre elas as leishmanioses (Da-Cruz et al. 2006; Badaró et al. 2015).

Corroborando com a literatura e com os trabalhos anteriores do grupo (Santos-Oliveira et al. 2010, 2013), nossos resultados mostraram que os níveis de ativação de linfócitos T, sobretudo em T CD8⁺, foram elevados nos pacientes LV/HIV, principalmente nas fases iniciais do acompanhamento. Isso vai de acordo com o fato de que, similar à infecção pelo HIV-1, a LV também cursa com intensa ativação imune crônica (Santos-Oliveira et al. 2011; Soong et al. 2012), o que culmina na potencialização desse *status* em pacientes LV/HIV (Santos-Oliveira et al. 2010; Casado et al. 2015; Lindoso et al. 2018). Além disso, confirmando nossa hipótese inicial, os pacientes R-LV/HIV mantiveram o intenso grau de ativação celular nos períodos posteriores ao tratamento da LV, em níveis similares aos da fase ativa da doença, diferente dos pacientes NR-LV/HIV que diminuíram esses valores nos 6 e 12 mpt.

Em um relato de caso publicado pelo nosso grupo, no qual um paciente LV/HIV foi avaliado prospectivamente, foi demonstrado que os níveis de ativação de células T foram baixos durante a remissão clínica da LV, mas aumentaram expressivamente durante um episódio de reativação da doença apresentado pelo mesmo (Santos-Oliveira et al. 2011). Ainda que tivesse carga viral indetectável, esse paciente apresentou baixas contagens de células T CD4⁺ durante todos os momentos avaliados, além de um quadro clínico atípico

de lesões cutâneas disseminadas (Santos-Oliveira et al. 2011). Esse primeiro relato já apontava indícios do quanto a imunossupressão em pacientes LV/HIV pode ser agravada pelo grau de ativação, e o quanto esses fatores podem culminar em um prognóstico clínico ruim para pacientes coinfectados.

De fato, no presente estudo, a relação entre esses três elementos (imunossupressão, ativação celular e recidiva) pode ser reforçada, uma vez que, uma correlação significativamente negativa foi observada entre os percentuais de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados e as contagens absolutas de células T CD4⁺ ($p < 0,05$; $r = -0,54$ e $-0,37$, respectivamente), em todas as fases do acompanhamento (dados não mostrados). Além disso, uma correlação significativamente positiva foi observada entre os percentuais dessas células T ativadas aos 12 mpt e o número total de recidivas apresentados pelos pacientes LV/HIV ($p < 0,05$; $r = 0,75$) (dados não mostrados). Tais resultados sugerem que cada recidiva da LV acompanhada de um aumento no grau de ativação resulta em resposta imune efetora cada vez mais comprometida, e conseqüentemente, ineficaz em controlar o parasito, culminando em um contínuo círculo vicioso. Dessa forma, acredita-se que a própria ausência de recidivas nos pacientes NR-LV/HIV pode estar contribuindo para a melhora do seu *status* imunológico geral.

O fato dos pacientes NR-LV/HIV e R apresentarem um comprometimento similar desses parâmetros nas fases iniciais do acompanhamento indica que a estimulação pelos antígenos parasitários liberados durante a doença ativa estava igualmente presente e influenciando em ambos os grupos. Neste contexto, a maioria dos pacientes LV/HIV (13 de 18 pacientes), independente de ser –R ou –NR, apresentou níveis elevados de carga parasitária periférica durante a LV ativa. Entretanto, nos períodos seguintes ao tratamento da LV, ainda que, ambos os grupos estivessem submetidos à profilaxia secundária anti-*Leishmania*, e a maioria dos pacientes já apresentasse parasitemia em níveis indetectáveis, foi possível observar diferenças importantes no *status* imunológico associado aos diferentes desfechos clínicos.

Ainda assim, alguns pontos precisam ser considerados diante da manutenção da baixa reconstituição e intensa ativação imune entre os pacientes R-LV/HIV: 1) Apesar da maioria controlar a parasitemia após o tratamento da LV, alguns pacientes R-LV/HIV, mas nenhum NR-, ainda mantiveram níveis de carga parasitária detectáveis aos 12 mpt. Isso reforça o conceito de que a persistência de baixos níveis de DNA parasitário no sangue periférico pode ocorrer em pacientes tratados, mesmo diante de resposta clínica adequada à terapia específica, sugerindo uma persistência do parasito em replicação residual em órgãos linfoides, como a medula óssea. Tal fato pode contribuir para manutenção do *status* imune ativado e conduzir a uma condição clínica caracterizada por uma alternância entre as formas assintomáticas e sintomáticas da doença (del Giudice et al. 2002; Cruz et al. 2006); 2) A manutenção do grau de imunossupressão e ativação celular nos pacientes R-LV/HIV que mostraram controle parasitário e viral poderia ser atribuída ao fato desse grupo possuir um tempo de exposição ao HIV-1 mais prolongado, até o momento da sua admissão no estudo, ou mesmo um intervalo maior entre o diagnóstico da infecção pelo HIV-1 e o primeiro episódio ativo da LV, fatores que podem ser cruciais para a predisposição desses pacientes às recidivas da LV. Por outro lado, na nossa casuística, o tempo mais prolongado de exposição ao vírus não diferiu entre os grupos NR e R (tabela 1/artigo 1), e também significou um tempo maior de submissão à cART e, dessa forma, de um controle da replicação viral mais precoce com cargas virais indetectáveis; 3) Ao considerar o grupo de pacientes R-LV/HIV como um todo, no qual o controle viral e parasitário periférico pelas terapias específicas e o uso da profilaxia secundária não impediram as recidivas da LV, é razoável afirmar que, além do HIV-1 e da *Leishmania*, outros fatores indiretamente relacionados às infecções, podem estar envolvidos nesse processo, e contribuindo para manutenção da intensa ativação, tais como a translocação microbiana.

De fato, a persistência do grau de ativação celular na infecção pelo HIV-1 e na associação LV/HIV tem sido associada à translocação microbiana do

lúmen intestinal para a corrente sanguínea (Brenchley et al. 2006; Younas et al. 2019; Santos-Oliveira et al. 2013). Essa translocação de produtos microbianos provenientes de bactérias gram-negativas, tais como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), resulta da interrupção da barreira do trato gastrointestinal e do tecido linfóide associado a mucosa do intestino (GALT). Os principais mecanismos envolvidos nesse comprometimento seriam a depleção massiva de células T CD4⁺ presentes nesse microambiente, especialmente a subpopulação de células Th17, o estabelecimento da inflamação/hiperativação da mucosa local, a exaustão da função fagocítica de macrófagos intestinais e o dano direto à estrutura intestinal, como a apoptose de enterócitos (Marchetti et al. 2013). Desta forma, a perda expressiva da integridade de mucosa culmina no aumento da permeabilidade intestinal aos componentes microbianos, de modo que ao alcançarem a corrente sanguínea passam a se constituir em importantes cofatores para a persistência do grau de ativação e, em consequência, para a patogênese da infecção (Douek, 2013; Ticanti et al. 2016).

Em adição, vale ressaltar que, similar ao que ocorre na infecção pelo HIV-1, acredita-se a *L. infantum* também possa estar envolvida em um possível dano direto ao GALT demonstrado, por exemplo, pela ocorrência de falência intestinal em paciente com LV apenas (Hicks et al. 2009). Além disso, a presença de antígenos do parasito já foi demonstrada em fragmentos de tecido da mucosa duodenal de pacientes com LV (Luz et al. 2010), assim como a presença de formas amastigotas no intestino ao lado de uma intensa resposta inflamatória local na LV canina (Silva et al. 2016). Dessa forma, tanto o HIV-1 como a *Leishmania* podem contribuir para o aumento da permeabilidade intestinal e, conseqüentemente, da translocação microbiana que, por sua vez, pode potencializar o grau de ativação em pacientes LV/HIV. Este presente estudo confirmou que ambos os fenômenos ocorreram e estavam intensificados em pacientes LV/HIV.

Além de contribuir para a manutenção dos níveis elevados de ativação celular, nossos resultados apontaram que a translocação microbiana constitui

em um mecanismo adicional para a ocorrência de recidivas da LV, certamente pela associação desses fenômenos. Isso foi comprovado pelo fato dos pacientes R-LV/HIV apresentarem níveis mais elevados de sCD14, que foram mantidos desde a fase ativa até os 12 mpt, diferente dos pacientes NR-LV/HIV. Além disso, os níveis de sCD14 foram positivamente correlacionados com os níveis de LPS no plasma dos pacientes LV/HIV, sugerindo que ambos se encontravam biologicamente ativos. Isso porque o CD14 é um correceptor do LPS, e sua forma solúvel é liberada após a ativação de monócitos/macrófagos pelo estímulo antigênico do LPS.

Quando associado à membrana, o CD14 (mCD14) facilita a transferência do LPS para o complexo MD-2/TLR-4 (*Toll-Like receptor 4*), modulando o reconhecimento do LPS. A ligação do LPS a esse complexo desencadeia uma cascata de sinalização com vias dependente de MyD88 ou TRIF, que resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias ou interferons do tipo I, respectivamente (Lu et al. 2008). Após esse processo de ativação celular, a expressão do CD14 de membrana diminui, e por outro lado, o sCD14 é liberado, aumentando-se seus níveis plasmáticos (Shive et al. 2015). Adicionalmente, já foi demonstrado em estudos *in vitro* que, além do LPS, outros ligantes de TLRs, como flagelina, bem como citocinas pro-inflamatórias, tais como IL-6 e IL-1 β , podem induzir a liberação de sCD14 (Shive et al. 2015). No nosso estudo, os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-8 e IL-6) foram tendencialmente maiores nos pacientes R-LV/HIV comparados ao NR-LV/HIV, que além de contribuírem para o *status* inflamatório sistêmico, podem estar potencializando a ativação sobre a manutenção dos níveis elevados de sCD14. Dessa forma, nossos achados apontam para uma hiperativação da imunidade inata que, possivelmente, está contribuindo para o *status* de ativação sistêmica, mantido entre pacientes R-LV/HIV, mesmo após o tratamento anti-*Leishmania*.

Além de contribuir para esse grau de ativação e inflamação sistêmica, estes resultados também sugeriram que a ativação de monócitos/macrófagos via sCD14 pode estar relacionada com o prejuízo na recuperação imunológica em pacientes de associação LV/HIV. Nesse contexto, foi observada uma

correlação negativa entre as contagens de células T CD4⁺ e os níveis plasmáticos de sCD14 ($p < 0,0001$; $r = -0,5$). Interessantemente, níveis elevados de sCD14 foram demonstrados em indivíduos que falharam em restaurar as contagens de células TCD4⁺ mesmo após supressão viral pela cART, estando fortemente correlacionado com tal parâmetro (Lederman et al. 2011). Dessa forma, todos os nossos resultados apontam a translocação microbiana como uma das “peças de um quebra-cabeça” que define a relação entre *status* imunológico comprometido com o déficit no controle parasitário a longo prazo, que resulta nas frequentes recidivas da LV.

Paralelamente, ao avaliar o grau de ativação do braço humoral da resposta imune, inferido pela dosagem de IgG total e das subclasses, IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania*, os resultados observados corroboraram com aqueles já descritos para o *status* de ativação de células T e da imunidade inata (níveis de sCD14). Dessa forma, os pacientes R-LV/HIV mantiveram níveis elevados destas Igs durante todo o acompanhamento prospectivo, ao passo que nos pacientes NR-LV/HIV esses valores foram sempre mais baixos. Interessantemente, os níveis de IgG3 foram, de forma similar, elevados entre os dois grupos nas fases iniciais do acompanhamento, porém diminuíram significativamente entre os pacientes NR-LV/HIV nos períodos posteriores ao tratamento, diferente dos pacientes R-LV/HIV. Esse resultado corroborou com a hipótese de que os níveis de IgG3 podem se constituir em um possível biomarcador de manutenção de cura clínica na leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*, após o tratamento específico (Fagundes-Silva et al. 2012).

A IgG3 (e em menos intensidade a IgG1) é a ativadora mais eficiente da via clássica do complemento, além de ser considerada uma Ig altamente citofílica, ou seja, é capaz de se ligar com alta afinidade a todos receptores Fc presentes nas células imunes do hospedeiro. Isso favorece o desencadeamento de funções efetoras importantes dessa subclasse, como degranulação, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e indução de fagocitose (Valenzuela & Schaub, 2018), sugerindo seu importante envolvimento na imunopatogênese das leishmanioses. Além disso, as IgGs são

produzidas em resposta às proteínas antigênicas do parasito ainda circulantes, e seu declínio após a terapia e cura clínica seria presumidamente devido à ausência do estímulo antigênico. Dessa forma, a manutenção dos níveis elevados da IgG3 após o tratamento anti-*Leishmania* pode predizer não só falha terapêutica, como também constante circulação de antígenos parasitários e potencial risco de recorrências da LV, como também já foi demonstrado para a subclasse IgG1 (Bhattacharyya et al. 2014), sobretudo em pacientes coinfectados pelo HIV-1. Nossos primeiros achados que inferiram uma intensa ativação dos linfócitos B, que foi mantida em pacientes R-LV/HIV mesmo após o tratamento, apontando para um possível papel dessas células no contexto de recidivas, que precisa ser melhor elucidado.

Diante do cenário discutido até aqui, pode-se sugerir que o prejuízo na reconstituição imunológica tem como uma de suas causas a intensa ativação crônica do sistema imune, os quais juntos contribuem para uma evolução clínica ruim, em termos de recidivas, em pacientes LV/HIV. Aliado a isso, a condição clínica-imunológica desses pacientes pode ser agravada pelas consequências diretas dessa intensa ativação, como o envelhecimento imune precoce em indivíduos cronicamente infectados (Appay et al. 2007; Gautam et al. 2013). Uma das formas de se avaliar esse grau de imunosenescência e exaustão imune é através do aumento da expressão de marcadores fenotípicos de natureza inibitória ($CD57^+CD27^-CD28^-$, $PD-1^+$, $CTLA-4^+$) na superfície de células T e B cronicamente ativadas, os quais desempenham um papel importante por afetarem a eficácia funcional da resposta anti-HIV (Appay & Sauce, 2017). Diante disso, os níveis de células T senescentes ($CD57^+CD27^-$) apresentados pelos pacientes LV/HIV avaliados neste estudo, poderia se constituir em outro importante cofator para explicar não só o comprometimento imunológico, como também as frequentes recidivas da LV. Isso estaria atrelado ao fato dos níveis elevados de ativação celular mantidos nos pacientes R-LV/HIV desempenharem um papel crucial em promover um rápido declínio da funcionalidade do sistema imune e, assim, da eficiência da resposta efetora em controlar o parasito.

Conforme esperado, os pacientes LV/HIV apresentaram altos percentuais de linfócitos T senescentes em comparação a indivíduos saudáveis de mesma idade, sobretudo na subpopulação de células T CD8⁺, que assim seguiram desde a fase ativa até os períodos finais do acompanhamento, quando valores mais pronunciados foram observados. Esse resultado confirmou que, de fato, os pacientes LV/HIV avaliados exibiram um sistema imune cronicamente ativado, que não se alterou apesar do uso da cART e da manutenção do tratamento anti-*Leishmania*. Tal achado foi consistente com o que já havia sido demonstrado para pacientes LV/HIV da Bacia do Mediterrâneo (Casado et al, 2015), apesar da nossa avaliação ter sido realizada prospectivamente e em pacientes LV/HIV com diferentes desfechos clínicos.

Entretanto, nossa hipótese inicial sobre a influência deste fenômeno sobre o controle parasitário não pôde ser confirmada pela avaliação do perfil fenotípico de senescência imune, uma vez que este não diferiu entre os pacientes NR-LV/HIV e -R. Isso nos fez refletir sobre possíveis explicações para esse fenótipo imunosenescente ter-se apresentado de forma similar entre os grupos. Primeiramente, o tempo de acompanhamento pode não ter sido suficiente para avaliar esse parâmetro, visto que um padrão de distribuição mais heterogêneo desses níveis, com o aparecimento de dois grupos separados de pacientes LV/HIV parece ser observado apenas no período de 12 mpt. Isto sugere que, em algum momento posterior ao acompanhamento, os dois grupos avaliados poderiam vir a apresentar diferenças entre si. Outra possível explicação se baseia no fato do fenômeno de imunosenescência de células T consistir em um processo irreversível (Brenchley et al. 2003; Appay et al. 2007). Dessa forma, considerando que ambos os grupos apresentaram um grau de ativação similarmente elevado no início do acompanhamento, o fato dos pacientes NR-LV/HIV terem revertido esses valores após o tratamento, não significa que esse mesmo padrão seria, imediatamente, observado em termos de expressão do fenótipo CD57⁺CD27⁻. Em outras palavras, a expressão de tal fenótipo nas células T terminalmente diferenciadas não pode ser revertida, permanecendo elevada por um longo tempo, até que a célula morra.

Além disso, embora o perfil fenotípico de senescência imune não tenha diferido entre os grupos avaliados, estes achados nos levaram a hipótese que diferenças em termos de funcionalidade de células T poderiam existir entre pacientes NR-LV/HIV e R-. Essa hipótese foi levantada pelo fato do fenômeno de imunosenescência consistir em um conjunto de fatores que caracterizam um prejuízo qualitativo importante do sistema imune, com um comprometimento multifatorial. Por exemplo, células T senescentes apresentam um encurtamento do telômero e perda da capacidade proliferativa, bem como uma deficiência na capacidade de produzir citocinas (Brenchley et al. 2003; Appay & Sauce, 2017). Além disso, de forma subjacente a esse processo, pode ser observada uma senescência global, que afeta os órgãos linfoides primários, como timo, acarretando na exaustão de suas funções. Dessa forma, pode-se ter um impacto direto sobre a funcionalidade tímica e, conseqüentemente, na geração de novas células T (Douek et al. 1998), bem como na distribuição do repertório V β dessas células na periferia, resultando em um repertório limitado e com o acúmulo de células T senescentes (Xu e Larbi, 2017; Sokoya, 2017).

Diante disso, além de comprovar possíveis diferenças em termos funcionais, a avaliação dessas conseqüências imunológicas do grau de imunosenescência pode ajudar a explicar as diferentes capacidades de reconstituição imunológica observadas entre pacientes NR-LV/HIV e R-, bem como os seus diferentes desfechos clínicos. Dessa forma, nossa primeira pergunta foi: será que essa reconstituição imune diferenciada entre NR-LV/HIV e -R poderia refletir na periferia em termos de alterações no perfil de distribuição do repertório de células T e no *status* inflamatório periférico? Além disso, tornou-se crucial a elucidação do possível compartimento responsável por essa reconstituição, sobretudo em pacientes NR-LV/HIV, podendo ser de origem periférica, refletida por um alto *turnover* de células T, ou de origem central, como resultado de uma melhor capacidade tímica em renovar esse *pool* de células T. A restituição ou prejuízo desses fatores podem estar relacionados com uma resposta imune efetora mais efetiva ou gravemente comprometida, respectivamente, que é responsável pelo controle parasitário e,

consequentemente, influencia na suscetibilidade às recidivas entre os pacientes LV/HIV.

Nós fomos buscar as respostas para essas perguntas na nossa avaliação mais recente e, surpreendentemente, observamos um perfil de mobilização do repertório $V\beta$ do receptor de células T (TCRV β) expressivamente alterado em pacientes LV/HIV, cuja heterogeneidade foi mantida, sobretudo, entre pacientes R-LV/HIV durante todo o acompanhamento. Aliado a isso, tais pacientes R-LV/HIV mantiveram, em sua maioria, um intenso *status* pró e anti-inflamatório, visto pela manutenção de altos níveis plasmáticos de várias citocinas inflamatórias. Por outro lado, durante os períodos tardios do acompanhamento, os pacientes NR-LV/HIV mostraram uma aparente atenuação desse cenário imune periférico, com um perfil de mobilização do repertório TCRV β aparentemente mais próximo da normalidade e uma importante diminuição dos níveis plasmáticos das citocinas inflamatórias. Esse padrão observado entre os pacientes NR-LV/HIV, ao lado da melhor reconstituição imunológica nesse grupo de pacientes, foi acompanhado por um aumento significativo nos níveis de TREC em células do sangue periférico, o que refletiu uma melhor capacidade tímica de repopulação da periferia com o *output* de novas células T. Tal fato não foi observado entre pacientes R-LV/HIV, comprovando um comprometimento geral da resposta imune nesse grupo, que deve estar influenciando nas frequentes recidivas da LV.

Nesse contexto, perturbações no repertório TCRV β consistem em uma das formas de se comprovar a exaustão dos recursos imunes primários, de modo que sua análise pode apontar alterações quantitativas e qualitativas no seu perfil de distribuição. Dessa forma, a análise do repertório TCRV β reflete a diversidade deste e, consequentemente, a capacidade de iniciar uma resposta imune eficaz frente a uma variedade de diferentes antígenos, uma vez que o $\alpha\beta$ TCR é expresso pela grande maioria dos linfócitos T (90-99%) (Brazin et al. 2015). De fato, já foi demonstrado que indivíduos infectados pelo HIV que apresentam um perfil de repertório TCRV β mono-oligoclonal restrito tendem a

progredir mais rapidamente para a aids (Pantaleo et al. 1994). Isso sugere que o perfil de distribuição do repertório de células T pode influenciar o prognóstico da infecção pelo HIV (Soudeyns et al 1993; Kolte 2013; Heather et al 2016) e da sua associação com outras infecções, como com o vírus Epstein-Barr (EBV) (Hernandez et al. 2018).

Em nossa avaliação, verificamos que o repertório TCRV β em células T CD4⁺ sofreu importantes perturbações nos pacientes coinfectados LV/HIV com a expansão ou retração de várias famílias V β , independente de serem R-LV/HIV ou NR- e, sobretudo, na fase ativa da LV e logo após o tratamento da anti-*Leishmania*. Isso pode ser observado pelas comparações realizadas com os indivíduos saudáveis, que foram simultaneamente avaliados com vistas a definir frequências de normalidade e distribuição do repertório TCRV β em humanos adultos brasileiros. No entanto, para a subpopulação de linfócitos T CD8⁺, as mobilizações em comparação com a normalidade foram mais evidentes entre os pacientes NR-LV/HIV, ao longo do acompanhamento, seja com a expansão ou retração de algumas famílias V β . Por outro lado, no grupo R-LV/HIV, apenas a família V β 23 nas células T CD8⁺ estava expandida durante a fase ativa, e mais algumas poucas perturbações foram observadas apenas em termos de retração do repertório V β em células T CD8⁺. Desta forma, acredita-se que a ausência de expansões e a predominância de restrições podem refletir perturbações em algumas famílias importantes para o reconhecimento desses patógenos, principalmente quando envolvem o repertório de células T CD8⁺, que são essenciais na resposta efetora às infecções. Tal fato pode estar relacionado com uma diminuição na capacidade de controle parasitário, sobretudo naqueles pacientes R-LV/HIV.

A diminuição da frequência de diversas famílias V β já foi demonstrada em pacientes com HIV coinfectados com EBV, sendo que tais famílias eram mais frequentes entre os controles saudáveis avaliados, enfatizando um possível papel destas na resposta imune protetora a esses antígenos (Hernandez et al. 2018). Em nosso estudo, alguns destaques interessantes foram observados, como as famílias V β 3 e V β 18 em células T CD8⁺, que foram

expressivamente retraídas entre pacientes R-LV/HIV, e apesar de terem sido pouco mobilizadas entre os indivíduos saudáveis, foram amplamente expandidas nos pacientes NR-LV/HIV, sobretudo na LV ativa. Desse modo, estudos futuros sobre o perfil de mobilização do repertório frente ao estímulo parasitário/viral poderão esclarecer quais famílias estão envolvidas na resposta específica e se, de fato, tais restrições irão se confirmar em pacientes com frequentes recidivas.

Outro fator que pode estar relacionado às alterações no repertório de indivíduos cronicamente infectados pelo HIV-1 é o estado de exaustão imune. Este processo é consistente com a meia-vida curta de células T CD4⁺ infectadas pelo vírus, bem como com a morte induzida por ativação também de células não-infectadas. Em consequência, graves alterações na dinâmica do repertório TCRV β periférico podem ser observadas, cuja variabilidade pode ser até três vezes menor do que indivíduos não infectados (Heather et al. 2016). Apesar da eficiência da cART em suprimir a replicação viral e, comumente, restaurar a resposta imune, ainda que lentamente, aumentando as contagens de linfócitos T CD4⁺, tais perturbações no perfil de mobilização do repertório TCRV β tendem a se perpetuar ou são apenas parcialmente restauradas com o uso da cART (Giacchia-Gripp et al. 2005; Heather et al. 2016). Ainda assim, a emergência de alguns segmentos V β diferentes daqueles utilizados pelos indivíduos infectados ainda sem cART, alterações no perfil de distribuição do repertório TCRV β e aumento da diversidade têm sido relatados em pacientes HIV positivos após a admissão da cART (Giacchia-Gripp et al. 2005; Yin et al. 2009; Conrad et al. 2012; González-Serna et al. 2013).

Nesse contexto, a avaliação das alterações no repertório TCRV β na periferia daqueles pacientes NR-LV/HIV, os quais foram capazes de restaurar as contagens de linfócitos T CD4⁺ após a cART e o tratamento anti-*Leishmania*, poderia fornecer indícios de que a dinâmica de mobilização desse repertório também pudesse diferir entre NR-LV/HIV e R-. Embora nosso estudo não tenha evidenciado um perfil de mobilização V β característico entre os casos NR-LV/HIV e -R, sobretudo que pudesse sugerir uma possível relação

entre expansões periféricas e a reconstituição de células T CD4⁺, algumas particularidades foram observadas.

Primeiramente, algumas famílias V β foram altamente mobilizadas nas fases iniciais do acompanhamento dos NR-LV/HIV, mas tenderam a sofrer retrações nesse grupo após o tratamento anti-*Leishmania* (V β 9/V β 8 em T CD4⁺ V β 18/V β 23/V β 13.1/V β 5.2 em ambos T CD4⁺ e T CD8⁺), evidenciando uma dinâmica de menos mobilizações nas fases tardias do acompanhamento desse grupo. Isso fez com que os níveis de mobilização de algumas famílias TCRV β , aos 12 mpt dos NR-LV/HIV, se aproximassem dos níveis apresentados pelos indivíduos saudáveis. Interessantemente, uma alta mobilização da família V β 5.2 já foi demonstrada na fase ativa da leishmaniose cutânea, seja na ausência ou presença de estímulo específico (Keesen et al. 2011). Além disso, tal família estava relacionada com uma maior expressão de CD45RO e HLA-DR, e produção de IFN- γ , TNF e IL-10 frente ao antígeno específico, além de estar correlacionada positivamente com o tamanho da lesão (Keesen et al. 2011).

Adicionalmente, a família V β 3 foi altamente mobilizada em T CD4⁺ e T CD8⁺ entre os pacientes NR-LV/HIV durante todo o acompanhamento clínico, mas aparentemente restrita entre os pacientes R-LV/HIV, apontando uma possível participação dessa família no controle parasitário e na manutenção da remissão clínica da LV. Um estudo anterior do grupo já havia verificado que a família V β 3 era altamente mobilizada em indivíduos saudáveis e em pacientes HIV positivos brasileiros, seja na ausência ou presença da cART (Giacoia-Gripp et al. 2005). Desta forma, em um cenário de associação LV/HIV e diante da intensa ativação imune, assim como a família V β 3, as famílias que parecem ser mais restritas entre pacientes R-LV/HIV (V β 9 e V β 18 em células T CD4⁺ e T CD8⁺, respectivamente), sobretudo durante a LV ativa, podem estar relacionadas ao processo de exaustão clonal mais agravado e que não se recupera nesse grupo.

Finalmente, embora diferentes famílias tenham sido mobilizadas entre os grupos R- e NR-, a análise através *heatmap* permitiu avaliar os padrões dessas perturbações de maneira individual e ao mesmo tempo global. Dessa forma,

nossa análise sugeriu um repertório TCRV β em células T CD4⁺ mais homogêneo entre os pacientes LV/HIV, especialmente aqueles NR-LV/HIV, com padrões de mobilizações das diferentes famílias V β mais semelhantes entre si. Por outro lado, o repertório TCRV β em células T CD8⁺, aparentemente, se mostrou extremamente heterogêneo quando os pacientes são avaliados individualmente, uma vez que diferentes padrões de mobilização das famílias V β (expansões ou retrações) foram demonstrados pelos pacientes LV/HIV. Tais alterações diferenciais pareceram mais intensas entre os pacientes R-LV/HIV, conforme o índice de mobilização obtido através do *heatmap*. Esse perfil pode estar relacionado com o grau de ativação de linfócitos T CD8⁺ e com as recidivas, já que se trata de uma população importante para o controle parasitário (Kaushal et al. 2014; Jawed et al. 2019). De um modo geral, maiores perturbações têm sido descritas no repertório TCRV β de células T CD8⁺ em pacientes infectados pelo HIV, independentemente do *status* clínico, das contagens de células T CD4⁺ e T CD8⁺ e da carga viral (Gorochov et al. 1998). Por outro lado, o repertório de células T CD4⁺ parece ser gravemente perturbado quando se tem baixas contagens de células T CD4⁺ e alta viremia, comumente, durante a fase aguda da infecção (Gorochov et al. 1998).

Apesar desses achados, nenhum perfil característico da dinâmica do repertório TCRV β em termos de clonalidade pôde ser observado neste estudo, sobretudo que pudesse ser relacionado com as recidivas da LV em pacientes LV/HIV. Ainda assim, acredita-se que as restrições em determinadas famílias V β , bem como a maior heterogeneidade mostrada pelos pacientes R-LV/HIV podem estar relacionadas ao grau de ativação contínuo e ao *status* de exaustão dos recursos imunes primários, que impactam no controle parasitário periférico e, por sua vez, nas recidivas da LV. Estudos futuros, principalmente que permitam avaliar a dinâmica desse repertório TCRV β em resposta ao estímulo antigênico específico, poderão elucidar melhor tais questões.

Corroborando com as observações em pacientes NR-LV/HIV, onde o grau de reconstituição imune foi acompanhado pela diminuição da intensa

ativação imune crônica e da diminuição das perturbações do repertório TCRV β , o perfil inflamatório periférico também diferiu após o tratamento anti-*Leishmania* desse grupo em relação ao R-LV/HIV. Dessa forma, observou-se que os pacientes NR-LV/HIV tenderam a diminuir os níveis plasmáticos de importantes citocinas pro- e anti-inflamatórias já após os 6 mpt, demonstrando uma aparente reversão do *status* inflamatório, diferente dos pacientes R-LV/HIV que mantiveram tais níveis elevados durante todo o acompanhamento clínico. É bem descrito o envolvimento de uma “tempestade de citocinas” na gravidade da leishmaniose visceral (Costa et al. 2013), assim como na piora do quadro imunológico e progressão para aids em indivíduos HIV positivos (Leeansyah et al. 2013). Nosso grupo também verificou previamente que há uma correlação positiva entre os níveis de IL-6, IL-8, TNF e IL-17 com a presença da *Leishmania* em pacientes LV/HIV (Santos-Oliveira et al. 2013), confirmando a potencialização do *status* inflamatório na coinfeção. Interessantemente, em nosso estudo, a manutenção dos elevados níveis séricos de IL-10 entre os pacientes R-LV/HIV parecem confirmar o envolvimento dessa citocina em diversos mecanismos imunopatogênicos que culminam na perda do controle parasitário (Brodskyn & Kamhawi, 2018). Dentre esses mecanismos estão, principalmente, a deativação de macrófagos e inibição da morte de amastigotas pela *downregulação* da produção de TNF e NO, além da supressão de múltiplas funções de apresentação de antígeno das DCs e macrófagos (Nylén & Sacks, 2007). Isso pode ser sugerido pelo fato de apenas os pacientes R-LV/HIV ainda mostrarem carga parasitária detectável aos 12 mpt, diferente do grupo NR-LV/HIV, onde todos os pacientes mostraram supressão parasitária no sangue periférico.

Finalmente, compondo um círculo vicioso, esse *status* inflamatório pode contribuir para a manutenção dos elevados níveis de ativação celular que, por sua vez, comprometem continuamente o estado imunológico geral dos pacientes R-LV/HIV, podendo influenciar em funções imunológicas de órgãos-centrais, como o timo. Por outro lado, a reversão desse cenário pelos pacientes NR-LV/HIV, ainda que não relacionada a uma diminuição no percentual de

células senescentes (artigo 1) e com um perfil característico de repertório TCRV β na periferia, pode ter impacto direto na capacidade tímica, que pode estar contribuindo para o grau de reconstituição imune observado nesses pacientes. Nesse contexto, sabe-se que a vasta maioria células T ativadas, torna-se senescente e rapidamente morre por apoptose, acarretando um ônus adicional no que diz respeito à capacidade tímica de renovação do *pool* de células T CD4⁺ na periferia (Zicari et al. 2019; Rb-Silva et al. 2019).

Dessa forma, o grau de reconstituição imune pode estar diretamente associado ao comprometimento no *output* tímico, seja pelo prejuízo na funcionalidade tímica em si, seja pela deficiência nos progenitores de linfócitos T provenientes da medula óssea, ou mesmo pela morte dos emigrantes tímicos recentes (ETRs) (Hazenberg et al 2001), considerando-se o cenário de intensa ativação. De fato, o prejuízo no *output* tímico, avaliado pela quantificação dos níveis de TREC em ETRs (Douek et al 1998), tem sido evidenciado em pacientes HIV positivos, sobretudo na ausência da cART (Ferrando-Martinez et al. 2017; Rosado-Sánchez et al. 2017; De Voeght et al. 2017; Zicari et al. 2019; Rb-Silva et al. 2019). Sabe-se que a função tímica pode ser diretamente afetada pela capacidade do vírus infectar ou no mínimo afetar células estromais tímicas, progenitores de linfócitos T, bem como tímócitos, resultando numa supressão da produção de novas células T e contribuindo para a baixa reconstituição imunológica (Savino et al. 1986; Ye et al. 2004; Savino et al. 2016). Além disso, a persistência do estímulo viral e, conseqüentemente, a própria ativação crônica, conduzem a uma exaustão e saturação da funcionalidade tímica (Appay & Kelleher, 2017; Zicari et al. 2019). Diante disso, os pacientes HIV positivos apresentam baixos níveis de TREC em PBMC e em células T CD4⁺ e T CD8⁺ separadamente na periferia, os quais são parcialmente restaurados após a admissão da cART (Ferrando-Martinez et al. 2017; De Voeght et al. 2017; Rb-Silva et al. 2019).

No presente estudo, os níveis de TREC/PBMC foram baixos durante a fase ativa da LV nos pacientes LV/HIV, sugerindo um comprometimento tímico na renovação desse *pool* de células, apesar do uso da cART e da carga viral

baixa ou indetectável na grande maioria dos pacientes (13 de 18 pacientes). Além disso, tais níveis foram mais baixos do que aqueles encontrados em pacientes mono infectados pelo HIV. Tal fato aponta que não só o HIV residual, mas também a presença da *Leishmania* pode estar contribuindo para uma potencialização do prejuízo da função tímica de pacientes LV/HIV. Estudos já evidenciaram que a *Leishmania* é capaz de afetar progenitores de células T na medula óssea, além de já ter sido demonstrado o impacto da infecção por *L. infantum* no microambiente tímico, o que pode favorecer um *output* tímico deficiente (Cuervo-Escobar et al. 2014; Kumar et al. 2017; Losada-Barragán et al. 2019). Além disso, o parasito ao potencializar os níveis de ativação imune crônica (Santos-Oliveira et al. 2010; Casado et al. 2015), sobretudo em pacientes R-LV/HIV, pode agravar o comprometimento da função tímica.

Interessantemente, esse déficit no *output* tímico se mostrou mais intenso naqueles pacientes R-LV/HIV, uma vez que estes mantiveram baixos níveis de TREC/10⁶PBMC durante todo o acompanhamento clínico, ao passo que pacientes NR-LV/HIV recuperaram esses valores aos 10 mpt. O fato dos pacientes NR-LV/HIV terem “atenuado” seu *status* imunológico geral, minimizando os impactos negativos que o próprio *status* inflamatório e ativado pode acarretar sobre o sistema imune central, pode contribuir para esse processo de reconstituição. Por outro lado, o *output* tímico comprometido nos pacientes R-LV/HIV corroborou com o prejuízo na reconstituição imunológica, mantido pelas baixas contagens absolutas de células T CD4⁺, confirmando a importância da participação tímica em restaurar a resposta imune periférica necessária ao controle parasitário. A correlação positiva entre os níveis de TREC aos 10 mpt e o número total de recidivas apresentado pelos pacientes LV/HIV reforçou essa importância. Isso porque, o acúmulo de um *pool* de células T senescentes e, possivelmente, não funcionais, e a ausência de repopulação com um repertório de células T, com novas e diferentes especificidades, resulta em um déficit resposta imune efetora ao parasito, culminando na ocorrência de recidivas da LV.

Adicionalmente, consideramos a importância de se quantificar, futuramente, esse parâmetro entre as subpopulações de células T, separadamente. Tal avaliação ajudará a confirmar se a manutenção da depleção de células T CD4⁺ entre pacientes R-LV/HIV resulta, de fato, de um prejuízo a nível tímico para repopular essa subpopulação, e não apenas de expansão e morte por ativação dessas células na periferia. Além disso, em um cenário de comprometimento na capacidade de *output* tímico, acredita-se que o conteúdo de TREC em células T CD8⁺ também esteja afetado. Ao mesmo tempo, tal análise confirmará se o aumento das contagens de células T CD4⁺ entre os casos NR é acompanhado por um aumento no número de TREC nessa subpopulação e não apenas por uma proliferação homeostática periférica ou redistribuição de células T a partir dos tecidos linfóides (Sempowski & Haynes, 2002). Acreditamos que o ganho de células T CD4⁺ não está relacionado à proliferação celular periférica, diante dos altos níveis de células T senescentes observados no sangue periférico destes pacientes.

Finalmente, além do prejuízo no *output* tímico e das perturbações na dinâmica do repertório TCRV β , espera-se que pacientes R-LV/HIV apresentem um déficit qualitativo na resposta imune celular efetora. Estudos em andamento estão avaliando o grau de comprometimento da capacidade proliferativa e de produção de citocinas dos linfócitos T, como parte do processo de imunosenescência nesses pacientes LV/HIV. Desta forma, esse conjunto de fatores pode, então, culminar numa maior suscetibilidade às recidivas da LV entre pacientes R-LV/HIV, que possuem um sistema imune por si só deficiente, mas que a cada recidiva se torna cada vez mais incapaz de controlar o parasito.

Diante de tudo que já foi discutido até aqui, é possível concluir que a maior parte do conhecimento acerca da imunopatogênese da coinfeção LV/HIV envolve o compartimento de células T. Até o momento, nenhum outro trabalho avaliou o papel das diferentes subpopulações de linfócitos B nessa associação, ao menos em termos de frequência fenotípica. No presente estudo, nós investigamos a presença de subpopulações de células B que têm

sido descritas na imunopatogênese da infecção pelo HIV-1. Diante do estado de ativação crônica e suas consequências sobre o sistema imune de indivíduos coinfectados, no que diz respeito aos linfócitos T, nossa hipótese foi que o mesmo ocorreria para a resposta imune humoral. Além disso, diante das observações prévias sobre a possível relação da IgG3 anti-*Leishmania* com a evolução clínica em termos de remissão e recidivas da LV, tornou-se importante investigar a dinâmica fenotípica dessas células B no decorrer de um acompanhamento prospectivo de pacientes LV/HIV.

Diante disso, avaliamos as frequências de células B quanto aos perfis de diferenciação, ativação e exaustão celular em uma casuística de 19 pacientes LV/HIV que foram, simultaneamente, comparados com 15 pacientes com LV sem HIV (controles LV) e voluntários saudáveis. Tais pacientes LV/HIV foram, em sua maioria, homens adultos que já possuíam diagnóstico prévio de infecção pelo HIV e, portanto, faziam uso de cART e apresentavam, na maior parte dos casos, carga viral baixa ou indetectável, embora na presença de baixas contagens de células T CD4⁺, durante a LV ativa. Com vistas a avaliar as possíveis relações dos fenótipos investigados sobre a ocorrência de recidivas da LV, novamente eles foram separados em NR-LV/HIV e R-. Diante da emergência de casos recidivantes entre pacientes com LV sem HIV-1, este grupo também foi separado em NR- e R-. A princípio, não foram observadas diferenças estatísticas entre esses pacientes NR-LV/HIV e R-, em termos de parâmetros que pudessem enviesar os principais resultados obtidos desta avaliação, tais como idade, tempo de diagnóstico de HIV, carga viral e contagens de T CD4⁺ na fase ativa da doença.

Primariamente, verificou-se que a frequência de células B totais CD19⁺ estava diminuída em pacientes LV/HIV durante a fase ativa da LV, e isso foi acompanhado por menores frequências dos compartimentos de células B *naive* e *resting* de memória, em comparação aos controles sadios. Um resultado similar foi observado em pacientes infectados apenas pelo HIV-1 antes de iniciarem a cART, onde tais subpopulações estavam significativamente diminuídas em comparação aos níveis encontrados um ano após o uso da

terapia (Moir et al. 2007). No entanto, a restauração desse déficit no *pool* de células B *resting* de memória em indivíduos infectados pelo HIV-1, parece ser possível apenas com a introdução precoce da cART (Moir et al. 2010), sendo dificilmente restaurado quando se estabelece a fase crônica da infecção, mesmo após longo tempo de terapia (Pensieroso et al. 2013). De fato, na nossa avaliação, foi possível observar um aumento expressivo nas frequências de linfócitos B CD19⁺ e *naive* após o tratamento da LV. No entanto, nenhuma restauração no compartimento de células B *resting* de memória foi observada. A ausência de restauração nessa subpopulação também já foi observada em pacientes coinfetados com o vírus da hepatite C e com HIV (HCV/HIV) mesmo em uso de cART e 24 meses após terapia específica (Kohli et al. 2015). Dessa forma, tais achados apontam que a admissão da cART, bem como o tratamento específico no caso das coinfeções, normalmente, são capazes de restaurar as frequências dos subtipos de células B durante a infecção crônica pelo HIV-1, exceto do *pool* de células B *resting* de memória. Isso aponta que outros mecanismos, além do vírus, podem impactar na disfunção dessas células, como a linfopenia de células T CD4⁺ e o grau de ativação imune crônica (Amu et al. 2014).

Nesse contexto, similar ao que acontece com o compartimento de células T, a imunidade humoral na infecção pelo HIV-1, e também na LV, é marcada por uma hiperativação policlonal de células B devido à natureza crônica da infecção, sendo caracterizada por outros fatores além da hipergamaglobulinemia (Lane et al. 1983; Galvão-Castro et al. 1984; Goto & Piantri, 2009). Dentre esses fatores pode-se apontar a frequência elevada de células B caracterizadas fenotipicamente por marcadores, como CD27, CD25, CD69, dentre outros, além de outros subtipos altamente diferenciados, como os plasmócitos. Adicionalmente, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IFN- α , TNF, IL-6, IL-10) e fatores de crescimento, como BAFF, também já foram apontados como envolvidos nesse processo (Moir & Fauci, 2009; Borhis et al. 2017). Como consequência dessa ativação imune crônica induzida pelo HIV-1, tem sido descrito o aumento da frequência de células B com características de

células exaustas/senescentes, inicialmente descritas como células B de memória *like-tissue* (Moir et al. 2008). Essas células foram, primariamente, caracterizadas pela presença do receptor inibitório FcRL-4, cujo papel imunoregulatório foi comprovado por inibir potencialmente a sinalização do BCR e a resposta proliferativa dessas células (Ehrhardt et al. 2005; Moir et al. 2008). Posteriormente, essas células B exaustas foram caracterizadas pela baixa expressão de CD21 e CD27, e demonstrou-se que sua frequência estava aumentada no sangue periférico de indivíduos HIV positivos virêmicos, bem como na resposta imune específica ao vírus (Moir et al. 2008).

Desta forma, estes e outros estudos apontam que a replicação persistente do HIV, conduz a um fenótipo imune de ativação e exaustão de células B, que não está normalmente presente em indivíduos saudáveis. Tal fenótipo tem sido definido por marcadores clássicos e receptores inibitórios, que também é demonstrado em outras doenças, infecciosas ou não, no qual a ativação imune crônica e/ou inflamação estão presentes (Moir & Fauci, 2014). Adicionalmente, na LV canina, algumas moléculas associadas à exaustão celular, como PD-1, CTLA-4 e TIM-3, possivelmente, estão relacionados à morte por apoptose de células B, sobretudo no microambiente esplênico, e à falha no controle parasitário (de Souza et al. 2019).

Corroborando com esses achados, nosso estudo demonstrou que pacientes LV/HIV apresentaram níveis elevados de células B ativadas e, conseqüentemente, células B fenotipicamente exaustas, durante a LV ativa, em comparação aos indivíduos saudáveis. Apesar de ser observada uma diminuição dos níveis desses subtipos de células B após o tratamento anti-*Leishmania*, estes não foram revertidos a níveis similares aos controles saudáveis no que se refere ao *pool* de células B exaustas. Embora os pacientes LV/HIV tenham demonstrado uma tendência a níveis mais elevados dessas subpopulações em comparação aos pacientes com LV apenas, estes grupos tenderam à similaridade durante a LV ativa. No entanto, os pacientes com LV com longo tempo após o tratamento se aproximaram dos percentuais exibidos pelos indivíduos saudáveis em termos de ativação e exaustão de células B,

demonstrando o impacto da associação LV/HIV em potencializar tais parâmetros. Interessantemente, a relação entre o grau de ativação e exaustão de células B pode ser confirmada através de uma correlação significativamente positiva entre esses dois parâmetros, durante a fase ativa e logo após o tratamento da LV dos pacientes LV/HIV, corroborando com o que já foi descrito para o compartimento de células T.

Diante das diferenças previamente observadas quanto aos níveis séricos de Igs específicas aos antígenos de *Leishmania*, julgamos importante avaliar as frequências de plasmócitos de vida curta e de vida longa no sangue periférico desses pacientes. Apesar de poucas diferenças nas frequências dessas células terem sido observadas nos pacientes avaliados em comparação aos indivíduos saudáveis, alguns pontos podem ser ressaltados: 1) os níveis de plasmócitos de vida curta foram expressivamente inferiores aos de plasmócitos de vida longa no sangue periférico, e isso pode ser reflexo de uma compartimentalização do primeiro para sítios inflamatórios, como baço e fígado, e de uma constante circulação do segundo em virtude da persistência dos estímulos antigênicos; 2) no final do acompanhamento, foi observada uma diminuição dos níveis de ambas subpopulações nos controles LV, e de plasmócitos de vida longa em pacientes LV/HIV, embora essa observação seja na presença de um *n* ainda pequeno de pacientes. Tal fato pode ter relação com a diminuição do estímulo antigênico em virtude do sucesso terapêutico, sobretudo de antígenos circulantes entre sangue periférico e órgãos linfoides secundários. Além disso, esse achado pode estar relacionado com a diminuição dos títulos de Igs anti-*Leishmania* previamente observada com a remissão clínica nas leishmanioses (Fagundes-Silva et al. 2012; Bhattacharyya et al. 2014) (artigo 1).

Na infecção pelo HIV-1, níveis mais elevados de plasmócitos já foram evidenciados em pacientes com infecção recente em comparação àqueles cronicamente infectados, ambos na ausência de cART (Moir et al. 2010). Tais diferenças podem ser explicadas pelo fato da infecção pelo vírus induzir, precocemente, uma ativação policlonal e, conseqüentemente, uma

diferenciação terminal de células B presentes no sangue periférico e no tecido linfoide associado à mucosa intestinal (GALT) (Levesque et al. 2009). Esse mecanismo parece estar associado com a presença de anticorpos com diferentes especificidades, ou seja, não apenas anti-HIV, durante a fase aguda da infecção. No entanto, após a admissão da cART, os níveis dos plasmócitos no sangue periférico, comumente, diminuem em pacientes HIV positivos tanto com infecção recente como crônica, chegando a níveis similares aos indivíduos não-infectados (Moir et al. 2010). Em nosso estudo não foi realizado uma comparação com as frequências de plasmócitos de pacientes mono-infectados pelo HIV-1, porém os níveis dessas células nos casos LV/HIV aparentemente só diminuíram após longo tempo do tratamento anti-*Leishmania*, o que sugere uma contribuição dos antígenos parasitários em manter a frequência dessas células na circulação.

Interessantemente, foi observada uma correlação significativamente positiva entre os percentuais de células B ativadas e os níveis de plasmócitos de vida curta e de vida longa, durante a fase ativa e logo após o tratamento dos pacientes LV/HIV. Tal fato parece sugerir uma relação entre o estado geral de ativação e de diferenciação dessas células B presentes no sangue periférico, sobretudo nos estágios precoces da infecção, que deve ser diretamente influenciada pela presença dos antígenos circulantes. Dessa forma, assim como o *status* de ativação, a proporção de plasmócitos circulantes no sangue periférico é significativamente elevada mediante uma exposição antigênica contínua. Tal fato tem apontado os plasmócitos circulantes, bem como os anticorpos específicos secretados por esses, como possíveis biomarcadores de tuberculose (TB) ativa, seja em pacientes co-infectados pelo HIV ou não, uma vez que estão ausentes na TB latente (Ashenafi et al. 2013). Mais estudos são necessários para avaliar o papel dessas subpopulações na co-infecção LV/HIV.

Adicionalmente, corroborando com os resultados anteriores do grupo, apresentados no artigo 1 dessa tese, níveis elevados de IgG total, IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* também foram observados nos pacientes LV/HIV, em comparação a indivíduos saudáveis provenientes de mesma área endêmica.

Embora esse resultado confirme, mais uma vez, a hipergamaglobulinemia clássica da associação LV/HIV, a relação deste parâmetro com a evolução clínica dos pacientes avaliados só será possível após a avaliação das demais fases do acompanhamento, o que poderá reafirmar o papel das subclasses na predição dos desfechos clínicos.

Finalmente, todos esses resultados apontam, de forma original, que similarmente aos linfócitos T, o compartimento de células B também pode estar alterado, sobretudo diante das baixas frequências de células B *resting* de memória e das frequências elevadas de linfócitos B expressando o fenótipo de exaustão. Apesar disso, ainda não foi possível relacionar as frequências fenotípicas dos subtipos de células B avaliados nesse estudo (*naive*, *resting* de memória, ativadas, exaustas e plasmócitos), com o prognóstico clínico desses pacientes no que se refere à ocorrência de recidivas da LV. Estudos futuros poderão esclarecer o papel funcional desses subtipos de células B na resposta imune humoral específica e sua possível relação com o prognóstico da LV.

7. CONCLUSÕES

- ✓ O *status* virológico (carga viral), parasitológico (carga parasitária) e imunológico (contagens de linfócitos T CD4⁺) dos pacientes coinfectados é similar durante a fase ativa da doença, independente dos pacientes apresentarem um único episódio de LV (NR-/não-recidivantes) ou mais de um episódio (R-/recidivantes), reforçando a influência dos antígenos parasitários e, portanto, da infecção por *Leishmania* na potencialização dos parâmetros imunológicos;
- ✓ Após longo tempo do tratamento anti-*Leishmania* (6 e 12mpt), o perfil imunológico dos pacientes NR-LV/HIV diferiu dos R-LV/HIV, de modo que os NR- evoluíram com: 1) níveis indetectáveis de carga parasitária na periferia; 2) redução dos percentuais de células T CD4⁺ e T CD8⁺ ativadas e de produtos de translocação microbiana (sCD14); 3) diminuição dos níveis de Igs anti-*Leishmania*, como IgG, IgG1 e especialmente, da subclasse IgG3;
- ✓ A manutenção do elevado grau de ativação de linfócitos T, translocação microbiana e de IgG3 anti-*Leishmania* podem se constituir em bons preditores de recidivas da LV em pacientes coinfectados pelo HIV-1;
- ✓ A manutenção dos percentuais elevados de linfócitos T senescentes durante todo o acompanhamento dos pacientes LV/HIV (NR- e R-) pode estar associado ao fato da imunosenescência ser um fenômeno irreversível, definido por um sistema imune cronicamente ativado, que não se modifica apesar da cART e do tratamento anti-*Leishmania*;
- ✓ Os pacientes NR-LV/HIV apresentaram um ganho importante nas contagens absolutas de linfócitos T CD4⁺ após o tratamento da LV, apontando um grau de reconstituição imune diferenciado daqueles pacientes R-LV/HIV;
- ✓ A similaridade nos percentuais de células T senescentes entre os pacientes coinfectados sugere que a capacidade proliferativa dessas células não deve estar contribuindo para o grau de reconstituição imune diferenciado entre NR- e R-;

- ✓ O repertório de famílias V β das células T CD4⁺ e T CD8⁺ encontrou-se alterado (expansões ou retrações) nos pacientes LV/HIV, recidivantes ou não-recidivantes, sobretudo na LV ativa, refletindo o grave prejuízo imunológico e o intenso grau de ativação celular observado nesta fase do acompanhamento;
- ✓ A análise individual dos pacientes LV/HIV (*heatmap*) demonstrou um repertório mais homogêneo em células T CD4⁺, com a retração de algumas famílias V β nas fases mais tardias do acompanhamento prospectivo (12 mpt), as quais tinham sido altamente mobilizadas na LV ativa. Essa diminuição foi mais consistente nos pacientes NR-LV/HIV, o que pode estar relacionado aos menores níveis de ativação celular ou mesmo uma deleção clonal pós-ativação de uma resposta imune efetora ao parasito;
- ✓ O repertório de células T CD8⁺ se mostrou mais heterogêneo ao longo de todo o acompanhamento, com inúmeras mobilizações (expansões e/ou retrações) de diferentes famílias V β não distribuídas uniformemente entre pacientes LV/HIV, em especial os R-, o que pode estar de acordo com a manutenção do grau de ativação celular neste grupo;
- ✓ A redução dos níveis plasmáticos de citocinas pró- e anti-inflamatórias em pacientes NR-LV/HIV, diferente do que ocorreu com os R-, foi coerente com a diminuição do grau de ativação, bem como com a aparente atenuação da mobilização do repertório TCRV β longo tempo pós-tratamento;
- ✓ A manutenção dos níveis de IL-10 nos pacientes recidivantes, cuja carga parasitária foi detectável, para alguns, mesmo após 12 mpt, reforça o papel desta citocina na imunopatogênese da LV, sobretudo em termos de influência sobre os mecanismos de controle parasitário;
- ✓ Ambos os grupos NR-LV/HIV e R- mostraram um comprometimento no *output* tímico na fase ativa da LV, coerente com o grau de imunossupressão e ativação/inflamação nessa fase da doença;
- ✓ O timo parece ser determinante para reconstituição diferenciada de células T na periferia dos pacientes NR-LV/HIV e R-, uma vez que os não-recidivantes apresentaram uma recuperação da capacidade tímica, refletida através do aumento dos níveis de TREC/10⁶PBMC aos 10 mpt;

- ✓ A capacidade tímica de reconstituir a periferia com novas células T com possível potencial efetor influencia a qualidade da resposta imune ao parasito que, por sua vez, pode contribuir para a manutenção da remissão clínica;
- ✓ A manutenção do grau de ativação/inflamação, ao lado de intensas perturbações no repertório TCRV β e de um déficit do *output* tímico pode contribuir para uma resposta imune efetora comprometida o que, por sua vez, predispõe os pacientes coinfetados às frequentes recidivas da LV;
- ✓ Semelhante ao que é observado para os linfócitos T, uma intensa ativação de linfócitos B estava correlacionada com as frequências elevadas de células B exaustas, sobretudo durante os períodos iniciais do acompanhamento;
- ✗ A avaliação do perfil de células B *resting* de memória na coinfeção LV/HIV apontou para um importante prejuízo na frequência destas células no sangue periféricos dos pacientes coinfetados, que parece não ser revertido mesmo após o tratamento anti-*Leishmania*;
- ✓ Os níveis de exaustão de células B dos pacientes LV/HIV tenderam a diminuir após o tratamento da LV, mas ainda se mantiveram superiores àqueles apresentados por controles sadios e pacientes com LV, corroborando com o fato do processo de exaustão culminar em um comprometimento imune a longo prazo;
- ✓ A ativação de natureza policlonal dos linfócitos B pode ser confirmada pelos níveis séricos de imunoglobulinas e pela alta frequência de plasmócitos, sobretudo dos de vida longa, observada no sangue periférico dos pacientes LV/HIV, o que pode refletir uma contínua circulação antigênica;
- ✓ Os pacientes com LV não infectados pelo HIV-1 apresentaram perfis fenotípicos de linfócitos B muito semelhantes aos LV/HIV, confirmando uma alteração nesse compartimento de células na infecção por *L. infantum* e, possivelmente, uma participação na imunopatogênese da doença, embora ainda não relacionada à evolução clínica da LV nestes grupos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adriaensen W, Dorlo TPC, Vanham G, Kestens L, Kaye PM, Griensven J van. Immunomodulatory Therapy of Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus-Coinfected Patients. *Front Immunol*. 2018. 8:1943.
- Alexandrino-de-Oliveira P, Santos-Oliveira JR, Dorval MEC, Da-Costa F das CB, Pereira GROL, Cunha RV da, Paniago AMM, Da-Cruz AM. HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in Central-west Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010. 105: 692–697.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Boer M Den, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Horst R Ter, López-Vélez R, Moreno J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. *Clin Microbiol Rev*. 2008. 21: 334–359.
- Amu S, Lavy-Shahaf G, Cagigi A, Hejdeman B, Nozza S, Lopalco L, Mehr R, Chiodi F. Frequency and phenotype of B cell subpopulations in young and aged HIV-1 infected patients receiving ART. *Retrovirology*. 2014. 11: 76.
- Amu S, Ruffin N, Rethi B, Chiodi F. Impairment of B-cell functions during HIV-1 infection. *Aids*. 2013. 27(15):2323–34.
- Andreani G, Lodge R, Richard D, Tremblay MJ. Mechanisms of interaction between protozoan parasites and HIV. *Curr Opin HIV AIDS*. 2012. 7(3):276–82.
- Andreani G, Ouellet M, Menasria R, Gomez AM. *Leishmania infantum* Amastigotes Trigger a Subpopulation of Human B Cells with an Immunoregulatory Phenotype. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015. 1–26.
- Ansari N a., Kumar R, Raj a., Salotra P. Elevated levels of IgG3 and IgG4 subclass in paediatric cases of kala azar. *Parasite Immunol*. 2008. 30: 403–409.
- Ansari NA, Saluja S, Salotra P. Elevated levels of interferon- γ , interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. *Clin Immunol*. 2006. 119: 339–345.
- Appay V, Almeida JR, Sauce D, Autran B, Papagno L. Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. *Exp Gerontol*. 2007. 42: 432–437.
- Appay V, Rowland-Jones SL. Premature ageing of the immune system: The cause of AIDS? *Trends Immunol*. 2002. 23: 580–585.
- Appay V, Sauce D. Assessing immune aging in HIV-infected patients. *Virulence*. 2017. 8: 529–538.
- Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol*. 2008. 214: 231–41.
- Appay V, Van Lier RAW, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. *Cytom Part A*. 2008. 73(11):975–83.
- Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med*. 2002. 8(4):379-85.
- Appay V, Kelleher AD. Immune activation and immune aging in HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*. 2016. 11(2):242-9.

- Araújo-Santos T, Andrade BB, Gil-Santana L, Luz NF, Santos PL Dos, Oliveira FA De, Almeida ML, Santana Campos RN De, Bozza PT, Almeida RP, Borges VM. Anti-parasite therapy drives changes in human visceral leishmaniasis-associated inflammatory balance. *Sci Rep*. 2017. 7: 1–8.
- Ashena S, Aderaye G, Zewdie M, Raqib R, Bekele A, Magalhaes I, et al. BCG-specific IgG-secreting peripheral plasmablasts as a potential biomarker of active tuberculosis in HIV negative and HIV positive patients. *Thorax*. 2013. 269–76.
- Atta M, Colossi R, Sousa-Atta MLB, Jeronimo SMB, Nascimento MDSB, Bezerra GF, Orge G, Carvalho EM. Antileishmanial IgG and IgE antibodies recognize predominantly carbohydrate epitopes of glycosylated antigens in visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004.99: 525–530.
- Badaró R, Gonçalves LO, Gois LL, Pereira Z. Leishmaniasis as a Manifestation of Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (IRIS) in HIV-Infected Patients: A Literature Review. *J Int Assoc Provid AIDS Care*. 2015. 14(5):402–7.
- Bandera A, De Benedetto I, Bozzi G, Gori A. Altered gut microbiome composition in HIV infection: Causes, effects and potential intervention. *Curr Opin HIV AIDS*. 2018. 13(1):73–80.
- Bankoti R, Gupta K, Levchenko A, Stäger S. Marginal Zone B Cells Regulate Antigen-Specific T Cell Responses during Infection. *J Immunol*. 2012.188(8):3961–71.
- Barreto de Souza V, Pacheco GJ, Silva AR, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Saraiva EM, Bou-Habbib DC. Increased *Leishmania* replication in HIV-1-infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis. *J Infect Dis*. 2006.194(6): 846-54.
- Bartovská Z, Beran O, Rozsypal H, Holub M. Antiretroviral treatment of HIV infection does not influence HIV-specific immunity but has an impact on non-specific immune activation. *Curr HIV Res*. 2011.9: 88–94.
- Becerra JC, Bildstein LS, Gach JS. Recent insights into the HIV/AIDS pandemic. *Microb Cell*. 2016. 3: 451–475.
- Benito JM, Lopez M, Lozano S, Martinez P, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V. CD38 expression on CD8⁺ T lymphocytes as a marker of residual virus replication in chronically HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004. 20(2):227-33.
- Bernier R, Barbeau B, Tremblay MJ, Olivier M. The lipophosphoglycan of *Leishmania donovani* up-regulates HIV-1 transcription in T cells through the nuclear factor-kappaB elements. *J Immunol*. 1998. 160: 2881–2888.
- Bhattacharyya T, Ayandeh A, Falconar AK, Sundar S, El-Safi S, Gripenberg M a., Bowes DE, Thunissen C, Singh OP, Kumar R, Ahmed O, Eisa O, Saad A, Silva Pereira S, Boelaert M, Mertens P, Miles M a.. IgG1 as a Potential Biomarker of Post-chemotherapeutic Relapse in Visceral Leishmaniasis, and Adaptation to a Rapid Diagnostic Test. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014. 8: e3273.
- Bofill M, Mocroft A, Lipman M, Medina E, Borthwick NJ, Sabin CA, Timms A, Winter M, Baptista L, Johnson MA, Lee CA, Phillips AN, Janossy G. Increased numbers of primed activated CD8⁺CD38⁺CD45RO⁺ T cells predict the decline of CD4⁺ T cells in HIV-1-infected patients. *AIDS*. 1996. 10(8):827-34.
- Borhis G, Trovato M, Chaoul N, Ibrahim HM, Richard Y. B-cell-activating factor and the B-cell compartment in HIV/SIV infection. *Front Immunol*. 2017. 8:1338.

- Boulougoura A¹, Sereti I. HIV infection and immune activation: the role of coinfections. *Curr Opin HIV AIDS*. 2016 Mar;11(2):191-200.
- Brazin KN, Mallis RJ, Das DK, Feng Y, Hwang W, Wang J huai, Wagner G, Lang MJ, Reinherz EL. Structural features of the $\alpha\beta$ TCR mechanotransduction apparatus that promote pMHC discrimination. *Front Immunol*. 2015. 6:441.
- Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, Casazza JP, Kuruppu J, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8. *Blood*. 2003. 101: 2711–2720.
- Brenchley JM, Price D a, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006. 12: 1365–1371.
- Brenchley JM, Douek DC. The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS*. 2008. 3(3):356-61.
- Brodskyn CI, Kamhawi S. Biomarkers for Zoonotic Visceral Leishmaniasis in Latin America. *Front Cell Infec. Microbiol*. 2018. 8: 245.
- Bucy RP, Hockett RD, Derdeyn CA, Saag MS, Squires K, Sillers M, Mitsuyasu RT, Kilby JM. Initial increase in blood CD4+ lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues. *J Clin Invest*. 1999. 103: 1391–1398.
- Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet*. 2018. 392: 951–970.
- Carvalho EM, Bacellar O, Barral a., Badaro R, Johnson WD. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *J Clin Invest*. 1989. 83: 860–864.
- Carvalho EM, Badaró R, Reed SG, Jones TC, Johnson WD. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest*. 1985. 76: 2066–2069.
- Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, Reed SG. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol*. 1994. 152(12):5949-56.
- Casado JL, Abad-Fernández M, Moreno S, Pérez-Elías MJ, Moreno a, Bernardino JI, Vallejo a. Visceral leishmaniasis as an independent cause of high immune activation, T-cell senescence, and lack of immune recovery in virologically suppressed HIV-1-coinfected patients. *HIV Med*. 2015. 16: 240–248.
- Castermans E, Hannon M, Dutrieux J, Humblet-Baron S, Seidel L, Cheynier R, et al. Thymic recovery after allogeneic hematopoietic cell transplantation with non-myeloablative conditioning is limited to patients younger than 60 years of age. *Haematologica*. 2011. 96(2):298–306.
- Celesia BM, Cacopardo B, Massimino D, Gussio M, Tosto S, Nunnari G, et al 2014. Atypical Presentation of PKDL due to *Leishmania infantum* in an HIV-Infected Patient with Relapsing Visceral Leishmaniasis. *Case Rep Infect Dis*. 2014. 3–5.
- Chang C-M, Hsu Y-W, Wong HS-C, Wei JC-C, Liu X, Liao H-T, Chang W-C. Characterization of T-Cell Receptor Repertoire in Patients with Rheumatoid Arthritis Receiving Biologic Therapies. *Dis Markers*. 2019. 1–12.

- Chiku VM, Silva KLO, Almeida BFM de, Venturin GL, Leal AAC, Martini CC de, Rezende Eugênio F de, Santos PSP dos, Lima VMF de. PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis. *Immunobiology*. 2016. 221: 879–888.
- Chou JP, Effros RB. T cell replicative senescence in human aging. *Curr Pharm Des*. 2013. 19(9):1680–98.
- Clarencio J, Oliveira CI de, Bomfim G, Pompeu MM, Teixeira MJ, Barbosa TC, Souza-Neto S, Carvalho EM, Brodskyn C, Barral A, Barral-Netto M. Characterization of the T-Cell Receptor V Repertoire in the Human Immune Response against *Leishmania* Parasites. *Infect Immun*. 2006. 74: 4757–4765.
- Connolly NC, Riddler SA, Rinaldo CR. Proinflammatory cytokines in HIV disease—a review and rationale for new therapeutic approaches. *AIDS Rev*. 2005. 7:168–80.
- Conrad JA, Ramalingam RK, Duncan CB, Smith RM, Wei J, Barnett L, Simons BC, Lorey SL, Kalams SA. Antiretroviral therapy reduces the magnitude and T cell receptor repertoire diversity of HIV-specific T cell responses without changing T cell clonotype dominance. *J Virol*. 2012. 86(8):4213–21.
- Costa ASA, Costa GC, Aquino DMC de, Mendonça VRR de, Barral A, Barral-Netto M, Caldas ADJM. Cytokines and visceral leishmaniasis: A comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012. 107: 735–739.
- Costa CHN, Werneck GL, Costa DL, Holanda TA, Aguiar GB, Carvalho AS, Cavalcanti JC, Santos LS. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010. 43: 386–392.
- Costa DL, Rocha RL, Carvalho RM a, Lima-Neto AS, Harhay MO, Costa CHN, Barral-Netto M, Barral AP. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathog Glob Health*. 2013. 107: 78–87.
- Costa RP, Gollob KJ, Fonseca LL, Rocha MOC, Chaves ACL, Medrano-Mercado N, Araújo-Jorge TC, Antas PRZ, Colley DG, Correa-Oliveira R, Gazzinelli G, Carvalho-Parra J, Dutra WO. T-cell repertoire analysis in acute and chronic human Chagas' disease: Differential frequencies of V β 5 expressing T cells. *Scand J Immunol*. 2000. 51: 511–519.
- Cota GF, Sousa MR de, Fereguetti TO, Rabello A. Efficacy of Anti-*Leishmania* Therapy in Visceral Leishmaniasis among HIV Infected Patients: A Systematic Review with Indirect Comparison. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013. 7(5):e2195.
- Cota GF, Sousa MR de, Rabello A. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in hiv-infected patients: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011. 5: 1–8.
- Crakes KR, Jiang G. Gut microbiome alterations during HIV/SIV infection: Implications for HIV cure. *Front Microbiol*. 2019. 10: 1–10.
- Cuervo-Escobar S, Losada-Barragán M, Umaña-Pérez A, Porrozzi R, Saboia-Vahia L, Miranda LHM, et al. T-Cell Populations and Cytokine Expression Are Impaired in Thymus and Spleen of Protein Malnourished BALB/c Mice Infected with *Leishmania infantum*. Stager S, editor. *PLoS One*. 2014. 9(12):e114584.
- Cunha Fievez AM da, Silva-Freitas ML, Sousa A de Q, Santos-Oliveira JR, Da-Cruz AM. Lower levels of leptin are associated with severity parameters in visceral leishmaniasis patients. *PLoS One*. 2019. 14: 1–15.

- Da-Cruz AM, Machado ES, Menezes JA, Rutowitsch MS, Coutinho SG. Cellular and humoral immune responses of a patient with American cutaneous leishmaniasis and AIDS. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992. 86(5): 511-2.
- Da-Cruz AM, Rodrigues AC, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Sabbaga-Amato V, Posada MP, Lindoso JA, Goto H. Alterações imunopatológicas na co-infecção HIV-*Leishmania*. *Rev Soc Bras Med Trop Suppl.* 2006. 3:75-9.
- Dayakar A, Chandrasekaran S, Veronica J, Bharadwaja V, Maurya R. Leptin regulates Granzyme-A, PD-1 and CTLA-4 expression in T cell to control visceral leishmaniasis in BALB/c Mice. *Sci. Rep.* 2017. 7: 1–12.
- Dayakar A, Chandrasekaran S, Veronica J, Maurya R. Leptin induces the phagocytosis and protective immune response in *Leishmania donovani* infected THP-1 cell line and human PBMCs. *Exp Parasitol.* 2016. 160:54–9.
- de Souza TL, da Silva AVA, Pereira L de OR, Figueiredo FB, Mendes Junior AAV, Menezes RC, et al. Pro-Cellular Exhaustion Markers are Associated with Splenic Microarchitecture Disorganization and Parasite Load in Dogs with Visceral Leishmaniasis. *Sci Rep.* 2019. 9(1):1–14.
- De Voeght A, Martens H, Renard C, Vaira D, Debruche M, Simonet J, et al. Exploring the link between innate immune activation and thymic function by measuring sCD14 and TRECs in HIV patients living in Belgium. *PLoS One.* 2017. 12(10):1–11.
- Deak E, Jayakumar A, Cho KW, Goldsmith-Pestana K, Dondji B, Lambris JD, McMahon-Pratt D. Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. *Eur J Immunol.* 2010. 40: 1355–1368.
- Deeks SG, Tracy R, Douek DC. Systemic Effects of Inflammation on Health during Chronic HIV Infection. *Immunity.* 2013. 39: 633–645.
- Deeks SG. HIV Infection, Inflammation, Immunosenescence, and Aging. *Annu. Rev. Med.* 2011. 62: 141–155.
- Del Giudice P, Mary-Krause M, Pradier C, Grabar S, Dellamonica P, Marty P, Gastaut JA, Costagliola D, Rosenthal E; French Hospital Database on HIV Clinical Epidemiologic Group. Impact of highly active antiretroviral therapy on the incidence of visceral leishmaniasis in a French cohort of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis.* 2002. 186(9):1366-70.
- Demarchi IG, Silveira TG V, Ferreira ICP, Lonardoni MVC. Effect of HIV protease inhibitors on New World *Leishmania*. *Parasitol Int.* 2012. 61: 538–544.
- Desai S, Landay A. Early immune senescence in HIV disease. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2010. 7: 4–10.
- Dillon SM, Lee EJ, Kotter C V., Austin GL, Dong Z, Hecht DK, Gianella S, Siewe B, Smith DM, Landay AL, Robertson CE, Frank DN, Wilson CC. An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia. *Mucosal Immunol.* 2014. 7: 983–994.
- Doitsh G, Greene WC. Dissecting How CD4 T Cells Are Lost During HIV Infection. *Cell Host Microbe.* 2016. 19(3):280-91.
- Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, Casazza JP, Kuruppu J, Kunstman K, Wolinsky S, Grossman Z, Dybul M, Oxenius A, Price DA, Connors M, Koup RA. HIV preferentially infects HIV-specific CD4 T cells. *Nature.* 2002. 417(6884): 95-8.

- Douek DC, Koup R a, McFarland RD, Sullivan JL, Luzuriaga K. Effect of HIV on thymic function before and after antiretroviral therapy in children. *J Infect Dis.* 2000. 181: 1479–1482.
- Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage E a, Massey JM, Haynes BF, Polis M a, Haase a T, Feinberg MB, Sullivan JL, Jamieson BD, Zack J a, Picker LJ, Koup R a. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature.* 1998. 396: 690–695.
- Douek DC, Roederer M, Koup R a. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med.* 2009. 60: 471–484.
- Douek DC. Immune activation, HIV persistence, and the cure. *Top Antivir Med.* 2013. 21: 128–132.
- Drumond O, Costa FAL. Quarenta anos de leishmaniose visceral no estado do Piauí: Revisão. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2011. 53: 3–11.
- Eggena MP, Barugahare B, Jones N, Okello M, Mutalya S, Kityo C, et al. Depletion of Regulatory T Cells in HIV Infection Is Associated with Immune Activation. *J Immunol.* 2005. 174(7):4407–14.
- Ehrhardt GRA, Hsu JT, Gartland L, Leu C, Zhang S, Davis RS, et al. Expression of the immunoregulatory molecule FcRH4 defines a distinctive tissue-based population of memory B cells. *J Exp Med.* 2005. 202(6):783–91.
- Esch KJ, Juelsgaard R, Martinez P a, Jones DE, Petersen C a. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. *J Immunol.* 2013. 191: 5542–5550.
- Fagundes-Silva G a, Vieira-Goncalves R, Nepomuceno MP, Souza M a de, Favoreto S, Oliveira-Neto MP, Da-Cruz a M, Gomes-Silva a. Decrease in anti-Leishmania IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite Immunol.* 2012. 34: 486–491.
- Fanales-Belasio E¹, Raimondo M, Suligoï B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita.* 2010. 46(1):5-14.
- Fernández-Mestre MT, Jaraquemada D, Bruno RE, Caro J, Layrisse Z. Analysis of the T-cell receptor β -chain variable-region ($V\beta$) repertoire in chronic human Chagas' disease. *Tissue Antigens.* 2002. 60: 10–15.
- Ferrando-Martinez S, Pablo-Bernal RS De, Luna-Romero M De, Ory SJ De, Genebat M, Pacheco YM, Parras FJ, Montero M, Blanco JR, Gutierrez F, Santos J, Vidal F, Koup RA, Muñoz-Fernández MÁ, Leal M, Ruiz-Mateos E. Thymic Function Failure Is Associated With Human Immunodeficiency Virus Disease Progression. *Clin Infect Dis.* 2017. 64: 1191–1197.
- Ferraz R, Cunha CF, Pimentel MI, Lyra MR, Schubach AO, Mendonça SCF de, Da-Cruz AM, Bertho AL. T-cell receptor $V\beta$ repertoire of CD8+ T-lymphocyte subpopulations in cutaneous leishmaniasis patients from the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015. 110: 596–605.
- Fiume G, Scialdone A, Albano F, Rossi A, Maria Tuccillo F, Rea D, Palmieri C, Caiazza E, Cicala C, Bellevicine C, Falcone C, Vecchio E, Pisano A, Ceglia S, Mimmi S, Iaccino E, Laurentiis A De, Pontoriero M, Agosti V, Troncone G, Mignogna C, Palma G, Arra C, Mallardo M, Maria Buonaguro F, Scala G, Quinto I. Impairment of T cell development and acute inflammatory response in HIV-1 Tat transgenic mice. *Sci Rep.* 2015. 5: 13864.

- Ford N, Meintjes G, Vitoria M, Greene G, Chiller T. The evolving role of CD4 cell counts in HIV care. *Curr Opin HIV AIDS*. 2017. 12(2):123–8.
- Freguja R, Gianesin K, Mosconi I, Zanchetta M, Carmona F, Rampon O, Giaquinto C, Rossi A De. Regulatory T cells and chronic immune activation in human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-infected children. *Clin Exp Immunol*. 2011. 164: 373–380.
- Gaardbo JC, Hartling HJ, Ronit A, Thorsteinsson K, Madsen HO, Springborg K, Gjerdrum LMR, Birch C, Laye M, Ullum H, Andersen ÅB, Nielsen SD. Different Immunological Phenotypes Associated with Preserved CD4+ T Cell Counts in HIV-Infected Controllers and Viremic Long Term Non-Progressors. *PLoS One*. 2013. 8: 1–10.
- Galvão-Castro B, Sá Ferreira J a, Marzochi KF, Marzochi MC, Coutinho SG, Lambert PH. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 1984. 56: 58–66.
- Gardinassi LG, Dotz V, Hipgrave Ederveen A, de Almeida RP, Nery Costa CH, Costa DL, et al. Clinical Severity of Visceral Leishmaniasis Is Associated with Changes in Immunoglobulin G Fc N-Glycosylation. *MBio*. 2014. 5(6):e01844-14.
- Garg R, Barat C, Ouellet M, Lodge R, Tremblay MJ. *Leishmania infantum* amastigotes enhance HIV-1 production in cocultures of human dendritic cells and CD4 T cells by inducing secretion of IL-6 and TNF-alpha. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009. 3: e441.
- Garg R, Lodge R, Descoteaux A, Tremblay MJ. *Leishmania infantum* promastigotes reduce entry of HIV-1 into macrophages through a lipophosphoglycan-mediated disruption of lipid rafts. *J Infect Dis*. 2008.197(12):1701-8.
- Gautam S, Kumar R, Maurya R, Ansari N, Rai M, Sundar S. IL-10 Neutralization Promotes Parasite Clearance in Splenic Aspirate Cells From Patients With Visceral Leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2011. 204(7): 1134–7.
- Gautam S, Kumar R, Singh N, Singh AK, Rai M, Sacks D, Sundar S, Nylén S. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2014. 209: 290–299.
- Gazzola L, Tincati C, Bellistri GM, Monforte Ad, Marchetti G. The absence of CD4+ T cell count recovery despite receipt of virologically suppressive highly active antiretroviral therapy: clinical risk, immunological gaps, and therapeutic options. *Clin Infect Dis*. 2009. 48(3):328-37.
- Giacoa-Gripp CBW, Neves I, Galhardo MC, Morgado MG. Flow Cytometry Evaluation of the T-Cell Receptor V β Repertoire Among HIV-1 Infected Individuals Before and After Antiretroviral Therapy. *J Clin Immunol*. 2005. 25(2):116–26.
- Gianesin K, Noguera-Julian A, Zanchetta M, Bianco P Del, Petrara MR, Freguja R, Rampon O, Fortuny C, Camós M, Mozzo E, Giaquinto C, Rossi A De. Premature aging and immune senescence in HIV-infected children. *Aids* 2016. 30: 1363–1373.
- Gioannini TL, Weiss JP. Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. *Immunol Res*. 2007. 39(1-3):249-60.
- Giorgi JV, Lyles RH, Matud JL, Yamashita TE, Mellors JW, Hultin LE, Jamieson BD, Margolick JB, Rinaldo CR JR, Phair JP, Detels R, MULTICENTER AIDS COHORT STUDY. Predictive value of immunologic and virologic markers after

- long or short duration of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002. 29(4):346-55.
- Giovannetti A, Pierdominici M, Marziali M, Mazzetta F, Caprini E, Russo G, Bugarini R, Bernardi ML, Mezzaroma I, Aiuti F. Persistently biased T-cell receptor repertoires in HIV-1-infected combination antiretroviral therapy-treated patients despite sustained suppression of viral replication. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003. 34(2):140-54.
- González-Serna A, Abad-Fernández M, Soriano-Sarabia N, Leal M, Vallejo A. CD8 TCR β chain repertoire expansions and deletions are related with immunologic markers in HIV-1-infected patients during treatment interruption. *J Clin Virol*. 2013. 58: 703–709.
- Gorochov G, Neumann AU, Kereveur A, Parizot C, Li T, Katlama C, Karmochkine M, Raguin G, Autran B, Debré P. Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy. *Nat Med*. 1998. 4: 215–221.
- Goto H, Lindoso JAL. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Brazilian J Med Biol Res*. 2004. 37: 615–623.
- Goto H, Prianti MDG. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2009. 51: 241–246.
- Goto Y, Omachi S, Sanjoba C, Matsumoto Y. Short report: Elevation of serum B-cell activating factor levels during visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2014. 91: 912–914.
- Grabmeier-Pfistershammer K, Stecher C, Zettl M, Roskopf S, Rieger A, Zlabinger GJ, Steinberger P. Antibodies targeting BTLA or TIM-3 enhance HIV-1 specific T cell responses in combination with PD-1 blockade. *Clin. Immunol*. 2017. 183: 167–173.
- Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med*. 2006. 12(3):289-95.
- Grund B, Baker J V., Deeks SG, Wolfson J, Wentworth D, Cozzi-Lepri A, Cohen CJ, Phillips A, Lundgren JD, Neaton JD. Relevance of interleukin-6 and D-dimer for serious non-AIDS morbidity and death among HIV-positive adults on suppressive antiretroviral therapy. *PLoS One*. 2016. 11: 1–16.
- Habib S, Andaloussi A El, Elmasry K, Handoussa A, Azab M, Elsayey A, Al-Hendy A, Ismail N. PDL-1 Blockade Prevents T Cell Exhaustion, Inhibits Autophagy, and Promotes Clearance of *Leishmania donovani*. *Infect Immun*. 2018. 86: 1–14.
- Hatzakis A, Touloumi G, Karanickolas R, Karafoulidou A, Mandalaki T, Anastassopoulou C, Zhang L, Goedert JJ, Ho DD, Kostrikis LG. Effect of recent thymic emigrants on progression of HIV-1 disease. *Lancet*. 2000. 355: 599–604.
- Hazenber MD, Verschuren MC, Hamann D, Miedema F, van Dongen JJ. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med (Berl)*. 2001. 79(11):631-40.
- He S, Zhang Z, Fu Y, Qin C, Li S, Han X, Xu J, Liu J, Jiang Y, Shang H. Thymic Function Is Most Severely Impaired in Chronic HIV-1 Infection, but Individuals With Faster Disease Progression During Early HIV-1 Infection Expressed Lower Levels of RTEs. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2015. 70: 472–478.

- Heather JM, Best K, Oakes T, Gray ER, Roe JK, Thomas N, Friedman N, Noursadeghi M, Chain B. Dynamic perturbations of the T-Cell receptor repertoire in chronic HIV infection and following antiretroviral therapy. *Front Immunol*. 2016. 6: 1–15.
- Henriquez S, Lecuroux C, Bitu M, Avettand-Fenoel V, Churaqui F, Catalan P, Cheret A, Boufassa F, Saez-Cirion A, Monceaux V, Meyer L, Goujard C, Lambotte O, Bourgeois C. The proportion of CD57+ cells among effector CD8+ T cells is lower HIV controllers compared to cART treated patients. *AIDS*. 2019. 33(14):2137-2147.
- Hensley-McBain T, Berard AR, Manuzak JA, Miller CJ, Zevin AS, Polacino P, Gile J, Agricola B, Cameron M, Hu SL, Estes JD, Reeves RK, Smedley J, Keele BF, Burgener AD, Klatt NR. Intestinal damage precedes mucosal immune dysfunction in SIV infection. *Mucosal Immunol*. 2018. 11(5):1429-1440.
- Hernández DM, Valderrama S, Gualtero S, Hernández C, López M, Herrera MV, Solano J, Fiorentino S, Quijano S. Loss of T-cell multifunctionality and TCR-V β repertoire against Epstein-Barr virus is associated with worse prognosis and clinical parameters in HIV+ patients. *Front Immunol*. 2018. 9: 1–15.
- Hicks L, Kant P, Tay PH, Vincini V, Schuster H, Rotimi O, et al. Visceral Leishmaniasis presenting with intestinal failure: a case report and literature review. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009. 21(1):117–22.
- Hodes RJ, Hathcock KS, Weng NP. Telomeres in T and B cells. *Nat Rev Immunol*. 2002. 2(9):699-706.
- Hunt PW, Hatano H, Sinclair E, Lee TH, Busch MP, Martin JN, et al. HIV-specific CD4+ T cells may contribute to viral persistence in HIV controllers. *Clin Infect Dis*. 2011. 52:681–7.
- INSIGHT START Study Group, Lundgren JD, Babiker AG, Gordin F, Emery S, Grund B, Sharma S, Avihingsanon A, Cooper DA, Fätkenheuer G, Llibre JM, Molina JM, Munderi P, Schechter M, Wood R, Klingman KL, Collins S, Lane HC, Phillips AN, Neaton JD. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *N Engl J Med*. 2015. 373: 795–807.
- Jawed JJ, Dutta S, Majumdar S. Functional aspects of T cell diversity in visceral leishmaniasis. *Biomed Pharmacother*. 2019. 117:109098.
- Karim R, Mack WJ, Kono N, Tien PC, Anastos K, Lazar J, et al. T-cell activation, both pre- and post-HAART levels, correlates with carotid artery stiffness over 6.5 years among HIV-infected women in the WIHS. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2014. 67(3):349–56.
- Karim R, Mack WJ, Stiller T, Operskalski E, Frederick T, Landay A, Young M a, Tien PC, Augenbraun M, Strickler HD, Kovacs A. Association of HIV clinical disease progression with profiles of early immune activation: results from a cluster analysis approach. *AIDS*. 2013. 27: 1473–1481.
- Kariminia A, Bourreau E, Ronet C, Couppie P, Sainte-Marie D, Tacchini-Cottier F, Launois P. Selective expression of the V beta 14 T cell receptor on *Leishmania guyanensis*-specific CD8+ T cells during human infection. *J Infect Dis*. 2007. 195(5):739-47.
- Kaushal H, Bras-Gonçalves R, Negi NS, Lemesre J-L, Papierok G, Salotra P. Role of CD8+ T cells in protection against *Leishmania donovani* infection in healed Visceral Leishmaniasis individuals. *BMC Infect Dis*. 2014. 14:653.

- Keesen TS, Antonelli LR, Faria DR, Guimarães LH, Bacellar O, Carvalho EM, Dutra WO, Gollob KJ. CD4(+) T cells defined by their V β T cell receptor expression are associated with immunoregulatory profiles and lesion size in human leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 2011. 165(3):338-51.
- Khoshdel A, Alborzi A, Rosouli M, Taheri E, Kiany S, Javadian MH. Increased levels of IL-10, IL-12, and IFN- in patients with visceral leishmaniasis. *Braz J Infect Dis*. 2009. 13(1):44-6.
- Kimura N, Toyonaga B, Yoshikai Y, Du RP, Mak TW. Sequences and repertoire of the human T cell receptor alpha and beta chain variable region genes in thymocytes. *Eur J Immunol*. 1987. 17(3):375-83.
- Kingkeow D, Srihthep S, Preparattanapan J, Supparatpinyo K, Pornprasert S. Thymic function during 12 months of highly active antiretroviral therapy in Thai HIV-infected patients with normal and slow immune recovery. *Jpn J Infect Dis*. 2015. 68: 353–356.
- Kip AE, Balasegaram M, Beijnen JH, Schellens JHM, Vries PJ de, Dorlo TPC. Systematic Review of Biomarkers To Monitor Therapeutic Response in Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015. 59: 1–14.
- Kip AE, Wasunna M, Alves F, Schellens JHM, Beijnen JH, Musa AM, Khalil EAG, Dorlo TPC. Macrophage Activation Marker Neopterin: A Candidate Biomarker for Treatment Response and Relapse in Visceral Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018. 8: 1–8.
- Kohli A, Funk E, Burbelo P, Barrett L, Meissner EG, Santich B, et al. Persistently Elevated Abnormal B-cell Subpopulations and Anti-Core Antibodies in Patients Co-Infected With HIV/HCV Who Relapse. *J Med Virol*. 2015. 552:544–52.
- Kolte L. Thymic function in HIV-infection. *Dan Med J*. 2013. 60: B4622.
- Kou ZC, Puhr JS, Wu SS, Goodenow MM, Sleasman JW. Combination antiretroviral therapy results in a rapid increase in T cell receptor variable region beta repertoire diversity within CD45RA CD8 T cells in human immunodeficiency virus-infected children. *J Infect Dis*. 2003. 187(3):385-97.
- Kramski M, Gaeguta AJ, Lichtfuss GF, Rajasuriar R, Crowe SM, French MA, Lewin SR, Center RJ, Purcell DFJ. Novel sensitive real-time PCR for quantification of bacterial 16S rRNA genes in plasma of HIV-infected patients as a marker for microbial translocation. *J Clin Microbiol*. 2011. 49: 3691–3693.
- Krebs SJ, Ananworanich J. Immune activation during acute HIV infection and the impact of early antiretroviral therapy. *Curr Opin HIV AIDS*. 2016. 11(2):163–72.
- Kumar P, Misra P, Thakur CP, Saurabh A, Rishi N, Mitra DK. T cell suppression in the bone marrow of visceral leishmaniasis patients: impact of parasite load. *Clin Exp Immunol*. 2018. 191(3):318–27.
- Lane HC, Masur H, Edgar LC, Whalen G, Rook AH, Fauci AS. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*. 1983. 309(8):453-8.
- Lederman MM, Calabrese L, Funderburg NT, Clagett B, Medvik K, Bonilla H, et al. Immunologic failure despite suppressive antiretroviral therapy is related to activation and turnover of memory CD4 cells. *J Infect Dis*. 2011. 204(8):1217–26.
- Lederman MM, Margolis L. The lymph node in HIV pathogenesis. *Semin Immunol*. 2008. 20: 187–195.

- Leeansyah E, Malone DFG, Anthony DD, Sandberg JK. Soluble biomarkers of HIV transmission, disease progression and comorbidities. *Curr Opin HIV AIDS*. 2013. 8(2):117–24.
- Leite de Sousa-Gomes M, Romero GAS, Werneck GL. Visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Brazil: Are we aware enough? *PLoS Negl Trop Dis*. 2017. 11: 1–13.
- Levesque MC, Moody MA, Hwang KK, Marshall DJ, Whitesides JF, Amos JD, et al. Polyclonal B cell differentiation and loss of gastrointestinal tract germinal centers in the earliest stages of HIV-1 infection. *PLoS Med*. 2009. 6(7).
- Lewis GK. Role of Fc-mediated antibody function in protective immunity against HIV-1. *Immunology*. 2014. 142: 46–57.
- Lieberman JM, Sacchetti J, Marks C, Marks WH. Human intestinal fatty acid binding protein: report of an assay with studies in normal volunteers and intestinal ischemia. *Surgery*. 1997. 121(3):335-42.
- Lindoso JA, Cota GF, Cruz AM da, Goto H, Maia-Elkhoury ANS, Romero GAS, Sousa-Gomes ML de, Santos-Oliveira JR, Rabello A. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014. 8: e3136.
- Lindoso JAL, Moreira CHV, Cunha MA, Queiroz IT. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: Current perspectives. *HIV/AIDS*. 2018. 10: 193–201.
- Lopez-Galindez C, Pernas M, Casado C, Olivares I, Lorenzo-Redondo R. Elite controllers and lessons learned for HIV-1 cure. *Curr Opin Virol*. 2019. 38:31–6.
- Losada-Barragán M, Umaña-Pérez A, Cuervo-Escobar S, Berbert LR, Porrozzini R, Morgado FN, Mendes-da-Cruz DA, Savino W, Sánchez-Gómez M, Cuervo P. Protein malnutrition promotes dysregulation of molecules involved in T cell migration in the thymus of mice infected with *Leishmania infantum*. *Sci Rep*. 2017. 7: 45991.
- Losada-Barragán M, Umaña-Pérez A, Durães J, Cuervo-Escobar S, Rodríguez-Vega A, Ribeiro-Gomes FL, et al. Thymic Microenvironment Is Modified by Malnutrition and *Leishmania infantum* Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019. 9:1–19.
- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008. 42(2):145–51.
- Luz KG, Tuon FF, Irma M, Duarte S, Maia GM, Matos P, Maria A, Ramos DO, Nicodemo AC. Cytokine expression in the duodenal mucosa of patients with visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010. 43: 393–395.
- Maia-Elkhoury ANS, Alves W a, Sousa-Gomes ML De, Sena JM De, Luna E a. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica*. 2008. 24: 2941–2947.
- Malaspina A, Moir S, Ho J, Wang W, Howell ML, O’Shea M a, Roby G a, Rehm C a, Mican JM, Chun T-W, Fauci AS. Appearance of immature/transitional B cells in HIV-infected individuals with advanced disease: correlation with increased IL-7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. 103: 2262–2267.
- Manches O, Frleta D, Bhardwaj N. Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. *Trends Immunol*. 2014. 35: 114–122.

- Manjati T, Nkambule B, Ipp H. Immune activation is associated with decreased thymic function in asymptomatic, untreated HIV-infected individuals. *South Afr J HIV Med.* 2016. 17: 1–6.
- Marchetti G, Tincati C, Silvestri G. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clin Microbiol Rev.* 2013. 26: 2–18.
- Marlais T, Bhattacharyya T, Singh OP, Mertens P, Gillemann Q, Thunissen C, Hinckel BCB, Pearson C, Gardner BL, Ains S, la Roche M de, Hayes K, Hafezi H, Falconar AK, Eisa O, Saad A, Khanal B, Bhattarai NR, Rijal S, Boelaert M, El-Safi S, Sundar S, Miles MA. Visceral Leishmaniasis IgG1 Rapid Monitoring of Cure vs. Relapse, and Potential for Diagnosis of Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018. 8: 427.
- Maurya R, Bhattacharya P, Dey R, Nakhasi HL. Leptin functions in infectious diseases. *Front Immunol.* 2018. 9: 1–15.
- Maurya R, Bhattacharya P, Ismail N, Dagur PK, Joshi AB, Razdan K, McCoy JP, Ascher J, Dey R, Nakhasi HL. Differential Role of Leptin as an Immunomodulator in Controlling Visceral Leishmaniasis in Normal and Leptin-Deficient Mice. *Am J Trop Med Hyg.* 2016. 95: 109–119.
- McCune JM. The dynamics of CD4⁺ T-cell depletion in HIV disease. *Nature.* 2001. 410(6831):974-9.
- Medrano FJ, Rey C, Leal M, Cañavate C, Rubio a., Sánchez-Quijano a., Alvar J, Lissen E. Dynamics of serum cytokines in patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection. *Clin Exp Immunol.* 1998. 114: 403–407.
- Mehraj V, Ramendra R, Isnard S, Dupuy FP, Lebouché B, Costiniuk C, Thomas R, Szabo J, Baril JG, Trottier B, Coté P, LeBlanc R, Durand M, Chartrand-Lefebvre C, Kema I, Zhang Y, Finkelman M, Tremblay C, Routy JP. CXCL13 as a biomarker of immune activation during early and chronic HIV infection. *Front Immunol.* 2019. 10:289.
- Mellors JW, Griffith BP, Ortiz MA, Landry ML, Ryan JL. Tumor necrosis factor alpha/cachectin enhances human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages. *J Infect Dis.* 1991. 163: 78-82.
- Menezes CAS, Rocha MOC, Souza PEA, Chaves ACL, Gollob KJ, Dutra WO. Phenotypic and functional characteristics of CD28⁺ and CD28⁻ cells from chagasic patients: Distinct repertoire and cytokine expression. *Clin Exp Immunol.* 2004. 137: 129–138.
- Miguel Benito J, López M, Lozano S, Martínez P, González-Lahoz J, Soriano V. CD38 Expression on CD8 T Lymphocytes as a Marker of Residual Virus Replication in Chronically HIV-Infected Patients Receiving Antiretroviral Therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2004. 20: 227–233.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, comunicação pessoal. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral no Brasil. 55° Congresso Brasileiro de Medicina Tropical. Belo Horizonte, 2019.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, 2006.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e

- acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*/HIV. Brasília, 2011.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*/HIV. Brasília, 2015.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Boletim epidemiológico HIV/AIDS. Brasília, 2018.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral. Brasília, 2017. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral/11334-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em Novembro de 2019.
- Moir S, Fauci A. B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009. 9: 235–245.
- Moir S, Fauci AS. B-cell exhaustion in HIV infection: the role of immune activation. *Curr Opin HIV AIDS*. 2014. 9: 472–477.
- Moir S, Ho J, Malaspina A, Wang W, DiPoto AC, O’Shea M a, et al. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med*. 2008. 205(8):1797–805.
- Moir S, Malaspina A, Ho J, Wang W, Dipoto AC, O’Shea M a, Roby G, Mican JM, Kottlilil S, Chun T-W, Proschan M a, Fauci AS. Normalization of B cell counts and subpopulations after antiretroviral therapy in chronic HIV disease. *J Infect Dis*. 2008. 197: 572–579.
- Moir S, Buckner CM, Ho J, Wang W, Chen J, Waldner AJ, Posada JG, Kardava L, O’Shea MA, Kottlilil S, Chun TW, Proschan MA, Fauci AS. B cells in early and chronic HIV infection: evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy. *Blood*. 2010. 16;116(25):5571-9.
- Molina-Pinelo S, Vallejo A, Díaz L, Soriano-Sarabia N, Ferrando-Martínez S, Resino S, Muñoz-Fernández MA, Leal M. Premature immunosenescence in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy with low-level CD4 T cell repopulation. *J Antimicrob Chemother*. 2009. 64: 579–588.
- Moore JWJ, Beattie L, Dalton JE, Owens BMJ, Maroof A, Coles MC, Kaye PM. B cell: T cell interactions occur within hepatic granulomas during experimental visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 2012. 7(3):e34143.
- Muigai R, Shaunak S, Gatei DG, Wozniak A, Bryceson ADM. Jejunal Function and Pathology in Visceral Leishmaniasis. *Lancet*. 1983. 322(8348):476–9.
- Mzingwane ML, Tiemessen CT. Mechanisms of HIV persistence in HIV reservoirs. *Rev Med Virol*. 2017. 27(2).
- Naylor C, Petri WA. Leptin regulation of immune responses. *Trends Mol Med*. 2016. 22(2):88–98.
- Nylén S¹, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol*. 2007. 28(9):378-84.
- O’Connor MA, Munson PV, Tunggal HC, Hajari N, Lewis TB, Bratt D, Moats C, Smedley J, Bagley KC, Mullins JI, Fuller DH. Mucosal T Helper 17 and T Regulatory Cell Homeostasis Correlate with Acute Simian Immunodeficiency

- Virus Viremia and Responsiveness to Antiretroviral Therapy in Macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2019. 35(3):295-305.
- Okwor I, Uzonna JE. The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. *Immunol Res*. 2013. 56(1):163–71.
- Oliveira Silva KL, Marin Chiku V, Luvizotto Venturin G, Correa Leal AA, Almeida BF de, Rezende Eugenio F De, Santos PSP Dos, Fabrino Machado G, Lima VMF De. PD-1 and PD-L1 regulate cellular immunity in canine visceral leishmaniasis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2019. 62: 76–87.
- Omachi S, Fujii W, Azuma N, Morimoto A, Sanjoba C, Matsumoto Y, et al. B-cell activating factor deficiency suppresses splenomegaly during *Leishmania donovani* infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017. 489(4):528–33.
- Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS, comunicação pessoal. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral nas Américas. 55° Congresso Brasileiro de Medicina Tropical. Belo Horizonte, 2019.
- Pagliano P, Esposito S. Visceral leishmaniasis in immunocompromised host: an update and literature review. *J Chemother*. 2017. 29: 261–266.
- Paiardini M, Müller-Trutwin M. HIV-associated chronic immune activation. *Immunol Rev*. 2013. 254: 78–101.
- Palmer BE, Blyveis N, Fontenot AP, Wilson CC. Functional and phenotypic characterization of CD57+CD4+ T cells and their association with HIV-1-induced T cell dysfunction. *J Immunol*. 2005. 175: 8415–8423.
- Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyns H, Graziosi C, Denis F, Adelsberger JW, Borrow P, Saag MS, Shaw GM, Sekalytt RP, Fauci AS. Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V β usage during the primary immune response to HIV. *Nature*. 1994. 370: 463–467.
- Pantaleo G, Soudeyn H, Demarest JF, Vaccarezza M, Graziosi C, Paolucci S, et al. Evidence for rapid disappearance of initially expanded HTV-specific CD8+ T cell clones during primary HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997. 94(18):9848–53.
- Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol*. 1996. 50:825-54.
- Papagno L, Spina C a., Marchant A, Salio M, Rufer N, Little S, Dong T, Chesney G, Waters A, Easterbrook P, Dunbar PR, Shepherd D, Cerundolo V, Emery V, Griffiths P, Conlon C, McMichael AJ, Richman DD, Rowland-Jones SL, Appay V. Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biol*. 2004. 2(2):E20.
- Pawelec G, Gupta S. Editorial: Immunology of Aging. *Front Immunol*. 2019. 10: 1–3.
- Pensiero S, Galli L, Nozza S, Ruffin N, Castagna A, Tambussi G, Hejdeman B, Misciagna D, Riva A, Malnati M, Chiodi F, Scarlatti G. B-cell subset alterations and correlated factors in HIV-1 infection. *AIDS*. 2013. 27(8):1209-17.
- Piconi S, Parisotto S, Rizzardini G, Passerini S, Terzi R, Argentero B, et al. Hydroxychloroquine drastically reduces immune activation in HIV-infected, antiretroviral therapy-treated immunologic nonresponders. *Blood*. 2011. 118(12):3263–72.

- Pinti M, Nasi M, Lugli E, Gibellini L, Bertoncelli L, Roat E, De Biasi S, Mussini C, Cossarizza A. T cell homeostasis in centenarians: from the thymus to the periphery. *Curr Pharm Des.* 2010. 16(6):597-603.
- Plasilova M, Risitano A, Maciejewski JP. Application of the molecular analysis of the T-cell receptor repertoire in the study of immune-mediated hematologic diseases. *Hematology* 2003. 8: 173–181.
- Plunkett FJ, Franzese O, Finney HM, Fletcher JM, Belaramani LL, Salmon M, et al. The Loss of Telomerase Activity in Highly Differentiated CD8 + CD28 – CD27 – T Cells Is Associated with Decreased Akt (Ser 473) Phosphorylation. *J Immunol.* 2007. 178(12):7710–9.
- Portugal S, Obeng-Adjei N, Moir S, Crompton PD, Pierce SK. Atypical memory B cells in human chronic infectious diseases: An interim report. *Cell Immunol.* 2017. 321: 18–25.
- Powderly WG, Landay A, Lederman MM. Recovery of the immune system with antiretroviral therapy: the end of opportunism? *JAMA.* 1998. 280(1):72-7.
- Quarona V, Zaccarello G, Chillemi A, Brunetti E, Singh VK, Ferrero E, Funaro A, Horenstein AL, Malavasi F. CD38 and CD157: A long journey from activation markers to multifunctional molecules. *Cytom Part B - Clin Cytom.* 2013. 84: 207–217.
- Quiros-Roldan E, Serana F, Chiarini M, Zanotti C, Sottini A, Gotti D, et al. Effects of combined antiretroviral therapy on B- and T-cell release from production sites in long-term treated HIV-1+ patients. *J Transl Med.* 2012. 10(1):1
- Rb-Silva R, Nobrega C, Azevedo C, Athayde E, Canto-Gomes J, Ferreira I, Cheynier R, Yates AJ, Horta A, Correia-Neves M. Thymic Function as a Predictor of Immune Recovery in Chronically HIV-Infected Patients Initiating Antiretroviral Therapy. *Front Immunol.* 2019. 10: 1–13.
- Reis LL dos, Balieiro AA da S, Fonseca FR, Gonçalves MJF. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017. 50: 638–645.
- Ribeiro RM, Boer RJ. The Contribution of the Thymus to the Recovery of Peripheral Naive T-Cell Numbers During Antiretroviral Treatment for HIV Infection (M Dustin and D McGavern, Eds.). *Acquir Immune Defic Syndr.* 2008. 49: 1–8.
- Richert Q, Trajtman A, Arroyave L, Toews J, Becker M, Kasper K, et al. Systemic inflammation before and after antiretroviral therapy initiation as a predictor of immune response among HIV-infected individuals in Manitoba. *Cytokine.* 2017. 91:74–81.
- Rodrigues-Neto JF, Monteiro GR, Keesen TSL, Lacerda HG, Carvalho EM, Jeronimo SMB. CD45RO+ T cells and T cell activation in the long-lasting immunity after *Leishmania infantum* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2018. 98: 875–882.
- Rodríguez-Alba JC, Abrego-Peredo A, Gallardo-Hernández C, Pérez-Lara J, Santiago-Cruz W, Jiang W, et al. HIV Disease Progression: Overexpression of the Ectoenzyme CD38 as a Contributory Factor? *BioEssays.* 2019. 41(1):1–10.
- Romiti ML, Cancrini C, Castelli-Gattinara G, Cesare S Di, Ciaffi P, Bernardi S, Gasperi MR De, Halapi E, Rossi P. Kinetics of the T-cell receptor CD4 and CD8 V(beta) repertoire in HIV-1 vertically infected infants early treated with HAART. *AIDS.* 2001. 15: 2075–2084.

- Rosado-Sánchez I, Herrero-Fernández I, Genebat M, Ruiz-Mateos E, Leal M, Pacheco YM. Thymic Function Impacts the Peripheral CD4/CD8 Ratio of HIV-Infected Subjects. *Clin Infect Dis*. 2017. 64(2):152–8.
- Rowen L, Koop BF, Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science*. 1996. 272(5269):1755-62.
- Rudy BJ, Kapogiannis BG, Worrell C, Squires K, Bethel J, Li S, et al. Immune Reconstitution but Persistent Activation After 48 Weeks of Antiretroviral Therapy in Youth With Pre-Therapy CD4 >350 in ATN 061. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2015. 69(1):52–60.
- Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N. Immune responses in kala-azar. *Indian J Med Res*. 2006. 123(3):245-66.
- Saison J, Ferry T, Demaret J, Maucourt Boulch D, Venet F, Perpoint T, Ader F, Icard V, Chidiac C, Monneret G, Peyramond D, Cotte L, Mialhes P, Biron F, Boibieux A, Braun E, Champagne H, Daoud F, Gueripel V, Koffi J, Longuet C, Pailhes S, Ponceau B, Schlienger I, Senechal A, Bouaziz A, Karsenty J, André P, Trabaud MA, Tardy JC, Scholtes C, Poitevin F, Malcus C. Association between discordant immunological response to highly active anti-retroviral therapy, regulatory T cell percentage, immune cell activation and very low-level viraemia in HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol*. 2014. 176: 401–409.
- Salameire D, Solly F, Fabre B, Lefebvre C, Chauvet M, Gressin R, Corront B, Ciapa A, Pernollet M, Plumas J, MacIntyre E, Callanan MB, Leroux D, Jacob MC. Accurate detection of the tumor clone in peripheral T-cell lymphoma biopsies by flow cytometric analysis of TCR-VB repertoire. *Mod. Pathol*. 2012. 25: 1246–1257.
- Sandler NG, Wand H, Roque a., Law M, Nason MC, Nixon DE, Pedersen C, Ruxrungtham K, Lewin SR, Emery S, Neaton JD, Brenchley JM, Deeks SG, Sereti I, Douek DC. Plasma Levels of Soluble CD14 Independently Predict Mortality in HIV Infection. *J Infect Dis*. 2011. 203: 780–790.
- Santos LO, Vitorio BS, Branquinha MH, Pedroso e Silva CM, Santos a. LS, d'Avila-Levy CM. Nelfinavir is effective in inhibiting the multiplication and aspartic peptidase activity of *Leishmania* species, including strains obtained from HIV-positive patients. *J Antimicrob Chemother*. 2013. 68: 348–353.
- Santos-Oliveira JR, Da-Cruz AM, Pires LHS, Cupolillo E, Kuhls K, Giacoia-Gripp CBW, Oliveira-Neto MP. Case report: Atypical lesions as a sign of cutaneous dissemination of visceral leishmaniasis in a human immunodeficiency virus-positive patient simultaneously infected by two viscerotropic *Leishmania* species. *Am J Trop Med Hyg*. 2011a. 85: 55–59.
- Santos-Oliveira JR, Da-Cruz AM. Lipopolysaccharide-Induced Cellular Activation May Participate in the Immunopathogenesis of Visceral Leishmaniasis Alone or in HIV Coinfection. *Int J Microbiol*. 2012. 2012: 1–4.
- Santos-Oliveira JR, Giacoia-Gripp CBW, Alexandrino de Oliveira P, Amato VS, Lindoso JÂL, Goto H, Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Grinsztejn B, Morgado MG, Da-Cruz AM. High levels of T lymphocyte activation in *Leishmania*-HIV-1 co-infected individuals despite low HIV viral load. *BMC Infect Dis*. 2010. 10: 358.
- Santos-Oliveira JR, Regis EG, Giacoia-Gripp CBW, Valverde JG, Alexandrino-De-Oliveira P, Lindoso JÂL, Goto H, Oliveira-Neto MP, Guerra JO, Grinsztejn B, Jerônimo SB, Morgado MG, Da-Cruz AM. Microbial translocation induces an

- intense proinflammatory response in patients with visceral leishmaniasis and HIV type 1 coinfection. *J Infect Dis*. 2013. 208: 57–66.
- Santos-Oliveira JR, Regis EG, Leal CRB, Cunha R V., Bozza PT, Da-Cruz AM. Evidence That Lipopolisaccharide May Contribute to the Cytokine Storm and Cellular Activation in Patients with Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011b. 5: e1198.
- Saresella M, Rainone V, M. Al-Daghri N, Clerici M, Trabattoni D. The PD-1/PD-L1 Pathway in Human Pathology. *Curr Mol Med*. 2012. 12: 259–267.
- Sassi A, Larguèche-Darwaz B, Collette A, Six A, Laouini D, Cazenave PA, Dellagi K. Mechanisms of the Natural Reactivity of Lymphocytes from Noninfected Individuals to Membrane-Associated *Leishmania infantum* Antigens. *J Immunol*. 2005. 174: 3598–3607.
- Sauce D, Elbim C, Appay V. Monitoring cellular immune markers in HIV infection: from activation to exhaustion. *Curr Opin HIV AIDS*. 2013. 8: 125–131.
- Savino W, Dardenne M, Marche C, Trophime D, Dupuy JM, Pekovic D, et al. Thymic epithelium in AIDS. An immunohistologic study. *Am J Pathol*. 1986. 122(2):302–7.
- Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Lepletier A, Dardenne M. Hormonal control of T-cell development in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2016. 12(2):77–89.
- Schaut RG, Lamb IM, Toepp AJ, Scott B, Mendes-Aguiar CO, Coutinho JF V., Jeronimo SMB, Wilson ME, Harty JT, Waldschmidt TJ, Petersen CA. Regulatory IgD hi B Cells Suppress T Cell Function via IL-10 and PD-L1 during Progressive Visceral Leishmaniasis. *J Immunol*. 2016. 196: 4100–4109.
- Sempowski GD, Haynes BF. Immune Reconstitution in Patients with HIV Infection. *Annu Rev Med*. 2002. 53(1):269–84.
- Serana F, Chiarini M, Zanotti C, Sottini A, Bertoli D, Bosio A, et al. Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies. *J Transl Med*. 2013. 11(1):1.
- Shivhare R, Ali W, Vishwakarma P, Natu SM, Puri SK, Gupta S. Leptin augments protective immune responses in murine macrophages and enhances potential of miltefosine against experimental visceral leishmaniasis. *Acta Trop*. 2015. 150:35–41.
- Shive CL, Jiang W, Anthony DD, Lederman MM. Soluble CD14 is a nonspecific marker of monocyte activation. *AIDS*. 2015. 29(10):1263-5.
- Siedner MJ, Zanni M, Tracy RP, Kwon DS, Tsai AC, Kakuhire B, Hunt PW, Okello S. Increased systemic inflammation and gut permeability among women with treated HIV infection in rural Uganda. *J Infect Dis*. 2018. 218: 922–926.
- Siedner MJ, Kim JH, Nakku RS, Bibangambah P, Hemphill L, Triant VA, Haberer JE, Martin JN, Mocello AR, Boum Y 2nd, Kwon DS, Tracy RP, Burdo T, Huang Y, Cao H, Okello S, Bangsberg DR, Hunt PW. Persistent Immune Activation and Carotid Atherosclerosis in HIV-Infected Ugandans Receiving Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis*. 2016. 213(3):370-8.
- Siewe B, Landay A. Effector and regulatory roles For B cells in HIV infection? *Autoimmunity*. 2012. 45: 348–352.

- Silva DT, Neves MF, Queiroz NMGP de, Spada JCP, Alves ML, Flóro e Silva M, et al. Correlation study and histopathological description of intestinal alterations in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Rev Bras Parasitol Veterinária*. 2016. 25(1):24–36.
- Silva RLL, Santos MB, Almeida PLS, Barros TS, Magalhães L, Cazzaniga RA, Souza PRM, Luz NF, França-Costa J, Borges VM, Lima-Junior DS, Lipscomb MW, Duthie MS, Reed SG, Almeida RP, Jesus AR. sCD163 levels as a biomarker of disease severity in leprosy and visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017. 11: 1–13.
- Singh AK, Das VNR, Amit A, Dikhit MR, Mahantesh V, Singh SK, Naryan S, Pandey K, Das P, Verma N, Bimal S. Cytokines and chemokines differentially regulate innate immune cell trafficking during post kala-azar dermal leishmaniasis. *J Cell Biochem*. 2018. 119(9):7406-7418.
- Singh B, Singh OP, Singh N, Singh SS, Sundar S. Abnormal B-Cell Subset and Blimp-1-Mediated Humoral Responses Associated With Visceral Leishmaniasis Pathogenesis. *Am J Trop Med Hyg*. 2019. 100(4):816-821.
- Sodora DL, Milush JM, Ware F, Wozniakowski A, Montgomery L, McClure HM, et al. Decreased Levels of Recent Thymic Emigrants in Peripheral Blood of Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques Correlate with Alterations within the Thymus. *J Virol*. 2002. 76(19):9981–90.
- Sokoya T, Steel HC, Nieuwoudt M, Rossouw TM. HIV as a Cause of Immune Activation and Immunosenescence. *Mediators Inflamm*. 2017. 2017: 1–16.
- Somech R. T-cell receptor excision circles in primary immunodeficiencies and other T-cell immune disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2011. 11: 517–524.
- Soong L, Henard C a., Melby PC. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. *Semin Immunopathol*. 2012. 34: 735–751.
- Srinontong P, Wu Z, Sato K, Nagaoka H, Maekawa Y. The circulating immunoglobulins negatively impact on the parasite clearance in the liver of *Leishmania donovani*-infected mice via dampening ROS activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018. 506(1):20-26.
- Steele AK, Lee EJ, Vestal B, Hecht D, Dong Z, Rapaport E, Koeppel J, Campbell TB, Wilson CC. Contribution of Intestinal Barrier Damage, Microbial Translocation and HIV-1 Infection Status to an Inflammaging Signature (C Bourgeois, Ed.). *PLoS One* 2014. 9: e97171.
- Summers NA, Armstrong WS. Management of Advanced HIV Disease. *Infect Dis Clin North Am*. 2019. 33(3):743-767.
- Taiwo B, Barcena L, Tressler R. Understanding and controlling chronic immune activation in the HIV-infected patients suppressed on combination antiretroviral therapy. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2013. 10: 21–32.
- Tincati C, Douek DC, Marchetti G. Gut barrier structure, mucosal immunity and intestinal microbiota in the pathogenesis and treatment of HIV infection. *AIDS Res Ther*. 2016. 13: 1–11.
- UNAIDS. AIDS Epidemic Update 2019 - Global Report. Disponível em: <http://aidsinfo.unaids.org/#>. Acesso em Novembro de 2019.

- Utay NS, Hunt PW. Role of immune activation in progression to AIDS. *Curr Opin. HIV AIDS*. 2016. 11: 131–137.
- Uyemura K, Pirmez C, Sieling PA, Kiene K, Paes-oliveira M, Modlin R. CD4+ Type 1 and CD8+ Type 2 T Cell Subsets in Human Leishmaniasis Have Distinct T Cell Receptor Repertoires. *J Immunol*. 1993. 151(12):7095-104.
- Valenzuela NM, Schaub S. The Biology of IgG Subclasses and Their Clinical Relevance to Transplantation. *Transplantation*. 2018. 102(1S Suppl 1):S7-S13.
- Vallejo A, Abad-Fernández M, Moreno S, Moreno A, Pérez-Elías MJ, Dronda F, Casado JL. High levels of CD4⁺ CTLA-4⁺ Treg cells and CCR5 density in HIV-1-infected patients with visceral leishmaniasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015. 34(2):267-75.
- Vandergeeten C, Fromentin R, Chomont N. The role of cytokines in the establishment, persistence and eradication of the HIV reservoir. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2012. 23: 143–149.
- Vergis EN, Mellors JW. Natural history of HIV-1 infection. *Infect Dis Clin North Am*. 2000. 14(4):809-25.
- Verstegen RHJ, Aui PM, Watson E, Jong S De, Bartol SJW, Bosco JJ, Cameron PU, Stirling RG, Vries E de, Dongen JJM van, Zelm MC van. Quantification of T-Cell and B-Cell Replication History in Aging, Immunodeficiency, and Newborn Screening. *Front Immunol*. 2019. 10:2084.
- Vijayan KV, Karthigeyan KP, Tripathi SP, Hanna LE. Pathophysiology of CD4+ T-Cell depletion in HIV-1 and HIV-2 infections. *Front Immunol*. 2017. 8: 1–8.
- Vivarini ADC, Santos Pereira R de M, Barreto-de-Souza V, Temerozo JR, Soares DC, Saraiva EM, et al. HIV-1 Tat protein enhances the intracellular growth of *Leishmania amazonensis* via the ds-RNA induced protein PKR. *Sci Rep*. 2015. 5:16777.
- WHO. World Health Organization, Endemicity of visceral leishmaniasis in 2016. 2018 Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>. Acesso em Novembro de 2019.
- WHO. World Health Organization, HIV/AIDS: Fact sheet 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>. Acesso em Novembro de 2019.
- WHO. World Health Organization, Leishmaniasis: Fact sheet 2019. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em Novembro de 2019.
- WHO. World Health Organization, Number of cases of visceral leishmaniasis reported: 2017. 2018 Disponível em: http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.htm. Acesso em Novembro de 2019.
- Wolday D, Akuffo H, Demissie A, Britton S. Role of *Leishmania donovani* and its lipophosphoglycan in CD4+ T-cell activation-induced human immunodeficiency virus replication. *Infect Immun*. 1999. 67: 5258–5264.
- Xu W, Larbi A. Markers of T cell senescence in humans. *Int J Mol Sci*. 2017. 18: 1–13.
- Yan L, Wang Z, Cui C, Guan X, Dong B, Zhao M, Wu J, Tian X, Hao C. Comprehensive immune characterization and T-cell receptor repertoire

- heterogeneity of retroperitoneal liposarcoma. *Cancer Sci.* 2019. 110(10): 3038-3048.
- Yan J, Zhang S, Sun J, Xu J, Zhang X. Irreversible phenotypic perturbation and functional impairment of B cells during HIV-1 infection. *Front Med.* 2017. 11(4):536-547.
- Yasuma-Mitobe K, Matsuoka M. The Roles of Coinhibitory Receptors in Pathogenesis of Human Retroviral Infections. *Front Immunol.* 2018. 9: 1–8.
- Ye P, Kirschner D, Kourtis A. The Thymus During HIV Disease: Role in Pathogenesis and in Immune Recovery. *Curr HIV Res.* 2004. 2: 177–183.
- Yin L, Zhong CK, Rodriguez C, Hou W, Goodenow MM, Sleasman JW. Antiretroviral therapy restores diversity in the T-cell receptor V β repertoire of CD4 T-cell subpopulations among human immunodeficiency virus type 1-infected children and adolescents. *Clin Vaccine Immunol.* 2009. 16: 1293–1301.
- Younas M, Psomas C, Reynes C, Cezar R, Kundura L, Portales P, Merle C, Atoui N, Fernandez C, Moing V Le, Barbuat C, Moranne O, Sotto A, Sabatier R, Fabbro P, Vincent T, Dunyach-Remy C, Winter A, Reynes J, Lavigne J-P, Corbeau P. Microbial Translocation Is Linked to a Specific Immune Activation Profile in HIV-1-Infected Adults With Suppressed Viremia. *Front Immunol.* 2019. 10: 1–8.
- Younas M, Psomas C, Reynes J, Corbeau P. Immune activation in the course of HIV-1 infection: Causes, phenotypes and persistence under therapy. *HIV Med.* 2016. 17: 89–105.
- Young CD, Angel JB. HIV infection of thymocytes inhibits IL-7 activity without altering CD127 expression. *Retrovirology.* 2011. 8(1):72.
- Zakhour R, Tran DQ, Degaffe G, Bell CS, Donnachie E, Zhang W, Pérez N, Benjamins LJ, Bianco G Del, Rodriguez G, Murphy JR, Heresi GP. Recent Thymus Emigrant CD4+ T Cells Predict HIV Disease Progression in Patients With Perinatally Acquired HIV. *Clin Infect. Dis.* 2016. 62: 1029–1035.
- Zevin AS, McKinnon L, Burgener A, Klatt NR. Microbial translocation and microbiome dysbiosis in HIV-associated immune activation. *Curr Opin HIV AIDS.* 2016. 11: 182–190.
- Zhao C, Papadopoulou B, Tremblay MJ. *Leishmania infantum* enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network. *Clin Immunol.* 2004. 113: 81–88.
- Zicari S, Sessa L, Cotugno N, Ruggiero A, Morrocchi E, Concato C, Rocca S, Zangari P, Manno E, Palma P. Immune Activation, Inflammation, and Non-AIDS Co-Morbidities in HIV-Infected Patients under Long-Term ART. *Viruses.* 2019. 11: 200.

9. ANEXOS

9.1 ANEXOS A

9.1.1 Termos de Consentimento Livre e Esclarecido - Casuística do Capítulo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Pacientes em investigação de co-infecção <i>Leishmania</i>/HIV
--

Instituição Proponente: Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Laboratório de Imunoparasitologia. Av. Brasil, 4365, Pav. Leônidas Deane sala 408, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ. Tel 0XX21-2562-1034.

Instituição

Responsável:

Título do Projeto: “Desenvolvimento de instrumentos clínicos e laboratoriais aplicáveis aos estudos clínico-epidemiológicos, ao diagnóstico e ao monitoramento terapêutico da co-infecção HIV/*Leishmania*. Pesquisador Responsável: Alda Maria Da-Cruz, médica, Pesquisadora Associada

Equipe: Carmem Beatriz Wagner Giacoia-Gripp (assistente de coordenação), Álvaro Bertho, Ana Lucia Telles Rabello, Carlos Henrique Costa Nery, Claude Pirmez, Elisa Cupolillo, Gustavo Romero, Hiro Goto, José Ângelo Lindoso, Marise Mattos, Manoel Paes Oliveira-Neto, Mariza G. Morgado, Rivaldo Venâncio, Valdir Sabbaga-Amato, Beatriz Grinzstejn, Valdiléa Veloso, Jose Pilotto .

Colaboradores/Médicos assistentes e Instituição/telefone de contato:

Nome _____ do _____ Voluntário:

Nome _____ do _____ Responsável:

Eu declaro que aceito participar como voluntário da investigação científica coordenada pela Dra. Alda Maria Da-Cruz e com a participação do meu médico Dr. _____. Neste estudo os pesquisadores querem descobrir as pessoas que tem leishmaniose e possam

ter AIDS ou pessoas que têm AIDS e possam ter leishmaniose. O objetivo melhorar os conhecimentos sobre os sintomas e o diagnóstico destas doenças, além de estudar como o sistema imunológico do organismo de uma pessoa que tem AIDS reage quando ela apresentar, ao mesmo tempo, a leishmaniose. Nos casos em que houver as duas doenças, será realizado um acompanhamento clínico e laboratorial dos pacientes. Nos casos de leishmaniose sem AIDS, os pacientes também poderão fazer parte do estudo caso seja de sua vontade.

Fui informado que este estudo poderá não me beneficiar diretamente, embora tenha a possibilidade de serem descobertos exames de laboratório que poderão ajudar a prevenir a evolução da leishmaniose. Os resultados dos exames deverão ser comunicados e entregues a mim ou ao médico responsável por meu acompanhamento.

Minha colaboração será submeter-me aos seguintes procedimentos, a serem realizados por profissionais de saúde especializados:

1. Responder a um questionário contendo informações pessoais, da minha residência e das doenças que apresentei ou tenho neste momento.
2. Consulta ambulatorial periódica para realização de exame clínico e exames laboratoriais de rotina procedimentos necessários para o diagnóstico da leishmaniose (coleta de sangue, biópsia e teste de Montenegro). Não aplicável aos indivíduos sadios.
3. Teste de Montenegro. Este consiste na aplicação de 0,1 ml de uma solução contendo parasitos mortos pelo mertiolate. A leitura é feita em 48h. Este poderá ser repetido quando for necessário avaliar minha imunidade para a leishmaniose. Não aplicável aos indivíduos sadios.
4. Coleta de 40 ml de sangue através de agulha que fará punção da veia do braço. Esta coleta deverá ser repetida periodicamente (a cada três ou seis meses).
5. Coleta de sangue para realizar sorologia anti-HIV com minha autorização.
6. Caso haja o diagnóstico de AIDS serei acompanhado e tratado.

Esclarecimentos sobre os procedimentos e inconvenientes:

O teste de Montenegro é utilizado rotineiramente para o diagnóstico da leishmaniose e quando for positivo indica que o organismo é capaz de ter resistência imunológica ao parasito causador da doença. No entanto, o teste NÃO deve ser aplicado nos indivíduos alérgicos a mertiolate. A reação positiva se acompanha de vermelhidão e endurecimento da pele no local onde o teste foi aplicado. Reações mais intensas como inflamação, ulceração da pele ou mesmo febre também podem ocorrer, mas são raras.

O volume de sangue retirado não causa distúrbios ou riscos ao organismo. Os possíveis desconfortos, se ocorrerem, são relacionados a problemas durante a retirada do sangue, como extravasamento de sangue que causam dor e hematoma, mas que regredem após 3 a 5 dias.

Para o diagnóstico também será realizada uma biópsia da úlcera para quem tem suspeita de doença na pele ou retirada de sangue da medula para quem tem suspeita de doença nas vísceras também serão realizados para o diagnóstico. Os indivíduos alérgicos ao anestésico NÃO poderão ser biopsiados. As complicações que podem ocorrer são dor e sangramento que regredem geralmente ao final de dois a três dias.

Todo o material retirado do meu corpo deverá ser utilizado somente para fins de diagnóstico e pesquisa. Autorizo que eles sejam guardados na FIOCRUZ ou nas Instituições que participam desta pesquisa, para serem utilizados em futuros projetos de pesquisa após análise e aprovação de um Comitê de Ética.

Os investigadores deverão, a qualquer momento, esclarecer minhas dúvidas sobre o estudo e a doença, a utilização do material biológico retirado do meu corpo e os resultados obtidos com o estudo. Os autores deverão guardar meus dados, sendo eles sigilosos e confidenciais. Os resultados poderão ser divulgados na forma de comunicação científica, mas não permito a minha identificação. A qualquer momento poderei me retirar deste estudo sem qualquer prejuízo ao meu tratamento.

Declaro estar ciente do teor deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e decidido a participar da investigação proposta no projeto. Este documento ficará arquivado no Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ ou no

(nome da Instituição colaboradora), ficando Eu de posse de uma cópia.

Voluntário/ : _____

RG:

Responsável

assinatura

Testemunha: _____

RG:

assinatura

Investigador: _____

RG:

assinatura

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Voluntários - Pacientes

Instituição Proponente: Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Laboratório de Imunoparasitologia. Av. Brasil, 4365, Pav. Leônidas Deane sala 408, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ. Tel 0XX21-2562-1034.

Instituição

Responsável:

Título do Projeto: “Desenvolvimento de instrumentos clínicos e laboratoriais aplicáveis aos estudos clínico-epidemiológicos, ao diagnóstico e ao monitoramento terapêutico da co-infecção HIV/*Leishmania*.”

Pesquisador Responsável: Alda Maria Da-Cruz, médica, Pesquisadora Associada

Equipe: Carmem Beatriz Wagner Giacoia-Gripp (assistente de coordenação), Álvaro Bertho, Ana Lucia Telles Rabello, Carlos Henrique Costa Nery, Claude Pirmez, Elisa Cupolillo, Gustavo Romero, Hiro Goto, José Ângelo Lindoso, Marise Mattos, Manoel Paes Oliveira-Neto, Mariza G. Morgado, Rivaldo Venâncio, Valdir Sabbaga-Amato, Beatriz Grinstejn, Valdiléa Veloso, Jose Pilotto .

Colaboradores/Médicos assistentes e Instituição/telefone de contato:

Nome do Voluntário:

Nome do Responsável:

Eu declaro que aceito participar como voluntário da investigação científica coordenada pela Dra. Alda Maria Da-Cruz e com a participação do meu médico Dr. _____. Neste estudo os pesquisadores querem descobrir as pessoas que tem leishmaniose e possam ter AIDS ou pessoas que têm AIDS e possam ter leishmaniose. O objetivo melhorar os conhecimentos sobre os sintomas e o diagnóstico destas doenças, além de estudar como o sistema imunológico do organismo de uma pessoa que tem AIDS reage quando ela apresentar, ao mesmo tempo, a leishmaniose. Nos casos em que houver as duas doenças, será realizado um acompanhamento clínico e laboratorial dos pacientes. **Nos casos de**

leishmaniose sem AIDS, ou AIDS sem leishmaniose os pacientes também estão convidados a fazer parte do estudo, caso seja da vontade dos mesmos.

Fui informado que este estudo poderá não me beneficiar diretamente, embora tenha a possibilidade de serem descobertos exames de laboratório que poderão ajudar a prevenir a evolução da leishmaniose. Os resultados dos exames deverão ser comunicados e entregues a mim ou ao médico responsável por meu acompanhamento.

Minha colaboração será submeter-me aos seguintes procedimentos, a serem realizados por profissionais de saúde especializados:

1. Responder a um questionário contendo informações pessoais, da minha residência e das doenças que apresentei ou tenho neste momento.
2. Consulta ambulatorial periódica para realização de exame clínico e exames laboratoriais de rotina procedimentos necessários para o diagnóstico da leishmaniose (coleta de sangue, biópsia e teste de Montenegro). Não aplicável aos indivíduos sadios e sem suspeita de leishmaniose.
3. Teste de Montenegro. Este consiste na aplicação de 0,1 ml de uma solução contendo parasitos mortos pelo mertiolate. A leitura é feita em 48h. Este poderá ser repetido quando for necessário avaliar minha imunidade para a leishmaniose. Não aplicável aos indivíduos sadios e sem suspeita de leishmaniose.
4. Coleta de 40 ml de sangue através de agulha que fará punção da veia do braço. Esta coleta deverá ser repetida periodicamente (a cada três ou seis meses).
5. Coleta de sangue para realizar sorologia anti-HIV com minha autorização.
6. Caso haja o diagnóstico de AIDS serei acompanhado e tratado.

Esclarecimentos sobre os procedimentos e inconvenientes:

O teste de Montenegro é utilizado rotineiramente para o diagnóstico da leishmaniose e quando for positivo indica que o organismo é capaz de ter resistência imunológica ao parasito causador da doença. No entanto, o teste NÃO deve ser aplicado nos indivíduos alérgicos a mertiolate. A reação positiva se acompanha de vermelhidão e endurecimento da pele no local onde o teste foi aplicado. Reações mais intensas como inflamação, ulceração da pele ou mesmo febre também podem ocorrer, mas são raras.

O volume de sangue retirado não causa distúrbios ou riscos ao organismo. Os possíveis desconfortos, se ocorrerem, são relacionados a problemas durante a retirada do sangue, como extravasamento de sangue que causam dor e hematoma, mas que regridem após 3 a 5 dias.

Para o diagnóstico também será realizada uma biópsia da úlcera para quem tem suspeita de doença na pele ou retirada de sangue da medula para quem

tem suspeita de doença nas vísceras também serão realizados para o diagnóstico. Os indivíduos alérgicos ao anestésico NÃO poderão ser biopsiados. As complicações que podem ocorrer são dor e sangramento que regredem geralmente ao final de dois a três dias.

Todo o material retirado do meu corpo deverá ser utilizado somente para fins de diagnóstico e pesquisa. Autorizo que eles sejam guardados na FIOCRUZ ou nas Instituições que participam desta pesquisa, para serem utilizados em futuros projetos de pesquisa após análise e aprovação de um Comitê de Ética.

Os investigadores deverão, a qualquer momento, esclarecer minhas dúvidas sobre o estudo e a doença, a utilização do material biológico retirado do meu corpo e os resultados obtidos com o estudo. Os autores deverão guardar meus dados, sendo eles sigilosos e confidenciais. Os resultados poderão ser divulgados na forma de comunicação científica, mas não permito a minha identificação. A qualquer momento poderei me retirar deste estudo sem qualquer prejuízo ao meu tratamento.

Declaro estar ciente do teor deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e decidido a participar da investigação proposta no projeto. Este documento ficará arquivado no Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ ou no

____ (nome da Instituição colaboradora), ficando Eu de posse de uma cópia.

Voluntário/ : _____

RG:

Responsável

assinatura

Testemunha: _____

RG:

assinatura

Investigador: _____

RG:

assinatura

9.1.2 Termos de Consentimento Livre e Esclarecido - Casuística do Capítulo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Pacientes em investigação de co-infecção <i>Leishmania</i>/HIV
--

Instituição Proponente: Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Laboratório de Interdisciplinar de Pesquisas Médicas. Av. Brasil, 4365, Pav. Cardoso Fontes sala 21, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ. Tel 0XX21-2562-1034 ou 1037

Instituição Responsável: _____

Título do Projeto: “**Avaliação prospectiva de parâmetros imunológicos aplicáveis ao monitoramento do curso clínico de pacientes co-infectados com leishmaniose visceral e HIV-1**” Pesquisador Responsável: Alda Maria Da-Cruz, médica, Pesquisadora Associada Joanna Reis Santos de Oliveira, bióloga, pesquisadora colaboradora **Equipe:** Leonardo Soares Pereira, Maria Rita Teixeira, Indiara Penido, Carmem Beatriz Wagner Giacoia-Gripp, Glaucia Cota, Maria Luciana Silva-Freitas, Gabriela Castro, Aline Fievez, Anastácio Queiroz de Sousa e Jose Angelo Lindoso.

Você está sendo convidado a participar desse estudo porque os pesquisadores querem investigar de que maneira você responde ao parasito causador da leishmaniose, assim como ao vírus que leva à AIDS. O objetivo é melhorar os conhecimentos sobre os sintomas e o diagnóstico destas doenças, além de estudar como o sistema imunológico do organismo de uma pessoa que tem AIDS reage quando ela apresentar ao mesmo tempo a leishmaniose. Nos casos em que houver as duas doenças será realizado um acompanhamento clínico e laboratorial dos pacientes.

Os resultados dos exames serão comunicados e entregues a você ou ao médico responsável pelo seu acompanhamento.

Sua colaboração, caso esteja interessado em participar desse estudo, será submetida aos seguintes procedimentos, a serem realizados por profissionais de saúde especializados:

7. Responder a um questionário contendo informações pessoais da sua residência e das doenças que apresentou, ou tem neste momento;
8. Consulta ambulatorial periódica para realização de exame clínico e exames laboratoriais de rotina necessários para o diagnóstico da leishmaniose que serão realizados pela equipe médica do hospital (coleta de sangue, aspirado de medula óssea, biópsia, e teste de Montenegro). Não aplicável se você for um indivíduo saudável: Os exames consistirão em uma coleta de sangue que deverá ser repetida a cada visita sua, ou seja, a cada dois meses, ao longo de 12 meses, totalizando 8 visitas. Nos casos em que você apresente recaída da doença, como febre, aumento do volume abdominal e perda de peso, você deverá procurar o hospital para ser examinado e nova coleta de sangue pode ser necessária.
9. Teste de Montenegro. Este teste na pele consiste na aplicação de 0,1 ml de uma solução contendo parasitos mortos pelo mertiolate. A leitura na pele é feita

em 48h. Este poderá ser repetido quando for necessário avaliar sua imunidade para a leishmaniose. Não aplicável aos indivíduos sadios;

10. Coleta de 45 ml de sangue (equivalente a três colheres de sopa de sangue) através de agulha que fará punção da veia do braço. Esta coleta deverá ser repetida periodicamente (a cada dois ou quatro meses);
11. Coleta de sangue para realizar sorologia anti-HIV com a sua autorização;
12. Caso haja o diagnóstico de AIDS, você será acompanhado e tratado.

AUTORIZAÇÃO PARA ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Caso você autorize que após as análises desse estudo, a parte restante (sobras) das suas amostras biológicas (sangue, biópsias) seja guardada na FIOCRUZ, para serem utilizados em futuros projetos de pesquisa, após análise e aprovação de um Comitê de Ética, autorize e assinale abaixo. Todos os esforços serão feitos para que você seja contactado de novo no futuro, caso os pesquisadores tenham novas ideias a serem estudadas, e autorize a realização da pesquisa. Para tanto, você deverá manter o seu cadastro na instituição sempre atualizado.

() Autorizo o armazenamento das amostras biológicas restantes por até três anos após a finalização do meu acompanhamento clínico laboratorial.

() Não autorizo o armazenamento das amostras biológicas restantes após a finalização do meu acompanhamento clínico laboratorial, e desejo que as amostras sejam destruídas.

ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Caso você autorize o armazenamento do restante das suas amostras, estas ficarão estocadas no laboratório na Fiocruz-RJ e serão utilizadas só até três anos após a finalização do seu acompanhamento clínico-laboratorial. Além disso, essas amostras restantes só serão utilizadas novamente, mediante seu novo consentimento e autorização do Comitê de Ética da instituição. Você poderá pedir informações associadas ao seu material biológico humano armazenado a qualquer momento. Após esse período, elas serão descartadas completamente. A pesquisadora responsável pelo biorrepositório será a Dra. Alda Da-Cruz do LIPMed (tel:21-2562-1034)

RISCOS DA COLETA DE SANGUE E MATERIAIS BIOLÓGICOS:

A coleta de sangue pode causar desconforto, sangramento ou rouidão no local da picada da agulha. Um pequeno coágulo pode se formar no local da picada da agulha e pode haver inchaço na região. Há um pequeno risco de infecção leve no local da picada. Também podem ocorrer vertigem e desmaios no momento da picada da agulha. Todos os cuidados apropriados serão tomados, como o uso de seringa, agulha e gaze descartável assim como álcool para limpeza local, entre outros.

Esclarecimentos sobre os outros procedimentos e inconvenientes:

O teste de Montenegro é utilizado rotineiramente para o diagnóstico da leishmaniose e quando for positivo indica que o organismo é capaz de ter resistência imunológica ao parasito causador da doença. No entanto, o teste NÃO deve ser aplicado nos indivíduos alérgicos a mertiolate. A reação positiva se acompanha de vermelhidão e endurecimento da pele no local onde o teste foi aplicado. Reações mais intensas como inflamação, ulceração da pele, ou mesmo febre também podem ocorrer, mas são raras.

Para o diagnóstico também será realizada uma biópsia da úlcera para quem tem suspeita de doença na pele, ou para quem tem suspeita de doença nas vísceras será retirado sangue da medula para a realização do diagnóstico. Os indivíduos alérgicos ao anestésico NÃO poderão fazer biópsia. As complicações que podem ocorrer são dor e sangramento local que regredem geralmente ao final de dois a três dias. A biópsia é feita com anestésico local a nível ambulatorial.

Todas as amostras biológicas colhidas são necessárias para um diagnóstico acurado da infecção e deverão ser utilizado somente para fins de diagnóstico e pesquisa.

PARTICIPAR DO ESTUDO TRAZ BENEFÍCIOS?

É possível que você não obtenha nenhum benefício de sua participação no estudo, embora os pesquisadores possam descobrir novos exames de laboratório que poderão ajudar a prevenir a evolução da leishmaniose ou novos episódios dessa doença, após o tratamento. Os resultados dos exames serão comunicados e entregues a você e ao médico responsável pelo seu acompanhamento.

Os conhecimentos obtidos no estudo poderão ajudar a outras pessoas no futuro que tenham a mesma doença.

E O SIGILO?

Serão feitos todos os esforços para manter a confidencialidade das suas informações pessoais. A publicação de qualquer material do estudo não usará seu nome e não o identificará pessoalmente. Serão utilizados códigos com as iniciais das duas doenças (HL) e um número correspondente à entrada no protocolo de estudo e a cada nova visita ambulatorial (HL01, HL01-2,HL01-3).

QUAIS SÃO OS CUSTOS ENVOLVIDOS?

Não há custos para você no que diz respeito aos medicamentos, às visitas, e aos procedimentos do estudo. Você só precisará vir ao hospital.

RECEBEREI ALGUM PAGAMENTO?

Você não receberá nenhum tipo de pagamento por participar deste estudo.

O QUE ACONTECE SE EU SOFRER ALGUM DANO?

Se você sofrer algum dano em decorrência da participação no estudo, você receberá imediatamente o tratamento adequado para suas lesões através do Centro de Referência em Leishmanioses onde você é acompanhado, sem custos para você. Não existe nenhum programa de compensação financeira por estas instituições. Entretanto, você não estará renunciando a nenhum de seus direitos legais ao assinar este termo de consentimento.

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS COMO PARTICIPANTE DE PESQUISA?

A participação no estudo é totalmente voluntária. Você pode optar por não participar do estudo ou pode sair do estudo a qualquer momento. Optar por não participar ou deixar o estudo não terá nenhum efeito em outros estudos que queira participar, e não resultará em nenhuma penalidade ou perda de benefícios aos quais, de outro modo, você tem direito. Você será informado/a de quaisquer dados novos, do estudo em questão ou de outros estudos, que possam afetar a sua saúde, o seu bem-estar ou à sua vontade de permanecer no estudo. Se quiser receber os resultados do estudo,

comunique isso à equipe responsável e mantenha sempre atualizado os seus contatos com a equipe da pesquisa.

O termo de consentimento livre e esclarecido será assinado e datado em duas vias, pelo pesquisador e por você. E você receberá uma via do termo de igual teor assinada e datada.

O QUE DEVO FAZER SE TIVER DÚVIDAS OU DIFICULDADES?

Se você tiver alguma dúvida sobre o estudo ou algum dano decorrente do estudo, entre em contato com:

- **Dra. Joanna Reis ou Dra. Alda Da-Cruz.**
- **Número de telefone: (21)2562-1034 ou 1035/ (21)99989-6527.**
- **Dr. Anastacio Queiroz (médico pesquisador do Hospital São José de Doenças Infecciosas do Ceará). Tel: (0XX85) 9981-6358**

Se quiser fazer qualquer pergunta sobre os seus direitos/direitos de seu(sua) filho(a) como participante de pesquisa, entre em contato com:

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP FIOCRUZ/IOC
Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz
Avenida Brasil, 4.036 - sala 705 (Expansão)
Manguinhos - Rio de Janeiro-RJ - CEP: 21.040-360
Tel.: (21) 3882-9011
e-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

PÁGINA DE ASSINATURAS

Se você leu este termo de consentimento (ou se ele lhe foi lido e explicado), todas as suas perguntas foram respondidas e você concorda em participar do estudo em questão, por favor, assinie abaixo.

Nome do participante
(letras de forma)

Assinatura do participante e data

Nome do responsável legal
(letras de forma)

Assinatura do responsável legal e data

Nome do membro da equipe
responsável pela obtenção
do consentimento
(letra de forma)

Assinatura do membro da equipe
responsável pela obtenção
do consentimento e data

Nome da testemunha
(letra de forma)
(se necessário)

Assinatura da testemunha e data
(se necessário)

<p style="text-align: center;">TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Voluntários - Pacientes</p>

Instituição Proponente: Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Laboratório de Interdisciplinar de Pesquisas Médicas. Av. Brasil, 4365, Pav. Cardoso Fontes sala 21, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ. Tel 0XX21-2562-1034 ou 1037

Instituição Responsável: _____

Título do Projeto: “**Avaliação prospectiva de parâmetros imunológicos aplicáveis ao monitoramento do curso clínico de pacientes co-infetados com leishmaniose visceral e HIV-1**” Pesquisador Responsável: Alda Maria Da-Cruz, médica, Pesquisadora Associada e Joanna Reis Santos de Oliveira, bióloga, pesquisadora colaboradora **Equipe:** Leonardo Soares Pereira, Maria Rita Teixeira, Indiara Penido, Carmem Beatriz Wagner Giacoia-Gripp, Glaucia Cota, Maria Luciana Silva-Freitas, Gabriela Castro. Aline Fievez, Anastácio Queiroz de Sousa e Jose Angelo Lindoso.

Você está sendo convidado a participar desse estudo porque os pesquisadores querem investigar de que maneira você responde ao parasito causador da leishmaniose ou como você responde ao vírus que leva à AIDS. O objetivo é melhorar os conhecimentos sobre os sintomas e o diagnóstico destas doenças, além de estudar como o sistema imunológico do organismo de uma pessoa que tem AIDS reage quando ela apresentar ao mesmo tempo a leishmaniose. Nos casos em que houver as duas doenças será realizado um acompanhamento clínico e laboratorial dos pacientes. Nos casos de **leishmaniose sem AIDS**, você também poderá fazer parte do estudo caso seja de sua vontade. Os indivíduos que tiverem a **infecção pelo HIV, sem leishmaniose** também podem ser incluídos no estudo caso queiram. Nos casos de indivíduos sadios, você também poderá fazer parte deste estudo. O seu acompanhamento clínico estará garantido independente de apresentar as duas, ou mesmo uma das doenças, bem como independente de sua decisão de participar ou não do estudo.

Os resultados dos exames serão comunicados e entregues a você ou ao médico responsável pelo seu acompanhamento.

Sua colaboração, caso esteja interessado em participar desse estudo, será submeter-se aos seguintes procedimentos, a serem realizados por profissionais de saúde especializados:

1. Responder a um questionário contendo informações pessoais, da sua residência e das doenças que você apresentou ou tem neste momento.
2. Consulta ambulatorial periódica para realização de exame clínico e exames laboratoriais de rotina necessários para o diagnóstico da leishmaniose que serão realizados pela equipe médica do hospital (coleta de sangue, biópsia e teste de Montenegro). Os exames consistirão em uma coleta de sangue que deverá ser repetida a cada visita sua, ou seja, a cada dois meses, ao longo de 12 meses, totalizando 8 visitas. Nos casos em que você apresente recaída da doença, como febre, aumento do volume abdominal e perda de peso, você deverá procurar o hospital para ser examinado e nova coleta de sangue pode ser necessária. Não aplicável se você for um indivíduo saudável e sem suspeita de leishmaniose.

3. Teste de Montenegro. Este consiste na aplicação de 0,1 ml de uma solução contendo parasitos mortos pelo mertiolate. A leitura na pele é feita em 48h. Este poderá ser repetido quando for necessário avaliar minha imunidade para a leishmaniose. Não aplicável aos indivíduos sadios e sem suspeita de leishmaniose.
4. Coleta de 45 ml de sangue (equivalente a três colheres de sopa de sangue) através de agulha que fará punção da veia do braço. Esta coleta deverá ser repetida periodicamente (a cada dois ou quatro meses).
5. Coleta de sangue para realizar sorologia anti-HIV com a sua autorização.
6. Caso haja o diagnóstico de AIDS você será acompanhado e tratado.

AUTORIZAÇÃO PARA ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Caso você autorize que após as análises desse estudo, a parte restante (sobras) das suas amostras biológicas (sangue, biópsias) seja guardada na FIOCRUZ, para serem utilizados em futuros projetos de pesquisa, após análise e aprovação de um Comitê de Ética, autorize e assinale abaixo. Todos os esforços serão feitos para que você seja contatada de novo no futuro, caso os pesquisadores tenham novas ideias a serem estudadas, e autorize a realização da pesquisa. Para tanto, você deverá manter o seu cadastro na instituição sempre atualizado.

() Autorizo o armazenamento das amostras biológicas restantes por até três anos após a finalização do meu acompanhamento clínico laboratorial.

() Não autorizo o armazenamento das amostras biológicas restantes após a finalização do meu acompanhamento clínico laboratorial, e desejo que as amostras sejam destruídas.

ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Caso você autorize o armazenamento do restante das suas amostras, estas ficarão estocadas no laboratório na FioCruz-RJ e serão utilizadas só até dois anos após a finalização do seu acompanhamento clínico-laboratorial. Além disso, essas amostras restantes só serão utilizadas novamente, mediante seu novo consentimento e autorização do Comitê de Ética da instituição. Você poderá pedir informações associadas ao seu material biológico humano armazenado a qualquer momento. Após esse período, elas serão descartadas completamente. A pesquisadora responsável pelo biorrepositório será a Dra. Alda Da-Cruz do LIPMed (tel:21-2562-1034).

RISCOS DA COLETA DE SANGUE E MATERIAIS BIOLÓGICOS:

A coleta de sangue pode causar desconforto, sangramento ou rouidão no local da picada da agulha. Um pequeno coágulo pode se formar no local da picada da agulha e pode haver inchaço na região. Há um pequeno risco de infecção leve no local da picada. Também podem ocorrer vertigem e desmaios no momento da picada da agulha. Todos os cuidados apropriados serão tomados, como o uso de seringa, agulha e gaze descartável assim como álcool para limpeza local, entre outros.

Esclarecimentos sobre os outros procedimentos e inconvenientes:

O teste de Montenegro é utilizado rotineiramente para o diagnóstico da leishmaniose e quando for positivo indica que o organismo é capaz de ter resistência imunológica ao parasito causador da doença. No entanto, o teste NÃO deve ser aplicado nos indivíduos alérgicos a mertiolate. A reação positiva se acompanha de vermelhidão e endurecimento da pele no local onde o teste foi aplicado. Reações mais intensas como inflamação, ulceração da pele, ou mesmo febre também podem ocorrer, mas são

raras. Não aplicável se você for um indivíduo saudável e sem suspeita de leishmaniose.

Para o diagnóstico também será realizada uma biópsia da úlcera para quem tem suspeita de doença na pele, ou para quem tem suspeita de doença nas vísceras será retirado sangue da medula para a realização do diagnóstico. Os indivíduos alérgicos ao anestésico NÃO poderão fazer biópsia. As complicações que podem ocorrer são dor e sangramento local que regredem geralmente ao final de dois a três dias. A biópsia é feita com anestésico local a nível ambulatorial. Não aplicável se você for um indivíduo saudável e sem suspeita de leishmaniose.

Todas as amostras biológicas colhidas são necessárias para um diagnóstico acurado da infecção e deverão ser utilizado somente para fins de diagnóstico e pesquisa.

PARTICIPAR DO ESTUDO TRAZ BENEFÍCIOS?

É possível que você não obtenha nenhum benefício de sua participação no estudo, embora os pesquisadores possam descobrir novos exames de laboratório que poderão ajudar a prevenir a evolução da leishmaniose ou novos episódios dessa doença, após o tratamento. Os resultados dos exames serão comunicados e entregues a você e ao médico responsável pelo seu acompanhamento.

Os conhecimentos obtidos no estudo poderão ajudar a outras pessoas no futuro que tenham a mesma doença.

E O SIGILO?

Serão feitos todos os esforços para manter a confidencialidade das suas informações pessoais. A publicação de qualquer material do estudo não usará seu nome e não o identificará pessoalmente. Serão utilizados códigos com as iniciais de umas das duas doenças (H ou L) e um número correspondente à entrada no protocolo de estudo (H01, H02, H03, LV01, LV02).

QUAIS SÃO OS CUSTOS ENVOLVIDOS?

Não há custos para você no que diz respeito aos medicamentos, às visitas, e aos procedimentos do estudo. Você só precisará vir ao hospital.

RECEBEREI ALGUM PAGAMENTO?

Você não receberá nenhum tipo de pagamento por participar deste estudo.

O QUE ACONTECE SE EU SOFRER ALGUM DANO?

Se você sofrer algum dano em decorrência da participação no estudo, você receberá imediatamente o tratamento adequado para suas lesões através do Centro de Referência em Leishmanioses onde você é acompanhado, sem custos para você. Não existe nenhum programa de compensação financeira por estas instituições. Entretanto, você não estará renunciando a nenhum de seus direitos legais ao assinar este termo de consentimento.

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS COMO PARTICIPANTE DE PESQUISA?

A participação no estudo é totalmente voluntária. Você pode optar por não participar do estudo ou pode sair do estudo a qualquer momento. Optar por não participar ou deixar o estudo não terá nenhum efeito em outros estudos que queira participar, e não resultará em nenhuma penalidade ou perda de benefícios aos quais, de outro modo, você tem direito. Você será informado/a de quaisquer dados novos, do estudo em

questão ou de outros estudos, que possam afetar a sua saúde, o seu bem-estar ou à sua vontade de permanecer no estudo. Se quiser receber os resultados do estudo, comunique isso à equipe responsável e mantenha sempre atualizado os seus contatos com a equipe da pesquisa.

O termo de consentimento livre e esclarecido será assinado e datado em duas vias, pelo pesquisador e por você e você receberá uma via do termo de igual teor assinada e datada.

O QUE DEVO FAZER SE TIVER DÚVIDAS OU DIFICULDADES?

Se você tiver alguma dúvida sobre o estudo ou algum dano decorrente do estudo, entre em contato com:

- **Dra. Joanna Reis ou Dra. Alda Da-Cruz.**
- **Número de telefone: (21)2562-1034 ou 1035/ (21)99989-6527.**
- **Dr. Anastacio Queiroz (médico pesquisador do Hospital São José de Doenças Infecciosas do Ceará). Tel: (0XX85) 9981-6358**

Se quiser fazer qualquer pergunta sobre os seus direitos/direitos de seu(sua) filho(a) como participante de pesquisa, entre em contato com:

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP FIOCRUZ/IOC
Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz
Avenida Brasil, 4.036 - sala 705 (Expansão)
Manguinhos - Rio de Janeiro-RJ - CEP: 21.040-360
Tel.: (21) 3882-9011
e-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

PÁGINA DE ASSINATURAS

Se você leu este termo de consentimento (ou se ele lhe foi lido e explicado), todas as suas perguntas foram respondidas e você concorda em participar do estudo em questão, por favor, assine abaixo.

Nome do participante
(em letras de forma)

Assinatura do participante e data

Nome do responsável legal
(em letras de forma)

Assinatura do responsável legal e data

Nome do membro da equipe
responsável pela obtenção
do consentimento
(em letra de forma)

Assinatura do membro da equipe
responsável pela obtenção
do consentimento e data

Nome da testemunha
(em letra de forma) (se necessário)

Assinatura da testemunha e data
(se necessário)

<p style="text-align: center;">TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Voluntários - Sadios</p>
--

Instituição Proponente: Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Laboratório de Interdisciplinar de Pesquisas Médicas. Av. Brasil, 4365, Pav. Cardoso Fontes sala 21, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ. Tel 0XX21-2562-1034

Instituição Responsável: _____

Título do Projeto: “**Avaliação prospectiva de parâmetros imunológicos aplicáveis ao monitoramento do curso clínico de pacientes co-infectados com leishmaniose visceral e HIV-1**” Pesquisador Responsável: Alda Maria Da-Cruz, médica, Pesquisadora Associada e Joanna Reis Santos de Oliveira, bióloga, pesquisadora colaboradora **Equipe:** Leonardo Soares Pereira, Maria Rita Teixeira, Indiara Penido, Carmem Beatriz Wagner Giacoia-Gripp, Glaucia Cota, Maria Luciana Silva-Freitas, Gabriela Castro. Aline Fievez, Anastácio Queiroz de Sousa e Jose Angelo Lindoso.

Você está sendo convidado a participar desse estudo porque os pesquisadores querem investigar de que maneira os pacientes respondem ao parasito causador da leishmaniose ou como eles respondem ao vírus que leva à AIDS. O objetivo é melhorar os conhecimentos sobre os sintomas e o diagnóstico destas doenças, além de estudar como o sistema imunológico do organismo de uma pessoa que tem AIDS reage quando ela apresentar ao mesmo tempo a leishmaniose. No entanto, este estudo necessita que todos os resultados sejam comparados ao que acontece normalmente em indivíduos sadios. Você está sendo convidado para fazer parte deste estudo por esse motivo.

Os resultados dos exames serão comunicados e entregues a você ou ao médico responsável pelo seu acompanhamento.

Sua colaboração, caso esteja interessado em participar desse estudo, será submeter-se aos seguintes procedimentos, a serem realizados por profissionais de saúde especializados:

1. Responder a um questionário contendo informações pessoais, da sua residência e das doenças que você apresentou ou tem neste momento.
2. Coleta de 45 ml de sangue (equivalente a três colheres de sopa de sangue) através de agulha que fará punção da veia do braço.

AUTORIZAÇÃO PARA ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Caso você autorize que após as análises desse estudo, a parte restante (sobras) das suas amostras biológicas (sangue) seja guardada na FIOCRUZ, para serem utilizados em futuros projetos de pesquisa atrelados a este presente estudo, após análise e aprovação de um Comitê de Ética, autorize e assinale abaixo. Todos os esforços serão feitos para que você seja contatada de novo no futuro, caso os pesquisadores tenham novas ideias a serem estudadas, e autorize a realização da pesquisa. Para tanto, você deverá manter o seu cadastro na instituição sempre atualizado.

() Autorizo o armazenamento das amostras biológicas restantes por até três anos após a finalização do meu acompanhamento clínico laboratorial.

() Não autorizo o armazenamento das amostras biológicas restantes após a finalização do meu acompanhamento clínico laboratorial, e desejo que as amostras sejam destruídas.

ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Caso você autorize o armazenamento do restante das suas amostras, estas ficarão estocadas no laboratório na Fiocruz-RJ e serão utilizadas só até dois anos após a finalização do acompanhamento clínico-laboratorial dos pacientes. Além disso, essas amostras restantes só serão utilizadas novamente, mediante seu novo consentimento e autorização do Comitê de Ética da instituição. Você poderá pedir informações associadas ao seu material biológico humano armazenado a qualquer momento. Após esse período, elas serão descartadas completamente. A pesquisadora responsável pelo biorrepositório será a Dra. Alda Da-Cruz do LIPMed (tel:21-2562-1034).

RISCOS DA COLETA DE SANGUE E MATERIAIS BIOLÓGICOS:

A coleta de sangue pode causar desconforto, sangramento ou rouidão no local da picada da agulha. Um pequeno coágulo pode se formar no local da picada da agulha e pode haver inchaço na região. Há um pequeno risco de infecção leve no local da picada. Também podem ocorrer vertigem e desmaios no momento da picada da agulha. Todos os cuidados apropriados serão tomados, como o uso de seringa, agulha e gaze descartável assim como álcool para limpeza local, entre outros.

Todas as amostras biológicas colhidas serão utilizadas somente para fins de diagnóstico e pesquisa.

PARTICIPAR DO ESTUDO TRAZ BENEFÍCIOS?

É possível que você não obtenha nenhum benefício de sua participação no estudo, embora os pesquisadores possam descobrir novos exames de laboratório que poderão ajudar a prevenir a evolução da leishmaniose ou novos episódios dessa doença, após o tratamento. Os resultados dos exames serão comunicados e entregues a você e ao médico responsável pelo seu acompanhamento.

Os conhecimentos obtidos no estudo poderão ajudar a outras pessoas no futuro que tenham a mesma doença.

E O SIGILO?

Serão feitos todos os esforços para manter a confidencialidade das suas informações pessoais. A publicação de qualquer material do estudo não usará seu nome e não o identificará pessoalmente. As amostras dos indivíduos sadios receberão um código de controle negativo e um número correspondente à ordem de entrada no estudo (Exemplo: CN01, CN02).

QUAIS SÃO OS CUSTOS ENVOLVIDOS?

Não há custos para você no que diz respeito aos procedimentos do estudo.

RECEBEREI ALGUM PAGAMENTO?

Você não receberá nenhum tipo de pagamento por participar deste estudo.

O QUE ACONTECE SE EU SOFRER ALGUM DANO?

Se você sofrer algum dano em decorrência da participação no estudo, você receberá imediatamente o tratamento adequado para suas lesões através do Centro de Referência em Leishmanioses onde você é acompanhado, sem custos para você. Desse modo, qualquer dano que você sofra em decorrência dos procedimentos citados no item: RISCOS DA COLETA DE SANGUE E MATERIAIS BIOLÓGICOS, normalmente aplicados na rotina e no seu acompanhamento clínico será assegurado pela instituição. Tal informação foi incluída no TCLE. Não existe nenhum programa de compensação financeira por estas instituições. Entretanto, você não estará renunciando a nenhum de seus direitos legais ao assinar este termo de consentimento.

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS COMO PARTICIPANTE DE PESQUISA?

A participação no estudo é totalmente voluntária. Você pode optar por não participar do estudo ou pode sair do estudo a qualquer momento. Optar por não participar ou deixar o estudo não terá nenhum efeito em outros estudos que queira participar, e não resultará em nenhuma penalidade ou perda de benefícios aos quais, de outro modo, você tem direito. Você será informado/a de quaisquer dados novos, do estudo em questão ou de outros estudos, que possam afetar a sua saúde, o seu bem-estar ou à sua vontade de permanecer no estudo. Se quiser receber os resultados do estudo, comunique isso à equipe responsável e mantenha sempre atualizado os seus contatos com a equipe da pesquisa.

O termo de consentimento livre e esclarecido será assinado e datado em duas vias, pelo pesquisador e por você e você receberá uma via do termo de igual teor assinada e datada.

O QUE DEVO FAZER SE TIVER DÚVIDAS OU DIFICULDADES?

Se você tiver alguma dúvida sobre o estudo ou algum dano decorrente do estudo, entre em contato com:

- **Dra. Joanna Reis ou Dra. Alda Da-Cruz.**
- **Número de telefone: (21)2562-1034 ou 1035/ (21)99989-6527.**
- **Dr. Anastacio Queiroz (médico pesquisador do Hospital São José de Doenças Infecciosas do Ceará). Tel: (0XX85) 9981-6358**

Se quiser fazer qualquer pergunta sobre os seus direitos/direitos de seu(sua) filho(a) como participante de pesquisa, entre em contato com:

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP FIOCRUZ/IOC
Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz
Avenida Brasil, 4.036 - sala 705 (Expansão)
Manguinhos - Rio de Janeiro-RJ - CEP: 21.040-360
Tel.: (21) 3882-9011
e-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

PÁGINA DE ASSINATURAS

Se você leu este termo de consentimento (ou se ele lhe foi lido e explicado), todas as suas perguntas foram respondidas e você concorda em participar do estudo em questão, por favor, assine abaixo.

Nome do participante
(em letras de forma)

Assinatura do participante e data

Nome do responsável legal
(em letras de forma)

Assinatura do responsável legal e data

Nome do membro da equipe
responsável pela obtenção
do consentimento
(em letra de forma)

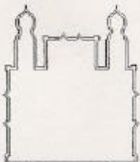
Assinatura do membro da equipe
responsável pela obtenção
do consentimento e data

Nome da testemunha
(em letra de forma)
(se necessário)

Assinatura da testemunha e data
(se necessário)

9.2 ANEXOS B

9.2.1 Aprovações no Comitê de Ética em Pesquisas com seres humanos (IOC, IPEC/INI, CPqRR e HEM/FHEMIG) – Casuística do Capítulo 1



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 17 de outubro de 2005.

PARECER

Título do Projeto: "Desenvolvimento de instrumentos clínico-laboratoriais aplicáveis aos estudos clínico-epidemiológicos, ao diagnóstico e ao monitoramento terapêutico da co-infecção HIV/Leishmania".
Protocolo CEP: 290/05
Pesquisador Responsável: Alda Maria Da-Cruz
Instituição: IOC
Deliberação: APROVADO COM RECOMENDAÇÃO

O projeto versa sobre a co-infecção HIV-Leishmaniose e tem por objetivo identificar "as características clínicas e epidemiológicas dos casos de co-infecção HIV-Leishmania em áreas de alta ocorrência de ambas as doenças, bem como identificar as principais características imunopatogênicas da associação entre estes patógenos". Pretende, ainda, "pesquisar a sensibilidade e a especificidade dos exames parasitológicos e sorológicos clássicos e compará-las respectivamente a métodos moleculares para identificação de DNA de *Leishmania* e testes sorológicos utilizando novos alvos (Hsp83 de *L. infantum* e rK39 de *L. chagas*) assim como identificar marcadores imunológicos que tenham valor preditivo de resposta ao tratamento ou evolução".

Para o alcance dos objetivos, propõe-se um estudo retrospectivo onde se dará a busca de registros hospitalares nas várias instituições participantes, utilizando-se um ficha clínica para recuperação e análise de aspectos clínicos, diagnósticos e evolutivos de portadores de co-infecção. A pesquisa prevê, ainda, um estudo a partir de busca ativa de pacientes onde serão organizados os seguintes grupos: a) cerca de 50 pacientes que se encontram atualmente em acompanhamento clínico; b) 30 pacientes portadores somente de leishmaniose tegumentar; c) 30 pacientes portadores somente de leishmaniose visceral (grupos b e c são pacientes sem história de infecção de HIV); d) 50 indivíduos com infecção por HIV, sem leishmaniose e; e) 20 indivíduos saudáveis.

Todas as instituições participantes enviaram documentação citando participar da pesquisa. **O termo de consentimento está adequado sugerindo-se a incorporação dos telefones locais nas cidades fora do Estado do Rio de Janeiro.**

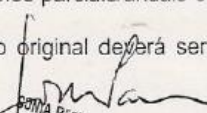
Após análise por este colegiado tendo por referência as diretrizes e normas da resolução CNS196/96, foi decidido pela **APROVAÇÃO** do referido protocolo.

Informamos, outrossim, que deverão ser apresentados relatórios parciais/anuais e relatório final do projeto de pesquisa.

Além disso, qualquer modificação ou emenda ao protocolo original deverá ser submetida para apreciação do CEP/Fiocruz.

p/

José Luiz Telles de Almeida
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Em Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz


REGINA REGINA LAMBERT PASSOS
Mat: 13544889
Chefe do Depto. de Epidemiologia e Antropologia
IPEC/FIOCRUZ



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO – 041/2007

Protocolo 0045.0.011.009-07

1. Identificação:

Título do Projeto: "Desenvolvimento de instrumentos clínicos e laboratoriais aplicáveis aos estudos clínico-epidemiológicos, ao diagnóstico e ao monitoramento terapêutico da co-infecção HIV/*Leishmania*".

Pesquisador Responsável: Alda Maria Da-Cruz (IOC).

Instituição Responsável: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas / FIOCRUZ.

Data de Apresentação ao CEP: 31/07/2007.

2. Sumário:

O objetivo deste projeto é identificar as características clínicas e epidemiológicas dos casos de co-infecção HIV-*Leishmania*", em áreas de alta ocorrência de ambas as doenças, bem como identificar as principais características imunopatogênicas da associação entre estes patógenos. Pretende-se pesquisar a sensibilidade e a especificidade dos exames parasitológicos e sorológicos clássicos, e compará-las respectivamente a métodos moleculares para identificação de DNA de *Leishmania* e testes sorológicos utilizando novos alvos (Hsp83 de *L. infantum* e rK39 de *L. chagasi*), assim como identificar marcadores imunológicos que tenham valor preditivo de resposta ao tratamento ou evolução. O estudo terá caráter tanto prospectivo, por busca ativa de casos, como retrospectivo, por busca em registros hospitalares. O universo de pacientes co-infectados identificado nos centros participantes deste estudo, que estão atualmente em acompanhamento, é de aproximadamente 50 casos. Como controle serão estudados pacientes portadores de leishmanioses tegumentar (30 casos) e visceral (30 casos) sem história de infecção pelo HIV; cerca de 50 indivíduos com infecção por HIV, sem leishmanioses (dependendo do parâmetro a ser estudado); 20 indivíduos saudáveis. Instituições envolvidas: Instituto de Medicina Tropical da USP; Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella da UFP; Núcleo de Medicina Tropical da UB; Instituto de Infectologia Emílio Ribas - Secretaria Estadual de SP; Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFMS; Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade Medicina de São Paulo.

3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).

Projeto com delineamento adequado. Apresenta dois Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, sendo um para Pacientes em Investigação de Co-infecção *Leishmania*/HIV e um segundo para Voluntários Sadios, ambos bem elaborados em linguagem acessível ao sujeito da pesquisa. Este projeto foi submetido ao PN DST/Aids – SVS / Ministério da Saúde.

4. Diligências:

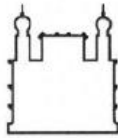
Não houve.

5. Parecer: APROVADO.

Data: 14 de agosto de 2007.

Assinatura do Coordenador:

Dr.ª Léa Camillo-Couta
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPEC / FIOCRUZ



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Comitê de Ética



CARTA DE APROVAÇÃO Nº 02/2011 – CEP / CPqRR / FIOCRUZ / MS

Protocolo CEP - CPqRR nº: 33/2010

Projeto de Pesquisa: "INTENSIDADE DE INFECÇÃO, PERSISTENCIA PARASITARIA E PERFIL IMUNI COMO PREDITORES DE EVOLUÇÃO CLINICA DE LEISHMANIOSE VISCERAL ENTRE PACIENTES INFECTADOS OU NÃO PELO HIV" - GIII.

Pesquisadora Responsável: Glauca Fernandes Cota

Instituição Realizadora: Hospital Eduardo de Menezes – FHEMIG

Instituição Vinculada: Centro de Pesquisas René Rachou

CAAE: xxx

Após submissão e análise criteriosa do protocolo em questão, no Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou, constamos que o estudo atende aos aspectos fundamentais da Resolução 196/96 CNS, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética do CPqRR / FIOCRUZ Minas, de acordo com as atribuições à ele concedidas pela Legislação vigente, manifesta-se pela homologação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: PROJETO APROVADO.

Firma-se diante deste documento a necessidade de serem apresentados os relatórios:

- Parcial 01: Fevereiro 2012;
- Parcial 02: Fevereiro 2013;
- Parcial 03: Fevereiro 2014;
- Final: Fevereiro 2015.

Bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

Belo Horizonte, 17 de Janeiro de 2010.



João Carlos Pinto Dias
João Carlos Pinto Dias
COORDENADOR
COMITÊ DE ÉTICA

Av. Augusto de Lima, 1715 Barro Preto 30190-002, Belo Horizonte – MG - Brasil
Tel: 55 0xx31 3295 3566 (ramal 181) Fax: 55 0xx31 3295 3115 <http://www.cpqrr.fiocruz.br>

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

HOSPITAL EDUARDO DE MENEZES

PARECER CONSUBSTANCIADO

TÍTULO: "INTENSIDADE DE INFECÇÃO, PERSISTÊNCIA PARASITÁRIA E PERFIL IMUNE COMO PREDITORES DE EVOLUÇÃO CLÍNICA DE LEISHMANIOSE VISCERAL ENTRE PACIENTES INFECTADOS OU NÃO PELO HIV"

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Dra. Gláucia Fernandes Cota

ORIENTADORA: Dra Ana Lúcia Teles Rabello

DATA DE APRESENTAÇÃO AO CEP: 15/12/2010

PARECER

A Pesquisa "Intensidade de Infecção, Persistência Parasitária e Perfil Imune como Preditores de Evolução Clínica de Leishmaniose Visceral entre Pacientes Infectados ou não pelo HIV" tem relevância clínica e sanitária.

A leishmaniose visceral é um grave problema de saúde pública. A técnica de PCR pode contribuir para a melhoria do atendimento aos pacientes, com diagnósticos mais precoces e abordagem mais rápida e segura nos casos de recorrência.

Está estruturado de forma que garante a proteção dos sujeitos da pesquisa.

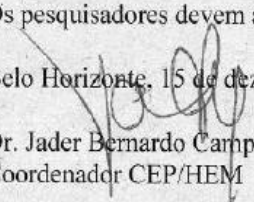
Está estruturado de forma a proteger o sujeito da pesquisa.

Apresenta Termo de Consentimento Livre e Esclarecido estruturado dentro das exigências da Resolução CNS 196/1996.

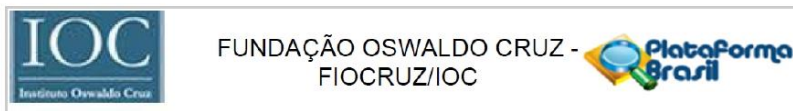
Proponho sua **APROVAÇÃO**.

Os pesquisadores devem apresentar relatório ao CEP dentro de 6 meses.

Belo Horizonte, 15 de dezembro de 2010


Dr. Jader Bernardo Campomizzi
Coordenador CEP/HEM

9.2.2 Aprovações no Comitê de Ética em Pesquisas com seres humanos (FIOCRUZ/IOC, HEM/FHEMIG e CPqRR) – Casuística do Capítulo 2



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação prospectiva de parâmetros imunológicos aplicáveis ao monitoramento do curso clínico de pacientes co-infectados com leishmaniose visceral e HIV-1

Pesquisador: Joanna Reis Santos de Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68118117.3.1001.5248

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ
CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.121.284

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_880170.pdf	09/05/2017 13:57:34		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_2017.doc	09/05/2017 13:56:32	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2017.doc	09/05/2017 13:56:18	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_pesquisador_SP.pdf	14/04/2017 09:22:28	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_pesquisadora_ceara.pdf	14/04/2017 09:12:25	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_pesquisador_ceara.pdf	14/04/2017 09:10:38	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	14/04/2017 09:02:30	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 14 de Junho de 2017

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação prospectiva de parâmetros imunológicos aplicáveis ao monitoramento do curso clínico de pacientes co-infectados com leishmaniose visceral e HIV-1

Pesquisador: Joanna Reis Santos de Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68118117.3.3002.5124

Instituição Proponente: FUNDACAO HOSPITALAR DO ESTADO DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ
CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.630.609

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2018_final.pdf	26/03/2018 11:05:11	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito
Outros	Biorepositorio.pdf	26/03/2018 11:04:38	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito
Outros	Pendencias.pdf	26/03/2018 11:04:11	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_2017.doc	09/05/2017 13:56:32	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 02 de Maio de 2018

Assinado por:
JADER BERNARDO CAMPOMIZZI
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Cristiano Rezende, 2213
Bairro: Bonsucesso CEP: 30.622-020
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3328-5084 Fax: (31)3328-5006 E-mail: hem.cep@fhemig.mg.gov.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação prospectiva de parâmetros imunológicos aplicáveis ao monitoramento do curso clínico de pacientes co-infectados com leishmaniose visceral e HIV-1

Pesquisador: Joanna Reis Santos de Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68118117.3.3001.5091

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.141.103

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_880170.pdf	09/05/2017 13:57:34		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_2017.doc	09/05/2017 13:56:32	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2017.doc	09/05/2017 13:56:18	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito

Continuação do Parecer: 2.141.103

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_880170.pdf	14/04/2017 11:43:02		Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_pesquisador_SP.pdf	14/04/2017 09:22:28	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_pesquisadora_ceara.pdf	14/04/2017 09:12:25	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_pesquisador_ceara.pdf	14/04/2017 09:10:38	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	14/04/2017 09:02:30	Joanna Reis Santos de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 27 de Junho de 2017

Assinado por:
MARCELO PASCOAL
(Coordenador)



Research Paper

Thalidomide is Associated With Increased T Cell Activation and Inflammation in Antiretroviral-naïve HIV-infected Individuals in a Randomised Clinical Trial of Efficacy and Safety



Tânia R.C. Vergara^{a,d}, Sadia Samer^a, Joanna R. Santos-Oliveira^f, Leila B. Giron^a, Muhammad Shoaib Arif^a, Maria Luciana Silva-Freitas^b, Lia A. Cherman^c, Mauro S. Treitsman^d, Alberto Chebabo^{d,e}, Maria Cecília A. Sucupira^a, Alda M. Da-Cruz^b, Ricardo Sobhie Diaz^{a,*}, the SPARC Working Group

^a Laboratório de Retrovirologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

^c Secretaria Municipal de Saúde Antônio Ribeiro Neto, Rio de Janeiro, Brazil

^d OncoHiv, Rio de Janeiro, Brazil

^e Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^f Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 May 2017

Received in revised form 28 July 2017

Accepted 7 August 2017

Available online 12 August 2017

Keywords:

Thalidomide

T cell activation

Inflammation

Latency reversal agent

HIV

ABSTRACT

Trial Design: Open-label, randomised, controlled, pilot proof-of-concept clinical trial.

Methods: Participants: Antiretroviral naïve adult males with CD4 count ≥ 350 cells/mm³.

Interventions: Patients were randomised to receive thalidomide 200 mg QD for 3 weeks (Thalidomide group) or not (Control group) and followed for 48 weeks.

Objective: We hypothesized that short-term Thalidomide use would reduce HIV related inflammation and HIV replication among antiretroviral naïve HIV infected individuals.

Outcome: Viral loads, CD4/CD8 counts, ultra-sensitive C-reactive protein (US-CRP), cell activation markers, and plasma lipopolysaccharide (LPS) were analyzed.

Randomisation: Unrestricted randomisation.

Blinding: No blinding was used.

Results: Numbers randomised: Thirty recruited individuals were randomised to Thalidomide (16 patients) or Control (14 patients) groups.

Recruitment: Patients were recruited from April 2011 to January 2013.

Outcome: Viral loads remained stable in both groups. During thalidomide treatment, a decrease in CD4/CD8 ratio ($p = 0.04$), a decrease in CD4 count ($p = 0.04$), an increase in cell activation calculated by the percentage of CD38⁺/HLA-DR⁺ CD8 cells ($p < 0.05$) and an increase in US-CRP ($p < 0.01$) were observed in the Thalidomide group, with all parameters returning to baseline levels after thalidomide interruption. We confirmed that thalidomide increased HIV replication *in vitro* of 6 of 7 samples from long-term antiretroviral suppressed individuals.

Harms: No class 3/4 adverse events occurred.

Conclusions: Short-term use of thalidomide led to an intense transient increase in T cell activation and inflammation, with a decrease in the CD4⁺ cell count without changes to the CD8⁺ cell count. We confirmed that thalidomide acts *in vitro* as a latency reversal agent and speculate that the *in vivo* results obtained were due to an increase in HIV replication.

© 2017 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Generalized immune activation and inflammation are hallmarks of the pathogenesis of HIV/AIDS (d'Ettorre et al., 2011). Important factors

driving HIV-induced immune activation include ongoing viral replication, microbial translocation from the gastrointestinal (GI) tract and co-infections (Marchetti et al., 2013). Irreversible damage to the integrity of the GI tract's mucosal barrier occurs early during HIV-1 acute infection caused by the irreversible massive depletion of CD4⁺ T (memory) cells from the GI tract mucosa, resulting in systemic activation of the immune system *via* the translocation of GI tract microbes and lipopolysaccharide (LPS, as a marker of microbial translocation) across the

* Corresponding author at: Rua Pedro de Toledo 669, 6o andar, Vila Clementino, São Paulo 04039-032, Brazil.
E-mail address: rsdiaz@catg.com.br (R.S. Diaz).

damaged barrier (Marchetti et al., 2013). New ultrasensitive techniques can detect very low levels of detectable HIV RNA in rectal samples of HIV-infected individuals with undetectable plasma viremia. Despite being on antiretroviral therapy (ART), this ongoing low-level replication at sites such as the GI tract contributes to the disease burden. During ART, microbial translocation declines but does not return to normal levels, indicating the potential role of microbial translocation in HIV-induced immune activation (Palmer, 2013).

The HIV-induced dysregulation of CD4⁺ T regulatory (Treg) cells also results in a permanently over-activated immune system due to the lack of immunomodulation (Chevalier and Weiss, 2013). The overburden of viral gene products together with those of foreign pathogens causes the overactivation of both T and B cells. The non-specific production of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF α), interleukin-1 (IL-1), IL-6 and several others, causes the bystander activation of T and B lymphocytes and ultimately leads to immunosenescence (Reeves, 2014). HIV-1 replication *per se* also relates to immune activation, and the higher the viral load, the higher the immune activation process (Hunt et al., 2003). It has been demonstrated that even defective HIV may produce HIV proteins, which conceivably maintains a state of inflammation in antiretroviral-suppressed individuals (Imamichi et al., 2016). Interestingly, cell activation is higher among HIV-infected elite controllers than among uninfected individuals or antiretroviral-treated individuals with viral loads below detection limits (Hunt et al., 2006).

This persistent immune activation and inflammation is responsible for enhanced CD4⁺ T cell death, lymphoid tissue destruction, kidney and liver problems, atherosclerosis, cardiovascular disease and neurocognitive impairment (Reeves, 2014). Therefore, the future treatment of HIV/AIDS requires the consideration of anti-inflammatory strategies with antivirals to overcome chronic inflammation-associated complications.

HIV-related immune activation is associated with a rapid and persistent increase in TNF levels (McMichael et al., 2010), resulting in the induction of adhesion molecules and chemokines from the vessel wall (Signorelli et al., 2007), endothelial cell activation and the increased adhesion of leukocytes (Mu et al., 2007).

One of the drugs known for its immunomodulatory potential is thalidomide.

Thalidomide has a beneficial effect on skin lesions of leprosy, erythema nodosum leprosum (Teo et al., 2002) and multiple myeloma (Chen et al., 2010). Thalidomide is used in the treatment of various autoimmune or inflammatory disorders, such as Behçet disease, cutaneous lupus erythematosus, prurigo nodularis, sarcoidosis, chronic graft-versus-host disease, and Kaposi's sarcoma (Chen et al., 2010; Franks et al., 2004).

The pharmacological effects of thalidomide have established it as an anti-inflammatory, immuno-modulatory and anti-angiogenic drug. The mechanisms underlying these features involve the modulation of inflammatory cytokines, such as TNF α , interferon gamma (IFN γ), IL-10, IL-12, cyclooxygenase 2 (COX-2) and nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF κ B) (Franks et al., 2004).

The transcription factor NF κ B controls the anti-inflammatory and anti-angiogenic properties of thalidomide. NF κ B is located in the cytoplasm in its inactive form bound to the inhibitory protein I κ B α . Once stimulated by inducers such as TNF α or IL-1 β , the phosphorylation of I κ B α proteins by I κ B kinase (IKK) releases NF κ B, which translocates to the nucleus and induces the activation of genes responsible for immune and inflammatory responses, cellular proliferation, angiogenesis and the suppression of apoptosis (Wang et al., 1999). Thalidomide exerts its anti-inflammatory effect by enhancing the degradation of TNF α mRNA, as observed in endotoxin-stimulated monocytes and macrophages (Moreira et al., 1993). In contrast to this anti-TNF activity of thalidomide, IL-2-dependent upregulation of TNF α by CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes has also been observed *in vitro* (Marriott et al., 2002).

NF κ B is an enhancer of HIV-1 transcription, which, upon the activation of an infected cell, migrates to the nucleus and induces the expression of HIV-1 genes (Pomerantz et al., 1990). Because of the convergence of the regulatory pathways for the transcription of HIV and of cytokine genes, it is possible that interventions directed at limiting the cytokine response to HIV-1 and opportunistic infections could have a profound impact on the replicating HIV-1 levels as well as the associated morbidity and mortality.

The link between circulating HIV and TNF α (Klausner et al., 1996) or TNF α receptors (Bilello et al., 1996) has long been identified in the plasma of infected individuals, and TNF α induces viral replication via a shared NF κ B-dependent transcriptional control mechanism (Pomerantz et al., 1990). Targeting TNF α may reduce viral replication, resulting in lower inflammation. Thalidomide has shown promising results in inhibiting the production of TNF α both *in vitro* and *in vivo* (Sampaio et al., 1993). These observations have provided the rationale for exploring the anti-inflammatory potential of thalidomide to inhibit TNF α , thereby reducing HIV replication and associated inflammation.

The present study was designed to examine whether thalidomide treatment of HIV-1-infected individuals would reduce the levels of HIV surrogate markers of inflammation. We recruited HIV-infected individuals who had not undergone ART, in whom any potential anti-inflammatory properties of thalidomide would be better quantified. We treated these individuals for a period of 3 weeks with thalidomide and followed the patients for 23 weeks. The results were compared to those obtained in a control group consisting of ART-naïve individuals who remained naïve throughout the study period.

Hypothesis. We hypothesized that the use of thalidomide would be safe and able to decrease HIV-related inflammation and bacterial translocation. If this hypothesis is confirmed, new trials should include HIV antiretroviral-treated individuals with viral loads below detection limits to further explore the impact of anti-TNF drugs on HIV-1-related inflammatory markers.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design and Participants

This was an open-label, randomised pilot proof-of-concept trial. Thirty individuals were recruited in Rio de Janeiro, Brazil and followed for 23 weeks from April 2011 to January 2013. The subjects were randomly allocated into two groups: the Thalidomide group or Control group (with no thalidomide exposure).

Patients were ART-naïve males from 18 to 60 years of age with a body weight ≥ 50 kg and CD4⁺ T cell counts > 350 cells/mm³. The participants were not eligible to begin ART according to local guidelines for the study period. (http://www.aids.gov.br/sites/default/files/consensoAdulto005c_2008montado.pdf)

Informed consent forms were signed by the participants, and the study protocol was approved by the Ethics Committee and Institutional Review Board at the Universidade Federal de São Paulo, Brazil (#17686/09) and Universidade Federal do Rio de Janeiro (#658/10).

2.2. Interventions

Patients were randomised to either receive 100 mg of thalidomide BID for 3 weeks upon study entry (Thalidomide group, 16 patients) or not (Control group, 14 patients); all were followed for 23 weeks. Blood samples were collected for safety tests and HIV monitoring tests, and laboratory work was performed at the Laboratório de Retrovirologia of the Universidade Federal de São Paulo, Brazil. The cell activation markers were double-checked at the Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

2.3. Sample Size

As a pilot study, a convenience sample size of 30 patients was determined.

2.4. Randomisation

Unrestricted randomisation. Allocation to distinct groups was determined using blind envelopes.

2.5. Clinical and Laboratory Assessments

Clinical and laboratory assessments were performed at the screening, baseline and at weeks 1, 2, 3, 7, 11, 15, 19, and 23. Patients were evaluated for HIV-1 viral loads, CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts, ultra-sensitive C-reactive protein (US-CRP), CD38 and HLA-DR on CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and LPS quantitation in plasma samples. Blood cell counts and biochemical parameters such as aminotransferase enzymes (ALT and AST), creatinine, and glucose were determined at the screening and at each visit. Electrocardiography was performed at the screening and the last visit.

Clinical assessment included clinical signs and symptoms related to HIV infection, adverse events, and adherence to thalidomide intake using a predefined questionnaire.

2.6. Laboratory Methods

2.6.1. Flow Cytometric Evaluation of Cellular Activation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated and cryopreserved. After thawing, PBMCs were labeled with anti-CD3 APC and anti-CD4 PercP (for the lymphocytic subpopulation) and anti-CD38 FITC and anti-HLA-DR PE (for cellular activation). Fixed cells were acquired on a FACSCalibur apparatus and analyzed with CellQuest software (BD Biosciences, San Diego CA, USA). The results were expressed as the percentage of CD38⁺ HLA-DR⁺ cells among CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes.

2.6.2. Assessment of Plasmatic LPS Levels

Microbial translocation was inferred by plasmatic LPS assessments using QCL-1000 Limulus Amebocyte Lysate (Lonza Walkersville Inc., Walkersville, MD, USA) according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as pg/mL, and the minimum limit of detection was 10 pg/mL.

2.6.3. Cytokine Measurement

Cytokine levels were measured in plasma by Cytometric Beads Array kit (CBA, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) processed according to the manufacturer's protocol. The following cytokine were quantified: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF and IFN- γ . A FACSCalibur were used to acquire the samples and data analysis was performed using the software provided by the manufacturer (FCAP Array, BD Biosciences). The standard curve for each cytokine covers a range of 20 to 5000 pg/mL.

2.6.4. Determination of CXCR4 and CCR5 Co-receptor Genotropism

After RNA extraction, reverse transcription nested PCR to amplify the HIV-1 C2V3 region of gp120 and sequencing were carried out as previously described (Lavigne et al., 2014). V3 loop sequences were interpreted to infer co-receptor tropism by web-based genotyping algorithms in Geno2pheno [coreceptor] (<http://www.coreceptor.geno2pheno.org>). Because only one PCR product was subjected to sequencing, in accordance with European guidelines, a false positive rate (FPR) of 10% was used to infer tropism (Poveda et al., 2012), and samples were classified as R5 (FPR > 10%) or non-R5 (FPR \leq 10%) tropic.

2.6.5. In Vitro Determination of Thalidomide's Effect on the HIV-1 Proviral Compartment

CD8⁺ T-cell depleted PBMCs (EasySep Human CD8 Positive Selection kit, STEMCELL TECHNOLOGIES) isolated from 7 HIV-infected ART-treated patients with undetectable viral loads over a period of two years were used. We measured HIV-1 recovery in *ex vivo* cell cultures first activated by phytohemagglutinin and treated with thalidomide (Sigma Aldrich) for 48 h and then cultured in RPMI medium (Gibco, CA, USA) supplemented with IL-2 20 IU/mL (Roche) and fetal bovine

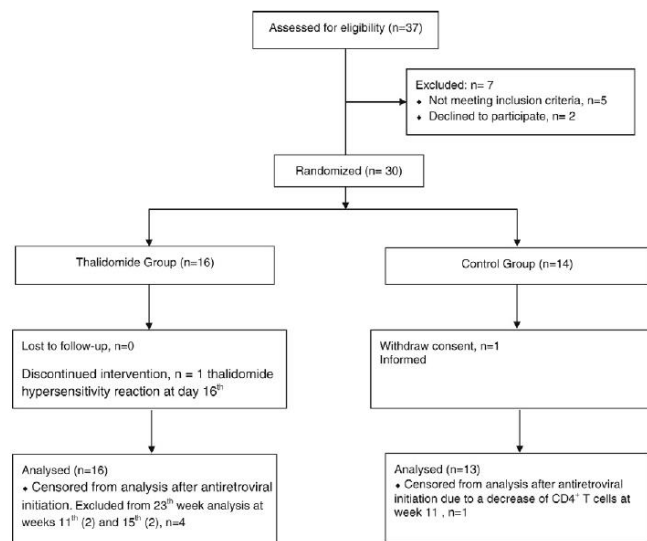


Fig. 1. Participant's flowchart.

serum (Gibco). Fetal bovine serum was used as the control sample. Supernatant samples were taken at days 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28 and 31 and monitored by commercial HIV viral load assay (Abbott RealTime HIV-1 assay, Abbott, Chicago IL).

2.7. Statistical Analyses

The Mann-Whitney *U* test, Student's *t*-test, analysis of variance (ANOVA), and the Kruskal-Wallis test with Dunn's *post hoc* test were used for comparisons between groups. Spearman's test was used to perform correlations between different parameters. GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was employed for the analyses.

3. Results

3.1. Patients' Dispositions, Baseline Characteristics and Virologic/Immunologic Response to Therapy

The participant's Flow chart is described in Fig. 1. Thalidomide-treated patients and control patients were comparable in terms of age, T cell counts and HIV viral load at the beginning of the study (Table 1). One patient in the Thalidomide group was co-infected with HCV, and one patient in the Control group was co-infected with HBV.

Adherence was measured weekly using a predefined questionnaire, and the pill count indicated 100% thalidomide use. One patient stopped the medication on day 16 due to a mild cutaneous rash that disappeared upon thalidomide interruption. There were no grade 3 or 4 adverse events during thalidomide use (Table 2).

Table 1
Baseline characteristics of the thalidomide and control groups.

Characteristics	Thalidomide	Control	p-Value
N	16	14	
Age (\pm SD)	36.88 (\pm 9.28)	31.36 (\pm 5.47)	0.16
Viral load log ₁₀			
Mean (\pm SD)	3.67 (\pm 1.33)	3.82 (\pm 0.57)	0.59
Median	4.11	3.75	
IQR	3.83–4.62	3.46–4.21	
CD4 ⁺ T cells/mm ³			
Mean (\pm SD)	623 (\pm 231)	605 (\pm 255)	0.93
Median	602	625	
IQR	468–660	388–716	
CD8 ⁺ T cells/mm ³			
Mean (\pm SD)	1162 (\pm 396)	1014 (\pm 360)	0.57
Median	1117	1061	
IQR	865–1383	734–1278	
CD4/CD8 ratio			
Mean (\pm SD)	0.58 (\pm 0.23)	0.67 (\pm 0.36)	0.77
Median	0.55	0.52	
IQR	0.38–0.71	0.41–0.85	
CD4/CD38/HLA-DR			
Mean (\pm SD)	7.10 (\pm 4.7)	5.98 (\pm 3.42)	0.75
Median	5.64	5.68	
IQR	2.82–12.1	3.18–7.36	
CD8/CD38/HLA-DR			
Mean (\pm SD)	20.41 (\pm 13.6)	20.07 (\pm 8.8)	0.93
Median	18.32	16.72	
IQR	7.73–32.74	13.90–24.25	
US-PCR mg/dL			
Mean (\pm SD)	2.70 (\pm 1.6)	2.15 (\pm 1.09)	0.45
Median	2.72	2.03	
IQR	1.34–4.28	1.21–3.07	
LPS level pg/mL			
Mean (\pm SD)	59.51 (\pm 28.7)	46.59 (\pm 21.7)	0.30
Median	51.05	42.9	
IQR	35.15–79.03	30.70–66.70	
B subtype			
R5	8	11	
Change of tropism	0/8	4/11	

Table 2

Adverse events during the clinical trial period. No grade 3 and 4 adverse events were detected.

Thalidomide group	Week	Week	Week	Week	Week	Week	Week
	1	2	3	7	15	21	23
	N	N	N	N	N	N	N
Probably unrelated to thalidomide							
Syphilis		1			1		
HPV					1		
Possibly unrelated to thalidomide							
Diarrhea	1						1
Common cold symptoms		3	2*	2*	1*		
Infectious gastroenteritis		1	1*				
Sinusitis			1				
Furunculosis						1	
Intestinal constipation			1				
Possibly related to thalidomide							
Somnolence	12	10	9				
Skin rash			1				
Dry mouth			1				
Dry skin		1	1				
Control group							
Gingivitis	1	1*	1*	1*	1*	1*	
Cold			1		1		1*
Dental abscess					1	1*	
Tonsillitis					1		
Syphilis					1		
Gonorrhoea					1		

* Patient presented the same symptoms at subsequent visit. N = number of patients.

The mean baseline viral loads were 3.67 (range: <2.6–4.85) and 3.82 (range: 2.93–4.95) log₁₀ HIV-1 RNA copies/mL for the Thalidomide and Control groups, respectively (Table 1). A non-significant increase in viral load was observed in Thalidomide group during the three weeks of thalidomide therapy; the mean viral load increased from 3.67 to 3.83 log₁₀ HIV-1 RNA copies/mL, returning to baseline values after thalidomide withdrawal (Supplemental Table 1). At week 23, the mean viral loads were 3.65 (range: <5.0–5.67) and 4.06 (range: 3.38–5.04) log₁₀ copies/mL for the Thalidomide and Control groups, respectively (Supplemental Tables 1 and 2). One patient (TV13) in the Thalidomide group was an elite controller, and at week 8, detectable viremia of 67 (1.83 log₁₀) copies/mL was observed, which returned to undetectable levels in subsequent visits (Supplemental Table 1).

The screening mean CD4⁺ T cell count was 623 cells/mm³ \pm 230 (median: 602 cells/mm³, IQR: 468–660 cells/mm³) and 605 cells/mm³ \pm 255 (median: 625 cells/mm³, IQR: 388–716 cells/mm³) for the Thalidomide and Control groups, respectively. Declines in the CD4⁺ T cell count ($p = 0.04$) and the CD4/CD8 ratio ($p = 0.05$) were observed during thalidomide use in the Thalidomide group, returning to baseline levels after drug withdrawal (Fig. 2) (Supplemental Tables 1 and 2). During the study period, the CD4⁺ T cell count of four patients (TV03, 11, 29 and 31) in the Thalidomide group and one patient (TV12) in the Control group declined to <350 cells/mm³ (were excluded from the subsequent analysis, as they initiated ART (Fisher's exact test: $p = 0.6$)).

The overall screening mean CD8⁺ T cell counts were 1162 \pm 396 cells/mm³ (median: 1117 cells/mm³, IQR: 865–1383 cells/mm³) and 1014 \pm 360 cells/mm³ (median: 1061 cells/mm³, IQR: 734–1278 cells/mm³) for the Thalidomide and Control groups, respectively. No significant change in the CD8⁺ T cell count was detected in either group (Table 1, Supplemental Tables 1 and 2).

As seen in Fig. 3, the mean Leucocytes count in the Thalidomide group was 6577.33 cells/mL as compared to 5402 cells/mL at week 23 ($p = 0.03$), and mean lymphocytes counts was 2283.79 cells/mL at

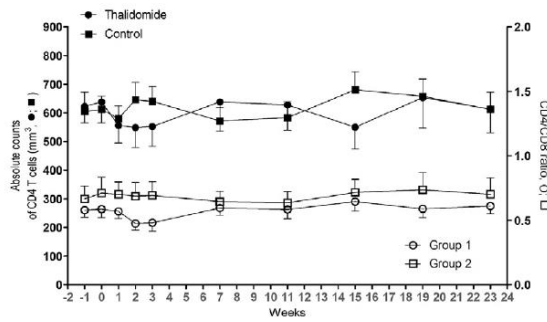


Fig. 2. Ratio of CD4⁺ T cell counts and CD4/CD8⁺ T cell counts over time among groups of Thalidomide and Control patients. Peripheral blood from patient of all groups was collected at each visit during 24 weeks for the absolute quantification of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes by flow cytometry. The closed symbols relate to absolute CD4⁺ T cell counts, and open symbols relate to the CD4/CD8⁺ ratio. The results are expressed as the mean \pm standard deviation. N = number of participants.

baseline and 1842 cells/mL at week 23 ($p = 0.001$), whereas the mean Leucocytes in the Control group were 5610.77 and 5653.08 cells/mL at baseline and week 23 respectively ($p = 0.9$), and mean lymphocytes counts were 1973.54 and 1009.92 cells/mL at baseline and week 23 respectively ($p = 0.7$).

3.2. Thalidomide was Accompanied by Increased Inflammation and Cell Activation Levels

At study onset, the levels of CD4⁺- or CD8⁺-activated T lymphocytes, as inferred by the percentages of cells expressing CD38 and HLA-DR, were similar in both groups, as shown in Table 1.

Counterintuitively, the Thalidomide group presented an increased cell activation status inferred by the percentage of CD38⁺/HLA-DR⁺ CD4⁺ cells and the CD8⁺ T cell counts ($p < 0.05$). This analysis was

repeated in the two participating laboratories at UNIFESP and FIOCRUZ, and the results were consistent (Fig. 4). In the elite controller patient, the percentage of CD38/HLA-DR⁺ on CD8⁺ cells increased during the thalidomide period from 3.2% to 11.3% after 3 weeks of thalidomide and then decreasing to 2.2, 2.4 and 1.8% at weeks 8, 12 and 20, respectively. No activation of CD4⁺ T cells was observed (data on file).

Furthermore, an increase in the unspecific inflammatory marker US-CRP was also detected in the Thalidomide group exclusively during the thalidomide intake period (Fig. 5, $p = 0.004$). All 30 enrolled volunteers showed a US-CRP level above 0.1 mg/dL during the screening visit; this level was above 1 mg/dL in 88% of the Thalidomide group and 86% of the Control group.

In relation to LPS levels, there was no significant baseline difference between the Thalidomide group (mean: 59.5 ± 28.7 pg/mL) and Control group (mean: 46.6 ± 21.7 pg/mL). However, a non-statically

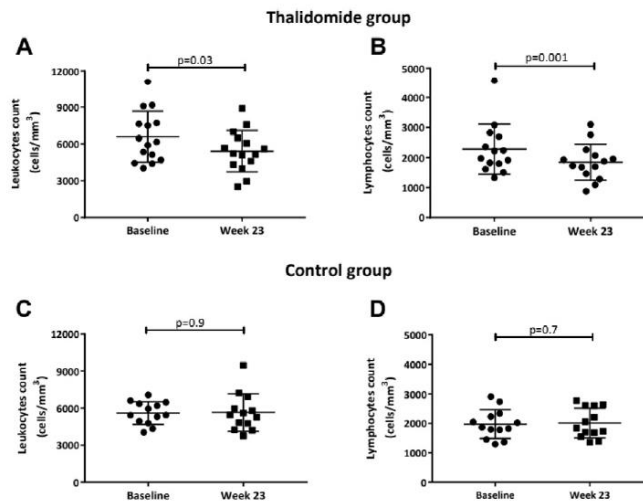


Fig. 3. Leukocytes and lymphocytes count at baseline and at the end of the study. Results are shown for the Thalidomide group (panels A and B respectively), and the control group (panels C and D respectively), and statistical analysis was performed using Pared parametric t-test.

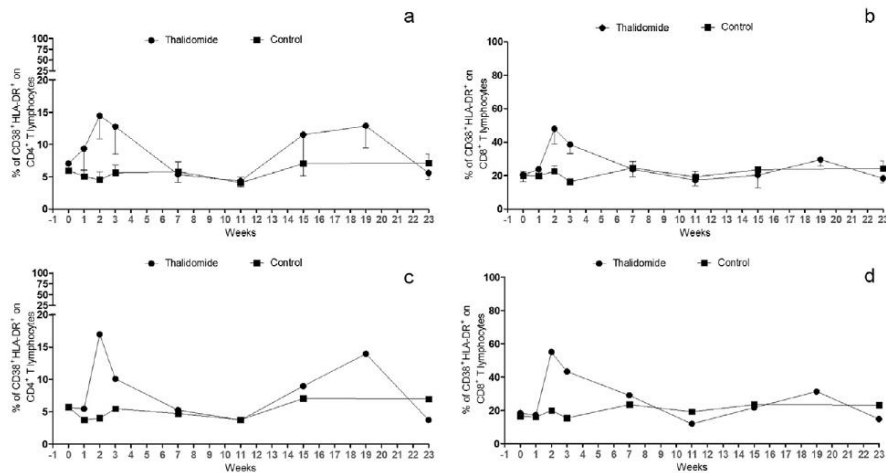


Fig. 4. T cell activation status over time among the Thalidomide and Control groups. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients of all groups were obtained by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. PBMC were thawed and used for immunophenotyping at the pre-established periods over 24 weeks. The percentages of CD38⁺/HLA-DR⁺ CD4⁺ T cells (2A) and CD8⁺ T cells (2B) are expressed as the mean \pm standard deviation (Panel A) and median (Panel B). The Thalidomide group showed an increased cell activation status compared to the Control group ($p < 0.05$). Thalidomide intake began in week 1 and was completed at the end of week 3. Patients were followed up until the end of week 23.

significant increase in the LPS levels was observed in the Thalidomide group during thalidomide intake with a reduction in the levels observed at subsequent visits.

3.2.1. Additional Correlations

There was also a positive correlation between T cell activation and viral load, demonstrated in both the percentage of CD38/HLA-DR⁺ CD8⁺ cells and the CD4⁺ T cell counts in both the Thalidomide and Control groups ($p = 0.001$, Supplemental Fig. 1). Interestingly, the increase in LPS level was accompanied by an increase in the US-CRP level in the Thalidomide group ($p = 0.05$, Supplemental Fig. 2). Interestingly, there was an apparent increase in the TNF levels in some individuals on the Thalidomide arm as compared to the control arm when comparing baseline levels to the levels encountered on the last day of Thalidomide intake (Fig. 6). However, no statistical significance in the mean and median TNF levels between different time points in each group. No statistical difference was detected in the other cytokine levels related to the period of Thalidomide intake (data on file).

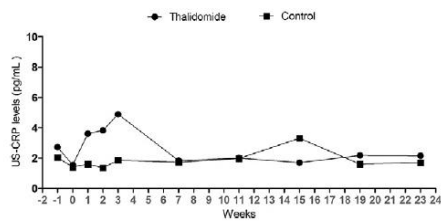


Fig. 5. Inflammatory status over time in the Thalidomide group and Control group inferred by the levels of ultra-sensitive C-reactive protein (US-CRP) were assessed in the patients plasma by colorimetric assay. The levels are expressed as medians.

3.3. HIV Evolution Vis a Vis Co-receptor Tropism

To understand the changes in the CD4⁺ T cell count during thalidomide therapy and the possible link with the HIV-1 subtype or co-receptor used, co-receptor tropism was assessed from plasma RNA. Initially, co-receptor tropism was assessed at screening and week 24. In case of amplification failure and/or detection of non-R5 viruses, intermediate collection time points were also analyzed. Amino acid alignments of the HIV-1 envelope V3 loops along with their inferred viral tropism and subtypes are shown in Supplemental Figs. 3 and 4. The co-receptor tropism of both groups at successive visits is shown in Table 3. No significant differences were observed in either group in terms of viral load and CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts on the basis of the tropism profiles (data on file).

As shown in Table 3, a change/switch in co-receptor tropism was not observed in 7 individuals in the Thalidomide group harboring R5 viruses at the final visit of the study period. However, in the Control group, 3 out of 12 patients switched to using CXCR4 during the study period (Fisher exact test, $p = 0.2$). HIV-1 subtypes and the co-receptor tropism profiles of the individuals were not found to influence the changes in CD4⁺ T cell counts observed in our study. The observed changes in CD4⁺ T cell counts were therefore an effect of thalidomide therapy (Table 3).

3.4. The In Vitro Effect of Thalidomide on HIV-infected Cells

The altered laboratory values detected in the Thalidomide group returned to baseline levels after thalidomide withdrawal. Although safe, the short-term use of thalidomide among ART-naïve individuals led to a counter-intuitive intense transitory increase in T cell activation and inflammation, with a decrease in CD4⁺ T cells without a detectable change in CD8⁺ T cells and viral loads, although it is inherently difficult to detect changes in viral load among naturally viremic individuals. We therefore asked whether these results might be related to the potential purging activity of thalidomide.

Samples from 7 individuals not participating in this study and under ART with viral loads below the detection limits for a mean period of

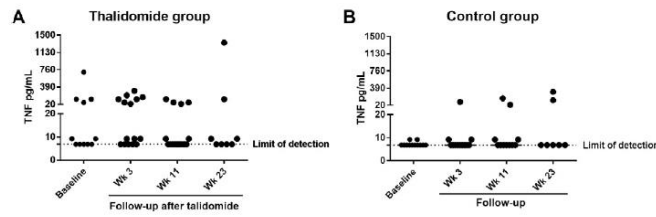


Fig. 6. Levels of TNF in the Thalidomide arm and control arm. Despite the apparent increase in the TNF levels in some individuals on the Thalidomide arm as compared to the control arm when comparing baseline levels to the levels encountered on the last day of Thalidomide intake, no statistical significance in the mean and median TNF levels between different time points in each group was observed.

10.4 years (from 2.1 to 18.2 years) were collected, and CD8⁺ T cells depleted of other PBMCs were used. Thalidomide treatment induced purging in 6 out of 7 samples (Fig. 7). On the second day after treatment with thalidomide, the culture supernatants were tested for viral load using qPCR, and the results revealed HIV-1 emergence at day 4 with a change in viral load from 2.2 log₁₀ to 6.0 log₁₀ (median of 5.7 log₁₀) HIV-1 RNA copies/mL, whereas viruses were not detected in control samples (Table 4). Relating viral emergence with clinical parameters showed that culture positivity was independent of the CD4⁺ T cell nadir, the time of viral load below detection limits, the antiretroviral scheme, viral tropism and the subtype of virus (data on file), reinforcing the role of thalidomide in this phenomenon.

4. Discussion

In this study, we explored the effects of thalidomide among ART-naïve HIV-infected individuals with stable CD4⁺ T cell levels for the short period of three weeks in comparison to an equivalent control group, both to be followed by a period of 23 weeks. As a potent TNF-α inhibitor, our hypothesis was that thalidomide use would be safe and

able to mitigate one of the major changes associated with chronic HIV infection: HIV-related inflammation. We also hypothesized that in the absence of antiretroviral medications, the anti-inflammatory thalidomide effect would become more evident. Thus, we carefully monitored HIV-related inflammatory markers, such as T cell activation, unspecific inflammatory markers, such as US-CRP, and bacterial translocation markers, such as plasmatic LPS levels, in addition to viral loads and CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts.

The basis of our hypothesis in this study was that TNF-α can trigger the cytokine production cascade by inducing cytokine secretion by target cells. TNF-α acts by activating the cellular transcription factor NF-κB, which induces the expression of cytokines and other cellular genes (Breen, 2002). TNF-α can bind to two membrane receptors on target cells, TNF receptor 1 (TNFR1, also known as TNFRSF1A and p55) or TNF receptor 2 (TNFR2, also known as TNFRSF1B and p75), to activate two distinct intracellular signaling pathways for gene transcription (Faustman and Davis, 2010). TNFR1 is present in almost all cells of the body, and its signaling induces the cascade related to apoptosis. TNF binding to TNFR1 activates apoptosis through two pathways involving the adaptor proteins TNFR1-associated death domain (TRADD) and

Table 3
HIV-1 and V3 co-receptor tropism of the Thalidomide group at successive visits inferred through Geno2pheno with an FPR set at 10%. -: HIV-1 env V3 region amplification failed or co-receptor tropism not determined.

	ID	Screening	Baseline	Week 1	Week 2	Week 3	Week 7	Week 11	Week 17	Week 19	Week 23
Thalidomide	TV01	R5	R5	-	-	-	-	-	-	-	-
	TV03	-	X4	-	-	-	-	-	-	-	X4
	TV05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TV07	R5	R5	-	-	-	-	-	-	-	R5
	TV09	-	R5	R5	R5	-	-	R5	R5	R5	R5
	TV11	R5	R5	-	-	-	-	-	-	-	R5
	TV13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TV15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TV21	R5	R5	-	-	-	-	-	-	-	R5
	TV23	R5	R5	-	-	-	-	-	-	-	R5
	TV25	R5	R5	-	-	-	-	-	-	-	R5
	TV27	-	-	-	-	-	-	-	-	X4	X4
	TV29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TV31	R5	R5	-	-	-	-	-	-	R5	-
	TV33	-	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4
	TV37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R5
	Control	TV02	-	-	R5	R5	R5	R5	R5	-	-
TV06		-	-	R5	R5	R5	R5	R5	X4	-	X4
TV08		-	-	X4	X4	X4	X4	X4	R5	X4	X4
TV12		-	R5	-	-	-	-	R5	-	-	-
TV14		-	X4	-	X4	X4	X4	-	-	X4	-
TV16		-	R5	-	-	-	-	R5	-	R5	-
TV18		-	R5	-	-	-	-	-	-	-	R5
TV20		R5	R5	-	-	-	-	-	-	-	R5
TV22		R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	X4	-	X4
TV24		R5	R5	-	-	-	-	-	-	-	R5
TV28		R5	R5	-	-	-	-	-	-	-	R5
TV32		R5	R5	X4	-	-	R5	R5	X4	-	X4
TV34		R5	R5	-	-	-	-	-	-	-	R5
TV36	R5	R5	-	-	-	-	-	-	-	R5	

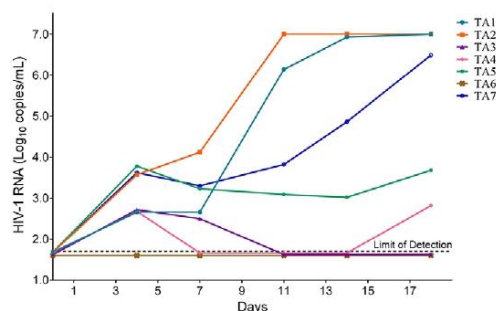


Fig. 7. The *in vitro* effect of Thalidomide on increase in viral load from PBMCs samples from seven patients on undetectable viral load. PBMCs were activated with Thalidomide in the presence of Phytohemagglutinin and IL-2 for 48 h. Viral RNA was quantified by qPCR. Y-axis shows HIV-1 RNA (\log_{10} copies/mL). X-axis shows the days at which supernatants were collected for viral RNA quantification. Symbol TA indicates patient ID.

Fas-associated death domain (FADD). TNFR2 is related to T cell survival, and its signaling involves the mobilization of the transcription factor NF- κ B to promote the transcription of pro-survival genes. NF- κ B contributes to a variety of components of the immune system through its role in the development and differentiation of immune cells and lymphoid organs. NF- κ B's strongest inducers are the cytokines TNF and IL-1, as well as pathogen-derived LPS.

Surprisingly, however, we were able to document that T cell activation markedly increased in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells during thalidomide exposure, returning to basal levels right after thalidomide withdrawal, whereas no specific trends were detected in the control group. The same result was observed in the Thalidomide group with regard to the US-CRP level. Furthermore, the CD4⁺ T cell counts decreased during thalidomide use without any changes in the CD8⁺ T cell counts, leading to a decrease in the CD4/CD8 ratios, although these levels returned to the baseline ranges immediately following thalidomide withdrawal, thus confirming that these changes were exclusively related to drug exposure. Again, no trends were observed in the control group. Interestingly, no changes in the viral loads were observed in both groups, and no changes were observed in the LPS plasma levels. We then speculated that an HIV viral replication process could be triggered by thalidomide, leading to an increase in inflammation and the death of infected CD4⁺ T cells without any apparent disturbance of CD8⁺ T cells and without changing the HIV-associated translocation process. As the studied individuals were naturally viremic, we were not able to detect any increase in the viral load levels because untreated individuals are able to produce and eliminate 10 billion HIV virions every day (Ho et al., 1995). However, previous studies using Thalidomide among HIV infected individuals have demonstrated a trend in the increase of HIV viral load after Thalidomide exposure, when this drug was used for oral aphthous ulcers (Jacobson et al., 1999) and HIV wasting syndrome (Kaplan et al., 2000). In another placebo controlled study, 28 days of thalidomide treatment was associated with the modest overshoot in the rebound of viremia, which vanished after stopping

the drug (Haslett et al., 1999). Interestingly, one of the individuals recruited in the Thalidomide group was an elite controller, and we detected increased expression of T cell activation markers and an increase in the US-CRP level during thalidomide use followed by a blip of viremia to 67 (1.83 \log_{10}) copies/mL. We therefore conducted *in vitro* assays to confirm that thalidomide was able to transactivate HIV, by showing that this drug could act as a latency reversal agent. Surprisingly, our preliminary results were unequivocal, showing a very potent latency-reverting effect of thalidomide in samples from 6 out of 7 tested patients. Thalidomide has been associated with inhibition of NF- κ B activity through a mechanism that involves the suppression of Inhibitor of kappa kinase (IKK) activity (Keifer et al., 2001). Since kappa kinase cannot phosphorylate the inhibitor, NF- κ B stays arrested in the cytoplasm and cell activation is halted at this step, which is the alleged mechanism for the anti-inflammatory properties usually seen with Thalidomide (Keifer et al., 2001). For complete T-cell activation, two signals delivered by antigen presenting cells are required: (i) T cell receptor binding to its cognate antigen and (ii) a co-stimulation signal in which CD28 molecule expressed by T cell binds with CD80/86 molecules expressed by Antigen presenting Cells. Beside suppression of IKK, Thalidomide is also known to co-stimulate T-cells via CD28 receptor (Haslett et al., 1998). This effect of Thalidomide could be associated with T-cell activation and increase in HIV replication, which reconciles with our *in vivo* and *ex-vivo* results. In fact, HIV viral load increase has been previously reported upon thalidomide therapy in trials treating oral aphthous ulcers (Jacobson et al., 1999) and HIV wasting syndrome (Kaplan et al., 2000). In another placebo controlled study, 28 days of thalidomide treatment was also associated with the modest overshoot in the rebound of HIV viremia, which vanished after stopping the drug (Haslett et al., 1999).

In spite of its inflammatory properties, TNF- α production can be a restrictive factor for HIV replication, and it is conceivable that thalidomide use was able to block this process. TNF- α is detected after HIV-1 infection of primary macrophages *in vitro* and is present in plasma and

Table 4

Viral load in the culture supernatants from thalidomide-treated samples. Subjects with viral rebound after drug treatment are highlighted. C = Supernatant collection; VL = Viral load (copies/mL); BDL = Viral load below detection limits.

ID	Day	VL	Day	VL	Day	VL	Day	VL	Day	VL
TA1	0	<50	4	459	7	462	11	1378169	14	8469592
TA2	0	<50	4	3740	7	13,091	11	>10,000,000	14	>10,000,000
TA3	0	<50	4	522	7	318	11	BDL	14	BDL
TA4	0	<50	4	478	7	BDL	11	BDL	14	BDL
TA5	0	<50	4	6009	7	1685	11	1230	14	1047
TA6	0	<50	4	BDL	7	BDL	11	BDL	14	BDL
TA7	0	<50	4	4191	7	1992	11	6610	14	71792

tissues of patients with AIDS (Herbein et al., 1996). *In vitro*, TNF- α is secreted by primary macrophages infected in culture by HIV-1 or treated with envelope glycoprotein gp120 and by HIV-infected monocytes isolated from patients (Merrill et al., 1989). TNF- α is able to enhance host cellular resistance to HIV-1 infection through selective inhibition of HIV-1 entry into primary tissue culture-differentiated macrophages (Herbein et al., 1996). One plausible strategy for the inhibition of HIV entry by TNF- α in macrophages may be through negative modulation of the transcription of CD4 and CCR5, which might explain the inhibition of HIV entry in these permissive cells (Karsten et al., 1996). For this reason, we also monitored the ability of thalidomide to select CXCR4, although no positive results were obtained in the current study. Of note and as mentioned before, we have not been able to find any difference in the cytokine levels between groups or during Thalidomide intake.

Interestingly, we observed in the Control group that T cell activation slightly and linearly increased over time, even with no changes in the basal viral loads. As seen in other studies, there was a positive correlation between the viral loads and CD4 and CD8 T cell activation levels (Hunt et al., 2003).

We recognize that the pilot proof-of-concept open-label nature of this study, specifically related to the small sample size of recruited patients, may preclude conclusions that are more definite. Furthermore, the lack of cytokine profile analysis also prevents us from further understanding the mechanisms related to the inflammatory processes documented here. In addition, a comparison group of HIV-uninfected individuals using thalidomide for the same period of time would enable us to further address the specific effects of thalidomide in association to HIV. Nevertheless, our results clearly demonstrated that thalidomide induces a potent inflammatory profile in the presence of HIV, indicating that this drug may serve as an HIV purging tool in the new era of HIV-sterilizing treatment discoveries.

Trial Registration

Brazilian agencies #17686/09 and #658/10.

Funding

FAPESP, grants #04/15856-9.

Authors' Contributions

TV: cohort follow-up and manuscript preparation; SS: *in vitro* studies for HIV latency reversal; JS-O: cell activation and LPS assays and statistical analysis; LG: cell activation assays; MSA: HIV genome sequencing and analysis and manuscript preparation; MLS-F: laboratory assistance; LACC: patient inclusion and clinical evaluation; MST: patient inclusion and clinical evaluation; AC: patient inclusion and clinical evaluation; MCS: laboratory supervision; AMC: laboratory supervision, statistical analysis, and manuscript preparation; RSD: study design, data interpretation, and manuscript preparation.

Conflict of Interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Appendix A. Supplementary Data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.08.007>.

References

Bilello, J.A., Stellrecht, K., Drusano, G.L., Stein, D.S., 1996. Soluble tumor necrosis factor- α receptor type II (sTNF α RII) correlates with human immunodeficiency virus (HIV) RNA copy number in HIV-infected patients. *J Infect Dis* 173 (2), 464–467.

Breen, E.C., 2002. Pro- and anti-inflammatory cytokines in human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacol. Ther.* 95 (3), 295–304.

Chen, M., Doherty, S.D., Hsu, S., 2010. Innovative uses of thalidomide. *Dermatol. Clin.* 28 (3), 577–586.

Chevalier, M.F., Weiss, L., 2013. The split personality of regulatory T cells in HIV infection. *Blood* 121 (1), 29–37.

d'Ettoire, G., Paiardini, M., Ceccarelli, G., Silvestri, G., Vullo, V., 2011. HIV-associated immune activation: from bench to bedside. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 27 (4), 355–364.

Faustman, D., Davis, M., 2010. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (6), 482–493.

Franks, M.E., Macpherson, G.R., Figg, W.D., 2004. Thalidomide. *Lancet* 363 (9423), 1802–1811.

Haslett, P.A., Corral, L.G., Albert, M., Kaplan, G., 1998. Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. *J. Exp. Med.* 187 (11), 1885–1892.

Haslett, P.A., Klausner, J.D., Makonkawkeyoon, S., et al., 1999. Thalidomide stimulates T cell responses and interleukin 12 production in HIV-infected patients. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 15 (13), 1169–1179.

Herbein, G., Montaner, L.J., Gordon, S., 1996. Tumor necrosis factor α inhibits entry of human immunodeficiency virus type 1 into primary human macrophages: a selective role for the 75-kilodalton receptor. *J. Virol.* 70 (11), 7388–7397.

Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., Markowitz, M., 1995. Rapid turnover of plasma vireons and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373 (6510), 123–126.

Hunt, P.W., Martin, J.N., Sinclair, E., et al., 2003. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 187 (10), 1534–1543.

Hunt, P.W., Deeks, S.G., Bangsberg, D.R., et al., 2006. The independent effect of drug resistance on T cell activation in HIV infection. *AIDS* 20 (5), 691–699.

Imamichi, H., Dewar, R.L., Adelsberger, J.W., et al., 2016. Defective HIV-1 proviruses produce novel protein-coding RNA species in HIV-infected patients on combination antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113 (31), 8783–8788.

Jacobson, J.M., Spritzler, J., Fox, L., et al., 1999. Thalidomide for the treatment of esophageal aphthous ulcers in patients with human immunodeficiency virus infection. National Institute of Allergy and Infectious Disease AIDS Clinical Trials Group. *J Infect Dis* 180 (1), 61–67.

Kaplan, G., Thomas, S., Fierer, D.S., et al., 2000. Thalidomide for the treatment of AIDS-associated wasting. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 16 (14), 1345–1355.

Karsten, V., Gordon, S., Kim, A., Herbein, G., 1996. HIV-1 envelope glycoprotein gp120 down-regulates CD4 expression in primary human macrophages through induction of endogenous tumor necrosis factor- α . *Immunology* 88 (1), 55–60.

Keifer, J.A., Guttridge, D.C., Ashburner, B.P., Baldwin Jr., A.S., 2001. Inhibition of NF- κ B activity by thalidomide through suppression of I κ B kinase activity. *J. Biol. Chem.* 276 (25), 22382–22387.

Klausner, J.D., Makonkawkeyoon, S., Akarasewi, P., et al., 1996. The effect of thalidomide on the pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 and M. tuberculosis infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovir.* 11 (3), 247–257.

Lavigne, S., Santos, C., Anif, M.S., et al., 2014. Short communication: HIV type 1 tropism determination in a novel dried blood spot membrane and the use of a mixture of outer nested polymerase chain reaction primers. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 30 (2), 147–150.

Marchetti, G., Tancari, C., Silvestri, G., 2013. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clin. Microbiol. Rev.* 26 (1), 2–18.

Mariotti, J.B., Clarke, I.A., Dredge, K., Muller, G., Stirling, D., Dalgleish, A.G., 2002. Thalidomide and its analogues have distinct and opposing effects on TNF- α and TNFR2 during co-stimulation of both CD4(+) and CD8(+) T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 130 (1), 75–84.

McMichael, A.J., Borrow, P., Tomaras, G.D., Goonetilleke, N., Haynes, B.F., 2010. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* 10 (1), 11–23.

Merrill, J.E., Koyanagi, Y., Chen, I.S., 1989. Interleukin-1 and tumor necrosis factor α can be induced from mononuclear phagocytes by human immunodeficiency virus type 1 binding to the CD4 receptor. *J. Virol.* 63 (10), 4404–4408.

Moreira, A.L., Sampaio, E.P., Zmuidzinas, A., Frindt, P., Smith, K.A., Kaplan, G., 1993. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor α by enhancing mRNA degradation. *J. Exp. Med.* 177 (6), 1675–1680.

Mu, H., Chai, H., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C., 2007. Current update on HIV-associated vascular disease and endothelial dysfunction. *World J. Surg.* 31 (4), 632–643.

Palmer, S., 2013. Advances in detection and monitoring of plasma viremia in HIV-infected individuals receiving antiretroviral therapy. *Curr. Opin. HIV AIDS* 8 (2), 87–92.

Pomerantz, R.J., Feinberg, M.B., Trono, D., Baltimore, D., 1990. Lipopolysaccharide is a potent monocyte/macrophage-specific stimulator of human immunodeficiency virus type 1 expression. *J. Exp. Med.* 172 (1), 253–261.

Poveda, E., Paredes, R., Moreno, S., et al., 2012. Update on clinical and methodological recommendations for genotypic determination of HIV tropism to guide the usage of CCR5 antagonists. *AIDS Rev.* 14 (3), 208–217.

Reeves, R.K., 2014. Mechanisms, consequences, and treatment of chronic inflammation in HIV disease. *J Antivir Antiretrovir.* 06 (02), xxxvi–xxxvii.

Sampaio, E.P., Kaplan, G., Miranda, A., et al., 1993. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *J Infect Dis* 168 (2), 408–414.

Signorelli, S.S., Mazzarino, M.C., Spandidos, D.A., Malaponte, G., 2007. Proinflammatory circulating molecules in peripheral arterial disease. *Int. J. Mol. Med.* 20 (3), 279–286.

Teo, S., Resztak, K.E., Scheffler, M.A., et al., 2002. Thalidomide in the treatment of leprosy. *Microbes Infect.* 4 (11), 1193–1202.

Wang, C.Y., Guttridge, D.C., Mayo, M.W., Baldwin Jr., A.S., 1999. NF- κ B induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bcl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 19 (9), 5923–5929.

RESEARCH ARTICLE

Lower levels of leptin are associated with severity parameters in visceral leishmaniasis patients

Aline Mireille da Cunha Fievez^{1,2}✉, Maria Luciana Silva-Freitas²✉, Anastácio de Queiroz Sousa¹, Joanna R. Santos-Oliveira^{2,3,4}✉, Alda M. Da-Cruz^{2,4}✉

1 Hospital São José de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil, **2** Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas—Instituto Oswaldo Cruz—FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Núcleo de Ciências Biomédicas Aplicadas, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia—IFRJ, Rio de Janeiro, Brazil, **4** National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM), Rio de Janeiro, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

* alda@ioc.fiocruz.br (AMDC); joanna.oliveira@ifrj.edu.br (JRJO)

OPEN ACCESS

Citation: Fievez AMdC, Silva-Freitas ML, Sousa AdQ, Santos-Oliveira JR, Da-Cruz AM (2019) Lower levels of leptin are associated with severity parameters in visceral leishmaniasis patients. PLoS ONE 14(3): e0214413. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214413>

Editor: Henk D. F. H. Schallig, Academic Medical Centre, NETHERLANDS

Received: November 28, 2018

Accepted: March 12, 2019

Published: March 26, 2019

Copyright: © 2019 Fievez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript.

Funding: This research was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Fellowship to AMDC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Fellowship to MLSF), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Fellowship to AMdCF), and Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (Prociência, intern funds to JRJO). The funders had no role in study

Abstract

Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe clinical form of leishmaniasis, and if untreated may be fatal. It affects important organs of the immune system and is characterized by a specific immunosuppression, along with intense cellular activation and cytokine storm. Moreover, VL is now recognized as a systemic inflammatory response syndrome (SIRS), in which multiple cytokines and other pro-inflammatory molecules are released. The action of these inflammatory mediators may be considered risk factors for poor prognosis and death. Leptin, a hormone derived from adipose tissue, has been described with several immunoregulatory functions *in vitro* and *in vivo* *Leishmania* infection models, particularly for enhancing the macrophage microbicidal mechanisms. Considering that evaluation of immunologic parameters that may be associated with this clinical scenario may help to decrease VL lethality, we evaluated whether leptin is associated with VL pathogenesis. Thirty-one patients were recruited in the active phase of VL, of which 22 were followed up until one month after therapy (1mpt). Except for creatinine levels, all clinical parameters were altered in active VL patients, especially leucocyte counts and albumin and hemoglobin levels. Also, elevated levels of lipopolysaccharide (LPS), immunoglobulins (Ig)G1 and G3 anti-*Leishmania* and interleukins (IL)-6 and -10 were higher than in healthy individuals. In contrast, active VL patients presented diminished serum leptin levels and positive correlation with leucocytes counts and hemoglobin and albumin levels. After 1mpt, VL patients showed a significant increase in leptin levels, reaching values similar to healthy volunteers. As expected, only LPS levels remained elevated after 1mpt. These findings suggest that leptin levels are affected in *Leishmania* infection and the correlation with important parameters associated with the prognosis of VL points to the involvement of this molecule in VL immunopathogenesis. Additional studies are needed to evaluate the possibility of leptin as a prognostic marker of VL.

design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: VL, visceral leishmaniasis; 1mptto, one-month post treatment.

1. Introduction

Visceral leishmaniasis (VL), also known as kala-azar, is the most severe clinical form of leishmaniasis due to frequent complications and if untreated, increases the risk of death. It is present in geographic areas with conditions of poverty, which contribute to the continuity of social inequality. Actually, VL is endemic in 98 countries and around 200,000–400,000 new cases are diagnosed every year. In the Americas, the majority of the cases are concentrated in Brazil, which reported 4,103 cases in 2017 with a lethality rate reaching around 8.8% in the last 10 years [1]. Among these cases, the Northeast region remains the first Brazilian region in number of notifications, whose Ceará state records the second highest number of cases.

Some factors inherent to the parasite (strain, virulence) and host factors (genetic, nutritional status, age and immune response) will dictate the clinical outcome of the disease, which can be presented as asymptomatic, classic, or severe. Typically, classical VL is characterized by anemia, fever, and hepatosplenomegaly along with nutritional deficiency and weight loss. However, for reasons not yet fully understood but that should include the parasite and the effector immune responses, some patients may progress to the more severe forms of the disease, which can be fatal in some cases. In this context, the decrease of VL lethality rate should take into account the physician's knowledge about signs of disease severity but also the evaluation of immunological parameters that may be associated with this clinical scenario.

VL affects important organs of the immune system, which in turn may compromise the effector immune responses and therefore, leading to a specific immunosuppression in response to the parasite [2]. On the other hand, despite the impairment of the specific response, an intense degree of cellular activation is observed. Active VL is now understood as a severe systemic inflammatory syndrome [3], in which elevated levels of interleukin (IL)-10 and inflammatory cytokines (IL-6, -8, -17, interferon [IFN]- γ , macrophage migration inhibitory factor [MIF], tumor necrosis factor [TNF]) [4–8], microbial products as lipopolysaccharide (LPS) [7], and soluble factors such as soluble CD14 [9], prostaglandin F 2α , leukotriene B 4 , resolvin D1 [10], neopterin [11], and sCD163 [12] are associated with worsening of patients' clinical status. Thereby, the clinical and systemic actions of these inflammatory mediators may be considered risk factors related to poor prognosis and death.

After treatment, the spleen or liver size presents a steady decrease but returns to normal values at only 120 days [4]. In this context, VL patients present a gradual reduction of inflammatory mediator levels (IL-6, IL-8 and IL-10) starting at 30 days after infection [10]. However, a delay in the effector immune response is observed since several soluble factors have not yet returned to normal even after six months of specific treatment [7]. Also, a decrease of IgG1 and IgG3-specific levels in response to *Leishmania* after six months of therapy may be a useful biomarker for monitoring the post-therapeutic cure in human VL [13,14]. More studies on laboratory parameters in order to predict successful therapeutic responses are needed and could help to elucidate the steps of the immune response's refreshment toward homeostatic status.

Leptin, a protein described in 1934 in studies on obese and diabetic mice, presents a multifactorial role in the immune system [15]. It is produced and secreted mostly by adipocytes, so that a positive correlation between body mass index (BMI) and circulating levels of leptin is observed in humans. Leptin may act as a hormone to regulate the phagocytic function and secretion of inflammatory cytokines in addition to increasing reactive oxygen species (ROS) production, granulocytes chemotaxis, and enhancement of Th1-associated immune responses. Earlier studies have already described that leptin or leptin receptor deficiency can contribute to an increase in susceptibility to bacterial infections and pneumonia [16]. *In vitro* studies have shown that in the presence of recombinant human leptin, *L. donovani*-infected macrophages presented an enhancement in phagocytic activity and IL-1 α , -1 β , -8 and TNF production [17].

Due to the crucial role of macrophages in the clearance of amastigotes, we hypothesized that weight loss in VL, either due to previous malnutrition or even during the course of the disease could lead to reduction of the leptin levels, which in turn could impair microbicidal functions.

In this context, the purpose of this study was to evaluate whether leptin is associated with VL pathogenesis. We demonstrated that the leptin levels were reduced during the active phase of infection and correlated with laboratory markers of severity but returned to normal levels after therapy.

2. Materials and methods

2.1 Study design and participants and ethical aspects

Thirty-one individuals with VL were evaluated from May 2015 to August 2016. They were recruited from the São José Hospital of Infectious Diseases at Fortaleza, Ceara, Brazil. VL diagnosis was based on the presence of specific antibodies to the recombinant k39 antigen using a commercial anti-k39 rapid test (Bio-Rad, Rio de Janeiro, Brazil) as recommended by the Ministry of Health of Brazil. At the time of admission to the study, all patients presented characteristics that are considered risk factors for severe VL according to the Brazilian Ministry of Health, which justified their hospitalization for treatment [18]. Several parameters for inclusion were monitored: (1) leukocyte counts <1000 cells/mm³; (2) platelet counts $<50,000$ /mm³; (3) hemoglobin levels <7.0 g/dL; (4) albumin levels <2.5 g/dL; and (5) fever for >60 days [18]. Peripheral blood was then collected from all patients for the hematological and laboratory analyses and was characterized as the active phase of VL based on the above-described parameters. Twenty-two patients underwent clinical follow-ups one month after the end of the anti-*Leishmania* treatment (1 mpt). During this visit, it was possible to obtain biological samples of peripheral blood to perform clinical and laboratory assessments. Exclusion criteria included several parameters: (1) individuals who had relapses of VL; (2) pregnant women; (3) individuals with autoimmune diseases; and (4) immunosuppression due to diseases or use of immunosuppressive drugs.

A group of ten individuals from the same endemic area and without history of VL were included as controls for the laboratory analyses, which included LPS levels, specific anti-*Leishmania* antibodies, leptin, and inflammatory cytokines. They came from the Center of Hemotherapy and Hematology of the Ceara State (HEMOCE).

This study was approved by Research Ethics Committee of the São José Hospital of Infectious Diseases and the Oswaldo Cruz Foundation under protocol number 922.417. Individuals who met the inclusion criteria were invited to participate in the study and signed the informed consent term.

2.2 Assessment of lipopolysaccharide (LPS)

LPS levels were quantified using a commercial assay kit (Limulus Amebocyte Lysate [LAL] QCL-1000; Cambrex, Milan, Italy). Each series of determinations included a blank and four endotoxin standards run in duplicate. The samples were diluted in endotoxin-free water (1:2), and 50 μ l of sample or standard were dispensed into the appropriate microplate. Then, the LAL followed by the substrate solution were added to produce a colorimetric reaction. The absorbance was determined at 405–410 nm via spectrophotometry. The results are expressed as picograms per milliliter (pg/mL), and the sensitivity level was 10 pg/mL.

2.3 Anti-*Leishmania* immunoglobulin detection

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed as described in detail previously by Fagundes-Silva et al (2012) [19], but some modifications were necessary. Briefly, *L.*

(*L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) promastigote soluble antigens (40 µg/mL) were used to coat the wells of a polystyrene flat-bottom microtiter plate (Nunc-Immuno, Roskilde, Denmark). Besides this, diluted peroxidase-conjugated mouse monoclonal anti-human antibodies, such as IgG (1:1000) (Invitrogen, San Francisco, CA, USA), IgG1 (1:200) and IgG3 (1:400) (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) were used. The absorbance was measured at 492 nm using a microplate reader (Benchmark, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The results were expressed as ELISA index (EI).

2.4 Quantification of serum Leptin and IL-6 levels

Leptin and IL-6 levels were determined using an ELISA with commercial kits (Human Leptin and IL-6 Quantikine ELISA, respectively, R&D Systems, Minneapolis, MD, USA). The assay diluent was added to all wells of the 96-well microplate provided by kit, and then 100 µL of samples were added per well. Also, a standard curve of seven-points diluted in calibration diluent, and a blank was performed in duplicate. The human leptin or IL-6 conjugate was added to each well and incubated for 1 h. The colorimetric reaction occurred after the substrate solution (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) was added to the microplate. The optical density was determined at a wavelength of 450 nm by spectrophotometry, and the results were expressed as picograms per milliliter (pg/mL).

2.5 Assessment of IL-10 in the serum

The levels of IL-10 was determined using an ELISA using the commercial kit DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MD, USA). The human detection antibody (anti-IL-10) was diluted in accordance to the protocol, and incubated for 2 h. The colorimetric reaction occurred after streptavidin-HRP followed by the substrate solution (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) were added to the microplate. The reading was performed in a spectrometer at a wavelength of 450 nm, and the results were expressed as picograms per milliliter (pg/mL).

2.6 Statistical analyses

Continuous variables were expressed as median and interquartile range (IQR). Statistical analyses were performed by a non-parametric analysis using the Mann-Whitney test when two groups were compared. Analysis of variance (ANOVA) Kruskal-Wallis test followed by Dunns' test was used when three groups were compared concurrently. The Spearman's test was used for correlation analysis. The statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 6.0, San Diego, CA, USA). Differences were considered statistically significant when the p value was <0.05.

3. Results

3.1 Clinical characteristics and severity parameters in the active phase of VL

Thirty-one VL patients were studied in the active phase, and 22 were prospectively followed up until one month after anti-*Leishmania* therapy. The clinical parameters of VL patients are shown in Table 1. The majority of them were male (93.5%), the median age was 42 years old (IQR: 33–52), and the median weight was 68 kg (IQR: 57.8–77.8 kg). The patients did not evolve to severe VL and none of them presented clinical signs of bacterial infection. Except for creatinine levels, the laboratory parameters were outside the reference values but the prospectively evaluated patients showed values within normal ranges after one-month post-treatment.

Table 1. Clinical characteristics of the visceral leishmaniasis patients in the active phase of disease.

Patient ID	Age	Sex	Weight (Kg)	Leukocytes (cells/ μ L)	Neutrophils (cells/ μ L)	Lymphocytes (cells/ μ L)	Hemoglobin (g/dL)	Platelets (μ L)	Creatinine (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Albumin (g/dL)
P01	54	M	74	4760	2903	1142	7.4	81000	1.8	22	13	3.8
P09	56	M	70	2640	1135	1214	9	140000	0.9	81	105	3.6
P10	54	M	60	3910	1173	2189	11.3	77000	0.7	77	33	3.6
P11	39	M	—	6560	3083	3017	11.2	87000	1	154	181	4.8
P13*	24	M	—	2380	1237	833	8.1	78000	0.8	261	135	2.4
P17	31	M	68	2000	600	1180	6.9	67000	0.8	78	65	2.7
P18	41	F	69.8	2010	1105	763	8.8	66000	0.5	75	28	3.0
P22	32	M	64	1350	567	594	7	61000	1	116	33	2.6
P23	44	M	45	960	201	672	6.2	29000	0.6	123	50	1.2
P30	34	M	79	1970	847	906	7.8	117000	1.1	33	12	3.6
P37	46	M	82	1160	777	290	5.8	54000	0.8	93	53	3.4
P38*	33	M	67.6	2180	1242	697	9.4	113000	0.9	848	1088	3.3
P45	56	M	68	1480	790	399	9	74000	0.7	—	12	3.9
P46*	47	M	56	1380	540	560	7.9	173000	0.6	—	22	3.3
P48	44	M	56	2620	1362	786	9.2	154000	0.8	54	94	3.6
P49	43	M	130	3090	1792	1041	12.7	55000	0.8	85	113	3.5
P52	42	M	65	4630	1805	2129	7.8	466000	0.8	—	54	—
P56*	43	M	48	1980	1360	409	7.8	76000	1.2	—	40	—
P58	22	M	89	1490	600	745	8.5	102000	3.3	57	39	3.4
P61	52	M	88	2110	1329	611	9.8	61000	0.9	87	64	3.9
P64	24	M	—	3280	1541	1410	10.8	65000	1.1	29	23	4.3
P68	33	M	—	3720	1748	1674	11.2	218000	1.0	133	69	3.2
P69	57	M	68	2370	1990	284	7.5	23000	1.0	36	46	3.6
P76	57	M	—	4220	2489	928	7.4	86000	1.7	102	62	2.2
P77*	35	M	—	3500	910	2485	9.8	153000	1.2	250	418	3.6
P82	47	M	72	1150	575	425	6.7	60000	1.4	13	13	3.3
P88*	19	F	—	2630	1393	1180	8.7	13000	1.5	—	108	2.5
P89*	39	M	68	2110	527	1498	6.7	141000	0.9	—	19	3.0
P93*	40	M	57	3730	2461	783	12.0	134000	0.9	23	14	3.2
P102*	55	M	54.4	1170	713	351	7.2	54000	3.0	42	33	2.7
P103	32	M	83	2730	1965	546	10.4	118000	0.9	260	49	4.0
Median (IQR)	42 (33–52)	NA	68 (57.8–77.8)	2370 (1490–3500)	1237 (713–1792)	786 (560–1214)	8.5 (7.4–9.8)	78,000 (61,000–134,000)	0.9 (0.8–1.2)	81 (39–128)	49 (23–94)	3.40 (2.85–3.60)
Reference values	NA	NA	NA	3900–10700	1600–7500	800–4500	F: 12–16 M: 14–17	150,000–350,000	0.7–1.3	0–35	0–35	3.5–5.5

* refers to the patients who did not complete the clinical follow up until 1 month post treatment.
NA: not applicable; F: female; M: male; IQR: interquartile range.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214413.t001>

It is important to stress that total regression may take a few months, but some parameters improved after the second week.

3.2 High levels of lipopolysaccharide (LPS) were observed in the active and post-treatment phases in VL patients

Considering that LPS may be implicated in VL pathogenesis as an important co-factor for increasing cellular level activation, we assessed the LPS levels in the active phase (Fig 1A) and

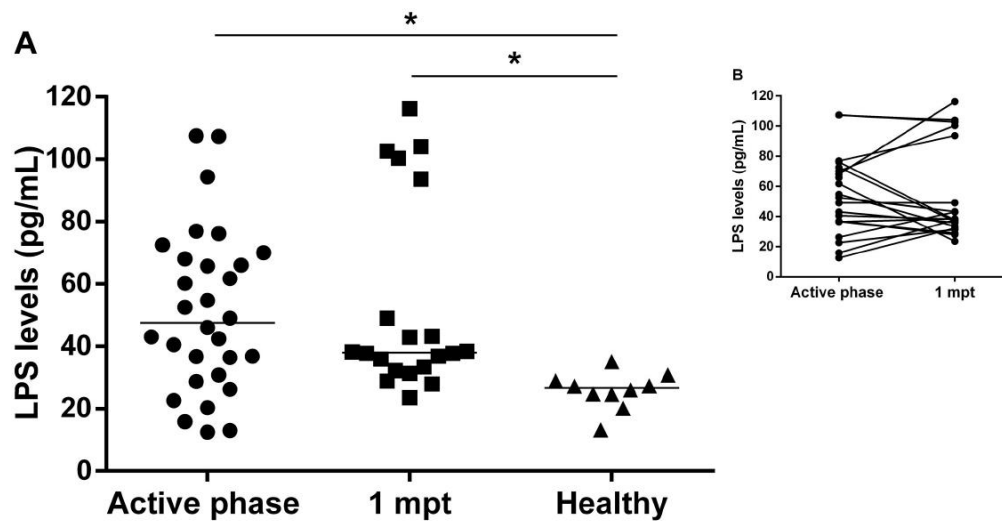


Fig 1. Plasma LPS levels in visceral leishmaniasis (VL) patients during clinical follow up. (A) LPS levels were analyzed in the active phase and one-month post-treatment (1 mpt) in VL patients and in healthy volunteers. (B) The insert shows the LPS levels from the same patients prospectively evaluated in two different time points ($n = 22$). Each symbol represents one patient. The horizontal bar represents the median values. Asterisks denote a statistically significant difference between groups, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214413.g001>

for those who were followed-up until the end of treatment (one month post treatment, 1mpt) (Fig 1B).

Active VL patients presented significantly elevated LPS levels (median: 47.6 pg/mL, IQR: 30.4–68.6 pg/mL) when compared to healthy volunteers (median: 26.6 pg/mL, IQR: 23.5–35.2 pg/mL) (Fig 1A). Despite the reduction of LPS 1mpt (median: 38 pg/mL, IQR: 32.5–82.5 pg/mL), the differences were not statistically significant in comparison to the active phase of VL, but they were still higher than levels in healthy controls ($p < 0.05$). Remarkably, twelve out of 20 VL patients prospectively followed-up maintained or even presented augmented the LPS levels 1mpt, suggesting that co-factors related with cellular activation status can still be biologically active (Fig 1B).

3.3 Reduction of anti-*Leishmania* IgG1 and IgG3 and also IL-6 and -10 cytokines post-treatment reinforces their role as laboratory biomarkers in clinical management of VL

As expected, anti-*Leishmania* IgG1 (median: 11.0; IQR: 10.0–17.9) and IgG3 (median: 6.7; IQR: 4.4–9.5) were positive in the active phase of the disease (Fig 2A–2D). The levels of both IgG1 (median: 8.9; IQR: 5.9–17.5) and IgG3 (median: 1.7; IQR: 0.8–3.2) had a reduction 1mpt in comparison to the active phase of VL (Fig 2A–2D). Interestingly, IgG3 had a most expressive significant decrease 1mpt ($p < 0.0001$), and the levels were similar to the healthy controls (median: 0.9, IQR: 0.5–1.5) in the majority of VL patients (Fig 2C).

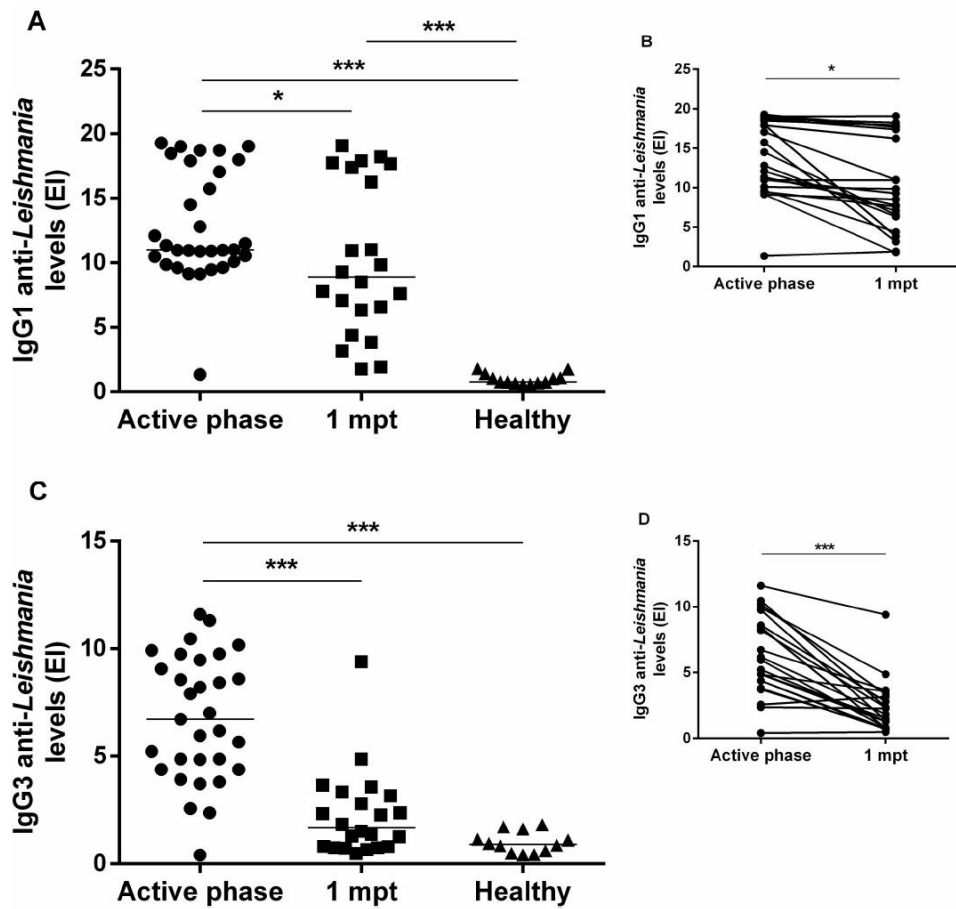


Fig 2. Titers of the anti-*Leishmania (L.) infantum* immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 in visceral leishmaniasis (VL) patients during clinical follow up. (A and C) IgG1 and IgG3 levels of VL patients in the active phase, after one-month post-treatment (1 mpt) and in healthy volunteers. (B and D) The insert shows the IgG1 and IgG3 levels from the same patients prospectively evaluated in two different time points (n = 22). Each symbol represents one patient. The horizontal bar represents the median values. Asterisks denote a statistically significant difference between groups, *p<0.05; ***p<0.0001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214413.g002>

Consistent with VL immunopathogenesis, active VL patients presented higher levels of IL-6 (IL-6 median: 33.8 pg/mL, IQR: 11.9–112.3 pg/mL) and IL-10 (median: 5.11 pg/mL, IQR: 0.1–148 pg/mL) when compared to the post-treatment levels (IL-6 median: 0.12 pg/mL, IQR: 0.11–6.2 pg/mL, IL-10 median: 0.10 pg/mL, IQR: 0.10–0.12 pg/mL) (Fig 3A–3D).

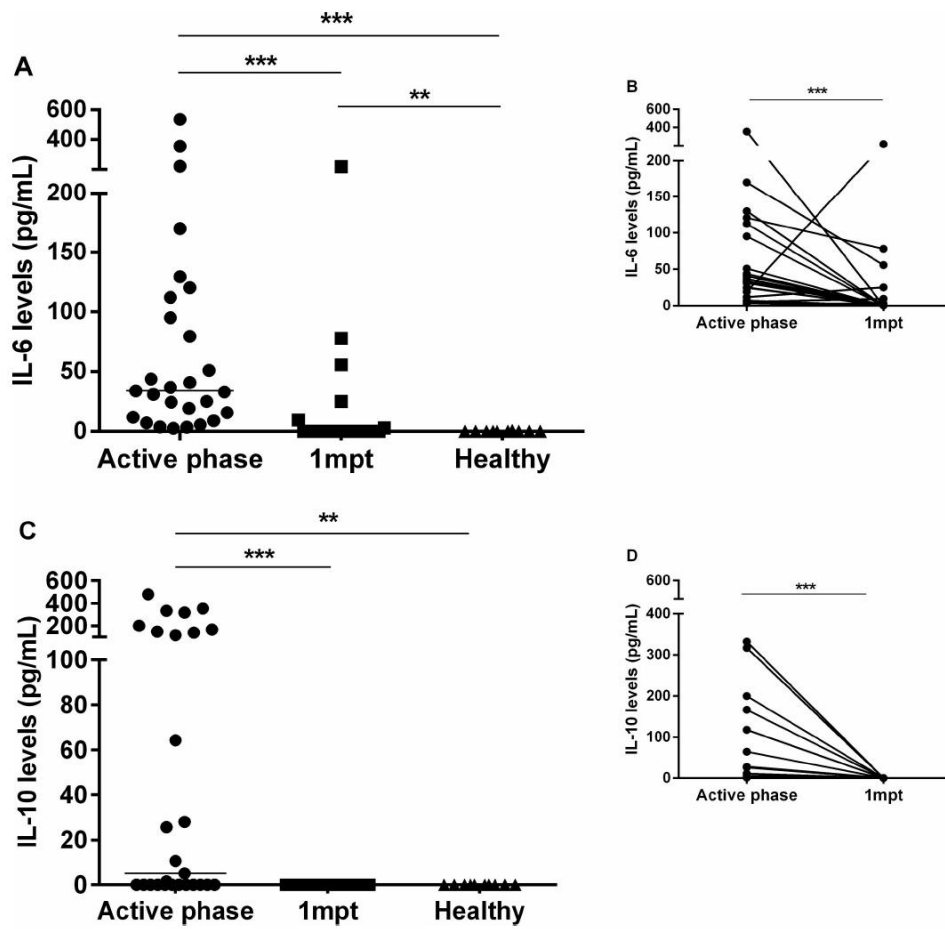


Fig 3. Plasma IL-6 and IL-10 levels in visceral leishmaniasis (VL) patients during clinical follow up. (A) IL-6 and (C) IL-10 levels were analyzed in the active phase and one-month post-treatment (1 mpt) in VL patients and in healthy volunteers. (B and D) The insert shows the IL-6 and IL-10 levels from the same patients prospectively evaluated in two different time points (n = 22). Each symbol represents one patient. The horizontal bar represents the median values. Asterisks denote a statistically significant difference between groups, *p<0.05; **p<0.01.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214413.g003>

3.4 Plasma leptin levels are increased in VL patients after anti-*Leishmania* treatment

Considering that leptin is a pleiotropic protein related to metabolism and immune function, we investigated whether the plasma leptin levels are affected in VL. During the active phase of VL, patients (median: 1,047 pg/mL; IQR: 541–1,455 pg/mL) showed lower levels of plasma

leptin compared to healthy controls (median: 1,455 pg/mL; IQR: 948–1,585 pg/mL) (Fig 4A). On the other hand, a significant augment of these levels after one-month post-treatment was observed (median: 1,455 pg/mL; IQR: 1,302–1,555 pg/mL) (Fig 4A and 4B), reaching similar levels to those presented by healthy controls. It was interesting to note that as observed with LPS, IgG, and cytokines, leptin levels were also dispersed in the active phase of VL patients. We then decided to investigate the possible association of these biomarkers with VL severity-associated laboratory parameters.

In this context, only leptin levels were positively correlated with lower leukocytes, hemoglobin, and albumin levels ($r = 0.48$, $r = 0.55$, and $r = 0.48$, respectively) (Fig 5A–5C), indicating that reduction of leptin is also related to VL severity. On the other hand, negative correlations were verified between albumin and IL-10 levels ($r = -0.89$) (Fig 5D) and between neutrophils and IL-6 levels ($r = -0.42$) (Fig 5E).

4. Discussion

Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) is the immunopathogenic substrate of several diseases such as sepsis [20], severe malaria [21], dengue [22], more recently, ebola [23] and severe influenza [24], and also visceral leishmaniasis [3] in which there are strong correlations between the abrupt release of multiple cytokines by the immune system (cytokine storm) and laboratory and clinical parameters

In order to understand the dynamics of immunological restoration, we monitored the kinetics of soluble immune mediators before and after specific therapy. As expected, elevated levels of LPS and IgG1 and G3 anti-*Leishmania* were observed in comparison to healthy

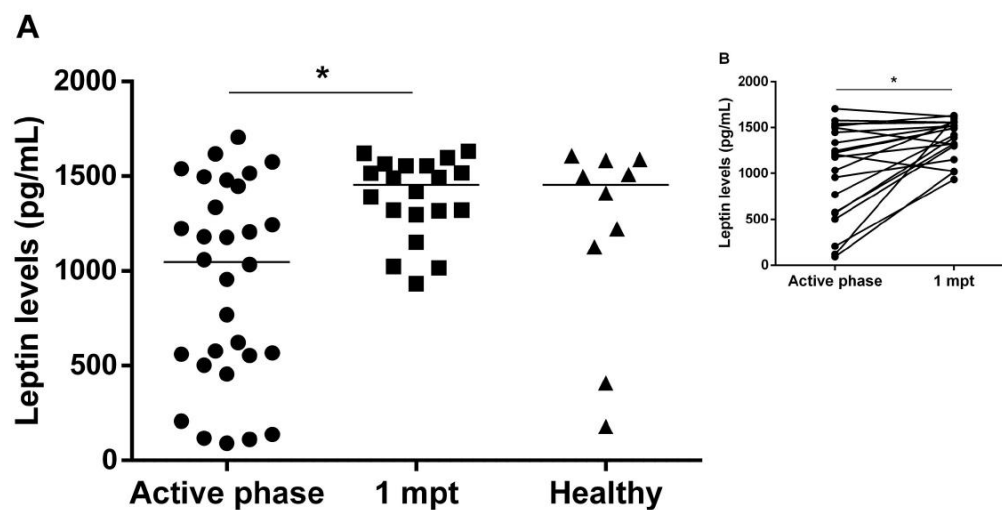


Fig 4. Levels of plasma leptin in patients with visceral leishmaniasis during clinical follow up (VL). (A) Leptin levels of VL patients in the active phase ($n = 31$), after one-month post-treatment (1 mpt, $n = 22$) and in healthy volunteers. (B) The insert shows the same patients prospectively evaluated in two different time points ($n = 22$). Each symbol represents one patient. The horizontal bar represents the median values. Asterisks denote a statistically significant difference between groups, $*p < 0.05$; $**p < 0.01$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214413.g004>

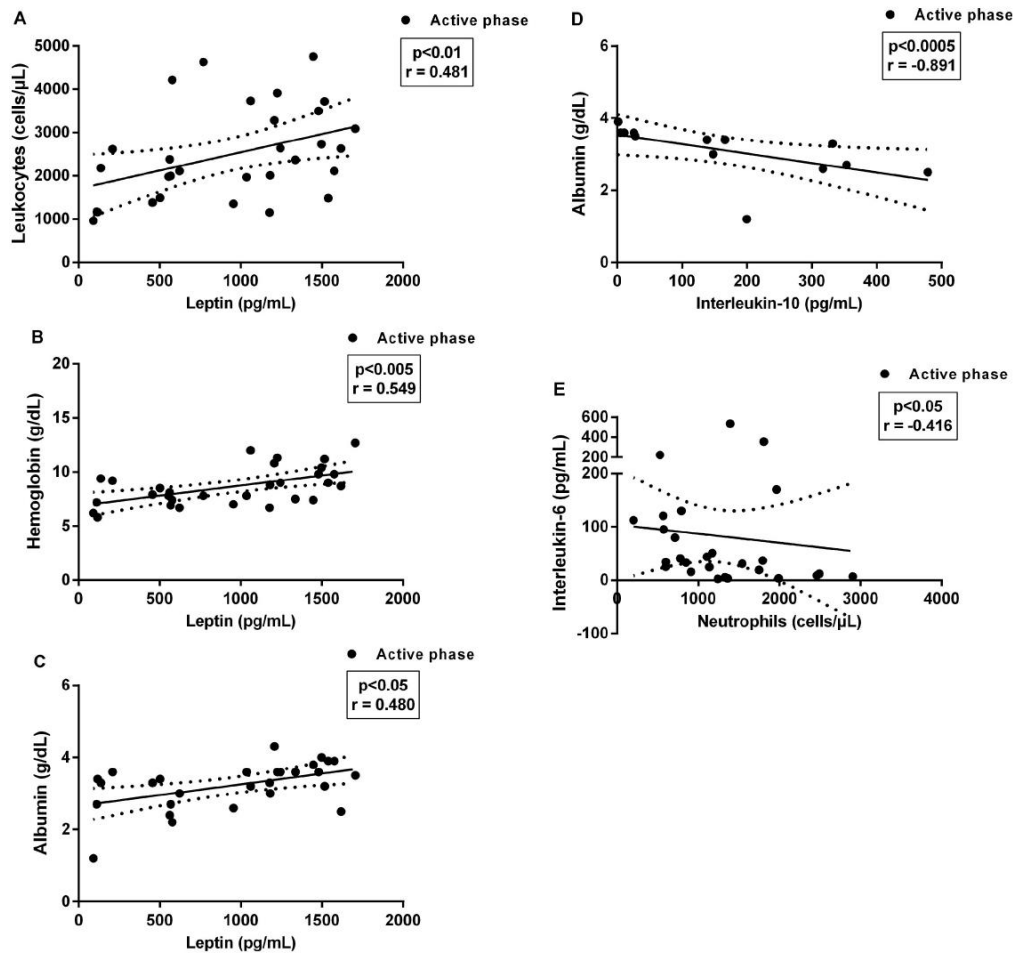


Fig 5. Correlations between laboratorial biomarkers of severity and leptin and cytokine levels in visceral leishmaniasis (VL) patients during active phase. Positive correlations between the leptin levels and (A) leukocytes, (B) hemoglobin and (C) albumin levels of the VL patients in the active phase of disease. Negative correlations between IL-10 and IL-6 levels and albumin and neutrophils levels (D and E, respectively). Each symbol represents one patient in the active phase of VL. Spearman correlation. $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.005$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214413.g005>

individuals in addition to plasmatic cytokines known to be increased in this phase of disease [8–10], particularly IL-6 and -10. Such an increase in IL-levels are consistent with the activation degree observed in VL patients in the active phase [7, 25].

We have shown for the first time that LPS could have a role in the pathogenesis of VL patients, since it was correlated with T-cell activation, macrophage activation, and pro-inflammatory cytokine such as IL-6 and -8 and MIF [7]. Since we only evaluated a few patients before and at different times post-therapy, we decided now to investigate a larger cohort at one month after therapy. In accordance with previous data, LPS levels were significantly higher in the active phase of disease in comparison to healthy individuals and slightly decreased after one-month post-treatment. However, even the patients evaluated six months after therapy did not present normal LPS levels [7]. Thus, it seems that despite a successful response to the specific therapy, the heightened cellular activation status takes time to return to immune homeostatic status.

The origin of LPS is still unclear, but there is evidence that it comes from Gram negative bacteria in the intestinal lumen. In accordance with this idea, diarrhea is one of the most frequent symptoms of VL patients, and the presence of *Leishmania* has been demonstrated in intestinal tissue [26,27] since the time of the first cases of the disease. It is important not to confound this supposed Gram-negative bacteremia with the infection caused by Gram-positive bacteria, which is a clinical condition frequently described in VL patients [3]. Thus, our results support that the higher plasmatic LPS levels in VL patients is not associated with bacterial co-infection but rather with the possibility of microbial translocation from lumen into the blood circulation, which in turn may contribute to worsening of VL patients' immunological status. Recently, in corroboration with our results, sCD14 levels, a soluble receptor of LPS, also correlated with inflammatory cytokine levels [9]. Altogether, these results reinforce that both LPS and parasitic antigens may trigger these inflammatory mechanisms [7].

IL-6 is elevated in active VL and is also associated with severity parameters (edema, vomiting, and bleeding) and lethality [8, 10]. The current results highlight once more the importance of IL-6 as a key cytokine in the VL pathogenesis. Even though IL-6 was elevated in active VL, the levels were not associated with laboratory parameters of severity and even declined after therapy. It is in agreement with the clinical status of our patients once they did not fulfill criteria for poor prognosis and evolved with a good clinical outcome. However, it was observed a negative correlation between IL-6 levels and neutrophil count, which can reinforce that neutropenia, thrombocytopenia and anemia are not only a consequence of depletion of bone marrow cellularity by *Leishmania* infiltration but also, a consequence of systemic inflammation [8]. Further studies with experimental models should inform us as to whether immunobiological molecular targeting for neutralizing IL-6 effects, along with anti-*Leishmania* therapy, could contribute to diminishing immune activation [28]. Finally, albumin was negatively correlated to IL-10 levels. Although there is no direct relation between them, both are parameters known to be associated with severity of VL, since high levels of IL-10 in the active phase of the disease may contribute to parasite proliferation and a successful infection. At the same time, low levels of albumin in active VL, along with plasma leakage may contribute to edema, another important parameter of severity.

More recently, leptin that is produced and secreted by several tissues, especially adipose tissue, was increased and was able to predict poor outcomes in sepsis patients [29]. Meanwhile, with respect to *L. donovani* infection, *in vitro* studies with recombinant leptin caused an increase in microbicidal activity of infected macrophages of both THP-1 lineage or human cells via enhancement of intracellular ROS generation [17]. On the other hand, its deficiency may worsen VL pathogenesis for contributing to Th2 polarization and impaired phagocytic activity. In addition, leptin restored the cellular immunity of mice infected with *L. donovani* contributing to the decrease in the parasitic burden through inhibition of arginase activity and regulation of expressions of molecules related to cellular exhaustion (such as CTLA-4/CD152 and programmed cell death protein (PD)-1 [30, 31].

To our knowledge, the current study is the first report concerning assessment of leptin levels in human VL from a prospective view. Our results indicate that leptin is altered in human VL once patients present diminished plasma leptin levels during the active phase of disease. It is important to note that leptin levels were not affected in around 50% of patients. Moreover, those presenting lower leptin levels in the active VL phase increased the leptin levels post anti-*Leishmania* therapy and reached similar values to those observed in healthy individuals. Although the patients included in this study were clinically negative for bacterial infection, assessment of leptin levels in serum alone could not be enough to establish their involvement in the disease. However, in the present study, it is clear that leptin levels are affected in VL patients during active phase of disease and these levels were positively correlated with leukocytes counts and hemoglobin and albumin levels, which are important parameters associated with VL prognosis. Altogether, our data suggest that in fact such a molecule may be related to several immune functions. Future studies are needed to clarify whether such alteration is directly caused by *L. infantum* infection or some consequence of LV.

One can consider that the leptin decrease is a consequence of weight loss since it is produced in amount proportional to body fat. However, in this study, we could not address this point since it was difficult for a patient to inform us of the number of pounds he/she lost since the onset of the disease. Despite identification of leptin as a hallmark biomarker in malnutrition, a previous study also verified a drastic fall in the serum leptin levels in *L. donovani* infected mice fed with a normal diet [17], confirming that the circulating leptin levels might be downregulated during *Leishmania* infection. It remains to be evaluated whether the malnutrition prior to or even the weight loss during the course of active VL potentiates the decrease of serum levels of leptin.

There was no correlation between leptin and immunological parameters, probably due to the fact that the patients did not progress to severe VL. In addition, in the current study all of the enrolled patients were adults <50 years old, which was different from what has been described in the literature with children or individuals >50 years old [8, 9, 32].

In conclusion, as far as we know, this work is the first to show that leptin production is affected in patients with VL. As suggested by experimental studies, the decrease in leptin levels can impair macrophage function and consequently increase the parasitic burden. The association between lower leptin levels and lower leukocyte counts raises the hypothesis of this molecule's involvement in VL immunopathogenesis. Keeping in mind that administration of recombinant leptin favored the decrease of *Leishmania* infection in infected mice [30], we can argue that recovery of leptin levels after therapy can be related to a restored effector immune response. Taken together, our results suggest that leptin may be potentially used as a prognostic marker of VL and indicates that further studies are needed to assess the real role of leptin in the immune responses in VL.

Acknowledgments

We would like to thank the participation of all the patients and healthy individuals enrolled in this study. Also, we would like to acknowledge the agreement between the UFC and the IOC/FIOCRUZ in the interinstitutional doctorate (DINTER).

Author Contributions

Conceptualization: Aline Mireille da Cunha Fievez, Anastácio de Queiroz Sousa, Alda M. Da-Cruz.

Data curation: Aline Mireille da Cunha Fievez, Maria Luciana Silva-Freitas.

Formal analysis: Aline Mireille da Cunha Fievez, Maria Luciana Silva-Freitas, Anastácio de Queiroz Sousa, Joanna R. Santos-Oliveira, Alda M. Da-Cruz.

Funding acquisition: Anastácio de Queiroz Sousa, Alda M. Da-Cruz.

Investigation: Aline Mireille da Cunha Fievez, Maria Luciana Silva-Freitas, Anastácio de Queiroz Sousa, Joanna R. Santos-Oliveira, Alda M. Da-Cruz.

Methodology: Aline Mireille da Cunha Fievez, Maria Luciana Silva-Freitas, Anastácio de Queiroz Sousa, Joanna R. Santos-Oliveira, Alda M. Da-Cruz.

Project administration: Anastácio de Queiroz Sousa, Alda M. Da-Cruz.

Resources: Anastácio de Queiroz Sousa, Alda M. Da-Cruz.

Supervision: Anastácio de Queiroz Sousa, Joanna R. Santos-Oliveira, Alda M. Da-Cruz.

Visualization: Aline Mireille da Cunha Fievez, Maria Luciana Silva-Freitas, Anastácio de Queiroz Sousa, Joanna R. Santos-Oliveira, Alda M. Da-Cruz.

Writing – original draft: Aline Mireille da Cunha Fievez, Maria Luciana Silva-Freitas, Anastácio de Queiroz Sousa, Joanna R. Santos-Oliveira, Alda M. Da-Cruz.

Writing – review & editing: Anastácio de Queiroz Sousa, Joanna R. Santos-Oliveira, Alda M. Da-Cruz.

References

1. Brazil, Ministry of Health—SVS. Visceral leishmaniasis: Epidemiological situation—Data. 2018. Available from: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral/11334-situacao-epidemiologica-dados>
2. Goto H, Prianti MDG. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2009; 51(5):241–6. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652009000500002> PMID: 19893975
3. Costa CHN, Wemeck GL, Costa DL, Holanda TA, Aguiar GB, Carvalho AS, et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010; 43(4):386–92. PMID: 20802936
4. Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, Weyenbergh JV, Brodskyn C, et al. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis*. 2005; 5:113. Published 2005 Dec 19. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-5-113> PMID: 16364177
5. Nylén S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol*. 2007 Sep; 28(9):378–84. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.07.004> PMID: 17689290
6. Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva LDA, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol*. 2006; 146(1):124–32. [<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03171.x>] PMID: 16968407
7. Santos-Oliveira JR, Da-Cruz AM. Evidence that lipopolysaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 2011; 5(7):e1198. [<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001198>] PMID: 21765960
8. Costa DL, Rocha RL, Carvalho RMA, Lima-Neto AS, Harhay MO, Costa CHN, et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathog Glob Health*. 2013; 107(2):78–87. [<https://doi.org/10.1179/2047773213Y.0000000078>] PMID: 23683334
9. Dos Santos PL, de Oliveira FA, Santos ML, Cunha LSC, Lino MTB, de Oliveira MFS, et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(1):e0004375. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004375> PMID: 26814478
10. Araújo-Santos T, Andrade BB, Gil-Santana L, Luz NF, dos Santos PL, de Oliveira FA, et al. Anti-parasite therapy drives changes in human visceral leishmaniasis-associated inflammatory balance. *Sci Rep*. 2017; 7(1):4334. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04595-8> PMID: 28659627

11. Kip AE, Wasunna M, Alves F, Schellens JHM, Beijnen JH, Musa AM, et al. Macrophage Activation Marker Neopterin: A Candidate Biomarker for Treatment Response and Relapse in Visceral Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018; 8:181. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00181> PMID: 29911074
12. Silva RL, Santos MB, Almeida PL, Barros TS, Magalhães L, Cazzaniga RA, et al. sCD163 levels as a biomarker of disease severity in leprosy and visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(3): e0005486. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005486> PMID: 28355218
13. Gomes IT, Carvalho SF, Rocha RD, Peruhype-Magalhães V, Dietze R, Martins-Filho OA, et al. Anti-*Leishmania chagasi* immunoglobulin G3 detected by flow cytometry for early cure assessment in American visceral leishmaniasis. *J Immunol Methods*. 2010 Aug 31; 360(1–2):76–83. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.06.011> PMID: 20598707
14. Bhattacharyya T, Ayandeh A, Falconar AK, Sundar S, El-Safi S, Gripenberg MA, et al. IgG1 as a Potential Biomarker of Post-chemotherapeutic Relapse in Visceral Leishmaniasis, and Adaptation to a Rapid Diagnostic Test. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(10):e3273. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003273> PMID: 25340782
15. Naylor C, Petri WA Jr2. Leptin Regulation of Immune Responses. *Trends Mol Med*. 2016 Feb; 22(2):88–98. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.12.001> PMID: 26776993
16. Mancuso P. Obesity and lung inflammation. *J Appl Physiol* (1985). 2010 Mar; 108(3):722–8. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00781.2009> PMID: 19875709
17. Dayakar A, Chandrasekaran S, Veronica J, Maurya R. Leptin induces the phagocytosis and protective immune response in *Leishmania donovani* infected THP-1 cell line and human PBMCs. *Exp Parasitol*. 2016 Jan; 160:54–9. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.12.002> PMID: 26688099
18. Brazil, Ministry of Health. Visceral leishmaniasis: clinical recommendations for lethality reduction. 2011; 1:78. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/leishmaniose_visceral_reducao_letalidade.pdf
19. Fagundes-Silva GA, Vieira-Goncalves R, Nepomuceno MP, de Souza MA, Favoreto S, Oliveira-Neto MP, et al. Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite Immunol*. 2012; 34(10):486–91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2012.01379.x> PMID: 22742527
20. Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care*. 2007; 11(2):R49. <https://doi.org/10.1186/cc5783> PMID: 17448250
21. Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LMA, Barral A, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J*. 2010; 9:13. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-13> PMID: 20070895
22. Srikiatkachom A, Mathew A, Rothman AL. Immune-mediated cytokine storm and its role in severe dengue. *Semin Immunopathol*. 2017; 39(5):563–574. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0625-1> PMID: 28401256
23. Younan P, Iampietro M, Nishida A, Ramanathan P, Santos RI, Dutta M, et al. Ebola Virus Binding to Tim-1 on T Lymphocytes Induces a Cytokine Storm. *MBio*. 2017; 8(5):e00845–17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00845-17> PMID: 28951472
24. Liu Q, Zhou YH, Yang ZQ. The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cell Mol Immunol*. 2015; 13(1):3–10. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.74> PMID: 26189369
25. Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Silvestre R, Estaquier J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasit Vectors*. 2016; 9:118. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1412-x> PMID: 26932389
26. Muigai R, Gatei DG, Shaunak S, Wozniak A, Bryceson AD. Jejunal function and pathology in visceral leishmaniasis. *Lancet*. 1983; 2(8348):476–9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)90510-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)90510-X) PMID: 6136644
27. Luz KG, Tuon FF, Irma M, Duarte S, Maia GM, Matos P, et al. Cytokine expression in the duodenal mucosa of patients with visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010; 43(4):393–5. PMID: 20802937
28. Tanaka T, Narazaki M, Masuda K, Kishimoto T. Regulation of IL-6 in Immunity and Diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 941:79–88. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_4 PMID: 27734409
29. Jacobsson S, Larsson P, Johansson G, Norberg M, Wadell G, Hallmans G, et al. Leptin independently predicts development of sepsis and its outcome. *J Inflamm (Lond)*. 2017; 14:19. <https://doi.org/10.1186/s12950-017-0167-2> PMID: 28919840
30. Shivahare R, Ali W, Vishwakarma P, Natu SM, Puri SK, Gupta S. Leptin augments protective immune responses in murine macrophages and enhances potential of miltefosine against experimental visceral

- leishmaniasis. *Acta Trop.* 2015; 150:35–41. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.024> PMID: 26119043
31. Dayakar A, Chandrasekaran S, Veronica J, Bharadwaja V, Maurya R. Leptin regulates Granzyme-A, PD-1 and CTLA-4 expression in T cell to control visceral leishmaniasis in BALB/c Mice. *Sci Rep.* 2017; 7(1):14664. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15288-7> PMID: 29116252
 32. de Araújo VE, Morais MH, Reis IA, Rabello A, Carneiro M. Early clinical manifestations associated with death from visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(2):e1511. [<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001511>] PMID: 22347514

9.5 ANEXO E (manuscrito aceito)



Article

Giardiasis Alters Intestinal Fatty Acid Binding Protein (I-FABP) and Plasma Cytokines Levels in Children in Brazil

Tiara Cascais-Figueiredo^{1,†}, Phelipe Austriaco-Teixeira^{1,†}, Maria Fantinatti¹, Maria Luciana Silva-Freitas¹, Joanna Reis Santos-Oliveira^{1,2,3}, Camila H. Coelho^{4,5}, Steven M. Singer⁵ and Alda Maria Da-Cruz^{1,3,6,*}

¹ Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil; tiara_ted@hotmail.com (T.C.-F.); phelipe.teixeira@ioc.fiocruz.br (P.A.-T.); fantinatti@ioc.fiocruz.br (M.F.); maria.freitas@ioc.fiocruz.br (M.L.S.-F.)

² Núcleo de Ciências Biomédicas Aplicadas, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia/ IFRJ, Rio de Janeiro 20061-002, Brazil, joanna.oliveira@ifrj.edu.br (J.R.S.-O.)

³ National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq), Brasília 71605-001, Brazil

⁴ Laboratory of Malaria Immunology and Vaccinology, National Institutes of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda 20892, MD, USA; camila.coelho@nih.gov

⁵ Biology Department, Georgetown University, Washington 20057, DC, USA; steven.singer@georgetown.edu

⁶ Disciplina de Parasitologia-DMIP, Faculdade de Ciências Médicas-Universidade do Estado do Rio de Janeiro/UERJ, Rio de Janeiro 20550-170, Brazil;

[†] Contributed equally to the work

* Correspondence: alda@ioc.fiocruz.br

Received: 20 September 2019; Accepted: 20 October 2019; Published: date

Abstract: Giardiasis is an intestinal infection caused by ingestion of water or food contaminated with cysts of *Giardia lamblia*. Susceptibility is higher in children and overall prevalence can reach up to 90% in low-income areas, although outbreaks are also reported in developed countries. Both parasite and immune-mediated epithelial damage has been observed in vitro and in animal models. However, whether enterocytes are directly damaged during infection is not entirely known. Our goal was to identify whether plasma levels of intestinal fatty acid binding protein (I-FABP), a marker of enterocyte damage, are related to the immune response in giardiasis. Blood plasma was collected from 31 children (19 *Giardia*-positive) from a public day care in Rio de Janeiro, Brazil. The levels of I-FABP were increased in *Giardia*-infected children compared to children without detectable infection. There was no difference in I-FABP levels in giardiasis caused by different genetic assemblages of *Giardia*. Levels of IL-8 were decreased, while there was a trend to elevated IL-17 in the *Giardia*-positive children. A positive correlation was observed between I-FABP and IL-17 levels as well as TNF, suggesting that epithelial damage can be related to cytokine production during giardiasis.

These results help elucidate the relationship between the disruption of the intestinal mucosal barrier and immune responses to *G. lamblia* in children.

Keywords: *Giardia lamblia*; giardiasis; children; I-FABP; cytokines; IL-17; *Giardia* assemblages

1. Introduction

Giardiasis is a worldwide intestinal infectious disease caused by transmission of water or food contaminated with cysts of *Giardia lamblia*, and exhibits both anthroponotic and zoonotic transmission. The real incidence of giardiasis is likely underestimated, since asymptomatic and even symptomatic patients frequently do not seek care. In addition, the low sensitivity of microscopic detection methods, commonly utilized in middle and low-income areas, further contributes to underreporting. Global initiatives examining the etiology of diarrhea identified *Giardia* as the second most common pathogen detected among children 12–24 months old [1] and one of the top four contributors to stunting, globally [2]. In Brazil, we showed that the prevalence of *Giardia* can reach 78% [3].

Eight assemblages of *G. lamblia* (A to H) have been described based on genetic differences. Assemblages A and B are the most commonly found in humans, although both also infect a variety of animals. Our group has previously identified assemblage E in humans [4], but there is no conclusive evidence of a correlation between clinical outcome or parasite burden and assemblage.

Giardia trophozoites colonize the luminal surface of the small intestine and attach to intestinal epithelial cells (IEC). Disease is thought to occur due to damage to the epithelial barrier, mediated by both the parasite and the immune response. The disruption of tight junctions, shortening of microvilli, epithelial permeability and altered intestinal motility have all been observed [5]. Several studies have analyzed cytokines in murine giardiasis, and a consensus has formed on the importance of IL-17 for protective immunity [6]. In adult human patients who recovered from giardiasis, IL-17 was upregulated when effector memory CD4⁺ T cells were restimulated in vitro with *Giardia* antigens [7]. However, roles for other cytokines in pathogenesis of giardiasis are much less clear, and few studies have addressed this issue in humans [8,9].

Giardia-secreted metabolites [10] along with cytokines and cytotoxic T cell responses are related to epithelial damage and the apoptosis of enterocytes [11]. However, whether enterocytes are directly damaged is not known. Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) is an intracellular protein that acts on the metabolism of long chain fatty acids and is abundantly expressed in the cytosol of epithelial cells in the small intestinal mucosa. Increased plasma levels of I-FABP have been associated with intestine-specific injury in several diseases [12]; however, studies of I-FABP in giardiasis are lacking.

Our goal was to identify whether enterocyte damage is connected to alterations in immune responses in children living in a low-income setting. Here, we show that plasma I-FABP levels are increased in *Giardia*-infected children and that there is a correlation between I-FABP levels and systemic cytokine levels. However, we did not observe any relationship with a specific *Giardia* genetic assemblage.

2. Results

2.1. Clinical and Hematological Profiles of *Giardia lamblia*-Infected Children

In an observational study performed in a government-run day care in Rio de Janeiro city, we identified 19 children infected with *G. lamblia* and 12 without laboratory evidence of intestinal parasites. The assemblages of *G. lamblia* identified were A ($n=11$), B ($n=6$) and E ($n=2$).

Alteration in normal stool consistency was a frequent occurrence among day care children. Thus, no association between diarrhea and infection by *G. lamblia* could be established. The children's anthropometric statuses, evaluated according to the WHO Z scores (length for age, weight for age and weight for length), showed that 28 out of 33 children were eutrophic, but only two of them were underweight.

The mean levels of hemoglobin in *Giardia*-positive preschoolers (11.50 g/dL (11.10–12.20 g/dL)) were similar to *Giardia*-negative (11.90 g/dL (11.28–12.53 g/dL)). Only one *Giardia*-negative child presented with moderate anemia. Similar results were observed for the other hematological parameters related to anemia. To investigate a possible influence of *G. lamblia* on immune cells we assessed leukocyte profiles. No differences were observed for lymphocyte, neutrophil or monocyte counts when *Giardia*-positive and *Giardia*-negative groups were compared. Seven out of 19 *Giardia*-positive children presented mildly increased eosinophil counts, and four out of 12 *Giardia*-negative children showed mild or moderate increases ($p=0.80$) (Table 1).

Table 1. Demographic data and hematological exams of the *Giardia*-positive and *Giardia*-negative children.

Parameters Analysed		Preschoolers	
		<i>Giardia</i> Positive	<i>Giardia</i> Negative
Age	(Months)Median IQ interval	27.9 [25.5–31.7]	36.2 [29.6–41.2]
Gender	Male	9	2
	Female	10	10
Hemoglobin	Normal	15	10
	Mild (10–10.9 g/dL)	4	1
	Moderate (7–9.9 g/dL)	0	1
	Severe (<7 g/dL)	0	0
Eosinophils	Normal (<500 cells/mm ³)	11	8
	Mild (501–1500 cells/mm ³)	7	2
	Moderate (1501–5000 cells/mm ³)	1	2
	Severe (>5000 cells/mm ³)	0	0
Neutrophils	Normal (1600–7150 cells/mm ³)	18	12
	Increased (>7151 cells/mm ³)	1	0
Monocytes	Normal (80-1100 cells/mm ³)	15	10
	Increased (>1101 cells/mm ³)	4	2
Lymphocytes	Normal (880–4950 cells/mm ³)	14	8
	Increased (>4951 cells/mm ³)	5	4

2.2. Plasma Cytokine Profiles of *Giardia* Lamblia-Infected Preschoolers Differ from Those Not Infected by *Giardia*.

Plasma levels of 15 cytokines or chemokines were quantified (Supplementary Table S1). Compared to *Giardia*-negative ($n=8$), the *Giardia*-positive group ($n=17$) showed significantly lower levels of IL-8 ($p=0.003$). The *Giardia*-positive group also showed a trend to higher levels of IL-17 ($p=0.09$) and IL-10 ($p=0.08$) and the IL-17 levels were significantly different ($p=0.047$) when evaluated using a Student's *t*-test. No difference in IFN- γ levels was observed between the two groups, but the IFN- γ /IL-10 ratios were also significantly lower ($p<0.05$) in the *Giardia*-positive group in comparison to *Giardia*-negative (Figure 1).

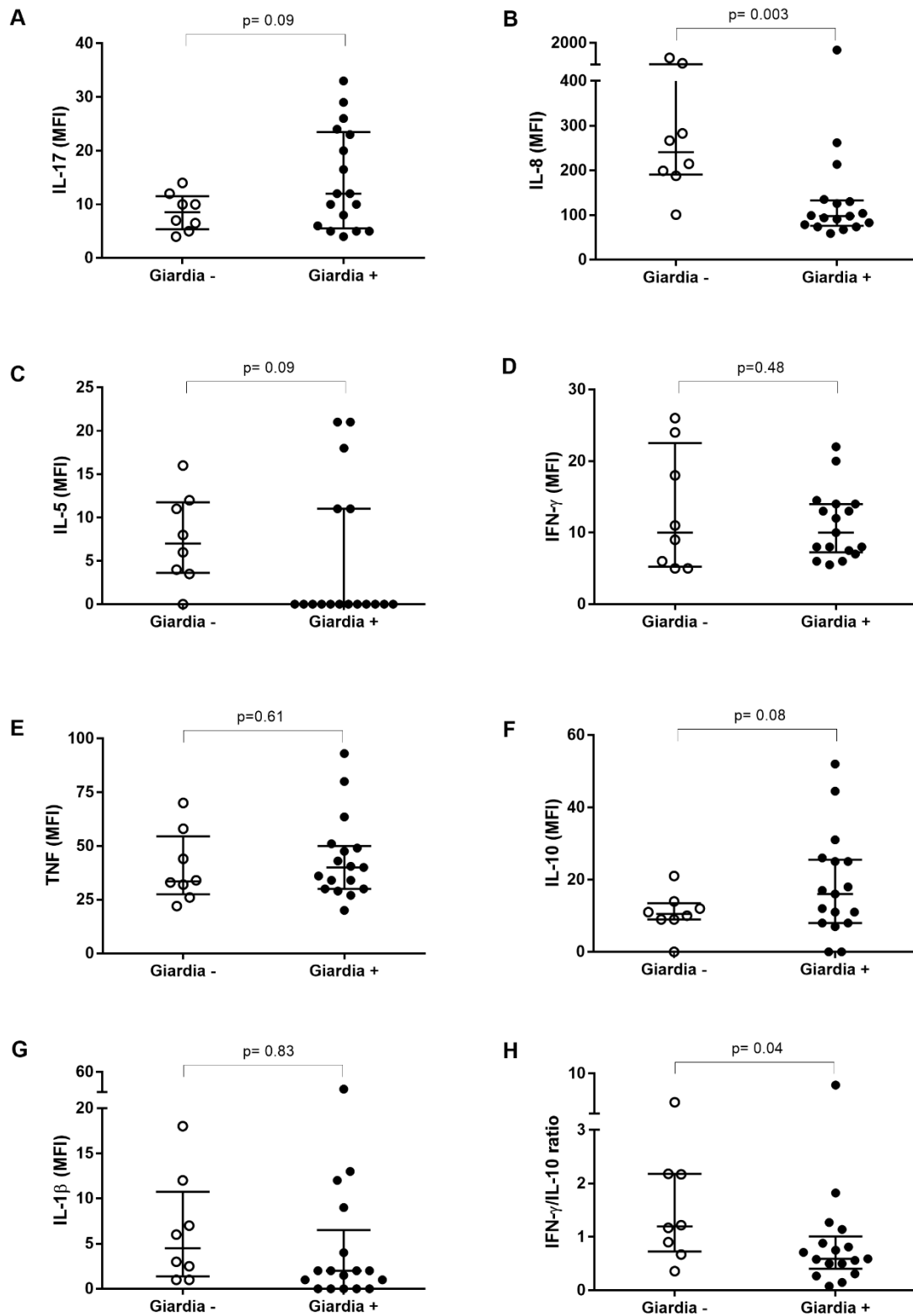


Figure 1. The cytokine profiles of *Giardia lamblia*-infected children from a Brazilian area. Plasma levels of (A) IL-17, (B) IL-8, (C) IL-5, (D) IFN- γ , (E) TNF, (F) IL-10 and (G) IL-1 β in children with giardiasis were determined using Luminex beads. The IFN- γ /IL-10 ratio (H) is also shown. Each

point corresponds to one subject. Results are expressed as median fluorescence intensity (MFI). Medians (horizontal bars), quartiles (range 25–75%) and results of Mann–Whitney statistical tests are shown.

2.3. Intestinal Fatty Acid Binding Protein (I-FABP) Levels are Increased in *Giardia lamblia*-Infected Children

Considering that enterocyte damage has been implicated in increased intestinal permeability and microbial translocation into the circulation [13] we evaluated whether *G.lamblia* infection could increase I-FABP levels, a known biomarker for damaged intestinal epithelial cells. *Giardia*-positive preschoolers presented significantly higher I-FABP levels (1274 pg/mL (622–2004 pg/mL); $n = 17$) than *Giardia*-negative children (741 pg/mL (422–960 pg/mL); $n = 12$) ($p=0.05$) (Figure 2).

As both low and high I-FABP levels were observed among *Giardia*-positive subjects, we decided to evaluate a possible relationship between enterocyte damage and the *G. lamblia* assemblages. There was no difference in I-FABP levels comparing children infected by assemblage A (1591 pg/mL (615–1882 pg/mL); $n = 11$) or assemblage B and E (1032 pg/mL (637–2431 pg/mL); $n = 6$) (Figure 2). We next asked whether the epithelial damage could be related to levels of systemic cytokines. A positive correlation was observed between I-FABP and IL-17 levels ($r=0.453$; $p < 0.03$) as well as TNF ($r=0.491$; $p < 0.02$) (Figure 2). Four *Giardia*-infected children showed I-FABP levels higher than 2000 pg/mL, although no clinical features could be associated with these high levels of I-FABP.

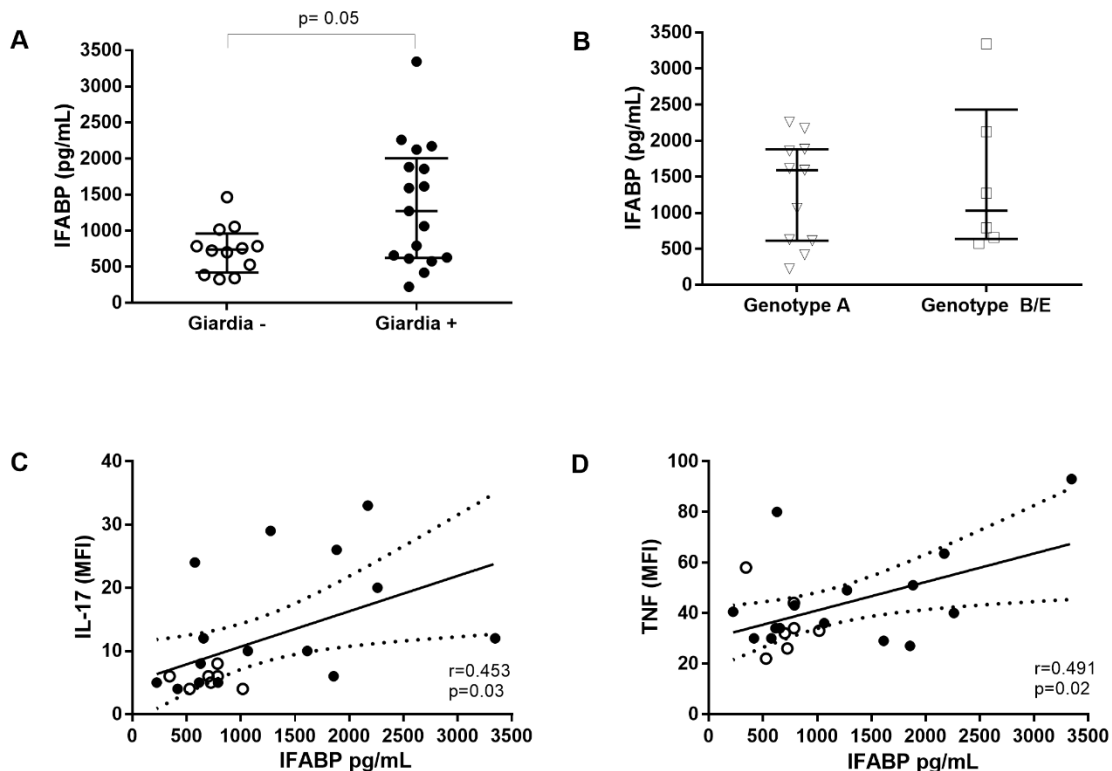


Figure 2. Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) levels and the correlation with systemic cytokine profiles and assemblages in *Giardia*-infected children in a Brazilian area. (A) I-FABP levels are increased in *G. lamblia*-infected pre-schools children. (B) Different assemblages (A, B or E) of *G. lamblia* are not associated to I-FABP levels. Correlation between I-FABP and IL-17 (C) or TNF (D) levels. Levels of I-FABP were elevated in *Giardia*-positive subjects (●) in comparison to *Giardia*-negative (○). Each point represents one subject. The horizontal bars indicate the median values and vertical bars indicate interquartile ranges (25–75%).

Considering the high variation observed among all the parameters analyzed, we investigated which factors were influencing the elevated I-FABP levels by using a multivariate linear regression analysis. The model showed a trend that *Giardia* infection influenced I-FABP levels ($p=0.071$) (Table 2), supporting an association between enterocyte damage and giardiasis. This correlation was independent of the levels of cytokines.

Table 2. Multivariate linear regression analysis to evaluate the association between the levels of intestinal fast acid bound protein (I-FABP) and independent variables (cytokines) in *Giardia*-positive preschoolers.

Independent Variables	Dependent Variable I-FABP Levels (pg/mL)		
	Coef ¹	SE ²	P
<i>Giardia</i> infection (positive or negative)	0.396	321.88	0.071
IL-17*	0.227	18.86	0.349
TNF*	0.437	9.80	0.135
IL-8*	-0.045	0.55	0.833
IL-10*	-0.341	14.29	0.215

¹Coef—Correlation coefficient; ² SE—standard error; * MFI—median fluorescence intensity; IL—interleukin, TNF—tumor necrosis factor, I-FABP—intestinal fast acid bound protein.

3. Discussion

The major findings of this study are that children infected with *Giardia* exhibited elevated plasma levels of IL-17 and reduced levels of IL-8 compared with children not infected with intestinal parasites. Infected children also had lower IFN- γ /IL-10 ratios and elevated levels of I-FABP that correlated with both IL-17 and TNF. The increase in I-FABP levels, however, was not related to the specific assemblage of *Giardia* with which they were infected.

Elevated in vitro IL-17 responses have been reported in a cohort of adult travelers returning to Denmark with giardiasis [7] and IL-17 has been shown to be essential for proper control of *G. muris* and *G. lamblia* infections in mice [6]. This is the first report of which we are aware showing IL-17 production in children with giardiasis.

Interleukin-8 is a chemokine that recruits neutrophils to sites of infection and inflammation. Recent work has indicated that proteases secreted by *Giardia* are able to degrade IL-8 in vitro [14]. Moreover, granulocyte responses after intracolonic administration of *C. difficile* toxin were attenuated in mice infected with *G. lamblia* strain NF [15]. This is the first report, to our knowledge, of reduced systemic levels of IL-8 in giardiasis. It would be interesting to determine if mucosal cytokine levels are also diminished.

Interferon- γ is a cytokine often associated with immunopathology of giardiasis. In a study of patients in Iran, symptomatic patients had higher levels of IFN- γ than uninfected controls, while patients with asymptomatic infections did not [8]. We were unable to classify the *Giardia*-infected children in this study as being symptomatic or asymptomatic. Nevertheless, we found

a reduced ratio of IFN- γ /IL-10 in the infected children. This is consistent with the lack of inflammation often reported in giardiasis.

While giardiasis has previously been shown to impact epithelial permeability [5], specifically, lactulose:mannitol test ratios, other markers of intestinal damage, have not been widely addressed in this infection. Our results are the first to indicate that children with *Giardia* infections have elevated levels of I-FABP, a marker for epithelial cell damage. Moreover, although I-FABP levels were independent of the genetic assemblage of *Giardia* present, they did correlate with plasma levels of both IL-17 and TNF. This correlation could indicate that immune responses themselves contribute to the epithelial damage observed or could reflect that epithelial damage facilitates the induction of the Th17 developmental program resulting in both IL-17 and TNF production. Unfortunately, our data were unable to determine a causal relationship between these cytokines and I-FABP levels.

Our study suffers from several limitations. First, limited access to additional biological samples prevents drawing extensive conclusions about the patterns observed and a larger cohort should be used to confirm these observations. We did not perform systematic surveillance on diarrhea status, although alteration in stool consistency was frequently noted among the children studied. While we were able to exclude concurrent parasitic infections and only *Giardia*-infected children were enrolled, we did not evaluate whether bacterial or viral infections were present that could also contribute to systemic levels of cytokines and/or I-FABP. Finally, because of the cross-sectional study design we were unable to determine whether the children enrolled in the study had been previously infected with *Giardia*, since a secondary immune response could lead to much greater cytokine production.

In summary, our data provides novel information on levels of cytokines and I-FABP in children with giardiasis and suggests a link between mucosal damage and the immune response. Further studies to identify the mechanisms underlying this correlation are needed.

4. Material and Methods

4.1. Study Design and Participants and Ethical Aspects

The cross-sectional study was conducted in a community (urban slum) of Rio de Janeiro, Brazil in 2015, from February to December. The area has a limited drinking water supply, no sewage network coverage and few streets are paved. Stray animals, such as dogs, cats, rodents, pigs, horses and cattle are commonly found moving throughout the location. The majority of inhabitants are from the low socioeconomic strata.

For the selection of preschoolers infected by *G. lamblia* (*Giardia*-positive) or not (*Giardia*-negative), stool samples were obtained from 105 children (ages varying from 10 months to four years) and used in parasitological and PCR assays for the detection of *Giardia* DNA). A collection device accompanied by instructions was provided for the guardians of children and nursery volunteers. One stool sample from each participant was examined for intestinal protozoa and helminths by three methods: Ritchie, Kato-Katz and spontaneous sedimentation. Children infected or co-infected by other pathogenic intestinal protozoa or helminths were excluded. Thirty-one children (19 *Giardia*-positive and 12 *Giardia*-negative) were selected for the study. The subjects were evaluated for anthropometric parameters. Standard deviation scores (Z-scores) of weight-for-height (WHZ), length-for-age (LAZ) and weight-for-age (WAZ) were calculated according to the World Health Organization's 1978 growth chart. Blood was submitted to hematological exams. Plasma samples were separated, and aliquots were stored at -70°C for immunological analysis.

All procedures were approved by the ethics committee for human research (Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Brazil, CAAE: 19705613.9.0000.5248). Biological samples were collected after informed consent was obtained from the guardians of the children.

4.2. Molecular Detection and Characterization of *Giardia lamblia*

The stool DNA extraction was conducted using the QIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Germany), with modifications [3]. Conserved gene fragments from glutamate dehydrogenase (*gdh*) and beta-giardin (*βgia*) were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primers previously reported [3]. The amplicons obtained for each pair of primers were purified using the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel GmbH and Co. KG, Germany). The purified products were sequenced using the ABI Prism™ BigDye Terminator Cycle Sequencing kit. Electropherograms were analyzed using Chromas 2.4 (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australia). Characterization of the sequences was performed using the Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides (BLASTn), and the contigs were obtained by the CAP3 Sequence Assembly Program. Nucleotide sequences of *gdh* and *βgia* were aligned by the CLUSTAL W algorithm from Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) output 7.0. The phylogenetic analysis was performed on the MEGA and the range estimation equations used were JIN and NEI (Kimura 2-parameter model). Phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining algorithm, with bootstrap analysis (1000 replicates). The sequences from the new isolates were aligned using reference sequences of *G. lamblia* from GenBank. The sequences obtained were deposited in GenBank: genotype A (*gdh*: MN541586, MN541659, MN541674, MN5416956, MN541648, MN541661, MN541666, MN541658, MN541657 and MN541804; *βgia*: MN541703, MN541775, MN541806, MN541790, MN541772, MN541764, MN541777, MN541782, MN541774, MN541773 and MN541804); genotype B (*gdh*: MN541687, MN541686, MN541643, MN541684, MN541678 and MN541668; *βgia*: MN541803, MN541802, MN541759, MN541800, MN541794 and MN541784), genotype E (*gdh*: MN541650 and MN541637; *βgia*: MN541766 and MN541754)

4.3. Quantification of Intestinal Fatty Acid Binding Protein (I-FABP) and Cytokines in Plasma

I-FABP levels were determined by ELISA (Duo Set; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The results were expressed as pg/mL, and the minimum detection limit was 31.2 pg/mL.

For cytokine measurement, a multiplex biometric immunoassay containing fluorescently dyed microbeads was used (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). The following cytokines were quantified: IFN- γ , TNF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, MCP-1 and MIP-1 β . Cytokine levels were calculated by Luminex Technology (Bio-Plex Workstation; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The analysis of data was performed using software provided by the manufacturer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A range of 0.51–8000 pg/mL of recombinant cytokines was used to establish standard curves and the sensitivity of the assay. The results were expressed as the median fluorescent intensity (MFI) [16].

4.4. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 7.0, San Diego, CA, USA). Mann–Whitney tests were performed for comparisons between two groups. A Student's *t*-test was additionally used when Mann–Whitney tests indicated a trend and the data were normally distributed. The Spearman test was used for correlation analysis and

Pearson's test was used for correlation matrix analysis. Continuous variables were expressed as medians and interquartile ranges (IQRs). Differences were considered statistically significant when *p*-value was equal or below 0.05. Multivariate linear regression analyses (software IBM SPSS, version 22.0, IBM, USA) were used to determine the influence of intervening variables on the levels of I-FABP. *Giardia* infection (positive or negative) and MFI levels of cytokines were considered as independent variables.

Supplementary Materials:

Author Contributions: Conceptualization, A.M.D.-C., M.F. and J.R.S.-O.; Methodology, T.C.-F., P.A.-T., M.L.S.-F. and J.R.S.-O.; Formal analysis, A.M.D.-C., J.R.S.-O. and C.H.C.; Writing—original draft preparation, A.M.D.-C., C.H.C. and S.M.S.; Writing—review and editing, A.M.D.-C., C.H.C. and S.M.S.; Funding acquisition, A.M.D.-C.

Funding: This work was supported by the Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ—Brazilian Ministério da Saúde (internal funds). M.F. was supported by a fellowship from CAPES (Brasil Sem Miséria/Brazilian governmental program) and CNPq (PDJ). A.M.D.-C. has a research fellowship from CNPq and FAPERJ (CNE). C.H.C. is supported by the Intramural Research Program of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. S.M.S. is supported by a grant from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases.

Acknowledgments: We are profoundly grateful to Elizabeth Salgado and the nursery team, for their unconditional support for the recruitment of children; to technicians from the Disciplina de Parasitologia—FCM-UERJ for the stool parasitological exams; and to Laboratório Bronstein, unidade Saeñs Pena, for their support during blood collection. We thank Dr. Elisangela Silva (UFRJ) and Dr. Zilton Vasconcelos (IFF/FIOCRUZ) for their support for cytokine quantification, and also to Dr Felipe Carvalho-Costa for assistance with statistical analysis.

Conflicts of Interest: The authors have declared that no conflict of interest.

References

1. Platts-Mills, J.A.; Babji, S.; Bodhidatta, L.; Gratz, J.; Haque, R.; Havt, A.; McCormick, B.J.; McGrath, M.; Olortegui, M. P.; Samie, A.; et al. Pathogen-specific burden of community diarrhoea in developing countries: A multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet Glob. Health* **2015**, *3*, e564–e575, doi:10.1016/S2214-109X(15)00151-5.
2. Rogawski, E.T.; Liu, J.; Platts-Mills, J.A.; Kabir, F.; Lertsethtakarn, P.; Sigua, M.; Khan, S.S.; Praharaj, I.; Murei, A.; Nshama, R.; et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to investigate the effect of enteropathogen infections on linear growth in children in low-resource settings: longitudinal analysis of results from the MAL-ED cohort study. *Lancet Glob. Health* **2018**, *6*, e1319–e1328, doi:10.1016/S2214-109X(18)30351-6.
3. Coelho, C.H.; Durigan, M.; Leal, D.A.G.; Schneider, A.B.; Franco, R.M.B.; Singer, S.M. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20 years of publications. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0006005, doi:10.1371/journal.pntd.0006005.
4. Fantinatti, M.; Bello, A.R.; Fernandes, O.; Da-Cruz, A.M. Identification of *Giardia lamblia* Assemblage E in human points to a new anthrozootic cycle. *J. Infect. Dis.* **2016**, *214*, 1256–1259, doi:10.1093/infdis/jiw361.
5. Fink, M.Y.; Singer, S.M. The intersection of immuneresponses, microbiota, and pathogenesis in giardiasis. *Trends Parasitol.* **2017**, *33*, 901–913, doi:10.1016/j.pt.2017.08.001.

6. Singer, S.M. Control of Giardiasis by Interleukin-17 in humans and mice-- are the questions all answered? *Clin. Vaccine Immunol.* **2016**, *23*, 2–5, doi:10.1128/CVI.00648-15.
7. Saghaug, C.S.; Sornes, S.; Peirasmaki, D.; Svard, S.; Langeland, N.; Hanevik, K. Human memory CD4+ T cell immune responses against *Giardia lamblia*. *Clin. Vaccine Immunol.* **2016**, *23*, 11–18, doi:10.1128/CVI.00419-15.
8. Pacheco, F.T.F.; Carvalho, S.S.; Cardoso, L.S.; Andrade, L.S.; das Chagas, G.M.T.; Gomes, D.C.; Mercês, C.F.; Rocha, F.C.; Silva, L.K.; Soares, N.M.; et al. Immune response markers in sera of children infected with *Giardia duodenalis* A and AI subassemblages. *Immunobiology* **2019**, *224*, 595–603, doi:10.1016/j.imbio.2019.04.001.
9. Babaei, Z.; Malihi, N.; Zia-Ali, N.; Sharifi, I.; Mohammadi, M.A.; Kagnoff, M.F.; Eckmann, L.; Singer, S.M.; Soleymani-Mohammadi, S. Adaptive immune response in symptomatic and asymptomatic enteric protozoal infection: Evidence for a determining role of parasite genetic heterogeneity in host immunity to human giardiasis. *Microbes Infect.* **2016**, *18*, 687–695, doi:10.1016/j.micinf.2016.06.009.
10. Liu, J.; Ma'ayeh, S.; Peirasmaki, D.; Lundstrom-Stadelmann, B.; Hellman, L.; Svard, S.G. Secreted *Giardia intestinalis* cysteine proteases disrupt intestinal epithelial cell junctional complexes and degrade chemokines. *Virulence* **2018**, *9*, 879–894, doi:10.1080/21505594.2018.1451284.
11. Chin, A.C.; Teoh, D.A.; Scott, K.G.; Meddings, J.B.; Macnaughton, W.K.; Buret, A.G. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 3673–3680, doi:10.1128/iai.70.7.3673-3680.2002.
12. Peoc'h, K.; Nuzzo, A.; Guedj, K.; Paugam, C.; Corcos, O. Diagnosis biomarkers in acute intestinal ischemic injury: Soclose, yet so far. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2018**, *56*, 373–385, doi:10.1515/cclm-2017-0291.
13. Brenchley, J.M.; Price, D.A.; Schacker, T.W.; Asher, T.E.; Silvestri, G.; Rao, S.; Kazzaz, Z.; Bornstein, E.; Lambotte, O.; Altmann, D.; et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med.* **2006**, *12*, 1365–1371, doi:10.1038/nm1511.
14. Cotton, J.A.; Bhargava, A.; Ferraz, J.G.; Yates, R.M.; Beck, P.L.; Buret, A.G. *Giardia duodenalis* cathepsin B proteases degrade intestinal epithelial interleukin-8 and attenuate interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 2772–2787, doi:10.1128/IAI.01771-14.
15. Cotton, J.A.; Motta, J.P.; Schenck, L.P.; Hirota, S.A.; Beck, P.L.; Buret, A.G. *Giardia duodenalis* infection reduces granulocyte infiltration in an in vivo model of bacterial toxin-induced colitis and attenuates inflammation in human intestinal tissue. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e109087, doi:10.1371/journal.pone.0109087.
16. Breen, E.J.; Polaskova, V.; Khan, A. Bead-based multiplex immunoassays for cytokines, chemokines, growth factors and other analytes: Median fluorescence intensities versus their derived absolute concentration values for statistical analysis. *Cytokine* **2015**, *71*, 188–198, doi:10.1016/j.cyto.2014.10.030.